

Ana Catarina Beco Pinto Reis

ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS PEPTÍDICOS PELO MÉTODO
DE EMULSIFICAÇÃO/GELIFICAÇÃO INTERNA

*Dissertação de candidatura ao grau
de Doutor apresentada à Faculdade
de Farmácia da Universidade de
Coimbra*

**Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra**

2007

Trabalho realizado no Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia – Bolsa de doutoramento SFRH/BD/13673/2003.

A capa é constituída por duas imagens. Uma delas representa as nanoesferas com insulina revestidas com quitosano e polietilenoglicol (imagem em duplicado) observadas por microscopia electrónica de varrimento (ampliação 2500 ×), e a outra imagem representa o tecido intestinal de um rato diabético, 30 min após a administração das nanoesferas com insulina marcada com isotiocianato de fluoresceína (formulação optimizada) em segmentos do intestino, observado por microscopia de fluorescência (ampliação 100 ×). Para mais detalhes, consultar o Capítulo VII desta dissertação e, em particular, as legendas das Figuras VII-3 e VII-13, respectivamente.

*“To laugh often and much,
to win the respect of intelligent people and
affection of children,
to earn the appreciation of honest critics and
endure the betrayal of false friends,
to appreciate beauty,
to find the best in others,
to leave the world a bit better
whether by a healthy child, a garden patch...
to know even one life has breathed easier,
because you have lived.
This is to have succeeded!”*

Emerson

Aos meus pais

Ao Paulo e à Filipa
Às avós
Ao Miguel

*Aos avôs
(In memoriam)*

Aos que eu amo

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Publicações	v
Organização da dissertação	vii
Resumo	ix
<i>Abstract</i>	xiii
Abreviaturas	xvii

Capítulo I. Introdução geral

1. Nanotecnologia na tecnologia farmacêutica.....	3
1.1. Definição de nanopartículas	3
1.2. Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas.....	5
1.2.1. Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monómeros	6
1.2.1.1 Polimerização de monómeros por emulsão	6
1.2.1.2 Polimerização interfacial de monómeros	7
1.2.2. Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados ou macromoléculas	8
1.2.2.1 Polímeros pré-formados sintéticos por emulsão/evaporação do solvente	9
1.2.2.2 Polímeros pré-formados sintéticos por deslocação do solvente e deposição interfacial.....	10
1.2.2.3 Polímeros pré-formados sintéticos por emulsificação/difusão do solvente	12
1.2.2.4 Polímeros pré-formados sintéticos por <i>salting-out</i>	13
1.2.2.5 Polímeros pré-formados ou macromoléculas de origem natural	14
1.2.2.6 Dessolvatação de macromoléculas	17
1.2.3. Técnicas de nebulização	18
1.3. Armazenamento das nanopartículas e sua estabilidade.....	18
1.4. Aplicação das nanopartículas poliméricas a fármacos peptídicos.....	22
1.4.1. Considerações gerais de absorção oral	23

1.4.2.	Administração oral de fármacos encapsulados em nanopartículas.....	31
1.4.2.1	Fármacos peptídicos encapsulados em nanopartículas.....	32
1.4.2.2	Outros fármacos encapsulados em nanopartículas.....	35
1.4.3.	Administração parentérica de fármacos encapsulados em nanopartículas ..	38
1.4.3.1	Fármacos peptídicos encapsulados em nanopartículas.....	38
1.4.4.	Administração oftálmica de fármacos encapsulados em nanopartículas.....	40
1.4.5.	Administração pulmonar de fármacos encapsulados em nanopartículas.....	41
1.4.6.	Outras vias de administração de fármacos encapsulados em nanopartículas.....	41
2.	Insulina como fármaco modelo.....	43
2.1.	Características físico-químicas.....	44
2.1.1.	Origem e estrutura química.....	44
2.1.2.	Regulação da síntese.....	47
2.1.3.	Carga eléctrica.....	48
2.1.4.	Cristalização.....	48
2.1.5.	Solubilidade.....	49
2.1.6.	Estabilidade.....	49
2.2.	Propriedades farmacológicas.....	51
2.3.	Mecanismo de acção.....	53
2.4.	Farmacodinâmica.....	56
2.5.	Indicações terapêuticas.....	56
2.6.	Farmacocinética.....	57
2.7.	Efeitos adversos.....	60
2.8.	Interações medicamentosas e contra-indicações.....	62
2.9.	Dosagem.....	62
3.	Novas alternativas terapêuticas para a administração oral da insulina.....	63
3.1.	Estratégias orais.....	64
3.1.1.	Inibidores enzimáticos.....	64
3.1.2.	Promotores de absorção.....	66
3.1.3.	Lipossomas.....	69
3.1.4.	Micro e nanopartículas.....	70
3.1.5.	Sistemas bioadesivos.....	74
3.1.6.	Células.....	75
3.1.7.	Modificações químicas da insulina.....	75
3.1.8.	Formulações farmacêuticas para administração vectorizada.....	77
3.1.8.1	Administração específica no cólon.....	77

3.1.8.2	Administração específica no óleo.....	78
3.1.9.	Resumo das combinações de estratégias	78
3.2.	Limitações da administração oral da insulina.....	81
4.	Método de emulsificação/gelificação interna	83
4.1.	Enquadramento do método de emulsificação/gelificação interna	83
4.2.	Tipo de polissacárido.....	85
4.3.	Origem, composição e concentração de alginato	87
4.4.	Tipo, forma e concentração do catião divalente	91
4.5.	Valor de pH	94
4.6.	Tipo de óleo.....	95
4.7.	Tipo e concentração do agente emulsivo.....	96
4.8.	Tipo de ácido	97
4.9.	Mecanismo de reacção.....	98
4.10.	Vantagens do método de emulsificação/gelificação interna.....	98
4.11.	Desvantagens do método de emulsificação/gelificação interna	99
5.	Objectivos e breve descrição do trabalho	100
6.	Bibliografia.....	102

Capítulo II. Transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica

1.	Introdução.....	149
2.	Materiais e métodos.....	155
2.1.	Materiais	155
2.2.	Preparação das partículas de alginato.....	155
2.3.	Caracterização granulométrica das partículas de alginato.....	158
2.4.	Monitorização da presença do óleo residual.....	159
2.5.	Caracterização morfológica das partículas de alginato	159
2.6.	Rendimento de recuperação (RR) das partículas de alginato	160
2.7.	Determinação do teor e da eficiência de encapsulação (EE) da insulina	160
2.8.	Perfil de libertação <i>in vitro</i>	161
2.9.	Estabilidade físico-química da insulina após preparação e recuperação das partículas de alginato	161
2.9.1.	HPLC-UV e HPLC-MS.....	161
2.9.2.	Dicroísmo circular (DC).....	163

2.10.	Análise estatística.....	163
3.	Resultados	164
3.1.	Processo de produção: influência dos parâmetros de processo e formulação na granulometria das partículas de alginato.....	164
3.1.1.	Velocidade de agitação	164
3.1.2.	Diâmetro da hélice	166
3.1.3.	Tipo de óleo	167
3.1.4.	Tempo de sonicação do carbonato de cálcio.....	168
3.1.5.	Concentração do agente emulsivo.....	169
3.1.6.	Concentração de alginato	171
3.1.7.	Razão A/O.....	172
3.2.	Processo de recuperação das partículas de alginato.....	173
3.2.1.	Caracterização granulométrica das partículas de alginato	173
3.2.2.	Monitorização da presença do óleo residual	174
3.2.3.	Caracterização morfológica das partículas de alginato.....	175
3.2.4.	Rendimento de recuperação (RR) das partículas de alginato	177
3.2.5.	Teor e eficiência de encapsulação (EE) da insulina.....	178
3.2.6.	Perfil de libertação <i>in vitro</i>	179
3.2.7.	Estabilidade físico-química da insulina após preparação e recuperação das partículas de alginato	180
3.2.7.1	HPLC-UV e HPLC-MS.....	180
3.2.7.2	Dicroísmo circular (DC).....	183
4.	Discussão	184
4.1.	Transposição do método de emulsificação/gelificação à escala nanométrica: processo de produção das partículas de alginato	184
4.2.	Transposição do método de emulsificação/gelificação à escala nanométrica: processo de recuperação das partículas de alginato.....	192
4.2.1.	Caracterização granulométrica das partículas de alginato	193
4.2.2.	Monitorização da presença do óleo residual	194
4.2.3.	Caracterização morfológica das partículas de alginato.....	194
4.2.4.	Rendimento de recuperação (RR) das partículas de alginato	195
4.2.5.	Teor e eficiência de encapsulação (EE) da insulina.....	196
4.2.6.	Perfil de libertação <i>in vitro</i>	198
4.2.7.	Estabilidade físico-química da insulina após preparação e recuperação das partículas de alginato	199
5.	Conclusões	201
6.	Bibliografia	204

Capítulo III. Redução da libertação da insulina durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

1. Introdução.....	217
2. Materiais e métodos.....	222
2.1. Materiais	222
2.2. Preparação das nanoesferas de alginato.....	223
2.3. Caracterização granulométrica das nanoesferas de alginato	224
2.4. Caracterização morfológica das nanoesferas de alginato	225
2.5. Peso molecular (PM) do alginato de sódio das nanoesferas com a menor granulometria.....	225
2.6. Determinação do teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido	227
2.7. Influência da razão cálcio/alginato (m/m) na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano	227
2.7.1. Granulometria das nanoesferas.....	227
2.7.2. Aspecto e viscosidade do gel de alginato de cálcio.....	228
2.7.3. Determinação do teor de cálcio	228
2.7.4. Determinação do teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido.....	229
2.8. Influência da razão molar ácido/cálcio na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano e com a razão cálcio/alginato (m/m) otimizada	229
2.8.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas	229
2.8.2. Variação de pH ao longo do processo de gelificação.....	229
2.8.3. Determinação do teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido.....	229
2.9. Análise estatística	230
3. Resultados.....	231
3.1. Tipo de alginato	231
3.1.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas	231
3.1.2. Peso molecular (PM) do alginato das nanoesferas com a menor granulometria.....	232
3.1.3. Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido	232
3.2. Tipo de polímero aniônico.....	233
3.2.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas	233
3.2.2. Caracterização morfológica das nanoesferas.....	235

3.2.3.	Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido.....	237
3.3.	Concentração do polímero aniônico	238
3.3.1.	Caracterização granulométrica das nanoesferas	238
3.3.2.	Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido.....	239
3.4.	Influência da razão cálcio/alginate (m/m) na matriz de alginate reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V)	240
3.4.1.	Caracterização granulométrica das nanoesferas	240
3.4.2.	Aspecto e viscosidade do gel de alginate de cálcio	240
3.4.3.	Teor de cálcio.....	243
3.4.4.	Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido.....	244
3.5.	Influência da razão molar ácido/cálcio na matriz de alginate reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V) e com a razão cálcio/alginate (m/m) otimizada...	245
3.5.1.	Caracterização granulométrica das nanoesferas	245
3.5.2.	Variação de pH ao longo do processo de gelificação	245
3.5.3.	Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido.....	246
4.	Discussão	248
4.1.	Tipo de alginate	248
4.2.	Tipo de polímero aniônico	251
4.3.	Concentração do polímero aniônico	255
4.4.	Influência da razão cálcio/alginate (m/m) na matriz de alginate reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V)	255
4.5.	Influência da razão molar ácido/cálcio na matriz de alginate reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V) e com a razão cálcio/alginate (m/m) otimizada...	257
5.	Conclusões	259
6.	Bibliografia	261

Capítulo IV. Avaliação da bioatividade da insulina libertada das nanoesferas

1.	Introdução	269
2.	Materiais e métodos	276
2.1.	Materiais.....	276

2.2.	Preparação das nanoesferas	276
2.3.	Caracterização granulométrica e morfológica das nanoesferas.....	278
2.4.	Determinação da eficiência de encapsulação (EE).....	278
2.5.	Perfil de libertação <i>in vitro</i>	278
2.6.	Bioactividade <i>in vitro</i> da insulina.....	279
2.6.1.	Cultura celular	279
2.6.2.	Congelamento das células	279
2.6.3.	<i>Cell splitting</i>	280
2.6.4.	Estimulação das células	280
2.6.5.	Doseamento da proteína pelo método de Bradford	281
2.6.6.	<i>Western blot</i>	282
2.6.7.	Libertação da insulina a partir das nanoesferas	283
2.7.	Bioactividade <i>in vivo</i> da insulina.....	283
2.7.1.	Indução da Diabetes <i>Mellitus</i>	283
2.7.2.	Libertação da insulina a partir das nanoesferas	285
2.8.	Análise estatística	286
3.	Resultados.....	287
3.1.	Caracterização granulométrica e morfológica das nanoesferas.....	287
3.2.	Eficiência de encapsulação (EE)	288
3.3.	Perfil de libertação <i>in vitro</i>	288
3.4.	Bioactividade <i>in vitro</i> da insulina.....	289
3.4.1.	Tempo necessário para obter a fosforilação máxima da proteína Akt	289
3.4.2.	Gradiente de concentração de insulina para obter a fosforilação máxima da proteína Akt	290
3.4.3.	Bioactividade <i>in vitro</i> da insulina libertada a partir das nanoesferas	291
3.5.	Bioactividade <i>in vivo</i> da insulina libertada a partir das nanoesferas	292
4.	Discussão.....	294
4.1.	Caracterização granulométrica e morfológica das nanoesferas.....	294
4.2.	Eficiência de encapsulação (EE)	294
4.3.	Perfil de libertação <i>in vitro</i>	295
4.4.	Bioactividade <i>in vitro</i> da insulina.....	295
4.5.	Bioactividade <i>in vivo</i> da insulina.....	296
5.	Conclusões.....	299
6.	Bibliografia.....	300

Capítulo V. Controlo do perfil de libertação da insulina encapsulada a pH intestinal

1. Introdução	309
2. Materiais e métodos	316
2.1. Materiais.....	316
2.2. Preparação das nanoesferas.....	316
2.3. Caracterização granulométrica das nanoesferas	317
2.4. Potencial zeta das nanoesferas	317
2.5. Determinação da eficiência de encapsulação (EE)	318
2.6. Perfil de libertação <i>in vitro</i>	318
2.7. Análise da insulina por HPLC	318
2.8. Análise dos perfis de libertação	319
2.9. Análise do complexo polielectrolítico por calorimetria de varrimento diferencial (DSC)	321
2.10. Análise do complexo polielectrolítico por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	321
2.11. Análise estatística.....	322
3. Resultados	323
3.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas	323
3.2. Potencial zeta das nanoesferas	324
3.3. Eficiência de encapsulação (EE).....	325
3.4. Perfil de libertação <i>in vitro</i>	325
3.5. Análise dos perfis de libertação	326
3.6. Análise do complexo polielectrolítico por calorimetria de varrimento diferencial (DSC)	328
3.7. Análise do complexo polielectrolítico por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	330
4. Discussão	333
4.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas	333
4.2. Potencial zeta das nanoesferas	335
4.3. Eficiência de encapsulação (EE).....	336
4.4. Perfil de libertação <i>in vitro</i>	337
4.5. Análise do complexo polielectrolítico por calorimetria de varrimento diferencial (DSC)	342
4.6. Análise do complexo polielectrolítico por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	344
5. Conclusões	346
6. Bibliografia	348

Capítulo VI. Efeito terapêutico oral da insulina após prevenção do ataque proteolítico a nível gástrico

1. Introdução.....	361
2. Materiais e métodos.....	370
2.1. Materiais	370
2.2. Preparação das nanoesferas	370
2.3. Caracterização granulométrica das nanoesferas	372
2.4. Potencial zeta das nanoesferas.....	372
2.5. Determinação da eficiência de encapsulação (EE).....	372
2.6. Estabilidade enzimática na presença da pepsina	372
2.7. Análise da insulina por HPLC	373
2.8. Efeito terapêutico após administração oral das formulações a ratos diabéticos.374	
2.8.1. Indução da Diabetes <i>Mellitus</i>	374
2.8.2. Administração oral das nanoesferas	376
2.9. Análise estatística	377
3. Resultados.....	378
3.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas	378
3.2. Potencial zeta das nanoesferas.....	379
3.3. Eficiência de encapsulação (EE)	380
3.4. Estabilidade enzimática na presença da pepsina	380
3.5. Efeito terapêutico após administração oral das formulações a ratos diabéticos.382	
4. Discussão.....	388
4.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas	388
4.2. Potencial zeta das nanoesferas.....	390
4.3. Eficiência de encapsulação (EE)	391
4.4. Estabilidade enzimática na presença de pepsina	392
4.5. Efeito terapêutico após administração oral das formulações a ratos diabéticos.396	
5. Conclusões.....	399
6. Bibliografia.....	401

Capítulo VII. Caracterização do sistema nanométrico, efeito terapêutico oral e estudo da absorção intestinal

1. Introdução	417
2. Materiais e métodos	420
2.1. Materiais.....	420
2.2. Preparação das nanoesferas.....	420
2.3. Caracterização granulométrica das nanoesferas	421
2.4. Caracterização morfológica das nanoesferas	421
2.5. Potencial zeta das nanoesferas	421
2.6. Determinação da eficiência de encapsulação (EE)	421
2.7. Perfil de libertação <i>in vitro</i>	422
2.8. Estabilidade enzimática na presença de pepsina.....	422
2.9. Efeito terapêutico da formulação otimizada após administração a ratos diabéticos	423
2.9.1. Indução da Diabetes <i>Mellitus</i>	423
2.9.2. Administração s.c. da formulação otimizada	423
2.9.3. Administração oral da formulação otimizada	424
2.9.3.1 Efeito terapêutico oral	424
2.9.3.2 Efeito dose-resposta	425
2.9.3.3 Prova de tolerância à glucose oral (PTGO).....	425
2.9.3.4 Determinação da insulinemia e biodisponibilidade.....	426
2.10. Estudo da absorção intestinal da formulação otimizada após administração <i>in situ</i> a ratos diabéticos	427
2.10.1. Visualização da captação intestinal da formulação otimizada.....	427
2.10.2. Quantificação da captação intestinal da formulação otimizada.....	428
2.10.3. Extracção da fluorescência.....	429
2.10.3.1 Extracção da fluorescência do plasma sanguíneo	429
2.10.3.2 Extracção da fluorescência do conteúdo intestinal.....	429
2.10.3.3 Extracção da fluorescência da mucosa intestinal	430
2.10.4. Quantificação da fluorescência	430
2.11. Análise estatística.....	431
3. Resultados	432
3.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas	432
3.2. Caracterização morfológica das nanoesferas	433
3.3. Potencial zeta das nanoesferas	434

3.4.	Eficiência de encapsulação (EE)	434
3.5.	Perfil de liberação <i>in vitro</i>	434
3.6.	Estabilidade enzimática na presença de pepsina	435
3.7.	Efeito terapêutico da formulação otimizada após administração a ratos diabéticos.....	437
3.7.1.	Administração s.c. da formulação otimizada	437
3.7.2.	Administração oral da formulação otimizada.....	438
3.7.2.1	Efeito terapêutico oral.....	438
3.7.2.2	Efeito dose-resposta.....	439
3.7.2.3	Prova de tolerância à glucose oral (PTGO)	440
3.7.2.4	Determinação da insulinemia e biodisponibilidade	441
3.8.	Estudos da absorção intestinal da formulação otimizada após administração <i>in situ</i> a ratos diabéticos.....	443
3.8.1.	Visualização da captação intestinal da formulação otimizada	443
3.8.2.	Quantificação da captação intestinal da formulação otimizada.....	447
4.	Discussão.....	451
4.1.	Caracterização granulométrica das nanoesferas	451
4.2.	Caracterização morfológica das nanoesferas.....	452
4.3.	Potencial zeta.....	452
4.4.	Eficiência de encapsulação (EE)	454
4.5.	Perfil de liberação <i>in vitro</i>	454
4.6.	Estabilidade enzimática na presença de pepsina	455
4.7.	Efeito terapêutico da formulação otimizada após administração a ratos diabéticos.....	456
5.	Conclusões.....	462
6.	Bibliografia.....	464

Capítulo VIII. Ensaio toxicológico e estudos do metabolismo do sistema nanométrico otimizado

1.	Introdução.....	473
2.	Materiais e métodos.....	477
2.1.	Materiais	477
2.2.	Preparação das nanoesferas	477

2.3.	Efeito toxicológico da formulação otimizada após 15 dias de administração oral a ratos diabéticos.....	477
2.3.1.	Indução da Diabetes <i>Mellitus</i>	477
2.3.2.	Administração oral das nanoesferas.....	478
2.3.3.	Variação do peso corporal e taxa de mortalidade.....	479
2.3.4.	Estudo histopatológico.....	479
2.3.4.1	Preparação das amostras.....	479
2.3.4.2	Hematoxilina/eosina para identificação de alterações morfológicas dos fragmentos seccionados.....	479
2.3.5.	Parâmetros bioquímicos.....	480
2.3.6.	Parâmetros hematológicos.....	481
2.3.7.	Análise sumária da urina.....	481
2.4.	Estudo do metabolismo.....	481
2.4.1.	Estudo do metabolismo em caixas metabólicas.....	481
2.4.1.1	Indução da Diabetes <i>Mellitus</i>	481
2.4.1.2	Administração oral da formulação otimizada.....	482
2.4.1.3	Quantificação dos parâmetros metabólicos.....	482
	Peso corporal.....	482
	Consumo de água e comida.....	483
	Volume de urina e proteinúria.....	483
2.4.2.	Estudo do metabolismo da glucose pela técnica RMN.....	483
2.4.2.1	Indução da Diabetes <i>Mellitus</i> e administração oral das nanoesferas.....	483
2.4.2.2	Prova de tolerância à glucose oral (PTGO).....	483
2.4.2.3	Extracção da glucose do plasma.....	484
2.4.2.4	Extracção do glicogénio do fígado.....	484
2.4.2.5	Hidrólise do glicogénio com amiloglicosidase.....	485
2.4.2.6	Síntese da monoacetona glucose (MAG).....	485
2.4.2.7	Metodologia de RMN.....	485
2.4.2.8	Análise dos dados de RMN.....	486
2.5.	Análise estatística.....	488
3.	Resultados.....	489
3.1.	Efeito toxicológico da formulação otimizada após 15 dias de administração oral a ratos diabéticos.....	489
3.1.1.	Variação do peso corporal e taxa de mortalidade.....	489
3.1.2.	Estudo histopatológico.....	490
3.1.3.	Parâmetros bioquímicos.....	496
3.1.4.	Parâmetros hematológicos.....	497

3.1.5.	Análise sumária da urina	499
3.2.	Estudo do metabolismo	500
3.2.1.	Estudo do metabolismo em caixas metabólicas	500
3.2.1.1	Peso corporal.....	500
3.2.1.2	Consumo de água e comida	501
3.2.1.3	Volume de urina e proteinúria	502
3.2.2.	Estudo do metabolismo da glucose pela técnica RMN	503
3.2.2.1	Prova de tolerância à glucose oral (PTGO)	503
3.2.2.2	Análise dos dados de RMN	504
	Enriquecimento da água corporal em $^2\text{H}_2\text{O}$	504
	Produção endógena de glucose.....	504
	Contribuição relativa das vias gluconeogénica e glicogénica para a produção de glucose	505
	Metabolização da glucose avaliada pela técnica ^{13}C -RMN.....	506
	Produção de glicogénio no fígado	508
4.	Discussão	509
4.1.	Efeito toxicológico da formulação otimizada após 15 dias de administração oral a ratos diabéticos	509
4.2.	Estudo do metabolismo em caixas metabólicas	515
4.3.	Estudo do metabolismo da glucose pela técnica RMN	517
5.	Conclusões.....	519
6.	Bibliografia.....	521

Capítulo IX. Conclusões gerais

Conclusões gerais	529
-------------------------	-----

Capítulo X. Perspectivas futuras da nanotecnologia na tecnologia farmacêutica

1. Perspectivas futuras da nanotecnologia na tecnologia farmacêutica.....	539
Vias de administração alternativas à administração s.c. da insulina	546

Administração bucal	546
Administração transdérmica	546
Administração nasal.....	547
Administração pulmonar.....	547
Administração oral.....	549
2. Bibliografia	551

Anexos

Quantificação da insulina pelo método de Bradford.....	555
Validação da técnica de HPLC para o doseamento da insulina.....	561
Análise elementar das nanosferas de alginato reforçadas com sulfato de dextrano	567
Bioactividade <i>in vitro</i> da insulina	569
Quantificação da fluorescência	573
Doseamento do n-hexano por cromatografia em fase gasosa.....	575
Bibliografia	577

AGRADECIMENTOS

É com imensa gratidão que exprimo o meu profundo reconhecimento a todos aqueles que, das mais variadas formas, contribuíram para a dignificação e a efectivação deste projecto e, hoje, se congratulam com o trabalho realizado.

Aos Professores Doutores Francisco Veiga e António José Ribeiro, quero expressar o meu sincero agradecimento pela orientação científica, pela revisão crítica desta dissertação e pelo seu contributo para o resultado final deste trabalho, bem como as palavras de apreço generosamente dirigidas, fonte de renovado estímulo para a concretização desta tese. Desejo também manifestar o meu agradecimento pela perseverança e determinação que permitiram criar as condições indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Ronald Neufeld, professor do departamento de Engenharia Química da Universidade de Queen's, Canadá, apresento o meu sentido agradecimento pela sua participação neste projecto, pelo espírito positivo e pela força anímica que em mim incutiu desde o primeiro dia de trabalho, incentivando-me a atingir as metas mais elevadas, pelos seus sensatos e sábios ensinamentos, pela disponibilidade sempre demonstrada e, mais importante ainda, pela amizade e confiança desde sempre demonstradas, que foram tão importantes para mim nos momentos de maior esmorecimento.

À Professora Doutora Christiane Damgé, professora na Faculdade de Medicina da Universidade Louis Pasteur, França, agradeço profundamente a disponibilidade com que me recebeu no período de permanência em Strasbourg. Gostaria ainda de referir que me sinto privilegiada pela inigualável amizade construída desde o primeiro dia de trabalho.

Ao Professor Doutor Adriano de Sousa, manifesto o meu reconhecimento pelo amável acolhimento no Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e pelas facilidades concedidas na utilização do equipamento do Laboratório UCQFarma.

Ao Professor Doutor Vítor Madeira, professor do departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, estou reconhecida pelas

facilidades concedidas na utilização da ultracentrífuga do Laboratório de Bioquímica. Ao Professor Doutor Manuel Matos, do mesmo departamento, o meu especial agradecimento pela cooperação e disponibilidade demonstrada no desenvolvimento dos estudos de recuperação das partículas poliméricas.

À Professora Doutora Margarida Figueiredo, do departamento de Engenharia Química, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, agradeço ter proporcionado os meios técnicos para a caracterização morfológica e granulométrica das partículas poliméricas e, mais tarde, das nanoesferas. Ao Engenheiro Vítor Redondo, estou grata pelo apoio técnico na realização dessas análises.

Ao Professor Doutor António Rocha Gonçalves, professor do departamento de Química, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, apresento o meu reconhecimento pelas facilidades concedidas na utilização do equipamento de cromatografia líquida de alta resolução. À Dr.^a Alexandra Rocha Gonçalves e colegas do respectivo departamento, quero deixar uma palavra de agradecimento pelo apoio prestado e pela disponibilidade permanente. Agradeço, igualmente, à Chymiotecnnon pela disponibilização dos equipamentos.

Ao Professor Doutor João Pessoa, professor do departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, também desejo expressar o meu agradecimento pela forma como me disponibilizou as suas instalações e equipamentos para os estudos de dicroísmo circular.

À Professora Doutora Luísa Sá e Melo, o meu sincero agradecimento pela disponibilidade concedida na utilização do espectrofotómetro de infravermelho. Ao Professor Doutor Alcino Leitão, manifesto o meu reconhecimento pelo apoio técnico na aquisição e interpretação dos espectros de infravermelho.

*À Professora Doutora Margarida Caramona, estou agradecida pela facilidade concedida na utilização do biotério do Laboratório de Farmacologia. À Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo, apresento o meu especial agradecimento pela amável disponibilidade, pelo precioso contributo prestado na orientação nos ensaios *in vivo* e, mais importante, pela amizade demonstrada.*

Ao Professor Doutor António Silvério Cabrita, professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e o apoio científico na realização dos estudos histopatológicos.

Ao Professor Doutor Rui de Albuquerque Carvalho, professor do departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, quero deixar o meu agradecimento público pela sua amizade e apoio técnico e científico facultado no âmbito dos estudos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear. À Dr.^a Patrícia Nunes, técnica da Unidade de Investigação de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, desejo apresentar o meu profundo agradecimento pela forma como sempre se disponibilizou e colaborou na orientação e execução dos ensaios toxicológicos.

Ao Professor Doutor John Jones, professor do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, agradeço o incansável apoio técnico e científico facultado no âmbito dos ensaios toxicológicos.

Às Dr.^a Lucília Silveira e à Dr.^a Ana Donato, deixo o meu reconhecimento pela disponibilidade e pelas facilidades concedidas na utilização dos equipamentos do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

À Dr.^a Cristina Fernandes, responsável técnica pelo Laboratório de Controlo de Qualidade da indústria farmacêutica Labesfal - Grupo Fresenius Kabi, agradeço o apoio técnico e científico facultado no doseamento dos solventes residuais por cromatografia em fase gasosa.

Aos Professores Doutores Maria Eugénia Pina, João Canotilho, João José Sousa, professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, agradeço o afecto e a genuína amizade demonstradas, bem como a permanente boa disposição que tornaram a nossa convivência agradável e da qual guardarei óptimas recordações e exemplos de vida.

Ao Professor Doutor Domingos Ferreira, professor da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, o meu sincero agradecimento pela disponibilidade e pelas facilidades que me concedeu nos estudos do potencial zeta. Ao meu colega do Laboratório de Tecnologia

Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Bruno Sarmento, quero apresentar o meu profundo agradecimento, pelo espírito de entreaajuda e pelo incentivo permanente.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em particular, Laura Ribeiro, Helton Santos, Manuel Vueba, Alice Urbano, Catarina Silva, Rita Silva, Monique Marques, Ana Francisca Soares, Felipe Varum, Tânia Laranjeira, Rui Manadas e André Granjo quero apresentar o meu profundo agradecimento, pelo espírito de entreaajuda e pelo incentivo permanente que tornaram a nossa amizade sólida e a projectaram para além deste trabalho.

Aos Hospitais da Universidade de Coimbra pelo fornecimento de insulina e a excelente receptividade que os elementos dos Serviços Farmacêuticos sempre demonstraram ao longo do presente trabalho.

Ao Banco Espírito Santo, à Fundação Ilídio Pinho e à Siemens Networks S. A., pretendo expressar o meu profundo agradecimento pelo interesse demonstrado no presente trabalho e agradecer a confiança e o incentivo que depositaram para o desenvolvimento futuro da presente formulação.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, gostaria de agradecer o incentivo e o apoio financeiro recebido ao longo destes quatros anos de bolsa de investigação.

Por último, e não menos importante refiro a minha Família, nomeadamente Pais, Irmãos e Avós, o Miguel e os meus Amigos de sempre, que discreta, mas decisivamente, me deram ânimo para percorrer o longo caminho que culminou na realização deste projecto, apoiando-me incondicionalmente e compreendendo todos os momentos de maior tensão. Para todos eles, o meu mais profundo obrigada.

PUBLICAÇÕES

Catarina Pinto Reis, Ronald J. Neufeld, António J. Ribeiro e Francisco Veiga. Design of insulin-loaded alginate nanoparticles: influence of calcium ion on polymer gel matrix properties. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* (2006) **12**, 47-52.

Catarina Pinto Reis, Ronald J. Neufeld, António J. Ribeiro e Francisco Veiga. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2006) **2**, 8-21.

Catarina Pinto Reis, Ronald J. Neufeld, António J. Ribeiro e Francisco Veiga. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2006) **2**, 53-65.

Catarina P. Reis, Ronald J. Neufeld, Sandra Vilela, António J. Ribeiro e Francisco Veiga. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation* (2006) **23**, 245-257.

Catarina Pinto Reis, António J. Ribeiro, Ronald J. Neufeld e Francisco Veiga. Alginate microparticles as novel carrier for oral insulin delivery. *Biotechnology and Bioengineering* (2007) **96**, 977-989.

Catarina Pinto Reis, António J. Ribeiro, Simone Houn, Francisco Veiga e Ronald J. Neufeld. Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and *in vitro/in vivo* bioactivity. *European Journal Pharmaceutical Sciences* (2007) **30**, 392-397.

Christiane Damgé, Catarina Pinto Reis e Philippe Maincent. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert Opinion on Drug Delivery* (2008) **5**, 45-68.

Catarina Pinto Reis, António J. Ribeiro, Ronald J. Neufeld, Christiane Damgé e Francisco Veiga. Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery. *Drug Delivery*, aceite para publicação.

Catarina Pinto Reis, Francisco Veiga, António J. Ribeiro, Ronald J. Neufeld e Christiane Damgé. Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, aceite para publicação.

Catarina Pinto Reis, F. Veiga, A. Ribeiro e Ronald J. Neufeld. *Insulin delivery systems: design innovation*. The bioartificial endocrine pancreas (B. A. E. P.), editores Jean-Pierre Hallé, Paul de Vos e Lawrence Rosenberg, Parte D.

Patente N.º PT103476: Processo de produção e isolamento de micro- e nanopartículas poliméricas contendo macromoléculas de natureza hidrofílica e termolábil.

Inventores: Catarina Pinto Reis, António J. Ribeiro, Ronald J. Neufeld e Francisco Veiga.

Titular da Patente: Universidade de Coimbra.

Extensão internacional em 2007.

Patente: Oral submicron particle delivery system for proteins and process for its production.

Inventores: Catarina Pinto Reis, António J. Ribeiro, Ronald J. Neufeld, Christiane Damgé e Francisco Veiga.

Titular da Patente: Universidade de Coimbra.

Pedido provisório de patente nos EUA em nome da Universidade de Coimbra, em 2006.

Pedido definitivo e extensão internacional após 1 ano.

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação que a seguir se apresenta encontra-se estruturada em 10 capítulos e 6 anexos.

O Capítulo I descreve uma introdução temática organizada em 4 secções, que correspondem às diferentes abordagens à nanotecnologia e respectivos níveis do tema da presente dissertação.

O trabalho experimental é então descrito ao longo de 7 capítulos, sendo cada um deles organizado em 6 secções: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e, por último, Bibliografia. Os capítulos dispõem-se com os seguintes temas:

- Capítulo II: Transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica.
- Capítulo III: Redução da libertação da insulina durante a incubação das nanoesferas em meio ácido.
- Capítulo IV: Avaliação da bioactividade da insulina libertada das nanoesferas.
- Capítulo V: Controlo do perfil de libertação da insulina encapsulada a pH intestinal.
- Capítulo VI: Efeito terapêutico oral da insulina após prevenção do ataque proteolítico a nível gástrico.
- Capítulo VII: Caracterização do sistema nanométrico, efeito terapêutico oral e estudo da absorção intestinal.
- Capítulo VIII: Ensaio toxicológicos e estudos do metabolismo do sistema nanométrico otimizado.

Finalmente, as conclusões gerais da presente dissertação, as perspectivas futuras da nanotecnologia na tecnologia farmacêutica e os anexos dispõem-se da seguinte forma:

- Capítulo IX: Conclusões gerais.
- Capítulo X: Perspectivas futuras da nanotecnologia na tecnologia farmacêutica.
- Anexos.

RESUMO

O presente trabalho fundamenta-se na aplicação das tecnologias de nanoencapsulação a fármacos peptídicos com o objectivo de aumentar a sua biodisponibilidade após administração oral. O fármaco modelo seleccionado foi a insulina pelo facto de ser uma proteína muito estudada, mas também pelo facto de apresentar uma sensibilidade às enzimas presentes no tracto gastrointestinal, susceptibilidade ao pH ácido e fraca permeabilidade intestinal. A insulina é uma proteína biologicamente activa que geralmente se administra por via subcutânea no tratamento da Diabetes *Mellitus*. Os trabalhos anteriores que envolveram a administração oral de insulina conduziram, por via de regra, a uma biodisponibilidade oral baixa. O presente estudo apresenta um sistema nanométrico baseado numa matriz polimérica de alginato (núcleo). O método escolhido para a preparação do sistema nanométrico foi o método de emulsificação/gelificação interna, uma vez que se trata de um método simples, de fácil transposição à escala industrial, mas mais importante que tudo isso, este método decorre à temperatura ambiente e segundo condições experimentais não drásticas que serão bastante vantajosas para a manipulação de fármacos peptídicos. O polímero seleccionado para a matriz foi o alginato pelo facto de ser um polímero natural, não tóxico e biodegradável. Trata-se de um polímero aniónico que gelifica na presença de iões de cálcio.

Numa primeira fase, o presente trabalho dedicou-se à transposição do método de emulsificação/gelificação interna, até então exclusivo na preparação de macro e microesferas, para a escala nanométrica. Nesta fase, foram estudados diversos parâmetros de processo e de formulação no sentido de obter partículas esféricas e de dimensões inferiores a 10 µm com uma distribuição granulométrica unimodal. Observou-se que a velocidade de homogeneização necessária para produzir a emulsão e a concentração do agente emulsivo foram os factores que mais influenciaram a granulometria das partículas. A granulometria obtida foi muito inferior ao limite de 10 µm. Neste caso, cerca de 90% das partículas produzidas apresentaram um diâmetro médio a 1680 nm.

Durante o desenvolvimento do método de preparação das partículas, foi necessário desenvolver um método eficiente de recuperação das mesmas. Verificou-se que, à medida que a granulometria das partículas diminuía, os problemas relacionados com a recuperação das partículas aumentavam. Foram estudadas várias estratégias para recuperar as partículas de alginato, sendo aquelas baseadas em duas principais vertentes: a primeira relacionada com a aplicação de diferentes forças centrífugas e tampão acetato de pH 4,5 como meio de lavagem e, a segunda através da aplicação de tampão acetato de pH 4,5 com agentes desidratantes seguida de centrifugação aplicando uma menor força centrífuga. Nesta fase, recorreram-se a diversas metodologias de forma a seleccionar a melhor estratégia. Os critérios de selecção basearam-se na granulometria, morfologia, eficiência de encapsulação, perfil de libertação *in vitro* e estabilidade físico-química da insulina através da análise da sua estrutura secundária. As técnicas utilizadas foram difractometria laser, microscopia electrónica de varrimento, cromatografia líquida de alta resolução (espectrofotómetro UV e espectrómetro de massa) e dicroísmo circular. A estratégia de recuperação seleccionada compreendia a associação de tampão acetato de pH 4,5 com agentes desidratantes, nomeadamente com a acetona, o isopropanol e o n-hexano e utilizando uma menor força centrífuga.

Nesta última fase, observou-se que as partículas de alginato libertaram insulina durante a incubação em meio gástrico. Foram testadas diferentes estratégias para reduzir ou eliminar a libertação de insulina, nomeadamente aplicando diferentes tipos de alginato e reforçando a matriz com polímeros aniónicos. Nesta fase, foram também estudadas a relação de massa entre o cálcio e o alginato e a razão molar entre o ácido e o cálcio durante o passo da gelificação. A formulação seleccionada consistiu num tipo de alginato com baixo conteúdo em resíduos do ácido gulurónico com a matriz reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V), uma razão de massa cálcio e alginato de 7% (m/m) e, finalmente, com uma razão molar de ácido e cálcio de 3.

A bioactividade da insulina foi avaliada aplicando duas técnicas diferentes, ensaios *in vitro*, recorrendo a cultura celular de mioblastos, e quantificação do estado de fosforilação da proteína Akt pela técnica *western blot* e através de ensaios *in vivo* após administração subcutânea da insulina encapsulada e libertada das nanoesferas a ratos diabéticos. Ambas as

técnicas demonstraram a preservação da bioactividade da insulina após a nanoencapsulação, liofilização e libertação da insulina das nanoesferas.

Para melhorar o perfil de libertação da insulina no meio que simula o gradiente de pH gastrintestinal, as nanoesferas de alginato contendo insulina foram revestidas com os polímeros catiónicos pelo processo de revestimento em duas etapas. Entre os polímeros catiónicos aplicados, o quitosano conduziu a uma libertação controlada em meio intestinal. A presença do quitosano nas nanoesferas foi suportada pela variação do potencial zeta. A interacção química entre o quitosano e o alginato foi confirmada através de duas técnicas diferentes: calorimetria diferencial de varrimento e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Ambas as análises confirmaram a gelificação do alginato com os iões cálcio e a formação de um complexo polielectrolítico entre o alginato e o quitosano.

No entanto, as nanoesferas de alginato, com a matriz reforçada com sulfato de dextrano e revestidas com quitosano, foram incapazes de prevenir o ataque proteolítico da pepsina e consequente degradação da insulina. Foram estudados vários revestimentos para proteger a insulina da proteólise enzimática. Entre todos os materiais estudados, a albumina foi a que conduziu à maior protecção enzimática da insulina. Este resultado foi confirmado *in vivo* após administração oral das nanoesferas contendo insulina a ratos diabéticos. Esta redução da glicémia foi ainda mais significativa após administração oral da mesma formulação, mas no estado hidratado e na presença de polietilenoglicol na formulação das nanoesferas. Este sistema nanométrico foi caracterizado em termos granulométricos, morfológicos, eficiência de encapsulação, perfil de libertação *in vitro*, estabilidade enzimática à pepsina e testado *in vivo*. Neste caso, cerca de 90% das nanoesferas produzidas apresentaram um diâmetro médio inferior a 1842 nm. A eficiência de encapsulação de insulina foi de 64%. O perfil de libertação *in vitro* da insulina foi controlado e observou-se uma grande estabilidade enzimática da insulina à pepsina. Esta formulação foi, então, designada de formulação optimizada. A redução da glicémia foi significativa após administração a ratos diabéticos de nanoesferas contendo insulina, comparativamente às nanoesferas vazias ou insulina não encapsulada. O efeito terapêutico da formulação optimizada foi prolongado e dependente da dose. Por outro lado, a melhoria da resposta

fisiológica à administração de glucose concentrada confirmou a eficácia da insulina quando encapsulada e administrada sob a forma de nanoesferas. Os níveis de insulinemia aumentaram segundo um factor de razão sete, indicando que a insulina foi protegida durante a passagem pelo tracto gastrintestinal e absorvida pela mucosa intestinal. A biodisponibilidade oral da insulina, calculada durante 8 h em comparação com a injeção subcutânea da insulina não encapsulada, foi de 34%. O mecanismo de absorção através da mucosa intestinal da insulina foi estudado recorrendo à marcação da insulina com isotiocianato de fluoresceína. A fluorescência foi analisada por espectrofluorometria e visualizada por microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varrimento laser em segmentos intestinais seccionados. Os resultados obtidos por espectrofluorometria indicaram que a insulina-isotiocianato de fluoresceína, na forma livre ou sob a forma de nanoesferas, foi captada pela mucosa intestinal. A insulina libertada das nanoesferas e/ou a insulina associada às mesmas transpuseram a mucosa intestinal através, principalmente, das placas de Peyer, mas também através do mecanismo intercelular/paracelular e da captação intracelular via ligação com o receptor celular.

Os ensaios relacionados com a avaliação toxicológica e metabólica foram realizados em modelos animais. O estudo toxicológico não revelou efeitos tóxicos a nível da histologia dos tecidos e/ou órgãos bem como a nível dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. O estudo metabólico em caixas metabólicas demonstrou que a formulação otimizada conduziu a efeitos benéficos a nível metabólico ao final de 4 dias de administração oral. O estudo do metabolismo avaliado através da técnica de ressonância magnética nuclear, após 15 dias de administração diária da formulação otimizada, demonstrou que a formulação não interferiu no metabolismo hepático da glucose.

Este trabalho conclui que este sistema nanométrico pode ser considerado uma estratégia promissora para proteger a insulina durante a nanoencapsulação, liofilização e libertação, mas também da degradação proteolítica durante a passagem pelo tracto gastrintestinal. Os resultados observados podem ser considerados não só benéficos para o tratamento da diabetes, mas também o poderão ser para outros péptidos e proteínas com aplicação terapêutica.

ABSTRACT

The present study is based on the use of nanoencapsulation techniques to optimise the bioavailability of peptidic drugs after oral administration. The proposed peptidic drug was insulin mainly due to the fact that it is well studied and understood, but also due to its enzymatic sensitivity to enzymes of gastrointestinal tract, susceptibility to gastric pH and low intestinal permeability. Insulin is a bioactive protein which is generally administrated by the subcutaneous route for Diabetes *Mellitus* treatment. Previous research with orally delivered insulin generally led to low oral bioavailability. The present study presents a nanometric system based on a polymeric core matrix of alginate. The method chosen for the preparation of the nanometric system was the emulsification/internal gelation method, mainly because it is a simple methodology, readily scaleable, but more importantly, the formulation is conducted at room temperature and through gentle experimental conditions which are advantageous for the manipulation of peptidic drugs. The selected core polymer was alginate because it is a natural, non-toxic and biodegradable. It is an anionic polymer that gels in the presence of calcium ions.

Initially, the present research focused on extending the emulsification/internal gelation method, until now exclusively used in the preparation of macro and microspheres, to the nanometric scale. Various different process and formulation parameters were studied in order to produce spherical particles sizing less than 10 μm with an unimodal size distribution. It was observed that the speed of homogenization necessary to produce the emulsion and the concentration of the emulsifier agent were the major factors which significantly influenced particle size. Particle size was lower than 10 μm . In this case, around 90% of particles had a mean diameter less than 1680 nm.

During the development of the particles preparation method, it was necessary to develop an efficient recovery process. As particle size decreased challenges related to the recovery and washing of particles were magnifying. Different strategies were tested based in two different ways: the first involved the application of different centrifugal force with acetate buffer at pH 4.5 as recovery medium and, the second the use of acetate buffer at pH 4.5 with

dehydrating agents coupled with lower centrifugal force. Several methodologies were applied to select the best recovery strategy. Criterion selection was based on particle size, morphology, encapsulation efficiency, *in vitro* release profile and physical and chemical stability of insulin through its secondary structure analysis. Techniques used were laser diffractometry, scanning electron microscopy, high performance liquid chromatography (spectrophotometer UV and spectrometer mass) and circular dichroism. The optimal recovery strategy comprised acetate buffer at pH 4.5 with dehydrating agents, namely acetone, isopropanol and n-hexane, coupled with lower centrifugal force.

It was observed that alginate particles released insulin during incubation in gastric medium. Several strategies were tested to reduce or eliminate insulin release, namely examining different alginate chemistry, matrix reinforcement with anionic polymers. In this study, mass ratio between calcium and alginate and molar ratio between acid and calcium during the gelation step were also studied. The chosen formulation comprised alginate with low guluronic content with 0.75% (w/v) of dextran sulfate for matrix reinforcement, with mass ratio between calcium and alginate of 7% (w/w) and with molar ratio between acid and calcium of 3.

Insulin bioactivity was evaluated applying two different techniques: an *in vitro* assay through cellular culture of myoblasts and quantification of the phosphorylation status of Akt protein by using *western blot* technique and through *in vivo* assays after subcutaneous administration of encapsulated and released insulin from nanospheres to diabetic rats. Both techniques demonstrated that insulin bioactivity was preserved after nanoencapsulation, lyophilization, and release from nanospheres.

To improve the release profile of insulin in the medium which simulated the gradient of pH along the gastrointestinal tract, insulin-loaded alginate nanospheres were coated with cationic polymers by a two-stage method. Between applied cationic polymers, chitosan led to a controlled insulin release in intestinal medium. The presence of chitosan coating was supported by potential zeta change. Chemical interaction between chitosan and alginate was confirmed through differential scanning calorimetry and Fourier-transformed infrared

spectroscopy. Both analyses confirmed alginate gelation with calcium ions and the formation of polyelectrolyte complexes formation between alginate and chitosan.

However, alginate nanospheres with dextran sulfate polymeric matrix reinforcement and coated with chitosan were unable to prevent protease attack by pepsin leading to insulin degradation. Various coatings were studied to protect insulin from enzyme hydrolysis. Between applied second-coating materials, albumin provided the highest protective effect. This result was confirmed by *in vivo* assays after oral administration of insulin-loaded nanospheres to diabetic rats. This glycemic reduction was more significant after oral administration of the same formulation but in the hydrated state and with poly(ethylene glycol) included in the nanosphere formulation. This nanometric system was physically and chemically characterized and bioassayed. In this case, around 90% of nanospheres had a mean diameter less than 1842 nm. Encapsulation efficiency of insulin was 64%. Insulin release profile was controlled and it was observed a high enzymatic stability of insulin in presence of pepsin. This last formulation was named as optimized formulation. Glycemic reduction was more significant after oral administration of insulin-loaded nanospheres to diabetic rats compared to empty nanospheres and non-encapsulated insulin. The therapeutic effect of the optimized formulation was dose-dependent and prolonged. On the other hand, the improvement of the physiological response to oral administration of glucose confirmed the effectiveness of insulin when encapsulated and delivered in nanospheres form. Insulinemia levels increased by a factor of seven which may clearly demonstrate that insulin was protected during passage through the gastrointestinal tract, and was absorbed through the intestinal mucosa. The relative oral bioavailability of insulin, calculated over 8 h by comparison with a subcutaneous injection of non-encapsulated insulin, was 34%. The mechanism of absorption through the intestinal mucosa was studied, by labelling insulin with fluorescein isothiocyanate. Fluorescence was analysed by spectrofluorometry and visualized by fluorescence microscopy and confocal laser microscopy in *in situ* isolated intestinal segments. Results of spectrofluorometry showed that fluorescein isothiocyanate labelled-insulin, free or associated to nanospheres, was captured by intestinal mucosa. Insulin released and/or associated to nanospheres overcame intestinal mucosa, mainly through Peyer's patches but

also by intercellular/paracellular mechanism and through insulin-receptor via intracellular mechanism.

Assays related to toxicological evaluation and metabolic function were performed in animal models. Toxicological study showed an absence of toxic effect on tissue and/or organ histology, biochemical and haematological parameters. The metabolic study of metabolic cages demonstrated that optimized formulation led to metabolic benefits after 4 days of oral administration. The study of metabolism evaluated by nuclear magnetic resonance technique showed that optimized formulation did not interfere with hepatic glucose metabolism after 15 days of daily administration.

This study concludes that this nanometric system may be considered as a promising strategy to protect insulin during nanoencapsulation, lyophilization and release but also from proteolytic degradation during gastrointestinal transit. Observed data may be considered as a great profit for diabetes treatment, but also potentially toward the oral delivery of many other therapeutic peptides and proteins.

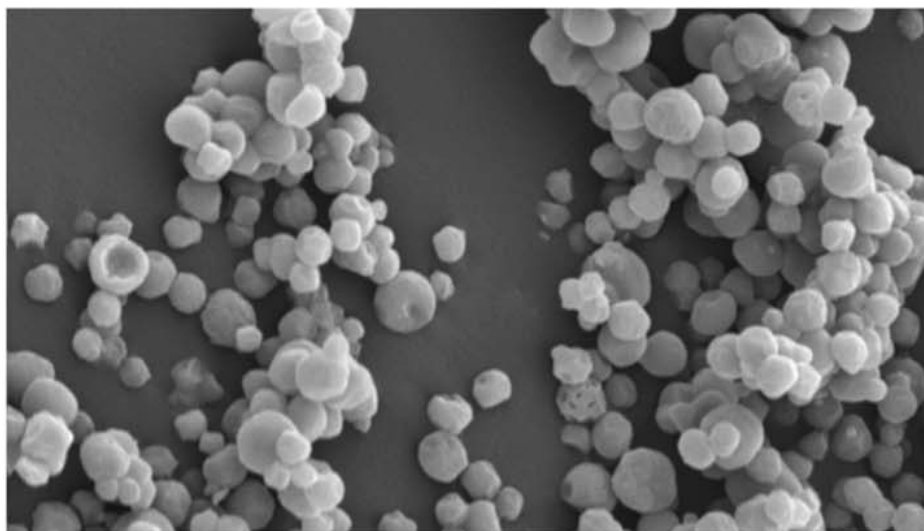
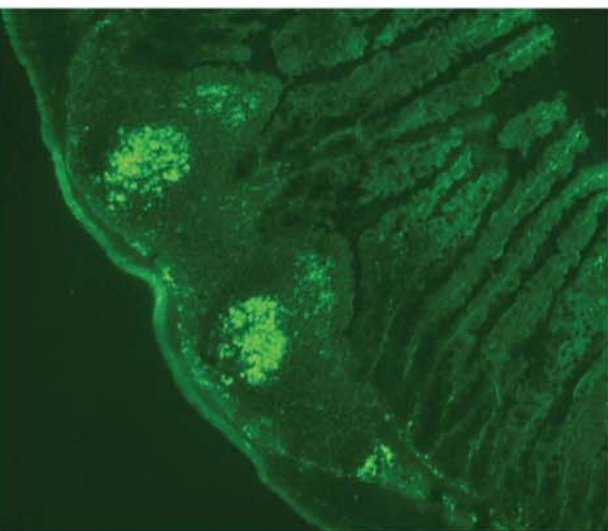
ABREVIATURAS

$^2\text{H}_2\text{O}$	Água deuterada
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt ou PKB	Proteína quinase envolvida na sinalização celular
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
A/O	Água em óleo
ARN_m	Ácido ribonucleico mensageiro
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATR	Método de reflexão total atenuada (<i>Attenuated Total Reflection</i>)
AUC	Área abaixo da curva da concentração sanguínea <i>versus</i> tempo
Blotto TBST	Tampão bloqueador
BRIJ[®]	Éter do polioxietilenoglicol
Ca²⁺	Ião cálcio
CV	Coefficiente de variação
DC	Dicroísmo circular
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMEM	Meio de cultura (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.P.	Desvio-padrão
D.P.M.	Desvio-padrão da média
DSC	Calorimetria de varrimento diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EC	Comissão das Enzimas (<i>Enzyme Comission</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

EMEA	Agência Europeia de Medicina (<i>European Medicine Agency</i>)
f_1	Factor de diferença
f_2	Factor de semelhança
F-6-P	Frutose-6-fosfato
F-B-P	Frutose-1,6-bifosfato
FDA	Entidade reguladora de fármacos e produtos alimentícios norte- -americana (<i>Food and Drug Administration</i>)
FID	Detector de ionização de chama
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
g	Força g
G	Ácido α -L-gulurónico
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato fosfoenolpiruvato
G-1-P	Glucose-1-fosfato
G-6-P	Glucose-6-fosfato
GLUT	Transportadores celulares de glucose
GRAS	Reconhecido como composto seguro (<i>Generally Regarded As Safe</i>)
h	Hora(s)
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta resolução com espectrofotómetro ultravioleta
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta resolução com espectrómetro de massa
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ICH	Conferência Internacional de Harmonização (<i>International Conference Harmonization</i>)

i.d.	Doses individuais
i.v.	Intravenoso(a)
i.p.	Intraperitoneal
M	Ácido β -D-manurónico
m/m	Massa/massa
m/V	Massa/volume
MAG	Monoacetona glucose
min	Minuto(s)
MWCO	Peso molecular de corte (<i>Molecular Weight Cut-Off</i>)
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
N.D.	Não determinado ou valor variável e dependente dos processos de formulação estudados
O/A	Óleo em água
PACA	Poli(alquilocianoacrilato)
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBCA	Poli(butilcianoacrilato)
PCL	Policaprolactona
PECA	Poli(etilcianoacrilato)
Pectina HM	Pectina com elevado teor de grupos metoxilo
Pectina LM	Pectinas com baixo teor de grupos metoxilo
PEG	Polietilenoglicol
PHMCG	Poli(hexametileno-co-guanidina)
pI	Ponto isoelétrico
PIBCA	Poli(isobutilcianoacrilato)
PIHCA	Poli(isohexilcianoacrilato)
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PLL	Poli-L-lisina
PM	Peso(s) molecular(es)

PMMA	Poli(metilmetacrilato)
PTGO	Prova de tolerância à glucose oral
S	Segundo (s)
s.c.	Subcutâneo(a)
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (<i>Scanning electron microscopy</i>)
SPAN	Factor SPAN (caracterização granulométrica)
STZ	Estreptozotocina
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rpm	Rotações por minuto
RR	Rendimento de recuperação
TEM	Microscopia electrónica de transmissão (<i>Transmission electron microscopy</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético
TGI	Tracto gastrintestinal
[U-¹³C]glucose	Glucose uniformemente marcada
UDP	Uridina difosfato
UDPG	UDP-glucose
UI	Unidade(s) Internacional(s)
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopeia Americana
V/V	Volume/volume
ZOT	Toxina da <i>zonula occludens</i>



INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO I

1. NANOTECNOLOGIA NA TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A nanotecnologia, como técnica para a encapsulação de fármacos, surgiu há pouco tempo, mas os avanços rápidos e recentes permitiram a descoberta e/ou desenvolvimento de novas oportunidades de diagnóstico e terapia de variadíssimas doenças. A nanoencapsulação tem sido utilizada nas mais diversas indústrias, nomeadamente na indústrias alimentar, agrícola, gráfica, médica e farmacêutica.

Na indústria farmacêutica, as aplicações das nanopartículas são variadas: na eliminação de sabores ou odores, na redução ou eliminação da irritação gástrica ou outros efeitos secundários provocados por alguns fármacos, no melhoramento das características de escoamento de pós, na maior facilidade no manuseio de substâncias tóxicas, na protecção em relação aos agentes atmosféricos (humidade, luz, calor e oxigénio), na redução da volatilidade dos princípios activos, na administração simultânea de fármacos que apresentem incompatibilidades entre si, na conversão de líquidos em sólidos, na dispersão de substâncias insolúveis em água ou em meios aquosos e, finalmente, no desenvolvimento de formas farmacêuticas de libertação controlada e vectorizada.

1.1. Definição de nanopartículas

As nanopartículas são definidas como sistemas sólidos à base de polímeros (sintéticos, semi-sintéticos ou naturais), ou de outros materiais, de natureza biodegradável ou não, com dimensão na ordem dos nanómetros, e que servem de veículo para fármacos ou outras substâncias (Couvreur, 1988; Couvreur *et al.*, 1995). Na presente dissertação, encontram-se referidas, apenas, as nanopartículas produzidas à base de polímeros.

Como ilustra a Figura I-1, o termo de nanopartícula engloba dois tipos mais específicos no que diz respeito à sua estrutura: as nanoesferas e as nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas que possuem uma estrutura do tipo matriz. Os fármacos ou substâncias a encapsular podem ser adsorvidos à superfície da nanoesfera ou encapsulados no

seu interior, de forma homogênea ou heterogênea. As nanocápsulas são sistemas vesiculares onde o fármaco, ou substância a encapsular, está confinado a um núcleo líquido ou sólido limitado por uma membrana polimérica vulgarmente conhecida, na terminologia da tecnologia farmacêutica, como invólucro. Neste último caso, o fármaco ou substância a encapsular pode localizar-se no núcleo sob a forma dissolvida ou suspensa ou, em última instância, adsorvido à superfície da nanocápsula.

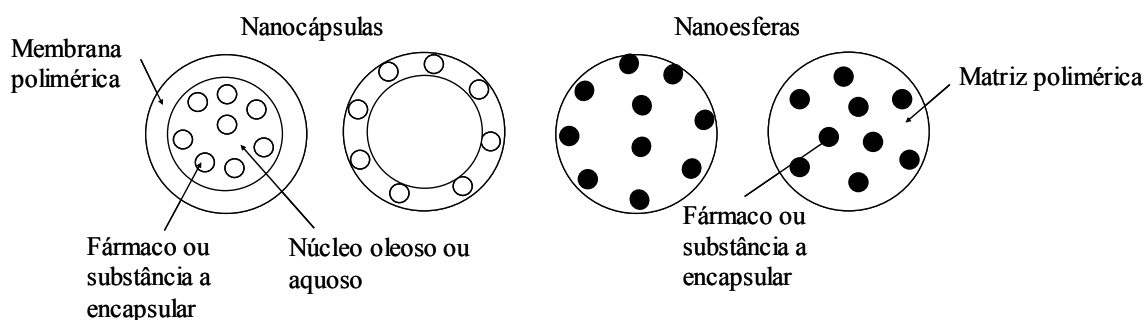


Figura I-1. Esquema ilustrativo da divisão das nanopartículas em nanocápsulas e nanoesferas.

Tal como referido anteriormente, as nanopartículas têm vindo a atrair cada vez mais atenção em variadíssimas áreas. A própria literatura tem vindo a enfatizar claras vantagens tecnológicas e terapêuticas das nanopartículas relativamente às micropartículas (McClellan *et al.*, 1998) e aos lipossomas (Benoit *et al.*, 1986; Soppimath *et al.*, 2001). Sabe-se que relativamente às micropartículas, a granulometria reduzida das nanopartículas oferece vantagens, no que concerne à sua elevada captação a nível intracelular. A captação intestinal é influenciada, entre outros factores, pela granulometria das partículas envolvidas. Para além da granulometria da partícula, a natureza do polímero e a carga eléctrica à superfície da partícula são factores que influenciam igualmente a captação intestinal das nanopartículas. Geralmente, as nanopartículas de polímeros hidrofóbicos apresentam maior captação intestinal do que as nanopartículas de polímeros hidrofílicos (Jung *et al.*, 2000). A importância da carga eléctrica à superfície da nanopartícula continua a ser motivo de debate, uma vez que muitos dos trabalhos recentes que se debruçam sobre este assunto apresentam grandes contrariedades entre si (Norris *et al.*, 1998).

De uma forma muito simples, a composição do polímero (hidrofobicidade, carga eléctrica à superfície e perfil de biodegradação), a natureza dos adjuvantes e o próprio fármaco (peso molecular (PM), carga e localização do fármaco nas próprias nanopartículas) têm uma forte influência na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação das nanopartículas. Assim, tendo em conta as características físico-químicas do fármaco ou da substância a encapsular, é possível escolher o método de preparação e o polímero adequados.

Na secção seguinte será feita uma abordagem geral sobre os métodos de preparação de nanopartículas, solventes utilizados e principais vantagens e desvantagens dos métodos de preparação do ponto de vista tecnológico e terapêutico. Relativamente aos solventes utilizados no método de preparação, considerou-se a classificação da Conferência Internacional de Harmonização (*International Conference Harmonization, ICH*) que avalia possíveis riscos para a saúde humana e os distingue em 3 classes: classe 1 (solventes a evitar), classe 2 (solventes com utilização limitada) e classe 3 (solventes com baixa toxicidade).

1.2. Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas

De uma forma geral, os métodos de preparação podem ser classificados em duas grandes categorias, caso as nanopartículas sejam produzidas através da formação de reacções de polimerização ou se estas resultarem directamente de uma macromolécula ou polímero natural, sintético ou semi-sintético pré-formado (Couvreur *et al.*, 1995). Os métodos que envolvem reacções de polimerização podem ser, ainda, divididos em métodos que envolvem reacções de polimerização por meio de emulsões (orgânicas ou aquosas), ou então, em métodos que envolvem reacções de polimerização interfacial. Além destes, existe um outro tipo de método de preparação de nanopartículas, diferente dos anteriores, que recorre a técnicas de nebulização. Esta última tecnologia é, vulgarmente, conhecida como tecnologia supercrítica.

1.2.1. Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monómeros

1.2.1.1 Polimerização de monómeros por emulsão

Polimerização de monómeros por emulsão é um dos métodos mais antigos e mais rápidos na preparação de nanopartículas. Podem ser divididos em duas categorias, conforme a fase externa seja orgânica ou aquosa.

A polimerização por emulsão com fase externa orgânica envolve a dispersão de um monómero numa emulsão, ou numa micro-emulsão inversa, ou num não-solvente do monómero (Kreuter, 1990) e a utilização de agentes emulsivos. Segundo este método, foram preparadas, por exemplo, nanoesferas de poliacrilamida (Ekman e Sjöholm, 1978; Lowe e Temple, 1994), poli(metilmacrilato) (PMMA), poli(etilcianoacrilato) (PECA) e de poli(butílicoacrilato) (PBCA) (El-Samaligy *et al.*, 1986). Alguns dos fármacos encapsulados foram a pilocarpina e o timolol (Harmia-Pulkkinen *et al.*, 1989). Outra substância encapsulada por este método foi, por exemplo, a fluoresceína (El-Samaligy *et al.*, 1986). No entanto, a quantidade de solventes orgânicos tóxicos, agentes emulsivos, monómeros e moléculas iniciadores residuais do processo de polimerização no produto final levaram ao abandono deste método.

Na polimerização por emulsão com fase externa aquosa, o monómero é dissolvido numa fase aquosa e não há a necessidade de agentes emulsivos, contrariamente ao método anterior. A iniciação ocorre quando a molécula de monómero dissolvida na fase externa colide com a molécula iniciadora, que poderá ser um ião ou um radical livre. Alternativamente, a molécula do monómero poderá alterar-se através de radiações altamente energéticas, incluindo as radiações γ , ultra-violeta (UV) ou luz visível, ou mesmo ser ela própria um radical iniciador (Vauthier *et al.*, 2003). A fase de separação ou formação de partículas sólidas poderá ter lugar antes ou depois do término da reacção de polimerização (Kreuter, 1982). Foram preparadas, segundo este método, nanopartículas de PMMA (Rolland

et al., 1986) e de poliacrilato (Turos *et al.*, 2007). Vários fármacos foram nanoencapsulados como, por exemplo, doxorrubicina (Rolland *et al.*, 1986) e antibióticos β -lactâmicos (Turos *et al.*, 2007). Trata-se de um método simples e conduz a elevadas eficiências de encapsulação (EE). Todavia, este método apresentou, até ao momento, duas grandes desvantagens: a primeira, relaciona-se com a necessidade de iniciação físico-química e, em segundo lugar, o polímero envolvido (PMMA) não é biodegradável (Kreuter *et al.*, 1983). Como resultado, foram apresentados polímeros alternativos ao PMMA e diferentes condições de preparação das nanopartículas. A alternativa proposta baseava-se num método à temperatura ambiente, sem radiação γ ou outra molécula iniciadora. Como polímero alternativo, foram utilizados derivados do poli(alquilcianoacrilato) (PACA). Os fármacos encapsulados, por este método, foram a doxorrubicina (Némati *et al.*, 1996), a lidocaína (Gulsen e Chauhan, 2004) e a ampicilina (Seijo *et al.*, 1990), entre outros. Além dos PACA, surgiu um outro polímero alternativo, derivado do poli(dialquilmetilideno), em que o grupo ciano foi substituído pelo grupo alquiloxicarbonilo, que é menos reactivo na presença de grupo hidróxido iniciador (Lescure *et al.*, 1991). Um dos fármacos encapsulados, por este último polímero, foi a primaquina (Mbela *et al.*, 1992). Mais recentemente, este método foi aplicado na produção de nanopartículas de látex (Sajjadi, 2007) .

1.2.1.2 Polimerização interfacial de monómeros

Este método utiliza derivados do PACA como polímeros base para a preparação de nanopartículas. Até ao momento, foram já usados o PECA (Watanasirichaikul *et al.*, 2000), o poli(isobutilcianoacrilato) (PIBCA) (Arahamian *et al.*, 1987; Lambert *et al.*, 2000) e o poli(isohexilcianoacrilato) (PIHCA) (Lenaerts *et al.*, 1995). Os monómeros de cianoacrilato e o fármaco ou substância a encapsular são dissolvidos primeiramente numa mistura de óleo e álcool absoluto (Al Khouri Fallouh *et al.*, 1986). Esta mistura sofre extrusão através de uma agulha para uma solução aquosa, com ou sem etanol (ICH, classe 3) ou acetona (ICH, classe 3) contendo um agente emulsivo. As nanopartículas, neste caso nanocápsulas, formam-se espontaneamente através da polimerização dos monómeros, após contacto com os iões

iniciadores presentes na água. A suspensão coloidal resultante é, depois, concentrada por evaporação sob vácuo. As vantagens da polimerização interfacial são as elevadas EE e a formação *in situ* de uma membrana polimérica, invólucro, nas nanocápsulas. A grande desvantagem reside na utilização de solventes orgânicos como fase externa. Além disso, a eliminação desses solventes e a reposição de água representam um consumo grande de tempo e um procedimento de difícil execução (Allémann *et al.*, 1993a). Alguns exemplos de fármacos encapsulados com sucesso por este método foram: a insulina (Damgé *et al.*, 1988; Watnasirichaikul *et al.*, 2000), a calcitonina (Lowe e Temple, 1994), a ovalbumina (Krauel *et al.*, 2005), o octreótido (Damgé *et al.*, 1997a), a darodipina (Hubert *et al.*, 1991), a indometacina (Gürsoy *et al.*, 1989; Ammoury *et al.*, 1991) e outros compostos fotossensíveis utilizados na terapia tumoral fotodinâmica como, por exemplo, as ftalocianinas (Lenaerts *et al.*, 1995). Para a encapsulação de fármacos ou outras substâncias muito hidrossolúveis foi proposto outro método mais simples e com menor toxicidade (Vranchx *et al.*, 1996a; Vranchx *et al.*, 1996b). O produto final tratava-se de uma suspensão de nanocápsulas em Miglyol[®] e as EE obtidas alcançaram valores de 50% e 30% para nanocápsulas pequenas e grandes, respectivamente (Allémann *et al.*, 1998).

1.2.2. Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados ou macromoléculas

Com excepção dos PACA e dialquilmetilidenos, a maioria dos monómeros utilizados em reacções de polimerização são considerados de baixo grau de biodegradabilidade. Por outro lado, os processos de eliminação dos compostos residuais (monómeros, agentes emulsivos e oligómeros) envolvidos na preparação de nanopartículas são de difícil execução. Por isso mesmo, considera-se que a utilização de polímeros pré-formados apresenta vantagens tecnológicas, relativamente aos processos anteriormente descritos.

1.2.2.1 Polímeros pré-formados sintéticos por emulsão/evaporação do solvente

Este método envolve dois passos principais: o primeiro, engloba a emulsificação, sob elevada agitação, do polímero dissolvido numa solução orgânica numa fase aquosa e, o segundo, envolve a evaporação do solvente do polímero por aumento de temperatura, sob pressão reduzida ou agitação contínua. O solvente é então eliminado e o polímero precipita, formando as nanopartículas, tal como mostra a Figura I-2.

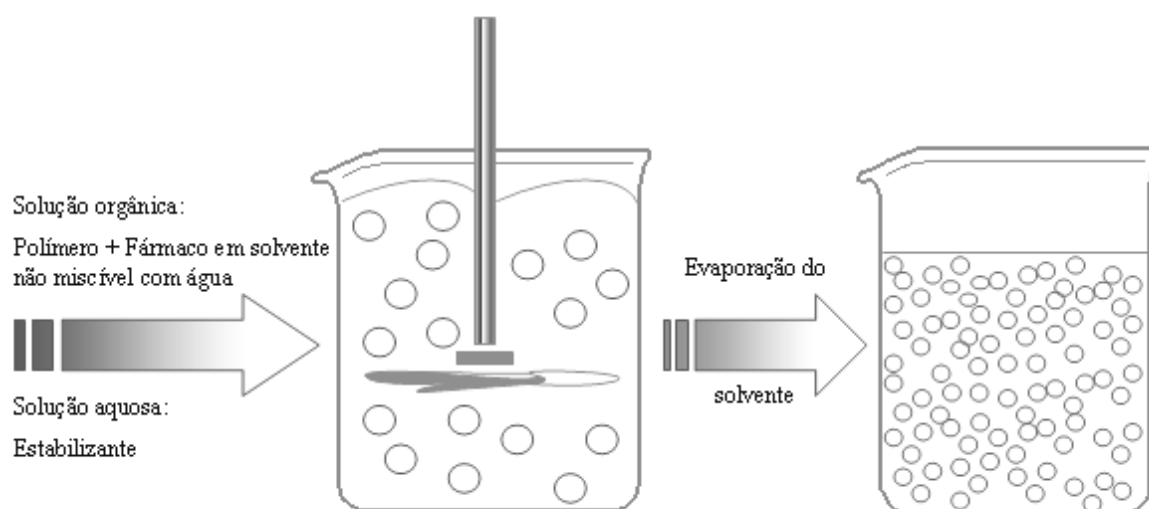


Figura I-2. Esquema ilustrativo da preparação de nanopartículas através do método de emulsificação/evaporação do solvente.

Os polímeros frequentemente utilizados são o ácido poliláctico (PLA) (Gurny *et al.*, 1981; Ueda e Kreuter, 1997; Zhang *et al.*, 2006b), o ácido poli(láctico-glicólico) (PLGA) (Tabata e Ikada, 1989; Dong e Feng, 2005; Mei *et al.*, 2007), a etilcelulose (Bodmeier e Chen, 1990), a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Gref *et al.*, 1994; Kumar, 2000; Lemarchand *et al.*, 2006), o PACA (Li *et al.*, 2001b) e o poli(β -hidroxibutirato) (Koosha *et al.*, 1987; Koosha *et al.*, 1989). Uma desvantagem associada a este método é o facto de ser aplicado a fármacos, na sua maioria, lipossolúveis. Exemplo de fármacos encapsulados por este método: toxina tetânica (Tobío *et al.*, 1998), testosterona (Gurny *et al.*, 1981), loperamida (Ueda e Kreuter, 1997; Ueda *et al.*, 1998), praziquantel (Mainardes e Evangelista, 2005), ciclosporina A (Sánchez *et al.*, 1993; Jaiswal *et al.*, 2004), ácidos nucleicos (Prabha *et al.*, 2002), a indometacina (Bodmeier e Chen, 1990) e, curiosamente, a albumina (Landry *et al.*, 1996).

1.2.2.2 Polímeros pré-formados sintéticos por deslocação do solvente e deposição interfacial

A deslocação do solvente e a deposição interfacial são métodos muito similares, baseados na emulsificação espontânea da fase interna orgânica contendo o polímero dissolvido na fase externa aquosa, como mostra a Figura I-3. Contudo, o método de deslocação do solvente produz nanoesferas ou nanocápsulas, enquanto a deposição interfacial produz, exclusivamente, nanocápsulas.

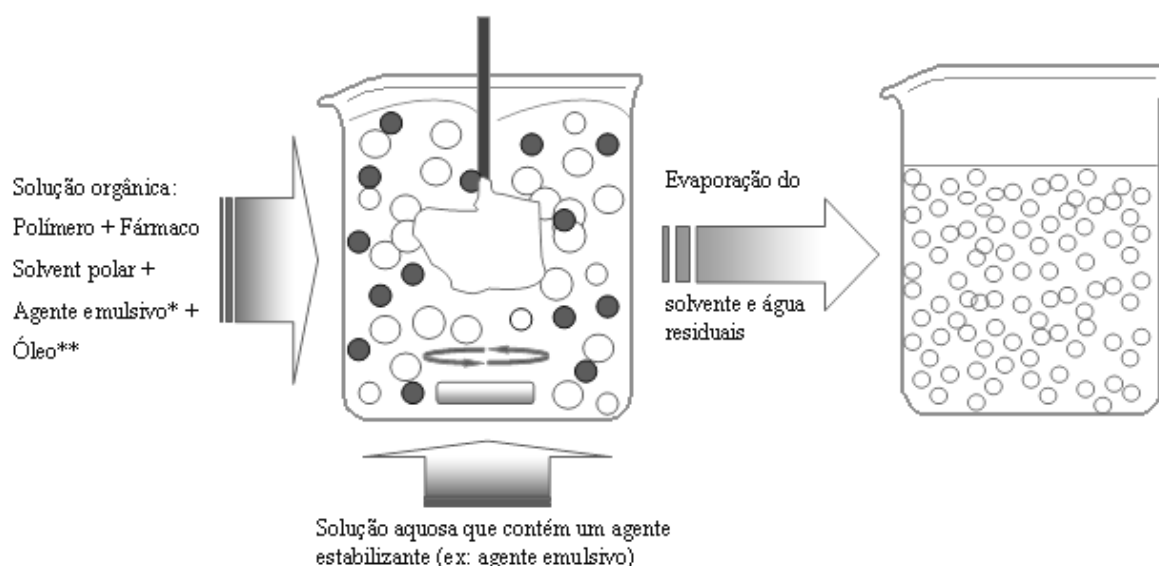


Figura I-3. Esquema ilustrativo dos métodos de deposição interfacial e deslocação do solvente.*Agente emulsivo opcional e **componente na deposição interfacial. Nota: Na deposição interfacial, o polímero é dissolvido simultaneamente com o fármaco numa mistura do solvente.

O método de deslocação do solvente envolve a precipitação do polímero pré-formado dissolvido na fase orgânica e a sua difusão para a fase aquosa, na presença ou não de um agente emulsivo (Fessi *et al.*, 1989; Barichello *et al.*, 1999; Galindo-Rodriguez *et al.*, 2004; Ganachaud e Katz, 2005). O polímero, geralmente PLA, é dissolvido num solvente hidrossolúvel de polaridade intermédia. Esta solução é injectada numa fase aquosa sob agitação, contendo um agente emulsivo como estabilizante. A deposição do polímero na interface da água e do solvente orgânico provoca uma difusão rápida do solvente e leva à formação instantânea de uma suspensão coloidal (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). No sentido de facilitar a formação da suspensão coloidal, a etapa de separação é, normalmente,

executada com um solvente totalmente miscível com a suspensão coloidal, mas não-solvente do polímero (Vauthier *et al.*, 2003). O método de deslocação do solvente permite a formação de nanocápsulas, quando é incorporada na fase orgânica uma quantidade reduzida de óleo não tóxico (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Considerando o núcleo das nanocápsulas de natureza oleosa, é possível obter uma encapsulação eficaz de fármacos ou de outras substâncias de características lipofílicas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). A utilidade desta técnica é enorme, mas é limitada a solventes hidrossolúveis. Além disso, este método encontra-se associado a uma certa instabilidade desses mesmos solventes hidrossolúveis (Dimitrova *et al.*, 1988). Em alternativa, são utilizadas misturas de acetona/diclorometano para facilitar a dissolução e melhorar a encapsulação. No entanto, o diclorometano (ICH, classe 2) além de ser considerado tóxico é também responsável pelo aumento da granulometria das nanopartículas (Wehrle *et al.*, 1995). Em suma, a grande dificuldade deste método relaciona-se com a escolha do sistema fármaco/polímero/solvente/não-solvente, uma vez que o solvente e o não-solvente deverão ser miscíveis. Este método tem sido utilizado na preparação de nanopartículas de PLA (Némati *et al.*, 1996; Musumeci *et al.*, 2006), PLGA (Barichello *et al.*, 1999; Musumeci *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2006), PCL (Molpeceres *et al.*, 1996; Piñón-Segundo *et al.*, 2006; Shah e Amiji, 2006), poli(metilviniléter-co-maleico-anidrido) (Arbós *et al.*, 2002; Irache *et al.*, 2005) e ciclodextrinas (Memisoglu *et al.*, 2003).

A deposição interfacial é um processo de produção de nanocápsulas; contudo, não é baseado numa técnica de polimerização, mas sim, numa emulsificação/solidificação. Neste método, é introduzido um quinto composto, podendo este último ser de natureza oleosa que deverá ser miscível com o solvente, mas imiscível com a mistura. O polímero deposita-se na interface formada pelas gotículas de óleo finamente dispersas, formando as nanocápsulas. Normalmente, é utilizada uma solução aquosa como fase externa. A grande diferença relativamente ao método anterior é que o polímero é dissolvido simultaneamente com o fármaco numa mistura de solvente (benzoato de benzilo, acetona e fosfolípidos) (Seijo *et al.*, 1990). Esta mistura é injectada lentamente e sob agitação num meio aquoso, resultando a deposição do polímero sob a forma de nanocápsulas de dimensões da ordem dos 230 nm

(Fessi *et al.*, 1989; Ammoury *et al.*, 1990; Ammoury *et al.*, 1991). A deposição do polímero ocorre na interface água/solvente (Ammoury *et al.*, 1991).

1.2.2.3 Polímeros pré-formados sintéticos por emulsificação/difusão do solvente

No método de emulsificação/difusão do solvente, o polímero é dissolvido num solvente parcialmente hidrossolúvel como, por exemplo, o carbonato de propileno mas saturado com água para assegurar o equilíbrio termodinâmico de ambos os líquidos. Para que ocorra a precipitação do polímero e a consequente formação de nanopartículas, é necessário promover a difusão do solvente disperso através da diluição de um excesso de água, quando o solvente orgânico é parcialmente miscível com água, ou de qualquer outro solvente orgânico. Subsequentemente, a fase saturada de polímero-água-solvente é emulsionada numa solução aquosa contendo um estabilizante, levando à difusão do solvente para a fase externa. Dessa forma, poderão resultar nanoesferas ou nanocápsulas, de acordo com a razão óleo-polímero. Finalmente, o solvente é eliminado por evaporação ou filtração. O procedimento encontra-se ilustrado na Figura I-4.

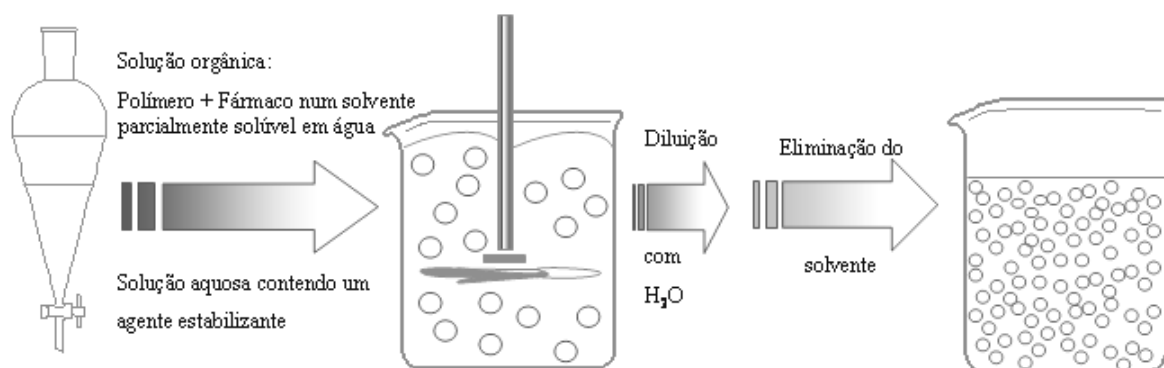


Figura I-4. Esquema ilustrativo do método de emulsificação/difusão do solvente.

Esta técnica apresenta vantagens tecnológicas, nomeadamente a simplicidade do processo, a elevada reprodutibilidade, a facilidade de transposição de escala e a distribuição granulométrica unimodal. As desvantagens residem na eliminação de grandes volumes de

água da suspensão e na possibilidade de perda do fármaco hidrossolúvel para a fase externa durante a emulsificação, reduzindo a EE. Este método é eficiente na encapsulação de fármacos lipofílicos, uma vez que a perda de fármaco durante a emulsificação é insignificante. Vários fármacos têm sido encapsulados pelo método de emulsificação/difusão do solvente, tais como: a mesotetra(hidroxifenil)-porfirina (Konan *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2004), a ciclosporina A (Italia *et al.*, 2007), a indocianina (Saxena *et al.*, 2004) e a doxorrubicina (Yoo *et al.*, 1999) em nanopartículas de PLGA; o ADN plasmídeo (Perez, 2001) e a cumarina (Lu *et al.*, 2005) em nanopartículas de PLA e, finalmente, a ciclosporina A em nanopartículas de gelatina e glicolato de sódio (El-Shabouri, 2002).

1.2.2.4 Polímeros pré-formados sintéticos por *salting-out*

O método *salting-out* consiste na separação de um solvente hidrossolúvel de uma fase aquosa através do efeito *salting-out*. Este processo pode ser considerado uma variante do método de emulsificação/difusão do solvente. O polímero e o fármaco a encapsular são, inicialmente, dissolvidos num solvente como, por exemplo, a acetona, e são, subsquentemente, emulsionados num gel aquoso contendo o agente de *salting-out* e um estabilizante coloidal (por exemplo a hidroxietilcelulose). Esta emulsão O/A (oléo em água) é diluída com um volume de água suficiente para promover a difusão da acetona para a fase aquosa, induzindo a formação de nanopartículas. Este agente *salting-out* poderá ser um electrólito, nomeadamente o cloreto de magnésio, cloreto de cálcio ou acetato de magnésio, ou um não electrólito, como seja a sacarose. Por fim, quer o solvente quer o agente *salting-out* são eliminados por filtração cruzada (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

Este método foi utilizado na preparação de nanoesferas tendo sido obtida uma elevada EE. Pode ser aplicado na encapsulação de fármacos termolábeis e apresenta uma grande facilidade de transposição de escala. Entre os polímeros usados referem-se o PLA (Cirstoiu-Hapca *et al.*, 2007), o PLGA (Eley e Mathew, 2007), a etilcelulose (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998) e o ácido poli(metacrílico) (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). As grandes desvantagens deste método centram-se na aplicação exclusiva a fármacos lipofílicos e

nos processos de lavagem exaustiva e de eliminação dos solventes (Couvreur *et al.*, 1995). Os passos preparativos deste método encontram-se ilustrados na Figura I-5.

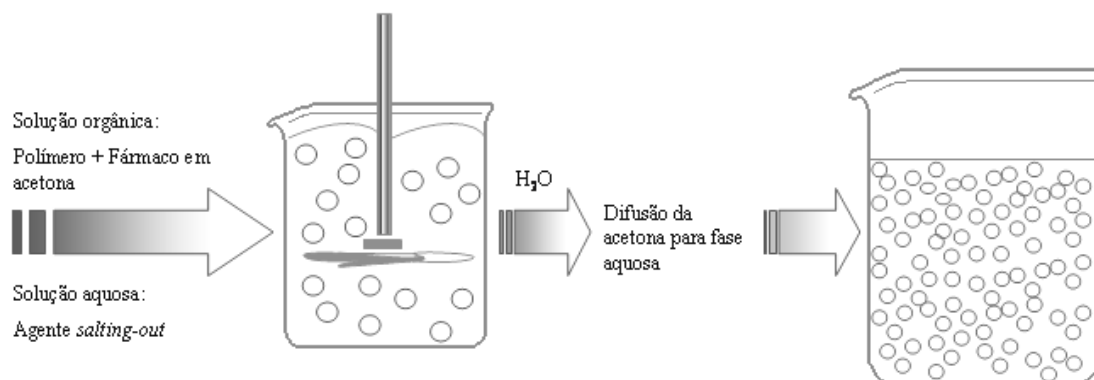


Figura I-5. Esquema ilustrativo do método de *salting-out* para a preparação de nanopartículas.

1.2.2.5 Polímeros pré-formados ou macromoléculas de origem natural

Nanopartículas de albumina

Entre vários métodos de preparação de nanopartículas de albumina, existem dois deles que são mais utilizados para a preparação de nanopartículas de albumina: térmico e químico com formação de emulsões. Encontram-se descritas, na literatura, variantes destas mesmas técnicas (Patil, 2003). No primeiro método, as nanopartículas de albumina são preparadas através da homogeneização de uma fase oleosa que contém gotículas de albumina que é estabilizada termicamente por elevação da temperatura de 175 para 180°C, durante 10 min (Patil, 2003). Esta mistura é sujeita a um processo de arrefecimento e diluída com éter etílico (ICH, classe 3) para reduzir a viscosidade da fase oleosa, de forma a permitir a rápida centrifugação e recuperação das nanopartículas.

Um exemplo de fármaco encapsulado em nanoesferas de albumina foi a progesterona (Luppi *et al.*, 2005). No entanto, como facilmente se percebe, esta técnica não é aplicável a fármacos termolábeis. Então, Wider *et al.* (Widder *et al.*, 1979) propôs como alternativa um

método com condições menos agressivas, o método químico. O passo da emulsificação é realizado a 25°C e, em seguida, promove-se a desnaturação da albumina através da ressuspensão das partículas em éter dietílico (ICH, classe 3) ao qual foram adicionados contendo agentes de *cross-linking*, tais como 2,3-butadieno. As partículas são, então, recuperadas por centrifugação e secas por liofilização. Com este método, observou-se que a libertação do fármaco encapsulado é mais rápida do que com o tratamento térmico e o passo de eliminação de solventes é, francamente, mais difícil. Surgiram, então, outras variantes deste método (Marty *et al.*, 1978; Longo *et al.*, 1982; Langer *et al.*, 2003; Arnedo *et al.*, 2004), mas o passo da eliminação dos solventes continuou a ser uma desvantagem. Exemplos de fármacos e outras substâncias encapsulados em nanopartículas de albumina: a azidotimidina (Mishra *et al.*, 2006), o ganciclovir (Merodio *et al.*, 2001), o interferão gama (Segura *et al.*, 2005), os oligonucleótidos (Arnedo *et al.*, 2002; Arnedo *et al.*, 2004) ou outras substâncias como, por exemplo, o rosa de bengal (Lin *et al.*, 2001).

Nanopartículas de gelatina

Neste método, contrariamente ao método térmico anterior, recorre-se a temperaturas baixas, em que a solução de gelatina é submetida a um banho de gelo. As nanopartículas solidificadas são, depois, filtradas, lavadas e sujeitas a *cross-linking* com formaldeído (ICH, classe 2) (Yoshioka *et al.*, 1981). Esta técnica permite a encapsulação de fármacos que sejam sensíveis à temperatura; contudo, a possibilidade de ocorrência de ligações covalentes entre os fármacos e a gelatina pode constituir uma desvantagem. Para além disso, pelo facto de serem utilizados agentes de reticulação, a granulometria das nanopartículas resultantes é, consideravelmente, superior. Por último e como facilmente se percebe, o agente de *cross-linking* poderá condicionar a formulação resultante devido à sua toxicidade. Por tudo isto, este método de preparação das nanoesferas tem vindo a ser colocado de parte.

Nanopartículas de alginato

A preparação de nanopartículas de alginato foi, pela primeira vez, realizada com soluções muito diluídas de alginato e de sais de cálcio, pelo método gelificação ionotrópica (Rajaonarivony *et al.*, 1993; Aynié *et al.*, 1999). Os tipos de fármacos encapsulados foram, exclusivamente, oligonucleótidos *antisense* (Rajaonarivony *et al.*, 1993; Aynié *et al.*, 1999). Atualmente, a gama de fármacos encapsulados é mais vasta como, por exemplo, fármacos convencionais, entre os quais se encontram: a rifampicina (Zahoor *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006), a isoniazida (Zahoor *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006), a pirazinamida (Zahoor *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006), o etambutol (Ahmad *et al.*, 2006), a doxorubicina (Chavanpatil e Khair, 2007), ou outros fármacos como, por exemplo, o ADN (Douglas e Tabrizian, 2005) ou mesmo outras substâncias tais como o azul de metileno (De e Robinson, 2003) ou a rodamina (Chavanpatil e Khair, 2007).

Nanopartículas de quitosano

As nanopartículas de quitosano têm vindo a ser preparadas para a encapsulação de fármacos, tais como: calcitonina (Prego *et al.*, 2006a), toxinas (Soppimath *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2004), citostáticos (Janes *et al.*, 2001), albumina bovina (Chen *et al.*, 2007), hemoglobina (Chen *et al.*, 2007), insulina (Ma *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2006; Jintapatanakit *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007), ciclosporina A (De Campos *et al.*, 2001), doxorubicina (Janes *et al.*, 2001), ovalbumina (Amidi *et al.*, 2006), mitoxantrona (Lu *et al.*, 2006) e ácidos nucleicos (Mao *et al.*, 2001; Mansouri *et al.*, 2004).

Os métodos propostos para a preparação de nanopartículas de quitosano baseiam-se na formação espontânea de complexos entre o quitosano e polianiões como, por exemplo, o tripolifosfato (Calvo *et al.*, 1997) ou sulfato de dextrano (Sarmiento *et al.*, 2007) ou na formação de uma emulsão (Tokumitsu *et al.*, 1998). Este último método apresenta a

desvantagem de utilização de solventes orgânicos de difícil remoção face ao método anterior (Vauthier e Couvreur, 2000).

Nanopartículas de agarose

Nanopartículas de agarose têm sido preparadas para encapsular proteínas e péptidos (Wang *et al.*, 1995; Wang e Wu, 1997). O método mais comum envolve a formação de uma emulsão à temperatura ambiente, tal como mostra a Figura I-6. A gelificação da agarose é induzida pela diluição da emulsão com óleo de milho arrefecido a 5°C e sob agitação.

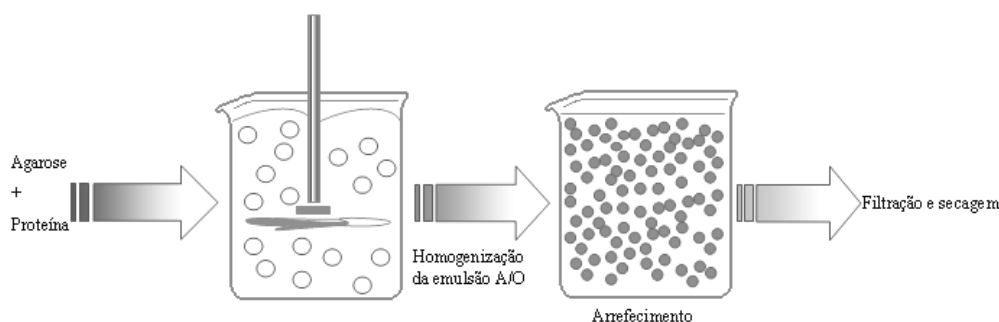


Figura I-6. Esquema ilustrativo da preparação das nanopartículas de agarose pelo método de emulsificação/gelificação por arrefecimento.

1.2.2.6 Dessolvatação de macromoléculas

Outra tecnologia aplicável a uma vasta gama de macromoléculas baseia-se na dessolvatação através da manipulação da carga eléctrica ou do pH ou através da acção de um agente que promove a dessolvatação (etanol ou soluções inorgânicas de sais). A grande vantagem deste método reside na aplicação a fármacos termolábeis, uma vez que não requer temperaturas elevadas (Ibrahim *et al.*, 1992). Neste método, podem ser utilizadas proteínas como material encapsulador, nomeadamente a albumina bovina (Marty, 1977), a albumina humana (Weber *et al.*, 2000; Dreis *et al.*, 2007; Kreuter *et al.*, 2007; Mo *et al.*, 2007), a

caseína (Marty, 1977) e a gelatina (Marty, 1977; Vandervoort e Ludwig, 2004; Zillies e Coester, 2004; Zwioerek *et al.*, 2004). Este processo oferece a vantagem de poder produzir nanopartículas directamente a partir da suspensão aquosa, mas a utilização de compostos potencialmente tóxicos como, por exemplo, o glutaraldeído, condiciona logicamente a sua aplicação. Têm sido utilizadas variantes deste método mas, no entanto, o rendimento de produção de nanopartículas é baixo, comparativamente com outras técnicas (El-Samaligy e Rohdewald, 1983).

1.2.3. Técnicas de nebulização

Algumas das técnicas anteriormente descritas são complexas e apresentam uma baixa EE (Caliceti *et al.*, 2004). Além disso, podem conduzir a uma degradação ou desnaturação do fármaco, ou mesmo, a sua não libertação (Caliceti *et al.*, 2004). Por outro lado, os produtos finais podem possuir elevados teores de solventes residuais (Caliceti *et al.*, 2004). Os métodos baseados em técnicas supercríticas poderão ser instrumentos interessantes na preparação de nanopartículas (Wang *et al.*, 2004). Na tecnologia supercrítica, o fármaco e o polímero são solubilizados num fluido supercrítico e a solução obtida é forçada a passar por uma agulha. O fluido supercrítico é evaporado e as partículas precipitam. O método é livre de solventes e apresenta excelentes propriedades tecnológicas e biofarmacêuticas para os fármacos peptídicos. Segundo este método, foram preparadas nanopartículas de PLA com polietilenoglicol (PEG) com insulina (Elvassore *et al.*, 2001). Contudo, neste método são necessárias pressões elevadíssimas e, em muitas situações, observam-se alguns problemas na dissolução de compostos fortemente polares no solvente supercrítico.

1.3. Armazenamento das nanopartículas e sua estabilidade

Na nanotecnologia existe uma série de requisitos aos quais as nanopartículas, sob a forma de produto final, devem obedecer. Em primeiro lugar, as nanopartículas devem ser

livres de impurezas. O grau de purificação depende da aplicação final das nanopartículas. Os processos de purificação mais comuns são: filtração em gel, ultracentrifugação, diálise e, muito recentemente, a filtração cruzada. Outro requisito essencial para o produto final diz respeito à esterilidade da formulação, especialmente quando se destina à administração parentérica. A escolha do agente esterilizante depende das características físico-químicas do produto final. Finalmente, as nanopartículas deverão ser de fácil armazenamento e administração.

As nanopartículas, em solução aquosa ou nanoemulsões, constituem um sistema físico relativamente estável, contrariamente a outro tipo de formulações, tais como os lipossomas (Soppimath *et al.*, 2001). Essa estabilidade é devida à sua natureza coloidal, entre outros factores. Geralmente, uma suspensão coloidal é estável e não tende a separar-se mas existem vários factores que podem condicionar essa estabilidade. Por outro lado, os fenómenos de aglomeração de nanopartículas são frequentes. Para prevenir a precipitação das nanopartículas é, por vezes, necessário adicionar outros compostos.

Existem algumas estratégias para aumentar a estabilidade das nanopartículas. A liofilização é uma dessas estratégias (Abdelwahed *et al.*, 2006). Na liofilização, o material a liofilizar é congelado abaixo do seu ponto eutético e, depois, é sujeito a um processo de desidratação sob vácuo através de uma rápida sublimação do solvente congelado. Recolhe-se, então, um produto sólido, geralmente fino, com elevada área de superfície, livre de solvente e com facilidade de re-hidratação (Schoug *et al.*, 2006). Normalmente, o processo de congelação é o passo mais agressivo da liofilização. Na maioria dos casos, as nanopartículas liofilizadas são facilmente dispersíveis em soluções aquosas. Em alguns sistemas, a facilidade de redispersão depende do processo de produção das nanopartículas. A ultrasonicação pode ser aplicada para assegurar a completa redispersão das nanopartículas. Geralmente, para assegurar a redispersibilidade, para permitir a vitrificação da suspensão durante o processo de congelação e para impedir a cristalização da suspensão líquida utilizam-se compostos designados por crioprotectores. Os crioprotectores podem ser substâncias de baixo PM (polióis, dimetilsulfóxido (DMSO), etc.) ou macromoléculas como, por exemplo: manitol, trealose, glucose, glicerol, sorbitol, PEG, dextrano, lactose, polivinilpirrolidona, (Esquisabel

et al., 1997; Abdelwahed *et al.*, 2006). É igualmente importante a presença de outros excipientes durante a liofilização, tais como: os correctores de isotonicidade (por exemplo a glucose) ou outros estabilizantes (por exemplo o dextrano).

Finalmente, as nanopartículas podem ser acondicionadas em frascos de vidro ou de plástico, a temperaturas abaixo de 6°C ou mesmo à temperatura ambiente. Pode ser necessário, em certas situações, o recurso a sistemas exsiccantes.

Em suma, os métodos de preparação das nanopartículas têm evoluído em três aspectos essenciais: procura de reagentes cada vez menos tóxicos e o recurso a um método de produção das nanopartículas onde se obtenham elevadas EE do fármaco e, por último, a simplificação das técnicas de produção, recuperação e secagem das nanopartículas, para que todo o processo seja economicamente sustentável e facilmente transponível à escala industrial. Na Tabela I-1 encontram-se alguns exemplos de nanopartículas, métodos de produção, polímeros envolvidos e a granulometria obtida.

Tabela I-1. Principais métodos de preparação de nanopartículas poliméricas, fármacos encapsulados e respectivas granulometrias obtidas.

Método/polímero	Fármaco	Granulometria (nm)	Referências
Nanopartículas produzidas a partir de reacções de polimerização			
Polimerização por emulsão			
<i>Com fase externa aquosa</i>			
Poli(metilmetacrilato)	<i>V. Influenza</i>	130	(Kreuter <i>et al.</i> , 1976)
Poli(metilmetacrilato)	Doxorrubicina	300	(Rolland <i>et al.</i> , 1986)
Copolímeros			
PACA			
PMCA	Vinblastina	200-300	(Couvreur <i>et al.</i> , 1980a)
PECA	Insulina	< 500	(Radwan e Aboul-Enein, 2002)
PBCA	Progesterona	250	(Lee <i>et al.</i> , 1986)
PIBCA	Ampicilina	40-80	(Kubiak <i>et al.</i> , 1988)
	Anticorpos	120	(Kubiak <i>et al.</i> , 1988)
	Factor da hormona do crescimento	140-170	(Grangier <i>et al.</i> , 1991)
PHCA	Vincamina	200	(Maincent <i>et al.</i> , 1986)
PIHCA	Ampicilina	30-80	(Némati <i>et al.</i> , 1996)
	Doxorrubicina	300	(Mbela <i>et al.</i> , 1992)

Método/polímero	Fármaco	Granulometria (nm)	Referências
<i>Com fase externa orgânica</i>			
Ácido poliacrílico PACA	Enzimas	< 1000	(Ekman e Sjöholm, 1978)
	Triamcinolona	500	(Krause <i>et al.</i> , 1986)
	Fluoresceína	800-1000	(El-Samaligy <i>et al.</i> , 1986)
	Pilocarpina	300-600	(Harmia-Pulkkinen <i>et al.</i> , 1989)
Outros polímeros: PECA, PBCA, poliestireno, poli(vinilpiridina) e poliactoleína.			
Polimerização interfacial			
PECA	Insulina	~151	(Watnasirichaikul <i>et al.</i> , 2000)
PIBCA	Indometacina	220-240	(Gürsoy <i>et al.</i> , 1989; Ammoury <i>et al.</i> , 1991)
	Darodipina	150	(Hubert <i>et al.</i> , 1991)
	Insulina	150-300	(Damgé <i>et al.</i> , 1988)
	Calcitonina	< 1000	(Lowe e Temple, 1994)
	Octreótido	260	(Damgé <i>et al.</i> , 1997a)
PIHCA	Ftalocianinas	180	(Lenaerts <i>et al.</i> , 1995)
Outros polímeros: poliamidas, poli(fenilésteres) e poliuretanos.			
Nanopartículas obtidas após polímeros pré-formados ou macromoléculas sintéticos e semi-sintéticos			
Evaporação do solvente			
PLA	Testosterona	< 1000	(Landry <i>et al.</i> , 1996)
	Albumina	100 -120	(Landry <i>et al.</i> , 1996)
	Toxina tetânica	150	(Tobío <i>et al.</i> , 1998)
	Loperamida	~300	(Ueda e Kreuter, 1997)
PLGA	ADN	~100	(Prabha <i>et al.</i> , 2002)
	Ciclosporina A	~300	(Sánchez <i>et al.</i> , 1993)
Outros polímeros: PCL e poli(β -hidroxibutirato).			
Deslocação do solvente			
PLGA	Indometacina	~168	(Barichello <i>et al.</i> , 1999)
	Doxorrubicina	274	(Némati <i>et al.</i> , 1996)
	Ciclosporina A	~170	(Barichello <i>et al.</i> , 1999)
	Ácido valpróico	~166	(Barichello <i>et al.</i> , 1999)
	Cetoprofeno		
	Vancomicina	~167	(Barichello <i>et al.</i> , 1999)
	Insulina	< 190	(Barichello <i>et al.</i> , 1999)
		~105-170	(Barichello <i>et al.</i> , 1999)
PLA	Dexametasona	~300	(Fessi <i>et al.</i> , 1989)
	Vitamina K	~270	(Fessi <i>et al.</i> , 1989)
PCL	Ciclosporina A	~100-200	(Molpeceres <i>et al.</i> , 1996)
Outro polímero: poli(metil vinil éter co-maleico anidrido).			

Método/polímero	Fármaco	Granulometria (nm)	Referências
Deposição interfacial			
PLA	Indometacina	230	(Fessi <i>et al.</i> , 1989; Ammoury <i>et al.</i> , 1990; Ammoury <i>et al.</i> , 1991)
Salting-out			
PLA Outro polímero: etilcelulose.	Savoxepina	< 1000	(Allémann <i>et al.</i> , 1993b)
Emulsificação/ difusão do solvente			
PLGA	Porfirinas Doxorrubicina	117-118 < 1000	(Konan <i>et al.</i> , 2003) (Yoo <i>et al.</i> , 1999)
PLA Outro polímero: PCL.	Porfirinas ADN	125 < 300	(Konan <i>et al.</i> , 2003) (Perez, 2001)
Polímeros naturais			
Albumina	Doxorrubicina	200-1500	(Widder <i>et al.</i> , 1979)
Gelatina	Mitomicina C ADN	280 < 330	(Yoshioka <i>et al.</i> , 1981) (Kommareddy e Amiji, 2007)
Polissacáridos	Oligonucleótidos	<1000	(Rajaonarivony <i>et al.</i> , 1993; Aynié <i>et al.</i> , 1999)
	Doxorrubicina	< 1000	(Némati <i>et al.</i> , 1996)
	Toxinas	< 1000	(Soppimath <i>et al.</i> , 2001)
	Calcitonina	< 1000	(Illum <i>et al.</i> , 1994)
Dessolvatação			
Gelatina Outros polímeros: caseína e etilcelulose.	ADN	< 1000	(Zwiorek <i>et al.</i> , 2004)
Técnicas de nebulização			
PLA	Insulina	400-600	(Elvassore <i>et al.</i> , 2001)

1.4. Aplicação das nanopartículas poliméricas a fármacos peptídicos

A nanoencapsulação de fármacos peptídicos em partículas poliméricas tem atraído um vasto interesse na tecnologia farmacêutica, mas o seu desenvolvimento também tem fomentado a exploração de novos sistemas terapêuticos que, presentemente, desencadeiam

uma série de revoluções na área da tecnologia e, como consequência, um impressionante avanço tecnológico na terapia e diagnóstico de inúmeras doenças do século.

Os fármacos peptídicos têm vindo a atrair atenções, à medida que avançam os conhecimentos na área da fisiopatologia humana e da biotecnologia/síntese bioquímica porque intervêm, essencialmente, em todos os processos biológicos e reacções, caracterizando-se por uma elevada eficiência e potência. Contudo, a utilização de fármacos peptídicos na medicina é limitada, principalmente devido à baixa biodisponibilidade, resultado da sua fraca estabilidade à degradação proteolítica e hidrolítica, à baixa permeabilidade intestinal e ao tempo de semi-vida curto na circulação sistémica (Li *et al.*, 2001a). A maioria dos fármacos peptídicos devido à sua fraca absorção intestinal no tracto gastrintestinal (TGI) continua a ser administrada pelas vias parentéricas.

Devido às suas características de versatilidade, propriedades de libertação sustentada, granulometria sub-celular e biocompatibilidade com tecidos e células, as nanopartículas surgem como alternativas promissoras para a administração de fármacos peptídicos. Outra grande aplicação das nanopartículas reside na administração vectorizada através da adição de certos ligandos à superfície da nanopartícula, tais como a transferrina, a lectina ou a avidina (Nobs *et al.*, 2004). A secção seguinte descreve as principais e actuais aplicações das nanopartículas à administração de fármacos peptídicos, demonstrando um particular interesse pela administração oral. As outras vias de administração também constituem objecto de estudo do presente capítulo e serão referidos alguns exemplos de fármacos peptídicos encapsulados em nanopartículas poliméricas.

1.4.1. Considerações gerais de absorção oral

Comparativamente a outras vias de administração, a administração de péptidos por via oral oferece francas vantagens. Além de ser considerada uma via de administração não-invasiva e relativamente livre das complicações associadas às vias parentéricas, esta via é mais conveniente do ponto de vista do doente e apresenta maior facilidade de dosificação.

Existem diversos factores a ter em conta no desenvolvimento de formulações orais para péptidos, que se encontram resumidos na Figura I-7. As considerações são, normalmente, atribuídas à grande susceptibilidade de degradação, através das enzimas secretadas a nível do lúmen intestinal, enzimas associadas às membranas intestinais e às enzimas citosólicas, tal como ilustra a Figura I-8.

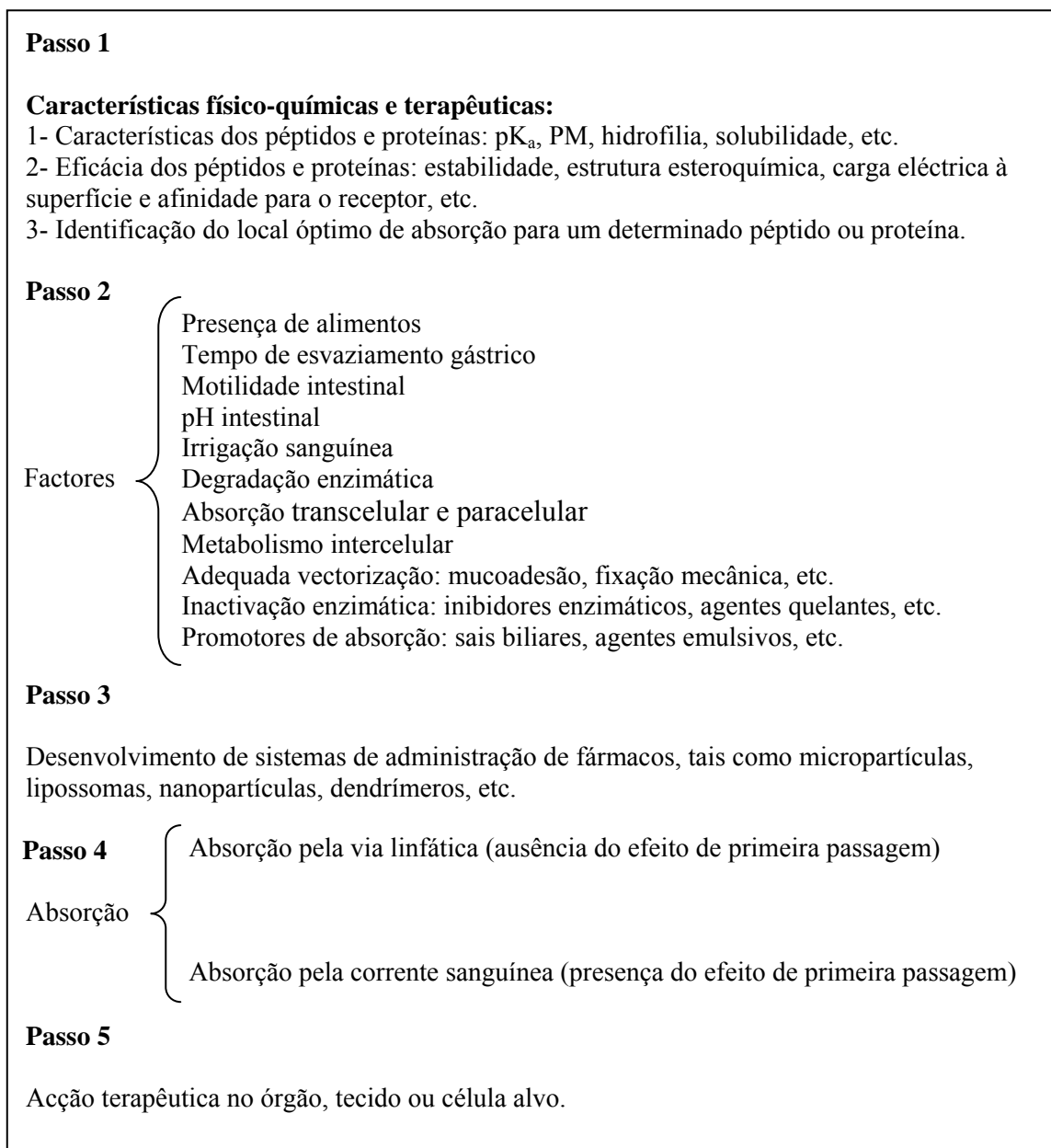


Figura I-7. Esquema representativo das considerações gerais na administração oral de péptidos e proteínas (adaptado de Dorkoosh *et al.*, 2002).

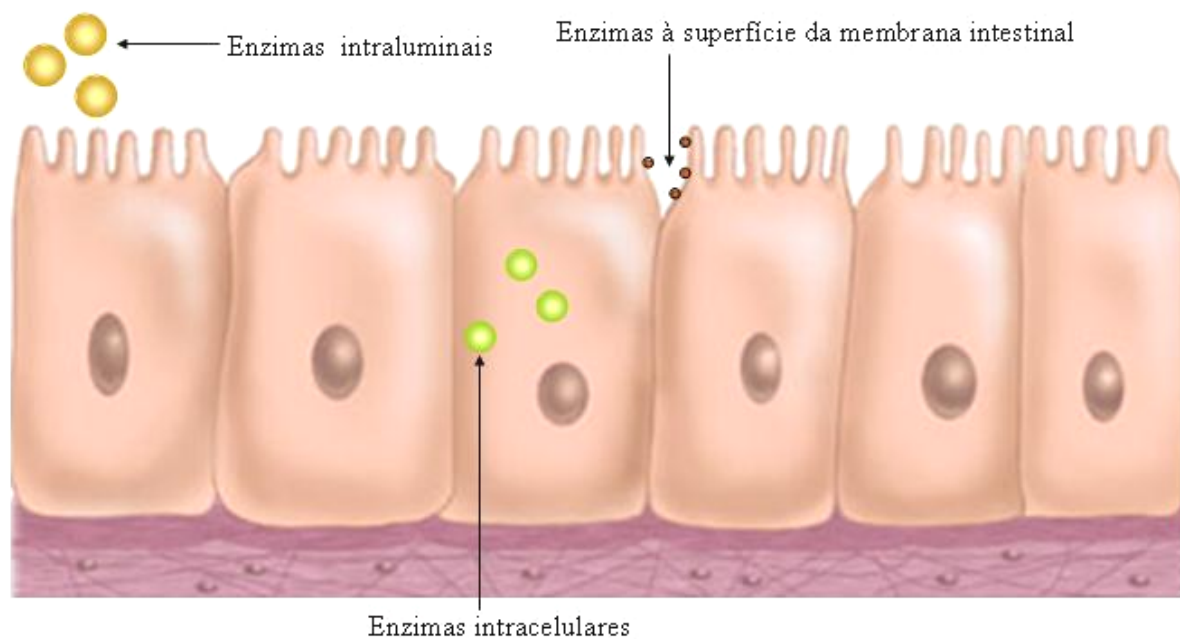


Figura I-8. Esquema ilustrativo da localização das enzimas presentes no TGI.

A proteólise inicia-se, geralmente, no estômago através da acção de uma família de proteases aspárticas designadas pepsinas (E.C. 3.4.23.1), que são mais activas num intervalo de pH 2 a 3 e tornam-se inactivas a um valor de pH superior a 5. A pepsina é, normalmente, responsável pela degradação da proteína em 10 a 20%. Quando as proteínas alcançam o duodeno, começam a actuar na digestão de proteínas outro tipo de enzimas. Estas enzimas incluem as serinas endopeptidases, tais como: a tripsina (E.C. 3.4.21.4), a α -quimiotripsina (E.C. 3.4.21.1), a elastase (EC 3.4.21.36) e as carboxipeptidases A (EC 3.4.17.1) e B (EC 3.4.17.2) (TenHoor e Dressman, 1992). Tal como evidencia a Figura I-8, as proteases associadas à mucosa intestinal estão localizadas a três níveis subcelulares dos enterócitos: no lúmen intestinal, na membrana intestinal e a nível intracelular (citoplasma e lisossomas) (TenHoor e Dressman, 1992). As proteases, na membrana e no citoplasma do enterócito, são muito importantes para a absorção dos péptidos e das proteínas. Por outro lado, as proteases tais como a tripsina, a α -quimiotripsina e outras proteases pancreáticas, podem ser adsorvidas do lúmen para a membrana do enterócito, colaborando, assim, na proteólise de oligopéptidos e proteínas (TenHoor e Dressman, 1992). Os péptidos que possuem o grupo N-terminal são os substratos preferidos pelas enzimas presentes nas membranas. As enzimas das membranas

hidrolisam, normalmente, tri- e tetrapéptidos, mas também péptidos com 2 a 10 aminoácidos. Especificamente, cerca de 60% da actividade proteolítica nos tripéptidos e 90% nos tetrapéptidos é localizada a nível das enzimas da membrana. Em contraste, as proteases citosólicas preferem di- e tripéptidos pequenos promovendo a sua hidrólise intracelular completa. A degradação intracelular de péptidos e proteínas pode também ocorrer após endocitose e captação por parte dos lisossomas e é, essencialmente, catalisada por catepsinas e pode envolver exopeptidases e endopeptidases (TenHoor e Dressman, 1992). Contrariamente a outros compostos, os péptidos e as proteínas são susceptíveis de degradação, em muitos locais, a nível do organismo. Por outro lado, o mesmo péptido ou proteína pode ser susceptível de degradação em mais de um sítio na molécula (TenHoor e Dressman, 1992).

Outra consideração igualmente importante para a degradação de péptidos e proteínas diz respeito à actividade metabólica da microflora existente no intestino delgado e grosso, especialmente, quando se trata da administração colónica de péptidos e proteínas. A microflora colónica é constituída por mais de 500 espécies, compreendo cerca de 10^{11} a 10^{12} bactérias por grama de conteúdo intestinal e, que são responsáveis por uma série de reacções, nomeadamente de descarboxilação, redução de ligações duplas e hidrólise de ésteres e amidas (Drasar e Hill, 1974).

O tipo de enzimas envolvidas na proteólise, as suas diferentes localizações ao nível do organismo e a multiplicidade de potenciais locais de degradação da molécula activa, sugerem que apenas uma pequena percentagem da dose inicial do péptido e proteína alcança, realmente, o local de acção.

Outra dificuldade no desenvolvimento de sistemas eficazes para administração oral de péptidos e proteínas está relacionada com a fraca permeabilidade intrínseca destes compostos através das membranas biológicas (TenHoor e Dressman, 1992). A tendência dos péptidos e proteínas para serem maiores que muitas outras moléculas limita a sua captação através dos poros intestinais. O seu tamanho no estado não aglomerado varia entre 0,6 e 10 kDa. No ser humano, a permeabilidade para moléculas pequenas, iões e água é maior no jejuno, intermédia no íleo e mais pequena no cólon (TenHoor e Dressman, 1992). O diâmetro do poro intestinal varia entre 8 e 16 Å e pode ser considerado um factor limitante para a absorção

intestinal de péptidos e proteínas (Zhou, 1994). O poro da mucosa pode ser modificado com promotores de absorção, tais como: agentes quelantes de cálcio, ácidos gordos ou agentes emulsivos (Hochman e Artursson, 1994). Outra consideração importante diz respeito à carga eléctrica à superfície da molécula. Devido à predominância de grupos carregados negativamente à volta dos poros intestinais, os compostos neutros ou catiónicos deverão atravessar os canais paracelulares mais facilmente do que os compostos aniónicos. Sabe-se que os aminoácidos e, portanto as proteínas, têm propriedades excepcionais de ácido-base. Os vinte α -aminoácidos padrão têm, pelo menos, dois grupos ácido-base. O valor de pK_a dos grupos carboxílicos é, aproximadamente, 2,2 e a valores de pH acima de 3,5 estes grupos encontram-se na forma de carboxilato. Todos os α -aminoácidos têm valores pK_a do grupo amina cerca de 9,4 e encontram-se sob a forma de iões amónio abaixo de pH 8,0. Dos vinte aminoácidos padrão, cinco têm cadeias laterais ionizadas. Os aminoácidos básicos, como a lisina, a arginina e a histidina, encontram-se carregados positivamente a pH fisiológico, enquanto os ácidos aspártico e glutâmico se encontram carregados negativamente, quando o pH se encontra acima de 3. Para além disso, os péptidos e as proteínas tendem a ser mais hidrofílicos do que a maioria das moléculas biológicas. Esta característica influencia a absorção intestinal de péptidos e proteínas através da difusão transcelular, a menos que as cargas sejam neutralizadas através de ligação par-ião. Com algumas excepções, os péptidos são relativamente insolúveis em lípidos e, mesmo que o gradiente de concentração seja favorável à sua absorção intestinal, a mesma não ocorre, devido à forte componente lipídica da barreira intestinal. Claramente, nem o tamanho, a carga eléctrica ou o carácter hidrofílico favorecem a passagem de péptidos e proteínas através da mucosa intestinal.

Ainda outra dificuldade associada ao desenvolvimento de formulações orais de péptidos e proteínas diz respeito à sua elevada solubilidade em água. A maioria dos métodos de nanoencapsulação baseia-se na afinidade do composto de interesse para a fase lipofílica de uma emulsão ou para o polímero, o que tem geralmente como consequência uma EE muito baixa (Couvreur e Puisieux, 1993).

Por outro lado, a instabilidade química dos péptidos e proteínas é outro factor a ter em conta na sua administração oral. A tendência para agregação, a sensibilidade à luz, calor,

humidade, pH, interações intermoleculares e interacção com excipientes são parâmetros que devem ser exaustivamente estudados, quando se pretende obter um sistema estável de nanopartículas contendo fármacos peptídicos (TenHoor e Dressman, 1992).

Além disso, muitos péptidos e proteínas são ainda susceptíveis ao metabolismo pré-sistémico com uma *clearance* rápida após absorção não limitada à extracção hepática, mas também à *clearance* por parte dos rins e do sangue (TenHoor e Dressman, 1992). Contrariamente a outros fármacos, os péptidos e as proteínas são igualmente susceptíveis à acção enzimática a nível da corrente sanguínea (Lee *et al.*, 1991).

Um outro obstáculo à administração oral de fármacos peptídicos diz respeito às barreiras físicas intestinais. Essas barreiras estão representadas, sumariamente, na Figura I-9. Para um determinado péptido ou proteína ser absorvido, deverá atravessar a barreira intestinal. Esta barreira compreende as paredes dos vasos linfáticos e sanguíneos, as camadas fosfolípidicas das membranas celulares e as junções intercelulares. A estrutura, a composição, a espessura, a área de superfície e o pH desta barreira são factores a ter em conta no desenvolvimento de formulações orais de péptidos e proteínas.

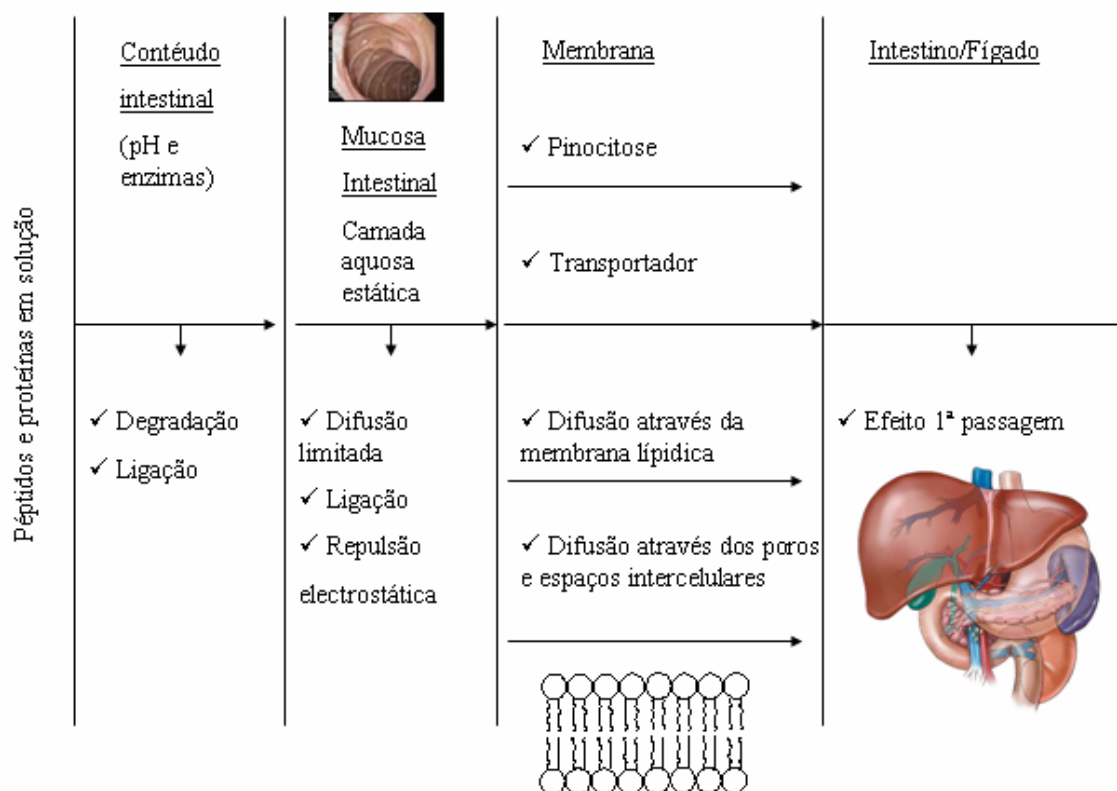


Figura I-9. Barreiras à absorção de peptídeos e proteínas quando administrados oralmente (adaptado de Davis, 1990).

Pelas razões expostas, diversas estratégias têm vindo a ser desenvolvidas no sentido de encontrar uma forma viável de administrar oralmente fármacos peptídicos. Lipossomas (Fukunaga *et al.*, 1991), emulsões (Matsuzawa *et al.*, 1995; Silva-Cunha *et al.*, 1997a), micropartículas (Couvreur e Puisieux, 1993; Allémann *et al.*, 1998; Morishita *et al.*, 1992b) e, em especial, as nanopartículas (Couvreur *et al.*, 1995; Panyam e Labhasetwar, 2003).

É descrito que as nanopartículas podem proteger os fármacos sensíveis das barreiras anteriormente descritas e aumentar a sua absorção através de uma optimização da sua interacção com o local de absorção na mucosa intestinal ou através da sua transposição directa para a circulação sistémica (Jaehere *et al.*, 1999). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a passagem das partículas através da mucosa intestinal, nomeadamente através da captação pelas placas de Peyer ou foliculos linfóides isolados (Eldridge *et al.*, 1990; Jani *et al.*, 1990; Michel *et al.*, 1991; Damgé *et al.*, 2000), através da captação intracelular (Kreuter

et al., 1989; Damgé *et al.*, 2000) ou através da captação intercelular/passagem paracelular (Aprahamian *et al.*, 1987; Damgé *et al.*, 2000) (Figura I-10). Entre estes, a captação pelas placas de Peyer aparece como sendo o mecanismo mais provável (Vauthier *et al.*, 2003). Contudo, existem alguns trabalhos descritos na literatura que contrariam a afirmação anterior (Florence, 1997; Jung *et al.*, 2000; Hussain, 2001). Apesar de ser necessário mais estudos sobre a passagem das partículas através da barreira intestinal, consegue retirar-se uma informação importante: a passagem intestinal de fármacos peptídicos encapsulados em nanopartículas é possível. A questão actual reside em saber a extensão dessa passagem particular através da barreira intestinal e, se essa extensão é compatível com os objectivos terapêuticos inicialmente propostos.

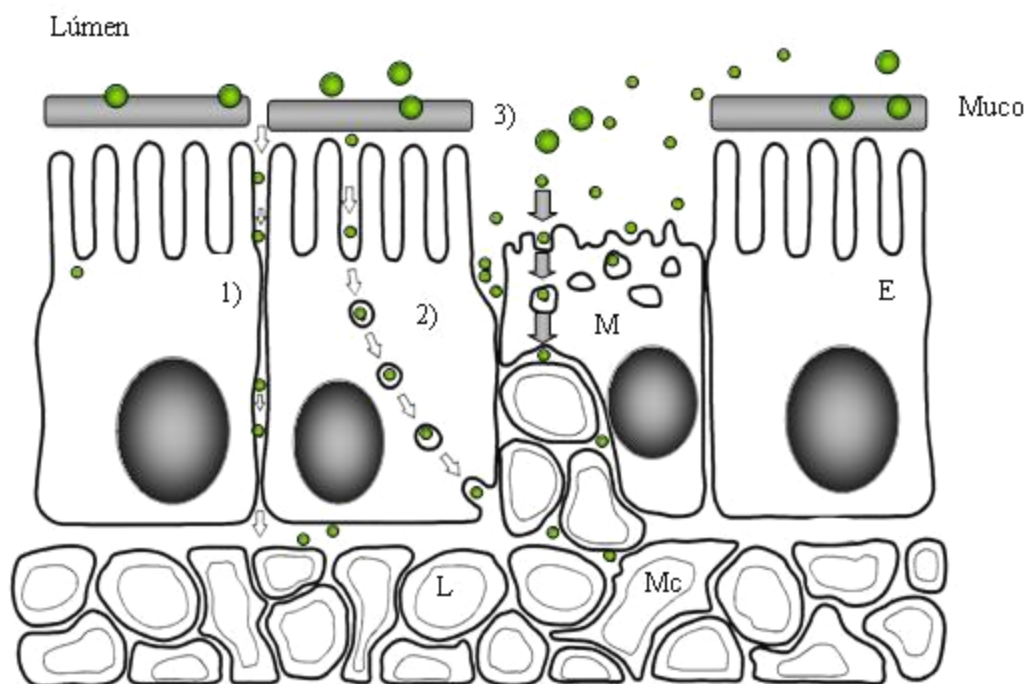


Figura I-10. Esquema do intestino, demonstrando os três mecanismos de absorção de partículas, nomeadamente a passagem intercelular/paracelular (1), a captação intracelular pelos enterócitos (2) ou a captação através das células M (3). Nota: As células M das placas de Peyer encontram-se representadas por M, os enterócitos por E, os linfócitos por L e os macrófagos por Mc (adaptado de Jung *et al.*, 2000).

1.4.2. Administração oral de fármacos encapsulados em nanopartículas

A administração oral, na qual o agente terapêutico é absorvido pelo TGI, é, sem dúvida, a via de administração mais desejável. Embora o seu sucesso permaneça limitado devido às barreiras descritas na secção anterior, as nanopartículas surgem como alternativas promissoras para transpor esses obstáculos. De uma forma muito sumária, as nanopartículas podem ser utilizadas como veículos orais para fármacos devido:

- Ao aumento da absorção intestinal de fármacos (Couvreur *et al.*, 1980b; Florence *et al.*, 1995);
- Ao prolongamento do tempo de residência dos fármacos no intestino (Damgé *et al.*, 2007);
- À vectorização de fármacos, nomeadamente na vacinação oral para os tecidos linfóides (Eldridge *et al.*, 1990; Jani *et al.*, 1990; Jani *et al.*, 1992a; Jani *et al.*, 1992b) e à vectorização de fármacos para redução de toxicidade (Espuelas *et al.*, 1997);
- À libertação controlada de fármacos (Hubert *et al.*, 1991; Allémann *et al.*, 1992);
- À redução da irritação da mucosa gástrica causada pelos fármacos (Fessi *et al.*, 1989; Ammoury *et al.*, 1991);
- Ao aumento da estabilidade dos fármacos no TGI (Grangier *et al.*, 1991; Roques *et al.*, 1992).

Na próxima secção apresentam-se alguns exemplos de fármacos peptídicos administrados por via oral através das nanopartículas.

1.4.2.1 Fármacos peptídicos encapsulados em nanopartículas

Insulina

A insulina é administrada por injeção subcutânea (s.c.) no tratamento da Diabetes *Mellitus*. Contudo, quando a insulina é injectada para a circulação sistémica expõe todos os tecidos à mesma concentração. Os músculos e os adipócitos respondem à dose de insulina administrada sem a monitorização hepática, uma vez que o fígado recebe, apenas, uma fracção da dose administrada. A exposição excessiva da vasculatura e outras células, nomeadamente musculares, faz com que a insulina injectada represente uma estimulação extra para o crescimento, para a divisão celular e outras respostas metabólicas que, de uma forma gradual, vão dando origem às complicações associadas à doença (Hirai *et al.*, 1978).

A administração oral da insulina tem vindo a ser investigada e múltiplas estratégias têm sido desenvolvidas, conforme se descreverá na próxima secção. Num dos primeiros trabalhos publicados, foram preparadas nanopartículas não poliméricas a partir de uma solução neutra de insulina, por um processo de dessolvatação seguida de um *cross-linking* com glutaraldeído (Oppenheim *et al.*, 1982). Mais tarde, a insulina foi encapsulada em vários polímeros, nomeadamente em PIBCA, segundo o método de polimerização interfacial (Al Khouri Fallouh *et al.*, 1986; Damgé *et al.*, 1988). A nanoencapsulação da insulina protegeu a proteína da actividade proteolítica, promoveu a absorção intestinal e conduziu a um efeito hipoglicémico prolongado (Aprahamian *et al.*, 1987; Pinto-Alphandary, 2003). Além disso, existem evidências experimentais que demonstram que as nanopartículas podem passar do lúmen do TGI para a circulação sistémica, através de uma passagem paracelular (Aprahamian *et al.*, 1987; Pinto-Alphandary, 2003).

Têm sido preparados vários tipos de nanopartículas, nomeadamente nanopartículas de PIBCA preparadas através do método de polimerização por emulsão (Mathiowitz *et al.*, 1997), nanopartículas de PLGA e ácido polifumárico preparadas através do método inversão de fases (Mathiowitz *et al.*, 1997), nanopartículas de PECA dispersas em microemulsões (Watnasirichaikul *et al.*, 2000), nanopartículas de PLA-PEG preparadas através do método de

nebulização (Gomez *et al.*, 1998), nanopartículas de quitosano preparadas através do método gelificação ionotrópica (Sullivan e Birkinshaw, 2004) e nanopartículas de PBCA preparadas através do método de polimerização (Sullivan e Birkinshaw, 2004). Os resultados, destes e outros estudos, encontram-se descritos na próxima secção.

Octreótido

O octreótido, um octapéptido sintético, é um análogo de longa duração de acção da somatostatina com capacidade de redução da produção de insulina e prolactina, em resposta aos estrogénios. A somatostatina é um tetrapéptido fisiológico secretado pelo hipotálamo e pelo TGI, e exerce múltiplas funções a nível biológico. Para além do seu efeito central inibidor de algumas hormonas, inibe outras substâncias endócrinas e exócrinas (insulina, glucagon, polipéptido pancreático, enzimas pancreáticas, etc.), inibe as respostas fisiológicas face à colecistoquinina e à secretina e reduz a motilidade intestinal e a circulação sanguínea. Contudo, o tempo semi-vida da somatostatina por via oral é muito curto, de forma que a alternativa que se propõe, presentemente, é a administração da somatostatina por via intravenosa. Em alternativa, foram preparadas nanopartículas de PACA, contendo octreótido para administração s.c. e oral. O octreótido apresentou um tempo semi-vida prolongado e vantagens biofarmacêuticas relativamente à somatostatina. Mais especificamente, num estudo onde foram preparadas nanocápsulas contendo octreótido e administradas oralmente a ratos tratados com estrogénios, os resultados experimentais demonstraram uma redução evidente da secreção de prolactina com um aumento dos níveis plasmáticos do octreótido, originando um efeito terapêutico eficaz e prolongado (Allémann *et al.*, 1998).

Hormona libertadora da hormona luteinizante

Sabe-se que complexos fármaco-polímero como, por exemplo, fármacos sensíveis associados à hidroxipropilmetacrilamida ou PEG, são frequentemente utilizados para

aumentar a estabilidade do fármaco e direccioná-lo ao órgão alvo (Allémann *et al.*, 1998). Contudo, tem vindo a demonstrar-se que a encapsulação em partículas é uma alternativa eficiente para proteger esses fármacos contra a actividade proteolítica (Hillery *et al.*, 1996a; Hillery *et al.*, 1996b). Ambas as estratégias foram realizadas e compiladas e desenvolveu-se um sistema polimérico (Allémann *et al.*, 1998). As nanoesferas resultantes demonstraram ser estáveis *in vitro*, quando incubadas em diferentes meios altamente ricos em actividade enzimática proteolítica (García-Fuentes *et al.*, 2005). Quando as nanoesferas contendo hormona libertadora da hormona luteinizante foram administradas oralmente, observou-se um efeito prolongado do péptido na circulação sanguínea contrariamente à ausência na circulação sanguínea, quando se administrou o mesmo péptido, na forma livre.

Calcitonina

A calcitonina, um péptido secretado pela glândula paratiroideia, é eficaz na redução da hipercalemia e da concentração de fosfatos em doentes com hiperparatiroidismo, hipercalemia idiopática da criança e intoxicação por vitamina D. É, ainda, eficaz nas doenças caracterizadas por aumento da reabsorção e formação óssea, como ocorre na doença de Paget e na osteoporose com dor intensa. A calcitonina utilizada na terapêutica é de origem sintética e só tem actividade quando administrada por via parentérica ou nasal. Contudo, a absorção nasal da calcitonina continua a ser fraca e variável (Allémann *et al.*, 1998). Além disso, há alguns anos atrás, surgiu a administração oral deste fármaco peptídico (Allémann *et al.*, 1998). A calcitonina foi encapsulada em nanoesferas de poliacrilamida (Lowe e Temple, 1994), PIBCA (Lowe e Temple, 1994), poliestireno (Sakuma, 1997) e quitosano (Allémann *et al.*, 1998). Os resultados experimentais mostraram-se promissores, revelando um aumento da estabilidade do fármaco peptídico no TGI e, em alguns casos, processos de bioadesão a nível mucosal.

Ciclosporina A

A ciclosporina A, um péptido cíclico não ribossômico de 11 aminoácidos, é produzida pelo fungo *Hypocladium inflatum gams*, inicialmente isolado a partir de uma amostra de solo norueguês. Apesar da sua utilização na medicina em transplantes devido às suas propriedades imunossupressivas, a ciclosporina A é também usada no tratamento da psoríase e, mais raramente, no tratamento de doenças mais severas, como a artrite reumatóide. Mais recentemente, a ciclosporina A começou a ser usada no tratamento da colite ulcerosa com resultados positivos. Quando administrada oralmente, a ciclosporina A é dificilmente absorvida, conduzindo, por isso, a uma biodisponibilidade relativa inferior a 50% (Allémann *et al.*, 1998). Contrariamente à maioria dos péptidos, a ciclosporina A é lipofílica. É praticamente insolúvel em água e solúvel em álcool. Estas características são favoráveis para muitos dos métodos de nanoencapsulação anteriormente descritos. Vários polímeros têm sido utilizados, incluindo PIHCA e PCL (Molpeceres *et al.*, 1996), demonstrando em ambos os casos, resultados promissores para uma nova alternativa de administração da ciclosporina A.

1.4.2.2 Outros fármacos encapsulados em nanopartículas

Citostáticos

Apesar dos avanços significativos no tratamento de muitas doenças tumorais, a estrutura e a localização dos tumores sólidos continuam a ser considerados grandes obstáculos para a maioria dos fármacos, nomeadamente antibióticos, citostáticos e uma variedade de neuropeptídeos (Vauthier *et al.*, 2003). Para além disso, a resistência aos próprios tratamentos é outro problema que continua a ser investigado (Dubernet *et al.*, 2000). Geralmente, são necessárias doses elevadas do fármaco citostático para atingir o efeito terapêutico desejado. Infelizmente, surgem limitações a nível da toxicologia destes agentes que tornam este aumento de doses, fisiologicamente, impraticável (Dubernet *et al.*, 2000).

São, pois, necessários novos métodos de administração que evitem uma distribuição generalizada do citostático. As nanopartículas podem servir como veículos vectorizadores, uma vez que apresentam uma tendência de acumulação em certos tumores (Kreuter, 2001; Das e Lin, 2005). Este facto acontece porque a maioria dos tumores apresenta uma actividade endocítica elevada. As nanopartículas movimentam-se facilmente nos espaços endoteliais do tumor e apresentam uma grande facilidade de adsorção por meio de um mecanismo de bioadesão à superfície dos vasos sanguíneos do tumor (Gaumet *et al.*, *in press*). Uma outra vantagem das nanopartículas no tratamento de tumores relaciona-se com a facilidade de transposição das barreiras fisiológicas, uma vez que em estudos anteriores foi observado que as nanopartículas conseguiram atravessar a barreira hemato-encefálica (Schroeder *et al.*, 1998; Kreuter, 2001). No que concerne à terapia tumoral, são frequentemente utilizadas as nanopartículas de PACA (Brasseur *et al.*, 1980; Beck *et al.*, 1993), de PLGA (Mo e Lim, 2005) e de PLA (Zhang e Feng, 2006).

Vacinas

O TGI é constantemente invadido por potenciais antígenos que são, normalmente, destruídos na mucosa intestinal, através de barreiras não imunológicas, como a acidez gástrica, as enzimas proteolíticas, o peristaltismo, a flora comensal, o muco intestinal e através de barreiras imunológicas (Holmgren e Lycke, 1986; Walker e Owen, 1988). A resposta imunitária desencadeia-se quando os antígenos têm acesso aos tecidos linfóides, a nível do TGI. O tecido linfóide associado ao intestino está distribuído por quatro zonas (O'Hagan *et al.*, 1987): *lamina propria*, que contém um grande número de células plasmáticas (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos); linfócitos intra-epiteliais, que se encontram dispersos entre as células epiteliais da mucosa; folículos linfóides isolados, ao longo do intestino e do cólon e, as placas de Peyer, que são pequenas associações de folículos linfóides localizadas ao longo da parede intestinal (Gilligan e Po, 1991). Normalmente, uma resposta imunitária ocorre nos tecidos linfóides isolados e nas placas de Peyer (Gilligan e Po, 1991).

Até este momento, a vacinação oral tem sido realizada através da administração de organismos vivos ou através de péptidos, cuja capacidade de absorção ao tecido intestinal faz com que seja possível uma resposta local ou uma resposta imunitária generalizada (Ma, 2003). Um outro método de vacinação oral baseia-se na produção de vacinas que veiculam ADN (Ma, 2003). Todavia, a vacinação oral pode falhar por variadíssimas razões: inactivação pelas enzimas presentes no TGI, baixa biodisponibilidade, interferência com outras bactérias e vírus presentes no TGI, interferência com vacinas que sejam administradas simultaneamente e rápido trânsito intestinal.

Com o objectivo de diminuir a dose e a frequência de administração, a investigação nesta área focaliza-se na administração vectorizada do agente que irá provocar a resposta imunitária, principalmente, para as células M das placas de Peyer. O recurso a sistemas multiparticulares pode conferir vantagens significativas, nomeadamente na promoção da captação de micro e nanopartículas pelas placas de Peyer, na protecção do antigene evitando a sua degradação, na possibilidade de administrar simultaneamente diversos antigenes, na possibilidade de incorporação de adjuvantes na formulação, na possibilidade de veicular antigenes através de um sistema não imunogénico, na capacidade de controlar ou permitir a libertação sustentada do antigene e, finalmente, na possibilidade de obtenção de uma administração vectorizada (O'Hagan *et al.*, 1987). Uma consideração importante na vacinação oral através das placas de Peyer relaciona-se com a dependência da granulometria da partícula. A granulometria crítica das partículas, para serem captadas pelas placas de Peyer não reúne uma opinião unânime, mas todos os estudos demonstram claras vantagens, mais uma vez, das nanopartículas face às micropartículas.

Ao longo dos tempos foram desenvolvidas várias estratégias de vacinação oral, sendo uma das pioneiras as micropartículas de poliacrilamida contendo antigenes (Jeurisson *et al.*, 1987) e, posteriormente, partículas de látex (Frey *et al.*, 1997; Calvo *et al.*, 1997). Curiosamente, as primeiras aplicações terapêuticas das nanopartículas foram mesmo na área da vacinação oral. Vírus, subunidades de vírus, toxinas bacterianas, péptidos e outros antigenes foram incorporados ou adsorvidos em nanopartículas (Frey *et al.*, 1997; Calvo *et al.*, 1997). Além disso, são diversos os polímeros que têm sido aplicados na preparação de

nanopartículas como, por exemplo, o PMMA (Eldridge *et al.*, 1990), o PLGA (Eldridge *et al.*, 1990), o poliestireno (Jani *et al.*, 1991; Jani *et al.*, 1992a; Jani *et al.*, 1992b), o alginato e o quitosano (Borges *et al.*, 2006), etc.

Face a tudo isto e associadas aos avanços na biologia molecular, virologia, imunologia e libertação controlada, as nanopartículas parecem surgir como a próxima geração de sistemas eficazes na administração de vacinas por via oral.

1.4.3. Administração parentérica de fármacos encapsulados em nanopartículas

A administração parentérica continua, em muito casos, a ser a única forma de administração de fármacos peptídicos. Em seguida, serão mencionados alguns exemplos de fármacos peptídicos e fármacos não peptídicos administrados por via parentérica e que se encontram, presentemente, referidos na literatura.

1.4.3.1 Fármacos peptídicos encapsulados em nanopartículas

Citostáticos

A imunoterapia com ativadores de macrófagos tem vindo a ser sugerida no tratamento de tumores metastáticos como alternativa à terapia convencional. Um dos exemplos é o muramildipéptido. O muramildipéptido é um composto sintético de baixo PM, derivado do peptidoglicano da micobactéria e é utilizado como activador dos macrófagos, uma vez que interage facilmente com os receptores intracelulares. No entanto, o muramildipéptido apresenta uma fraca captação nos macrófagos e é rapidamente eliminado após administração intravenosa. Estes problemas foram solucionados através da encapsulação do muramildipéptido em nanopartículas (Yu *et al.*, 1991; Seyler *et al.*, 1999). Um derivado lipofílico desta substância, o muramiltripéptido-colesterol, foi encapsulado em PIBCA através

do método de polimerização interfacial e foi observada uma estimulação da actividade antimicrobiana e citostática nos macrófagos (Yu *et al.*, 1991).

Outro exemplo do sucesso das nanopartículas na terapia tumoral e em doenças dependentes da angiogénese diz respeito ao hexapéptido rico em arginina. Este péptido possui actividade antiangiogénica e foi encapsulado, com êxito, em nanopartículas de quitosano-sulfato de dextrano (Chen *et al.*, 2003).

Hormonas

O factor de libertação da hormona do crescimento é um dos exemplos com sucesso em que foram aplicadas as nanotecnologias. Esta hormona, constituída por 44 aminoácidos, é secretada a nível do hipotálamo pelo núcleo *arcuate*, estimulando a hormona do crescimento. Os seus efeitos a nível do organismo têm sido descritos como efeitos anabólicos. O factor de libertação da hormona do crescimento é, normalmente, utilizado no tratamento de certas doenças, designadamente os síndromes de Turner e Prader-Willi. Contudo, tal como em outras situações, são necessárias administrações pelas vias parentéricas para alcançar os objectivos terapêuticos. Uma solução alternativa envolve o desenvolvimento de preparações parentéricas de longa-duração. Este desenvolvimento tecnológico é dificultado devido às características físico-químicas do péptido (Gautier *et al.*, 1992). A nanotecnologia surgiu, então, como alternativa; o factor de libertação da hormona do crescimento foi encapsulado em nanopartículas de PIHCA e demonstrou níveis elevadíssimos de protecção do fármaco peptídico face à degradação enzimática.

Além deste exemplo, as nanopartículas também têm surgido como meio de administração de outros fármacos peptídicos, designadamente a testosterona por via intramuscular (Gurny *et al.*, 1977) e a insulina pela via s.c., quer sobre a forma de nanoesferas (Couvreur *et al.*, 1980b) quer como nanocápsulas (Damgé *et al.*, 1988).

1.4.4. Administração oftálmica de fármacos encapsulados em nanopartículas

Também na área da oftalmologia, as nanopartículas têm vindo a demonstrar resultados promissores seja providenciando uma protecção ao fármaco face à degradação química e enzimática, aumentando a tolerância e captação por parte do tecido corneal ou aumentando o tempo de semi-vida do fármaco (Lallemand *et al.*, 2003).

Um dos estudos pioneiros foi realizado em 1980 (Gurny e Taylor, 1980). Subsequentemente, foram propostos vários sistemas nanopoliméricos contendo fármacos peptídicos. Um desses exemplos foi a ciclosporina A, em que foi encapsulada em nanopartículas de PCL (Calvo *et al.*, 1996), PACA (Zimmer *et al.*, 1991; Le Bourlais *et al.*, 1997) e quitosano (Lallemand *et al.*, 2003). Todavia, alguns parâmetros ainda permanecem por solucionar, devido à *clearance* rápida do tecido pré-corneal. Das três formulações anteriormente referidas, a mais promissora, segundo alguns autores, é a que usa o quitosano, por razões relacionadas com as suas características bioadesivas e de biodegradabilidade (Lallemand *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004).

Além disso, sabe-se que a eficiência farmacológica pode ser influenciada não só pela natureza do polímero mas também pelas características do fármaco. A progesterona, por exemplo, foi sujeita a um processo de nanoencapsulação e, desta vez, os resultados não foram tão positivos como se esperava (Lee *et al.*, 1986), uma vez que o fármaco peptídico apresentou uma afinidade mais forte para o polímero do que propriamente para o local de acção. Para além da natureza do polímero e das características do fármaco, há outro aspecto importante a considerar. Trata-se do estado fisiopatológico do local de acção. Foi demonstrado que, na presença de processos inflamatórios, as nanopartículas apresentam uma bioadesividade de cerca de quatro vezes superior comparativamente aos tecidos normais (Diepold *et al.*, 1989).

1.4.5. Administração pulmonar de fármacos encapsulados em nanopartículas

Na administração pulmonar de nanopartículas através de inalação é necessário ter em conta uma série de considerações, tais como: o local de deposição do aerossol, o design do aparelho de inalação, as características físico-químicas do fármaco a ser encapsulado, a granulometria das partículas, a concentração e as características da superfície das partículas (McCallion *et al.*, 1995).

Um exemplo de fármaco peptídico nanoencapsulado e administrado por esta via foi a insulina. Este processo de nanoencapsulação conduziu a uma maior estabilidade do fármaco peptídico (Leung *et al.*, 1996; Bridges e Taylor, 1998; Zhang *et al.*, 2001).

1.4.6. Outras vias de administração de fármacos encapsulados em nanopartículas

Também noutras vias de administração, as nanopartículas estão presentes. Um dos exemplos é o interferão gama. Este fármaco é usado para o tratamento de *herpes cutaneous* mas tem um tempo de residência no local de acção muito curto. Com o objectivo de aumentar o tempo de residência do fármaco peptídico na pele, o interferão gama foi também sujeito a um processo de encapsulação (Weiner *et al.*, 1989). Os resultados obtidos foram animadores.

Outros exemplos de fármacos nanoencapsulados e administrados por outras vias, que não as tradicionais, foram a insulina (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1999; Dyer *et al.*, 2002), ADN (Cui e Mumper, 2002) e a toxina tetânica (Tobío *et al.*, 1998). A via de administração utilizada nos estudos anteriores foi a via nasal.

Outro exemplo é o minoxidil, cujo processo de encapsulação e de administração pela via transdérmica decorreu, igualmente, com êxito (Shim *et al.*, 2004).

Em suma, os resultados dos estudos anteriores são indicadores de que as nanopartículas podem ser realmente encaradas como alternativas às outras formas farmacêuticas tradicionais. Exemplo disso são os inúmeros ensaios clínicos que decorrem por

todo mundo nas mais variadas fases e que testam sistemas constituídos por nanopartículas, contendo fármacos peptídicos, e que apoiam a afirmação anterior. Contudo, o sucesso da nanotecnologia vai depender do desenvolvimento de novos polímeros, do seu potencial para a terapêutica e da demonstração da sua segurança.

2. INSULINA COMO FÁRMACO MODELO

Em 1889, Von Mering e Minkowski demonstraram que a pancreatectomia produzia, no cão, um síndrome semelhante à Diabetes *Mellitus* do ser humano, com polúria, polifagia, cetose, dificuldade de cicatrização e infecções várias.

A descoberta da insulina e o início do seu uso na terapêutica da Diabetes *Mellitus* foi um dos marcos da medicina do século passado. Esta descoberta foi atribuída a Banting e Best que demonstraram, em 1921-1922, a acção terapêutica de um princípio activo, extraído do pâncreas, sobre cães e, posteriormente, em pessoas diabéticas. O primeiro diabético a ser tratado com insulina foi um jovem de 14 anos, insulino-dependente, internado num hospital de Toronto, no Canadá, em 1922. Foi também nos anos 20 que se obteve a forma cristalizada de insulina. Nos anos 50, Sanger conseguiu estabelecer a sequência de aminoácidos das duas cadeias de insulina e, por esse facto, ganhou o prémio Nobel da Química. Mais tarde, Katsoyannis conseguiu sintetizar a insulina (Duarte, 1997). Desde então, o estudo da molécula de insulina manteve-se na vanguarda da investigação médica e biotecnológica.

Nesse campo, a investigação da insulina tem evoluído, fundamentalmente, em dois sentidos: a purificação da insulina e a obtenção de modos de acção/administração alternativos. Relativamente à purificação da insulina, os primeiros tipos baseavam-se em extractos pancreáticos do boi e do porco. Existe uma semelhança muito grande entre a insulina humana, suína e bovina. A insulina suína difere da insulina humana em um único aminoácido (substituição na insulina humana da treonina pela alanina na posição B₃₀), enquanto a bovina tem a mesma modificação mais as duas substituições na insulina humana (treonina por alanina em A₈ e isoleucina por valina em A₁₀) (Duarte, 1997). Além disso, o PM da insulina humana (PM = 5,734 kDa) é diferente da insulina do boi e do porco, sendo 5,703 e 5,747 kDa, respectivamente. Mais tarde, com as técnicas de biotecnologia e genética, foi possível a obtenção de insulina mais pura e com menos efeitos secundários, que estão normalmente associados às insulinas de origem animal. Os anos 80 trouxeram a chamada insulina humana e, mais recentemente, a insulina obtida através de técnicas de ADN recombinante (insulina

biossintética) ou através da modificação enzimática da insulina do porco (insulina semi-biossintética), substituindo, nesta última, o único aminoácido que é diferente na insulina do porco e do homem na cadeia B. Desde então, a insulina humana e insulina recombinante substituíram as anteriores insulinas animais na terapêutica da Diabetes *Mellitus*.

Nos anos 90, através dos avanços da genética, desenvolveram-se análogos da insulina, por meio de mutações na molécula da insulina que alteraram a sua farmacocinética. Quanto à duração da acção da insulina, conseguiram-se desenvolvimentos importantes, nomeadamente ao prolongar essa duração através da adição de zinco ou protamina, uma vez que a aplicação destes compostos altera o estado de associação da insulina. Outros aspectos relacionados com a melhoria da farmacocinética de insulina foram também alvo de investigação. Quanto às formas de administração de insulina, existe, ainda, uma grande insatisfação, pois a via s.c. continua a ser a única via de administração utilizada na terapêutica da Diabetes *Mellitus*. Apesar dos avanços tecnológicos que permitiram a utilização de dispositivos de administração de insulina quase indolores (“canetas”, agulhas microfinas, bombas infusoras, etc.), a via parentérica não deixa de ser, actualmente, a principal via de administração de insulina.

2.1. Características físico-químicas

O pâncreas contém uma parte exócrina que secreta o suco pancreático e outra parte endócrina que secreta hormonas, nomeadamente a insulina e o glucagon. A nível do pâncreas, existe, ainda, a secreção parácrina da somatostatina e do polipéptido pancreático.

2.1.1. Origem e estrutura química

A insulina é uma hormona anabólica secretada pelas células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas sob a forma de pré-pró-hormona. Como se mostra na Figura I-11, a pré-pró-insulina é um grande polipéptido constituído por 16 aminoácidos que se repetem, no qual se consideram 3 porções: a cadeia A, que possui 21 aminoácidos com uma ponte

dissulfureto intrapeptídica, ligando os 6º e 11º aminoácidos; a cadeia B, que possui 30 aminoácidos, estando ligada à cadeia A por duas pontes dissulfureto situadas entre as posições B₇ e A₇ e B₁₉ e A₂₀; e a cadeia C ou péptido C, que possui 33 aminoácidos e está intercalado entre as cadeias A e B, ligando-se à posição 1 da cadeia A e à posição 30 da cadeia B. A pré-pró-hormona é sujeita a uma série de quebras de ligação, dando origem à insulina que, por sua vez, é constituída por duas cadeias de aminoácidos A e B interligadas por duas pontes de dissulfureto.

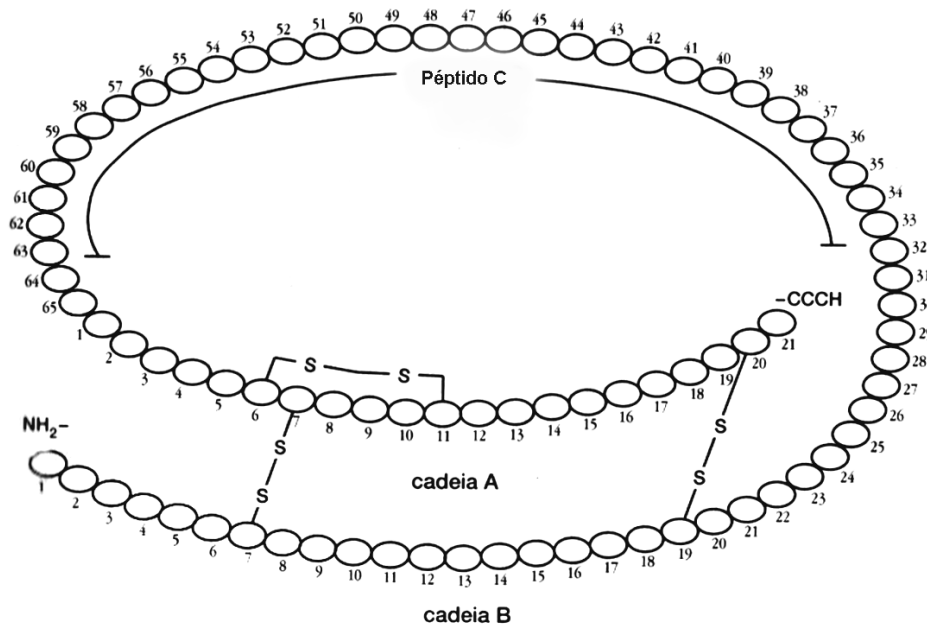


Figura I-11. Representação esquemática da molécula de pré-pró-insulina (Duarte, 1997).

A insulina é sintetizada como pré-pró-hormona nas células β , que é imediatamente clivada em pró-insulina. Esta é armazenada em vesículas secretoras do aparelho de Golgi, onde se dá a cisão em insulina e péptido C (King, 2006). As células pancreáticas possuem elevados níveis de zinco que são muito importantes no armazenamento da insulina (Chien, 1996). Existem estudos que referem que a hormona sofre uma clivagem espontânea, enquanto outros apontam a clivagem como resultado de uma acção enzimática (Chien, 1996). Nesta última situação, uma protease específica cliva a molécula e dissocia o péptido C, mantendo apenas as cadeias A e B.

A composição em aminoácidos é variável para diferentes espécies de animais, mas em cada cadeia existem 10 resíduos invariáveis. Os resíduos invariáveis das cadeias A e B são

responsáveis pela integridade estrutural da molécula de insulina e ajudam a definir a conformação da estrutura primária da proteína, através das pontes de dissulfureto inter e intracadeias. Por outro lado, os resíduos variáveis das cadeias A e B são responsáveis pelo rearranjo tridimensional da molécula. Apesar das diferenças na estrutura primária, o enrolamento e o empacotamento das cadeias A e B numa conformação tridimensional são, essencialmente, os mesmos para todas as moléculas de insulina.

A cadeia A forma duas α -hélices próximas anti-paralelas (A_2 a A_8 e A_{13} a A_{20}), enquanto a cadeia B forma uma única α -hélice (B_9 a B_{19}), seguida de um β -turn e de uma folha β pregueada (B_{21} a B_{30}). Os resíduos de cisteína A_6 e A_{11} e as cadeias laterais alifáticas dos resíduos A_2 , A_{16} , B_{11} e B_{15} formam um núcleo apolar. A superfície da insulina é constituída por resíduos polares e apolares.

A estrutura tridimensional da insulina é determinada pelas posições das pontes de dissulfureto e depende de forças de *Van der Waals*. A conformação estrutural da insulina é essencial para a sua actividade hipoglicemiante (Chien, 1996).

A molécula de insulina existe como um monómero a baixas concentrações ($< 0,1 \mu\text{M}$ ou $< 0,6 \mu\text{g/mL}$). Em condições fisiológicas, a insulina é mantida a uma concentração inferior a $10^{-3} \mu\text{M}$ para assegurar que circula e exerce a sua actividade biológica como molécula monomérica. O diâmetro hidrodinâmico do monómero é aproximadamente 2,6 nm (Chien, 1996). Para concentrações superiores, a insulina dimeriza. São, sobretudo, os resíduos apolares do monómero de insulina que estão envolvidos na associação em dímeros e hexâmeros, pelo que a sua superfície é, quase na totalidade, polar. A conformação da unidade monomérica é essencialmente a mesma nos estados livre e associado (Brange *et al.*, 1987). A formação de dímeros envolve, sobretudo, resíduos da cadeia B. Por exemplo, se os resíduos B_9 , B_{12} , B_{16} , B_{25} , B_{26} , B_{27} , B_{28} e A_{21} forem substituídos, estes diminuem a formação de dímero (Chien, 1996). O dímero de insulina apresenta uma forma elipsóide. Em soluções neutras, ou ligeiramente ácidas (pH 4-8), na presença de iões zinco e para concentrações superiores a $10 \mu\text{M}$, ocorre a associação de 3 dímeros para formar um hexâmero. Para concentrações superiores a $2 \mu\text{M}$, o hexâmero pode formar-se em pH neutro e até na ausência de iões zinco.

Um hexâmero possui uma forma esférica ligeiramente achatada, tal como ilustra a Figura I-12, e possui um diâmetro hidrodinâmico de, aproximadamente, 5,6 nm (Chien, 1996).

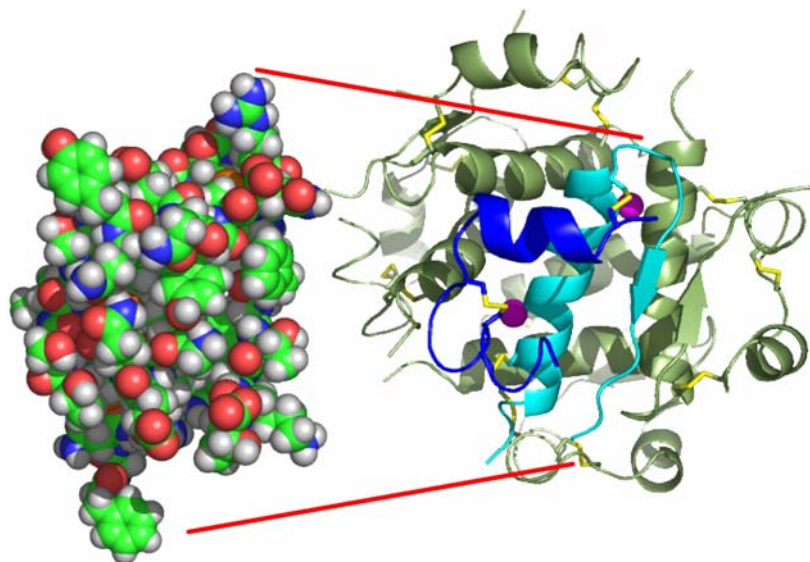


Figura I-12. Estrutura da insulina. No lado esquerdo, encontra-se representada a insulina na forma monomérica. O átomo do carbono está assinalado a verde, do hidrogênio a cinzento, do oxigênio a vermelho e do azoto a azul. No lado direito, encontra-se uma ilustração do monómero de insulina inserido no hexâmero sendo a cadeia A a azul e a B a ciano. As ligações dissulfureto encontram-se assinaladas a amarelo e os iões zinco a violeta.

Dependendo da concentração, pH, iões metálicos e sais, assim se terão diferentes estados de associação da insulina. Em solução, poderão existir em equilíbrio monómeros, dímeros, tetrâmeros, hexâmeros e, possivelmente, outros estados de associação superiores (Brange *et al.*, 1987).

2.1.2. Regulação da síntese

A secreção de insulina a partir das células β é regulada, principalmente, pelos níveis plasmáticos de glucose. Um aumento da captação de glucose pelas células pancreáticas β produz um aumento concomitante do metabolismo através de um aumento da razão ATP/ADP. Esta alteração leva a uma inibição do canal de potássio, sensível ao ATP. Desta forma, resulta uma despolarização da célula com um influxo de cálcio e um aumento da

secreção de insulina (King, 2006). Existem, ainda, outros factores que regulam a secreção de insulina, nomeadamente a hormona do crescimento, o lactogénio placentar, estrogénios e progestinas.

Após a sua síntese, a insulina é directamente difundida pela veia porta em direcção ao fígado, onde exerce os seus efeitos metabólicos. No estado basal, a insulina é secretada a uma velocidade de 1 UI (Unidades Internacionais) por hora (Hoffman e Ziv, 1997). Após as refeições, a secreção da hormona aumenta cinco a dez vezes. Apenas metade dessa insulina é extraída pelo fígado durante o primeiro metabolismo hepático (Hoffman e Ziv, 1997).

2.1.3. Carga eléctrica

A molécula de insulina contém 51 aminoácidos, sendo que seis apresentam carga positiva e dez apresentam carga negativa. A carga eléctrica geral da molécula de insulina varia com o pH do meio. O ponto isoeléctrico (pI) da insulina encontra-se compreendido entre 5,3 e 5,4 (Brange *et al.*, 1987).

2.1.4. Cristalização

Existem várias preparações de insulina cristalina que contêm água de cristalização e quantidades pequenas de iões. A insulina cristaliza, isoelectricamente, a pH 5,5-5,6 na presença de iões metálicos divalentes (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , etc.). O conteúdo em metal é directamente proporcional ao seu peso atómico. Alguns aniões, como o cloreto, o acetato, o citrato, o fosfato ou o carbonato também podem estar presentes na cristalização da insulina. Em soluções ácidas (pH 2-2,5) e com baixa força iónica, a molécula de insulina associa-se muito pouco e cristaliza, mesmo na ausência de metal. A insulina pode cristalizar mesmo na presença de bases orgânicas e sem zinco (Chien, 1996). Foram detectadas, pelo menos, 5 formas cristalinas da insulina humana (Brange *et al.*, 1987).

2.1.5. Solubilidade

A solubilidade da insulina depende da sua pureza, da natureza do solvente, do pH, da temperatura, da força iónica e da concentração de iões metálicos divalentes.

Em meio aquoso, a insulina pode precipitar num intervalo de pH próximo do seu pI. Para valores de pH neutros e básicos, a solubilidade é fortemente dependente da concentração de iões divalentes como, por exemplo, o zinco (Brange *et al.*, 1987). Na presença de soluções com concentrações elevadas de sais, isto é, com uma elevada força iónica, a insulina pode sofrer *salting-out*. A solubilidade da insulina também é influenciada pela presença de compostos orgânicos. Em soluções neutras, moléculas carregadas positivamente podem interagir com a insulina carregada negativamente, formando complexos que precipitam. A insulina é muito solúvel em misturas homogéneas de água e solventes orgânicos. No entanto, quando o conteúdo em solvente orgânico é muito elevado, a solubilidade da insulina diminui dependendo do solvente, temperatura, pH e conteúdo em sal (Brange *et al.*, 1987). O pH também influencia a solubilidade da insulina, se esta estiver associada ao ião zinco. Por exemplo, a dissolução dos cristais de insulina-zinco ocorre melhor num solvente ácido e em menor extensão em meio neutro ou ligeiramente alcalino. As soluções básicas fortes não devem ser utilizadas, porque degradam as pontes dissulfureto da insulina (Brange *et al.*, 1987).

2.1.6. Estabilidade

Relativamente à estabilidade físico-química, a insulina pura é muito estável e pode manter-se estável durante anos, se o pH da solução for 4 a uma temperatura de 2°C. Alguns estudos demonstram que a actividade biológica da insulina pode mesmo manter-se durante 2 anos a 0°C, mas diminui 20%, logo após 1 ano, se a temperatura estiver compreendida entre 20 a 25°C (Chien, 1996).

O pH influencia a estabilidade da insulina. Em ácidos diluídos, a insulina sofre clivagem em vários fragmentos. A hidrólise ocorre, preferencialmente, entre os resíduos de asparagina e glutamina. O grupo β -amida do resíduo asparagina (A₂₁) é particularmente sensível à hidrólise, podendo a insulina ser parcialmente degradada em desamido-insulina durante a extracção pancreática. Porém, este produto retém quase a totalidade da actividade biológica. Em soluções alcalinas, a insulina é rapidamente decomposta por hidrólise das ligações amida e da degradação dos resíduos de cisteína (Chien, 1996).

Na presença de trocadores iónicos ácidos e básicos, as ligações no C-terminal da cadeia B são, preferencialmente, hidrolisadas. A ureia concentrada causa carbamilação na molécula de insulina mas sem redução da sua actividade. Já os peroxiácidos quebram as pontes dissulfureto, ficando a molécula no estado oxidado e sem actividade biológica. Sabe-se, também, que as duas pontes dissulfureto intercadeias são mais facilmente reduzidas do que a ponte intracadeia da cadeia A (Chien, 1996). Os agentes redutores, como o sulfureto de hidrogénio, inactivam rapidamente a insulina (Chien, 1996).

Relativamente à influência da luz na estabilidade da insulina, sabe-se que as radiações UV degradam geralmente os resíduos de cisteína. A fotoxidação conduz a uma degradação do grupo imidazol no resíduo de histidina. Por outro lado, é conhecido que os ultra-sons podem igualmente desencadear a degradação da insulina, mas de um modo não específico (Chien, 1996).

Relativamente à estabilidade enzimática, a insulina nativa é resistente à hidrólise enzimática *in vitro*, possivelmente devido a um elevado conteúdo em zinco (Chien, 1996). No entanto, a insulina pode sofrer clivagem na presença das endopeptidases, tripsina e α -quimotripsina. A tripsina cliva apenas a cadeia B, actuando lentamente entre B₂₂ e B₂₃, mas rapidamente entre B₂₉ e B₃₀. O resultante péptido (B₂₃-B₃₀)-insulina é biologicamente inactivo (Chien, 1996). A insulina pode ser ainda degradada na presença da elastase (Marschutz *et al.*, 2000). As carboxipeptidases A e B degradam a molécula de insulina por clivagem do resíduo do terminal carboxílico B₃₀. O resíduo C-terminal da cadeia A permanece estável ao ataque enzimático pelas exopeptidases estáveis. Quer a carboxipeptidase A quer a carboxipeptidase B, não apresentam nenhuma especificidade para a asparagina da cadeia A na posição 21

(Marschutz *et al.*, 2000). A incubação da cadeia B da insulina, pelo mesmo período de tempo, na presença das exopeptidases A e B conduz a uma hidrólise da alanina na posição B₃₀, o que significa dizer que, na molécula nativa, este terminal da cadeia B deve estar estericamente protegido da degradação. Como o resíduo B₃₀ é um resíduo variável entre as diferentes espécies, não deve influenciar a actividade farmacológica, pelo que se conclui que na administração oral de insulina a protecção contra as endopeptidases é mais importante do que contra as exopeptidases (Marschutz *et al.*, 2000). A insulina pode sofrer ainda alterações na presença de outras enzimas, nomeadamente a subtilisina (EC 3.4.21.62) e a leucina-aminopeptidase (EC 3.4.11.1). Esta última degrada rapidamente a cadeia B a partir do N-terminal lipofílico. Além disso, é de salientar que, e tal como foi referido nas secções anteriores, não deverá ser esquecido que a insulina poderá ainda sofrer degradação enzimática ao nível dos lisossomas e citoplasma das células.

2.2. Propriedades farmacológicas

Quando a produção/acção da insulina é inadequada ou completamente ausente, surge a doença *Diabetes Mellitus*, cujo tratamento com insulina exógena é complementar ou obrigatório. A administração exógena de insulina tem como objectivo obter níveis plasmáticos idênticos aos da secreção fisiológica bimodal em indivíduos não diabéticos.

A *Diabetes Mellitus* é, então, caracterizada por níveis sanguíneos elevados de glucose e episódios de cetoacidose. As complicações crónicas da doença incluem a retinopatia diabética com potencial perda de visão, a nefropatia que provoca falha renal, a neuropatia periférica responsável por úlceras nos pés e, ainda, disfunções gástricas, intestinais, genito-urinárias e sexuais. A doença também é acompanhada de uma incidência aumentada de aterosclerose cardiovascular, doença cerebrovascular e vascular periférica.

A evidência da relação entre o controlo metabólico e a ocorrência de complicações microvasculares tem estimulado a comunidade científica, na procura de novos métodos para melhorar a terapêutica com insulina.

A Diabetes *Mellitus* pode ser classificada em quatro grandes grupos: tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos específicos associados a certos síndromes ou doenças. Relativamente ao último tipo, este ocorre quando existem situações de defeitos genéticos na função da célula pancreática β , defeitos genéticos na acção da insulina, doenças do pâncreas exócrino (por exemplo pancreatite, pancreatectomia, tumores, fibrose quística e hemocromatose), endocrinopatias (por exemplo acromegalia, glucogonoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostatina e aldosteronoma), diabetes induzida por substâncias químicas (tiazidas, pentamidina, glucocorticóides e interferão alfa), formas pouco comuns de diabetes mediada por mecanismos imunes, síndromes genéticas e infecções.

A Diabetes *Mellitus* tipo 1 pode ser mediada imunologicamente ou ser do tipo idiopática. Geralmente, este tipo de diabetes tem início na infância ou na adolescência, mas pode ocorrer em qualquer idade, sendo responsável por 5 a 10% dos casos diagnosticados de diabetes. Caracteriza-se pela ausência total de produção de insulina, devido à destruição das células β pancreáticas, geralmente como resultado de uma resposta auto-imune. Nos doentes diabéticos tipo 1, a necessidade da insulinoterapia é perpétua, ao contrário do que acontece noutras situações clínicas, em que pode ser transitória. Por este facto, este tipo de diabetes designa-se vulgarmente por Diabetes *Mellitus* tipo 1 ou insulino-dependente.

A Diabetes *Mellitus* tipo 2 surge, normalmente, na fase adulta e considera-se a forma mais comum, constituindo, aproximadamente, 90% dos casos diagnosticados de diabetes. A patogenia deste tipo de diabetes é menos conhecida que a diabetes tipo 1. Importa desde logo esclarecer que na diabetes tipo 2 não se observou, até ao momento, qualquer relação com o complexo de histocompatibilidade, nem a existência de mecanismos auto-imunes. Em todo caso deverá existir, à semelhança da diabetes tipo 1, uma combinação de factores genéticos e ambientais (King, 2006). Este tipo de diabetes caracteriza-se por uma diminuição da secreção de insulina, resistência à hormona, intolerância à glucose e, ainda, desordens lipídicas. A maioria dos doentes com diabetes tipo 2 não requer insulinoterapia para sobreviver. Por este facto, este tipo de diabetes designa-se vulgarmente por Diabetes *Mellitus* tipo 2 ou não insulino-dependente. A terapêutica para estes casos recorre normalmente a antidiabéticos orais. Contudo, a insulinoterapia pode ser alternativa no caso de falência dos antidiabéticos

orais, em situações de intercorrências médicas graves, durante cirurgias, no período pré e pós-operatório e em situações de lesões isquémicas dos membros inferiores (Duarte, 1997).

Apesar de décadas de esforços desenvolvidos, não foi, ainda, possível desenvolver uma forma de administração de insulina suficientemente segura ou eficaz, que substitua a administração parentérica nos diabéticos insulino-dependentes. Geralmente, estes pacientes diabéticos têm de administrar insulina exógena, várias vezes ao longo do dia, para obterem um bom controlo glicémico.

Por isso, a tecnologia farmacêutica aposta em duas grandes abordagens: no prolongamento da actividade insulínica de forma a reduzir o número de doses e na procura de outras vias alternativas de administração. Na primeira situação, têm surgido muitos avanços, uma vez que têm surgido muitos análogos de insulina que diferem entre si, fundamentalmente, na duração da sua acção. Assim sendo, as insulinas dividem-se, de modo geral, em insulina de acção rápida, intermédia e lenta ou longa. A actividade hipoglicemiante da insulina é expressa em Unidades Internacionais (UI). Na segunda situação, isto é, na procura de outras vias alternativas de administração, os avanços tecnológicos são bem mais discretos.

2.3. Mecanismo de acção

De uma forma muito simples, o receptor da insulina é um heterotetrámero. Trata-se de um complexo transmembranar constituído por duas subunidades α (parte extracelular) e duas subunidades β (parte transmembranar) (Tsakiridis *et al.*, 1999). As subunidades β possuem actividade de tirosina quinase. O mecanismo geral de acção da insulina inicia-se com a ligação da insulina à subunidade α , seguida de alterações conformacionais e subsequente, activação parcial da subunidade β e activação de outras proteínas citoplasmáticas. A activação total da subunidade β dá-se através de autofosforilações (Tsakiridis *et al.*, 1999). A nível hepático, a activação do receptor da insulina conduz a uma série de reacções de fosforilação com aumento do armazenamento de glucose e com o aumento concomitante dos níveis de glicogénio, através da activação da glicogénio sintetase (EC 2.4.1.11) e inibição da glicogénio

fosforilase (EC 2.4.1.1). Na maioria dos tecidos não hepáticos, a insulina aumenta a captação de glucose através do aumento de transportadores de glucose (GLUT) na membrana plasmática, que estão constante estado *turnover*. Existem diferentes classes de transportadores de glucose: GLUT1, presente na maioria dos tecidos; GLUT2, por exemplo, presente no fígado e células β pancreáticas; GLUT3, por exemplo, presente no cérebro e GLUT4, por exemplo, presente no coração, tecido adiposo e músculo esquelético (King, 2006).

A ligação da insulina ao receptor na célula, que depende das concentrações plasmáticas de glucose, desencadeia uma série de respostas intracelulares que irão culminar, entre outras reacções, com o estímulo à secreção da própria insulina.

A activação do receptor da insulina induz a fosforilação de múltiplos substratos, incluindo o substrato receptor da insulina 1 (IRS-1) que, associado aos domínios SH2 da subunidade p85 da fosfatidilinositol quinase (EC 2.7.1.137), activa a subunidade p110. A fosfatidilinositol quinase catalisa uma série de reacções sendo uma delas a produção de lípidos fosforilados na ligação 3'-OH, como o fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato. Este último modifica a quinase dependente do fosfoinosítídeo. Por sua vez, esta activa uma série de serina-treonina quinases (EC 2.7.11.1), incluindo p70 ribossomal s6 quinase, proteína quinase B (PKB ou Akt) (EC 2.7.11.1) e proteína quinase C (EC 2.7.11.13) nas isoformas ζ e λ . Tanto a proteína quinase (PKB ou Akt), como a proteína quinase C estão envolvidas na estimulação do transporte da glucose, através da translocação de moléculas GLUT para a membrana plasmática. Para além disso, a proteína quinase (PKB ou Akt) desempenha uma função importante na translocação de glucose até à membrana plasmática, actua como reguladora da síntese de glicogénio e tem um papel importante na morte celular. Outros substratos igualmente envolvidos nesta cascata de fosforilações estão implicados no transporte da glucose. A acção da insulina a nível celular encontra-se ilustrada na Figura I-13.

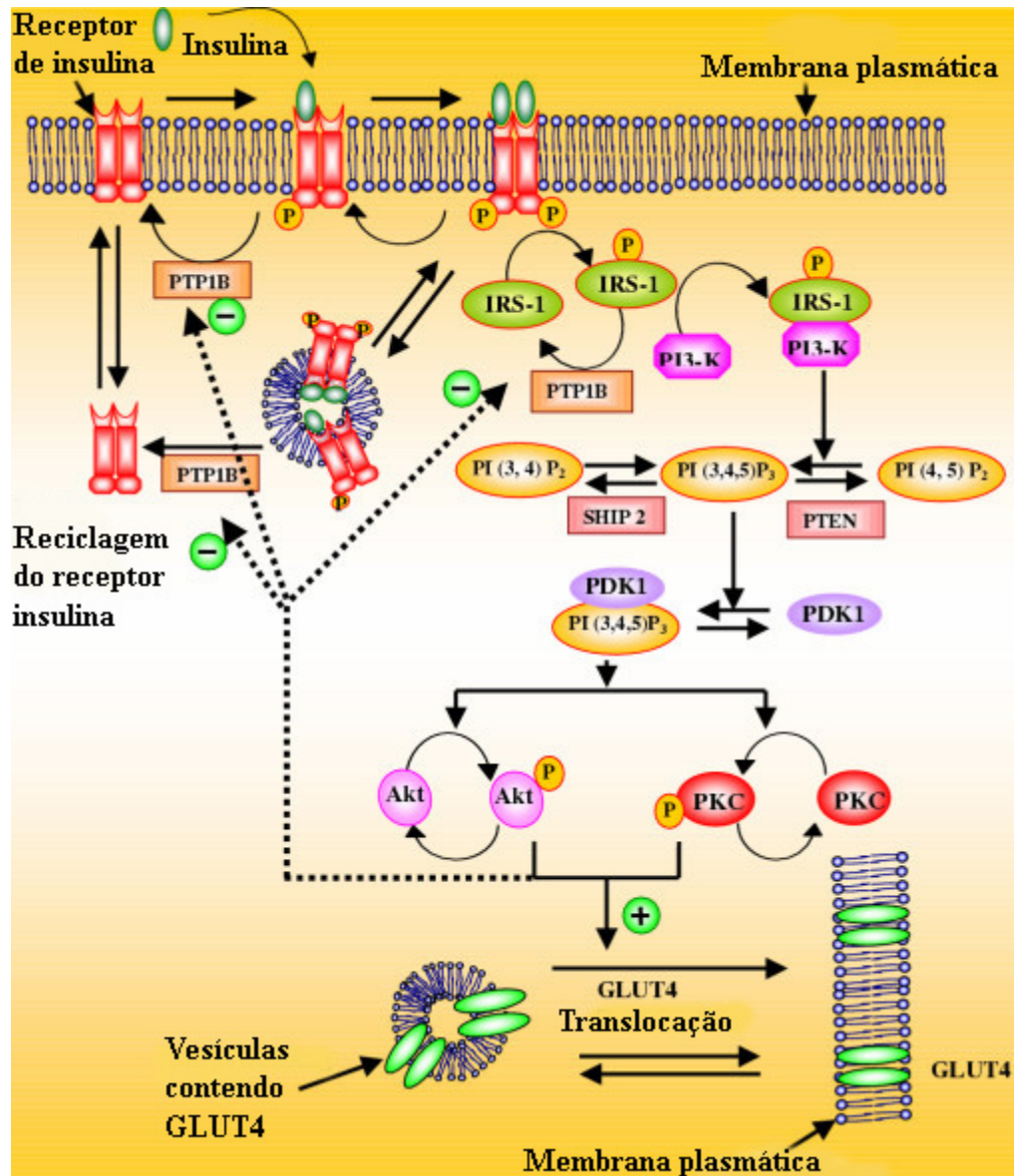


Figura I-13. Esquema da ação da insulina a nível celular, por exemplo, no tecido muscular. Nota: GLUT4 representa o transportador de glucose isoforma 4; IRS-1, o substrato receptor da insulina 1; PI3K, a fosfatidilinositol-3-quinase; PI (3, 4, 5) P₃, o fosfatidilinositol-3, 4, 5 trifosfato; PI (3, 4) P₂, o fosfatidilinositol-3, 4 bifosfato; PI (4, 5) P₂, o fosfatidilinositol-4, 5 bifosfato; PDK1, a quinase dependente do fosfoinosítídeo 1; Akt, a proteína quinase Akt ou PKB; PKC, a proteína quinase C; PTP1B, a proteína tirosina fosfatase 1B; PTEN, fosfatase (ligação 3') e SHIP2, a fosfatase (ligação 5'). A letra P indica as espécies fosforiladas.

Este processo é também mediado por sinalizadores intermediários, tais como o íon cálcio (Ca²⁺) e o AMP cíclico (AMPc). Alguns estudos têm demonstrado que o Ca²⁺ intracelular está intimamente relacionado com a secreção de insulina. O efeito chave do Ca²⁺, na iniciação da secreção da insulina, envolve a activação de uma proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina. A potencialização da secreção por agentes activadores da proteína

quinase A ou C parece envolver um aumento na sensibilidade do sistema secretório para o Ca^{2+} . A identificação das quinases e fosfatases responsáveis não é conhecida, mas a presença nas membranas de células β de várias quinases não dependentes de Ca^{2+} ou AMPc, incluindo a tirosina quinase, é documentada juntamente com a presença de ambas as proteínas fosfatases dependentes e independentes de Ca^{2+} . A fosforilação de proteínas está também envolvida nos fluxos de Ca^{2+} das células β .

2.4. Farmacodinâmica

A farmacodinâmica da insulina é complexa e depende de vários factores, por exemplo, da via de administração, função hepática e concentração de glucose (Hoffman e Ziv, 1997). A actividade terapêutica principal da insulina humana é a regulação do metabolismo da glucose. A insulina intervém, igualmente, no metabolismo de lípidos e de proteínas (King, 2006). De facto, a insulina interfere com a lipogénese, diminui a lipólise, diminui a produção de corpos cetónicos, modula a transcrição e altera o conteúdo celular de ARN_m (Chien, 1996; King, 2006). Além disso, a insulina estimula o crescimento, a síntese de ADN e a replicação celular, actuando em conjunto com factores de crescimento *insulin-like* e com relaxinas.

No músculo e em outros tecidos (excepto no cérebro), a insulina conduz a um rápido transporte da glucose e aminoácidos para o interior das células, promovendo o anabolismo e inibindo o catabolismo proteico. No fígado, a insulina promove a captação e o armazenamento da glucose na forma de glicogénio, inibindo a gluconeogénese e promovendo a conversão do excesso de glucose em triglicéridos.

2.5. Indicações terapêuticas

A insulina é utilizada maioritariamente na terapêutica da Diabetes *Mellitus* tipo 1. A terapêutica da Diabetes *Mellitus* tipo 2 recorre normalmente a antidiabéticos orais. A insulino-terapia pode ser alternativa para doentes diabéticos tipo 2 nas situações descritas

anteriormente. A falência secundária aos antidiabéticos orais deve-se à existência de insulinopenia, quer pela diminuição do número de células β quer pelo efeito de glucotoxicidade sobre a própria célula β , acompanhando-se de excessiva gluconeogénese nocturna (Duarte e Caldeira, 1997). A insulinoterapia pode ser ainda alternativa para outros casos clínicos, nomeadamente durante a gravidez, situações onde o uso de antidiabéticos orais está contra-indicado e em caso de diabetes sintomática com hiperglicémia marcada (Duarte, 1997).

2.6. Farmacocinética

A farmacocinética da insulina inclui o processo de absorção e a distribuição compreendendo a ligação aos anticorpos circulantes na corrente sanguínea e aos receptores de insulina e, em último, a degradação e a excreção dos metabolitos resultantes (Binder *et al.*, 1984). A distribuição e o metabolismo da insulina exógena absorvida são similares aos correspondentes da insulina endógena. Estas etapas não podem ser activamente alteradas, a não ser que existam anticorpos para a insulina em circulação no sangue, que, em casos raros, também são responsáveis pela ocorrência de resistência à insulina. O recurso a preparações de insulina de baixa imunogenicidade poderá evitar ou diminuir esta alteração de acção (Binder *et al.*, 1984).

As variações na absorção de insulina estão relacionadas com a dose, concentração, volume administrado bem como outros factores incluindo circulação capilar local, modo de administração, diferenças de localização da administração (profundidade, região anatómica e presença de lipohiperatrofias) e outras alterações locais (Duarte, 1997).

A forma conformacional da insulina influencia a sua farmacocinética: os cristais de insulina agrupam-se em hexâmeros e dímeros e só após a sua dissociação em monómeros, estes entram em circulação nos capilares do tecido s.c. (Duarte, 1997).

Por outro lado, sabe-se que quanto maior for o volume administrado ou concentração injectada menor será a taxa de absorção. Além disso, sabe-se que a insulina com alto teor em zinco tem uma absorção mais lenta do que a insulina regular (Duarte, 1997).

O modo de absorção varia conforme o método de administração empregue, que poderá ser por injeção, jacto ou perfusão contínua (Duarte, 1997).

Relativamente à região anatómica, a insulina é absorvida mais rapidamente a partir da região abdominal, seguindo-se a região deltóide, nádega e, por último, a coxa (Duarte, 1997). A título de exemplo, sabe-se que a insulina demora o dobro do tempo a ser absorvida a partir do braço, comparativamente ao abdómen.

Por seu lado, a administração intramuscular numa injeção mais profunda torna a absorção mais rápida e tem interesse particular para determinadas situações de cetoacidose de emergência (Duarte, 1997).

A circulação capilar local também influencia a absorção da insulina. Nos tecidos s.c., o número de capilares é variável e os fenómenos de vasodilatação e vasoconstrição local influenciam, em larga medida, a superfície vascular disponível para a absorção da insulina. Por outro lado, factores como o calor, o exercício físico, a massagem local, o álcool, situações de cetoacidose aumentam a absorção da insulina, enquanto outros factores, nomeadamente o frio, a hipoglicémia e o tabaco diminuem a sua absorção (Duarte, 1997).

Tal como a insulina endógena, a insulina exógena tem um tempo de semi-vida curto nos indivíduos saudáveis, cerca de 4 min (Hoffman e Ziv, 1997). Por este motivo, o perfil tempo-acção de uma preparação de insulina é determinado, unicamente, pelas suas características de absorção. Contudo, o tempo de semi-vida da insulina pode prolongar-se em indivíduos diabéticos por mais de 13 h, provavelmente como resultado da ligação da insulina a anticorpos. A ligação a anticorpos específicos pode envolver cerca de 95 % da insulina plasmática total. A correlação entre o título de anticorpos e o tempo de semi-vida da insulina deve indicar que a constante de velocidade de dissociação do complexo insulina-anticorpo é significativamente menor do que a velocidade de eliminação da insulina, tornando-se, assim, o passo limitante do processo de eliminação da insulina. Nos casos em que o título de anticorpos é baixo, a insulina é rapidamente metabolizada, principalmente no fígado e, em pequena extensão, nos rins e nos tecidos musculares.

Após injeção s.c., a acção hipoglicemiante das insulinas regulares humanas é normalmente rápida. Tem um início de acção de, aproximadamente, 30 min e atinge a

actividade máxima em 2 h. A duração é, no entanto, curta, variando de 4 a 8 h. Assim, são requeridas 2 a 4 injeções diárias destas preparações para se poder ter um adequado controlo glicémico (Duarte, 1997).

O fígado e os rins são os dois principais órgãos responsáveis pelo metabolismo da insulina. Neste caso, a extracção hepática de insulina pode atingir 70% numa única passagem, enquanto a metabolização renal é responsável por 10 a 40% da degradação diária de insulina. A enzima insulinase (EC 3.4.24.56) é responsável pela catálise das ligações redutoras de pontes dissulfureto na molécula de insulina. As cadeias reduzidas são posteriormente hidrolisadas em fragmentos menores. Além do fígado, o pâncreas e os tecidos muscular e adiposo também podem clivar a molécula de insulina por redução ou proteólise (Chien, 1996).

Há evidências de que, em concentrações fisiológicas (33-105 $\mu\text{U}/\text{mL}$), a insulina segue uma cinética linear, sendo a taxa de disposição proporcional às concentrações séricas (Sacca *et al.*, 1984). No entanto, em concentrações acima dos níveis fisiológicos, a *clearance* da insulina sistémica é reduzida. Pensa-se que esta redução da *clearance* resulta da saturação da capacidade do fígado em metabolizar elevados níveis de insulina. No entanto, a não proporcionalidade entre as concentrações plasmáticas e a velocidade de eliminação da insulina em indivíduos não diabéticos tem sido controversa.

A *clearance* metabólica total da insulina humana é mais baixa nos doentes diabéticos do que nos indivíduos saudáveis. A *clearance* da insulina é realizada, inicialmente, no fígado, onde cerca de 50% da insulina plasmática é removida durante o metabolismo de primeira passagem hepática (Michel, 1991). A captação hepática não é estática e varia de acordo com várias condições fisiopatológicas, estando a *clearance* da insulina diminuída nos indivíduos com a função hepática comprometida. Geralmente, as *clearances* hepáticas encontram-se diminuídas nos doentes diabéticos e nos indivíduos obesos. De acordo com o modelo de cinco compartimentos, o tempo de residência média da insulina secretada endogenamente é de 71 min, dos quais 62 min são gastos na ligação ao receptor hepático, 6 min para a ligação aos receptores periféricos e 3 min no sangue. De acordo com este modelo, cerca de 80% da insulina total liga-se a receptores no fígado.

O rim é outro local de *clearance* da insulina existente na circulação sistémica. É também no rim que ocorre a *clearance* dos análogos da insulina. Nos diabéticos tipo 1, a *clearance* renal assume uma maior importância, quando se compara com a dos indivíduos saudáveis, isto porque, a insulina administrada por via s.c. não é sujeita ao mecanismo de primeira passagem hepática, sendo, então, o rim responsável pela remoção da insulina nestes doentes. Em indivíduos saudáveis, isto é, sem doenças renais ou função renal comprometida, o rim reabsorve cerca de 99% da insulina, excretando apenas 1% de insulina (Michel, 1991). Uma falha renal pode ser responsável pelo aumento de episódios hipoglicémicos em indivíduos tratados com insulina.

A insulina que não é removida pelo fígado e pelo rim é removida, em última instância, por outros tecidos. Todas as células sensíveis à insulina removem e degradam esta hormona. O músculo é responsável, a seguir ao fígado e ao rim, pela sua remoção através de um mecanismo que envolve a ligação da insulina ao receptor, a sua internalização e consequente degradação. Também a placenta, os adipócitos, os fibroblastos, os monócitos e os linfócitos são responsáveis pela captação e degradação da insulina.

2.7. Efeitos adversos

Clinicamente, a administração s.c. de insulina não reproduz a insulina fisiológica hepática e a da circulação sistémica. Num indivíduo normal, a insulina é secretada rapidamente, como resposta metabólica ao aumento de glucose no sangue após ingestão de comida, directamente para a veia porta e desta para o local primário da acção da insulina – o fígado. As concentrações hepáticas de insulina são francamente superiores às sistémicas. Quando a insulina é injectada pela via s.c., apenas 20% da insulina inicial alcança o fígado, uma vez que esta é libertada na circulação sistémica e é necessário um período de tempo para a sua dissolução e difusão, sendo este período de tempo independente da concentração de glucose no sangue. Dessa forma, podem ocorrer os casos de hipoglicémia.

A administração de insulina pela via s.c. pode conduzir ainda a inúmeros efeitos adversos, nomeadamente efeitos adversos alérgicos. Inicialmente, alguns dos efeitos adversos

alérgicos da insulina estavam relacionados com o grau de purificação e origem animal da insulina. Actualmente, estes problemas não se colocam. No entanto, os fenómenos alérgicos locais poderão ser mais frequentes com insulinas em suspensão. Além disso e apesar de raros, podem ocorrer casos de hipersensibilidade ao zinco e à protamina.

Um efeito adverso associado à terapia insulínica por via s.c. relaciona-se com a ocorrência de lipoatrofias (Duarte, 1997). A insulina pode provocar a perda de tecido s.c. nas áreas de injeção repetida.

Podem também ocorrer situações extremamente raras, tais como as reacções alérgicas generalizadas. Caracterizam-se por uma reacção anafilática e ocorre em indivíduos que retomam a insulinoterapia após a terem abandonado temporariamente.

A insulina pode actuar como um alergéneo. Este facto é observado durante o aparecimento de auto-anticorpos anti-insulina no decurso da fase inicial da agressão auto-imunitária da Diabetes *Mellitus* ou no desenvolvimento de anticorpos anti-insulina no decurso da terapêutica insulínica, embora, habitualmente, em títulos muito baixos com as insulinas humanas (Duarte, 1997).

Efeitos adversos que ainda são comuns na prática clínica são o aparecimento de zonas de lipohipertrofia e, mais raramente, edemas insulínicos. A primeira situação acontece devido às injeções locais repetidas que promovem o aumento de gordura no tecido s.c. e, o subsequente desenvolvimento de adiposidades localizadas. Como a injeção repetida num determinado local se torna indolor, o doente diabético tem a tendência para continuar a injectar nessa área. A absorção de insulina nesta área lipohipertrófica é errática e a sua acção é menos potente, visto a insulina actuar localmente como factor lipogénico local. Os edemas insulínicos, apesar de raros, ocorrem no início ou reinício da terapêutica insulínica em indivíduos com largo período de descontrolo glicémico. A etiologia destes edemas está relacionada com um período prévio de desidratação crónica provocada por um estado permanente de hiperglicémia (Duarte, 1997).

Por último, do ponto de vista do doente, a administração s.c. traz variadíssimas complicações associadas ao desconforto psicológico. Vejamos que, se um paciente diabético precisar de administrar diariamente insulina s.c. para obter um bom controlo glicémico

(por exemplo 4 i.d.), este regime corresponderá a 1460 injeções ao final de um ano. Esta via de administração não é, claramente, a primeira escolha do paciente.

2.8. Interações medicamentosas e contra-indicações

A dose de insulina poderá ser aumentada quando o doente fizer uma terapêutica com medicamentos com alguma actividade hiperglicémica, nomeadamente anticoncepcionais orais, corticosteróides e tratamento de substituição tiroidea. Por outro lado, a dose poderá ser diminuída quando o doente fizer terapêutica com medicamentos com alguma actividade hipoglicémica, incluindo salicilatos, antibióticos do grupo sulfanoamidas e inibidores da monoaminoxidase.

A insulina humana está contra-indicada na ocorrência de episódios de hipoglicémia e em doentes com hipersensibilidade à insulina humana ou a qualquer componente da sua fórmula medicamentosa.

2.9. Dosagem

A posologia da insulina é individual e é determinada com base nos critérios do médico. As doses individuais de insulina encontram-se entre 0,5 e 1,0 U/Kg/dia, dos quais, aproximadamente, dois terços são administrados antes das principais refeições e um terço é considerado insulina basal. O importante é que seja realizado um controlo metabólico eficaz, de forma a atrasar a progressão das complicações diabéticas.

3. NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA A ADMINISTRAÇÃO ORAL DA INSULINA

A obtenção de uma forma farmacêutica oral de insulina seria, certamente, uma grande contribuição para o tratamento da Diabetes *Mellitus* e, mesmo que não substituísse a terapia parentérica na sua totalidade, poderia em última instância, complementá-la. A importância da insulina oral é enorme e estende-se a vários níveis. Para além do aumento da adesão à terapêutica, por ser considerada do ponto de vista do doente uma via de administração mais cómoda, a insulina exógena administrada oralmente iria assemelhar-se, em todos os aspectos, à insulina fisiológica em indivíduos saudáveis (Still, 2002). Fisiologicamente, a insulina absorvida pelo intestino, seria reencaminhada até ao fígado onde exerceria um papel fundamental no metabolismo da glucose, segundo mecanismos muito semelhantes ao estado fisiológico de indivíduos sem a doença (Cernea e Raz, 2006). Para além disso, a administração oral de insulina tem demonstrado outros efeitos benéficos, nomeadamente na alteração da resposta imunitária, que é responsável pela destruição das células pancreáticas em doentes diabéticos (Hoffman e Ziv, 1997).

Infelizmente, a sensibilidade às enzimas presentes ao longo do TGI, a fraca permeabilidade intestinal e a própria instabilidade físico-química da proteína fazem com que o objectivo anterior não seja fácil de alcançar. Ao longo dos tempos, têm sido utilizadas diversas estratégias para administrar oralmente a insulina: inibidores enzimáticos, promotores de absorção, sistemas bioadesivos, lipossomas, micro e nanopartículas, modificação química da molécula de insulina, etc. Estas estratégias, até ao momento, têm obtido um sucesso muito discreto, mas quando associadas entre si, esse sucesso tem-se revelado bem mais expressivo. Os últimos desenvolvimentos tecnológicos (Lin *et al.*, 2004) são prova disso e envolvem grandes companhias farmacêuticas, como a Emisphere Technologies, Inc., a Nobex Corporation, a AutoImmune, a Cortec, a Unigene Lab, etc.

3.1. Estratégias orais

A primeira estratégia para a insulina oral foi desenvolvida por Saffran e colaboradores (Saffran *et al.*, 1997), quando foram administradas doses elevadas de soluções de insulina a ratos diabéticos. Os níveis de glicémia diminuíram, mas os ratos tornaram-se hiperfágicos e perderam peso corporal. O mecanismo de acção da insulina proposto neste estudo foi baseado numa diminuição da motilidade gastrointestinal, da digestão e da absorção através da diminuição do fluxo sanguíneo do intestino para o fígado.

Um outro estudo demonstrou um resultado ligeiramente diferente; observou-se um efeito benéfico da insulina oral apenas em termos de evolução da patologia diabética mas sem qualquer efeito nos níveis de glicémia (Heng *et al.*, 2000).

De seguida, serão apresentados diversos estudos que se encontram organizados de acordo com o tipo de estratégia utilizada. A descrição não engloba todos os estudos que envolveram a administração oral de insulina, mas seleccionaram-se os mais relevantes.

3.1.1. Inibidores enzimáticos

Os inibidores enzimáticos são considerados estratégias muito úteis na administração oral de insulina. A insulina, tal como acontece com outros fármacos peptídicos, é degradada pelas enzimas presentes no TGI. A selecção do inibidor enzimático depende tanto do tipo de fármaco peptídico a proteger como do tipo de enzimas a inibir.

Nos anos 80, Ziv estudou o efeito do colato de sódio e da aprotinina numa solução contendo insulina. Esta solução foi injectada no íleo de ratos e aumentou a absorção intestinal da insulina (Ziv *et al.*, 1987). Um outro estudo usou a acarbose como inibidor da α -glucosidase intestinal e observou-se um efeito positivo em animais diabéticos (Katavoich e Meldrum, 1993). O mesmo aconteceu com um inibidor específico da quimiotripsina FK-448 associado à quimostatina (Fujii *et al.*, 1985). Contudo, resultados obtidos em outros estudos

revelaram que, a acção dos inibidores enzimáticos nem sempre foi previsível e eficaz. Por exemplo, um estudo que envolveu o inibidor da tripsina de soja fundamenta a observação anterior (Fujii *et al.*, 1985).

Apesar de resultados discordantes, muitos outros estudos surgiram e envolveram outros inibidores de enzimas, sendo eles a aprotinina ou o inibidor Bowman–Birk. O efeito inibidor foi dependente do local de actuação (Morishita *et al.*, 1992a; Morishita *et al.*, 1992b). Um outro estudo consistiu na co-administração da aprotinina e do inibidor da tripsina de soja, aprotinina isolada ou a combinação de mesilato de camostato com a bacitracina. Esta última estratégia revelou-se mais eficaz na redução da glicémia, comparativamente com as outras estratégias (Yamamoto *et al.*, 1994).

Muitos têm sido os trabalhos que envolvem inibidores enzimáticos e sistemas poliméricos e que têm demonstrado um aumento da absorção intestinal da insulina, quando administrada oralmente. Por exemplo, o grupo pioneiro de Morishita e colaboradores desenvolveu uma formulação de microesferas de insulina contendo aprotinina (Morishita *et al.*, 1993). A seguir a este, foram surgindo outros trabalhos nesta área mas que usaram cápsulas de gelatina contendo colato de sódio e revestidas com Eudragit[®] S100 (Hosny *et al.*, 1997); nanocápsulas de PACA dispersas em meio oleoso contendo o *poloxamer 188* e o ácido deoxicólico (Damgé *et al.*, 1997b) e microesferas de N-8[2-(hidroxibenzoílo) amino] caprilato de sódio (Qi e Ping, 2004).

A associação de inibidores enzimáticos também se tem revelado uma boa estratégia. Um trabalho desenvolvido por Marschutz e colaboradores (Marschutz *et al.*, 2000) associou diversos inibidores enzimáticos (inibidor de *Bowman-Birk*-carboximetilcelulose e carboximetilcelulose-elastatinal) e demonstrou que a formulação em causa foi eficaz na redução da glicémia por mais de 72 h e não causou danos a nível das células intestinais.

Para além das cápsulas e microesferas, também foram utilizados *pellets* em associação com inibidores enzimáticos. Os *pellets* contendo insulina revestidos com azopolímeros e mesilato de camostato, conduziram a uma redução nos níveis de glicémia em ratos (Tozaki *et al.*, 2001). Também a associação de inibidores enzimáticos com os lipossomas se revelou vantajosa (Katayama *et al.*, 2003).

O tipo de inibidores enzimáticos influencia a sua eficácia. O trabalho desenvolvido por Agarwal e colaboradores (Agarwal *et al.*, 2001a; Agarwal *et al.*, 2001b) envolveu micropartículas de PECA, contendo ovomucóides de galinha e de pato como inibidores enzimáticos. Observou-se que o ovomucóide de galinha foi ineficaz na inibição da quimiotripsina, enquanto que o ovomucóide de pato foi eficaz para a mesma enzima. Curiosamente, a associação destes dois inibidores enzimáticos revelou-se eficaz na inibição da tripsina (Agarwal *et al.*, 2000). Esta glicoproteína da ovomucóides de pato foi ainda utilizada, mais tarde, num hidrogel de insulina (Plate *et al.*, 2002).

Porém, o uso crónico dos inibidores enzimáticos pode conduzir a uma toxicidade provocada pela sua inespecificidade. De facto, estes agentes, se não forem absorvidos, podem inibir as enzimas digestivas e alterar a digestão de outras proteínas como, por exemplo, as nutritivas (Otsuki *et al.*, 1987). Por outro lado, se forem absorvidos, a sua absorção pode resultar numa toxicidade sistémica (McCaffrey e Jamieson, 1993). Além disso, a acção inibitória dos inibidores enzimáticos pode aumentar a secreção das enzimas inibidas por um mecanismo de *feedback* negativo e originar efeitos secundários severos, como as intoxicações sistémicas ou como os casos de hipertrofia e hiperplasia do pâncreas (Peppas e Kavimandan, 2006).

3.1.2. Promotores de absorção

O promotor de absorção é um agente capaz de aumentar a absorção intestinal de fármacos, pelas vias transcelular e paracelular. A promoção da absorção intestinal pode ocorrer por alteração estrutural da mucosa e membranas epiteliais ou, simplesmente, através da difusão do próprio fármaco através da membrana intestinal (Shao *et al.*, 1993).

Os promotores de absorção incluem os ácidos gordos (Mesiha *et al.*, 1994), os sais biliares, o ácido 5-metoxisalicílico (Nishihata *et al.*, 1981), Labrasol[®] (Gattefossé, NJ, EUA) (Eaimtrakan *et al.*, 2002), PEG (Michel, 1991) e agentes quelantes como, por exemplo, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), entre outros. Alguns deles são considerados tóxicos, principalmente, o dodecilsulfato de sódio, o EDTA e o desoxicolato de sódio (Shao *et al.*,

1993). Outros, como o glicolato de sódio, o caprato de sódio e o n-lauril- β -D-maltopiranosido têm vindo a receber mais atenção como promotores de absorção da insulina devido à sua baixa toxicidade (Uchiyama *et al.*, 1999; Katsuma *et al.*, 2006).

Para a administração da insulina, os promotores de absorção mais usados têm sido os sais biliares, o EDTA e o citrato trisódico apesar dos geles de agentes emulsivos não iónicos também terem demonstrado um aumento da permeabilidade da insulina em ratos (Touitou *et al.*, 1980).

A associação de estratégias com promotores de absorção também se revelou vantajosa, designadamente a associação de ácido gordo-éter gordo de polioxialquileno (*Brij*[®]) e ácido esteárico (Mesiha e El-Bitar, 1981). Em termos de combinação de estratégias, observou-se também que cápsulas de gelatina, contendo laurato de sódio em meio oleoso, aumentaram a biodisponibilidade da insulina de 9,3 para 12,7% (Touitou e Rubinstein, 1986). Porém, foi obtido um resultado diferente com a associação *Brij*[®] com hidroxipropilcelulose. Este último sistema não foi eficaz na redução da glicémia em coelhos. Outros estudos surgiram e estes envolveram outras combinações de estratégias, tais como a utilização de dois promotores de absorção (*Brij*[®] 35 e salicilato de sódio) e de dois polímeros (celulose e hidroxipropilcelulose) (Mesiha e Sidhöm, 1995). Neste último estudo, observou-se que o efeito na glicémia foi dependente do grau de viscosidade da hidroxipropilcelulose.

Um estudo que merece particular atenção foi desenvolvido por Hosny e colaboradores (Hosny *et al.*, 1995), onde que foram utilizadas cápsulas de gelatina contendo salicilato de sódio, como promotor de absorção, e revestidas com uma mistura de vários tipos de Eudragit[®]. A dose administrada de insulina foi de 13,2 a 15,3 UI/kg e a biodisponibilidade observada foi de 13,26 a 14,15%, relativamente à injeção intraperitoneal (i.p.).

Uma outra estratégia para promover a absorção da insulina foi a aplicação de uma toxina designada por *zonula occludens toxin* (ZOT). Num estudo desenvolvido por Fasano e Uzzau, observou-se que a ZOT aumentou a permeabilidade intestinal da insulina, aumentando a sua biodisponibilidade de 8 para 16% (Fasano e Uzzau, 1997). A seguir a este estudo, muitos outros se desenvolveram e, os dados obtidos até ao momento mostram que ZOT é uma

alternativa muito promissora para aumentar a absorção de insulina ou mesmo de outras proteínas (Carino e Mathiowitz, 1999).

Apesar de terem sido alcançados óptimos resultados com os promotores de absorção, a verdade é que, numa forma geral, estes agentes podem conduzir a uma alteração do tecido intestinal. Um estudo onde foram observados danos intestinais confirmou esta afirmação, mas tal facto ocorreu de uma forma não consistente (Bernkop-Schnürch *et al.*, 2005). Por este motivo, a problemática da toxicidade dos promotores de absorção tem sido alvo de debate. Por exemplo, um estudo desenvolvido por Suzuki e colaboradores (Suzuki *et al.*, 1998) incidiu num estudo *in situ* de uma emulsão contendo ácido docosahexanóico em intestinos de ratos e demonstrou que, realmente, a absorção de insulina aumentou sem este causar danos nas células epiteliais do intestino. Pelo contrário, um outro estudo, que envolveu a aplicação de alquilglicósidos como promotores de absorção, mostrou diversas desvantagens devido aos danos causados nas membranas celulares (Eley e Triumalashetty, 2001). Num outro estudo, onde foi testada a acção promotora de absorção e a potencial toxicidade em ratos do glicolato de sódio, taurocolato de sódio, deoxicolato de sódio, EDTA, salicilato de sódio, caprato de sódio, maleato de dietilo e mistura de micelas, observou-se que apenas o glicolato de sódio e o taurocolato de sódio mostraram níveis baixos de toxicidade e actuaram como promotores eficazes da absorção do vermelho de fenol (Uchiyama *et al.*, 1996).

Outros compostos descritos na literatura e que apresentaram uma acção promotora de absorção da insulina foram as ciclodextrinas (Shao *et al.*, 1994; Dileep *et al.*, 1998; Gowthamarajan e Kulkarni, 2003) e, mais recentemente, os péptidos designados por *cell-penetrating peptides* (Cernea e Raz, 2006). Estes últimos aumentaram cerca de seis a oito vezes o transporte intestinal da insulina em culturas celulares Caco-2, relativamente à insulina normal. Contudo, este aumento de transporte intestinal não assegura que um determinado agente possa, efectivamente, aumentar a biodisponibilidade de um fármaco. Além disso, assumindo que a modificação da lipofilia possa favorecer a passagem de insulina através da mucosa intestinal, diversos derivados da insulina quimicamente modificados por acilação de ácidos gordos ou por conjugação com polímeros têm vindo a ser testados, mas muitos deles têm-se revelado ineficazes no aumento da absorção intestinal da insulina (Cernea

e Raz, 2006). Um dos poucos estudos em humanos que demonstrou um resultado contrário, isto é, observando-se um aumento da absorção de insulina foi através da aplicação do N-8[2-(hidroxibenzoílo) amino] caprilato de sódio (Cernea e Raz, 2006).

Uma nota importante na utilização destes promotores de absorção prende-se com o facto de, apesar de aumentarem a permeabilidade do fármaco alvo, estes agentes também aumentam a permeabilidade de outras substâncias, tais como vírus e bactérias, o que pode levar a efeitos secundários adversos. Uma outra desvantagem associada à aplicação de agentes promotores de absorção relaciona-se com a possível alteração da superfície da estrutura lipídica das membranas celulares. Por isso, é necessário que, no momento da selecção do promotor de absorção se questione o tipo de mecanismo envolvido bem como a potencial toxicidade que lhe possa estar associada.

3.1.3. Lipossomas

Tecnologicamente, os lipossomas são pequenas esferas de fosfolípidos cuja estrutura se assemelha à das membranas celulares. São pequenas vesículas constituídas por uma ou mais camada lipídica alternada com compartimentos aquosos. Os lipossomas podem ser classificados em diferentes tipos: vesículas pequenas ou grandes unilamelares ou vesículas multilamelares (Gowthamarajan e Kulkarni, 2003).

O primeiro estudo de lipossomas com insulina surgiu com Patel e Ryman em cães diabéticos, onde foi observada uma diminuição da glicémia em função do tempo (Patel e Ryman, 1976). Desde então, muitos estudos têm usado os lipossomas na administração da insulina (Patel e Ryman, 1977; Manosroi e Bauer, 1990; Choudhari *et al.*, 1994; Takeuchi *et al.*, 1996; Iwanaga *et al.*, 1997; Iwanaga *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Ramadas *et al.*, 2000; Kisel *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Huang e Wang, 2006). Na sua maioria, a diminuição da glicémia dependeu de factores como, por exemplo, a composição lipídica, a presença ou ausência de agente emulsivo, o tamanho do lipossoma e a carga eléctrica (Dapergolas e Gergoriadis, 1976; Choudhari *et al.*, 1994; Agarwal, 2001; Kisel *et al.*, 2001; Varshovaz *et al.*, 2003).

Sabe-se que os lipossomas convencionais são susceptíveis de degradação enzimática e dissolução por parte dos sais biliares, mas essa sensibilidade pode ser diminuída com reacções de polimerização (Chen *et al.*, 1996; Langer, 1998; Agarwal, 2001), através de técnicas de revestimento com quitosano, álcool polivinílico ou ácido poliacrílico (Takeuchi *et al.*, 1996), ou por meio da incorporação de taurocolato de sódio (Degim *et al.*, 2004), de dipalmitoilfosfatidiletanol (Kisel *et al.*, 2001) ou de monoésteres de sorbitano (Varshovaz *et al.*, 2003). Porém, os resultados com lipossomas contendo insulina continuam a ser contraditórios. Essa contrariedade tem sido atribuída à diferente composição das diversas formulações e, nem tanto à eficiência dos próprios lipossomas que, em muitas outras áreas da tecnologia farmacêutica, já têm demonstrado bons resultados (Simões *et al.*, 2005).

Outras abordagens que também se encontram em estudo envolvem emulsões múltiplas e podem ser consideradas potenciais veículos para a administração oral de insulina (Matsuzawa *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1996; Silva-Cunha *et al.*, 1997b; García-Fuentes *et al.*, 2003; Toorisaka *et al.*, 2003; Li e Deng, 2004; Cilek *et al.*, 2005). Outras envolvem sistemas vesiculares muito semelhantes aos lipossomas. Estes sistemas são denominados por transfersomas e conduziram a um aumento da biodisponibilidade da insulina, quando administrados localmente na cavidade bucal (Song *et al.*, 2004).

3.1.4. Micro e nanopartículas

O primeiro estudo com nanopartículas de insulina preparadas pelo método de dessolvatação data de 1982 (Oppenheim *et al.*, 1982). Esta formulação foi administrada oralmente a ratos e conduziu a uma diminuição da glicémia de 15 a 20%, após 3 h da administração. A redução da glicémia foi lenta, mas mais pronunciada do que a redução da glicémia observada com a administração s.c. (Oppenheim *et al.*, 1982).

Mais tarde, a insulina foi adsorvida a nanopartículas de PACA mas, após administração oral a ratos diabéticos, observou-se que a formulação anterior não conduziu a um abaixamento da glicémia. Depois, em vez de adsorvida, a insulina foi encapsulada e, neste caso, foi observada uma redução ligeira na glicémia (Couvreur *et al.*, 1980b).

Desde então, foram surgindo muitos estudos dedicados à administração oral de insulina. Um desses estudos foi realizado com nanopartículas de PIBCA preparadas por polimerização interfacial (Al Khouri Fallouh *et al.*, 1986; Damgé *et al.*, 1988). Estas nanopartículas, mais especificamente nanocápsulas, contendo insulina demonstraram um efeito hipoglicémico prolongado em ratos diabéticos, em jejum ou com alimentação, mas não demonstraram efeito hipoglicémico em ratos normais (Dalgé *et al.*, 1988). A duração do efeito hipoglicémico prolongado foi atribuído não só a uma passagem lenta pelo TGI associada a uma chegada progressiva de nanocápsulas intactas, contendo insulina, à mucosa intestinal, mas também a outros passos após a absorção (Michel *et al.*, 1992). Este efeito hipoglicémico prolongado foi, também, explicado pela retenção de insulina no próprio sistema polimérico. Num outro estudo desenvolvido por Damgé e colaboradores (Dalgé *et al.*, 1990), observou-se que a encapsulação de insulina em nanocápsulas de PIHCA protegeu o fármaco das enzimas proteolíticas e permitiu a absorção da insulina através da mucosa intestinal. A redução da glicémia foi de 50-60% em relação aos valores de glicémia basais. Desde o estudo de Damgé (Dalgé *et al.*, 1988), outros investigadores estudaram a vantagem das nanopartículas de PACA na administração oral de insulina (Watnasirichaikul *et al.*, 2000; Radwan, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Behan *et al.*, 2002; Cournarie *et al.*, 2002; Pinto-Alphandary, 2003; Mesiha *et al.*, 2005).

Outro exemplo de sistema polimérico foi desenvolvido por Morishita e colaboradores (Morishita *et al.*, 1992a), e consistia em microesferas de Eudragit® contendo um inibidor enzimático. Neste estudo, foi observada uma forte protecção enzimática da insulina, relativamente à pepsina, mas esta formulação permitiu a degradação da insulina na presença de tripsina e quimiotripsina. Após administração oral de 20 UI/kg de microesferas de insulina, sem o inibidor enzimático, a biodisponibilidade observada em ratos diabéticos e ratos normais foi de 1,1 e 0,9%, respectivamente. Na presença do inibidor enzimático, para a aprotinina, a biodisponibilidade inicial aumentou para 2,1 e 3,4% em ratos diabéticos e normais, respectivamente. Este estudo concluiu que a presença de inibidores enzimáticos foi crucial para o aumento da biodisponibilidade da insulina (Morishita *et al.*, 1992a). Esta conclusão foi, também, confirmada por outros grupos (Agarwal *et al.*, 2001b).

Outro polímero aplicado na administração oral de insulina foi o álcool polivinílico. Kimura e colaboradores (Kimura *et al.*, 1996) prepararam microesferas de álcool polivinílico e administraram esta formulação a ratos diabéticos nas doses 287-344,4 UI/kg. As microesferas aumentaram o tempo de residência da insulina a nível intestinal e foram responsáveis pelo efeito hipoglicémico observado. A biodisponibilidade da insulina obtida foi de 2%.

Um outro polímero utilizado na administração da insulina foi o PMMA com PEG sob a forma de micropartículas (Lowman *et al.*, 1999). As micropartículas, depois de preparadas, foram secas e introduzidas numa cápsula de gelatina. A biodisponibilidade obtida foi, consideravelmente, superior à biodisponibilidade obtida com cápsulas controlo, contendo insulina não encapsulada (4% *versus* 0,55%). Face a estes resultados, um outro grupo desenvolveu nanopartículas do mesmo polímero e observou que os níveis de glicémia obtidos foram muito inferiores aos valores do grupo controlo (Foss *et al.*, 2004; Foss e Peppas, 2004). O efeito hipoglicémico prolongou-se durante 6 h. O PMMA foi ainda utilizado em outros estudos, misturado com outros polímeros, nomeadamente o alginato (Sajeesh e Sharma, 2004) e o quitosano (Sajeesh e Sharma, 2006b).

Um trabalho que mereceu uma atenção especial foi desenvolvido por Mathiowitz e colaboradores (Mathiowitz *et al.*, 1997), que encapsularam a insulina em nanopartículas de PLGA e ácido fumárico. Este estudo demonstrou um controlo nos níveis de glicémia dos animais com nanopartículas de PLGA e ácido fumárico muito superior em relação ao grupo de animais controlo, sugerindo, assim, que a insulina foi libertada das nanoesferas na sua forma bioactiva e foi capaz de atravessar a barreira intestinal. Esta formulação foi reformulada num trabalho posterior e demonstrou uma biodisponibilidade oral de 11,4% (Carino *et al.*, 2000).

A insulina foi ainda encapsulada em micropartículas de PLA (Ma *et al.*, 2000). A redução da glicémia foi de $57 \pm 21\%$, após administração oral, e a variabilidade hipoglicémica foi atribuída à diferente absorção da insulina ao longo do TGI.

Outros polímeros, nomeadamente os terpolímeros de N-isopropilacrilamida, o metacrilato de butilo e ácido acrílico (Ramkissoon-Ganorkar *et al.*, 1999), a PCL e o Eudragit[®]

(Damgé *et al.*, 2007), o fosfato de cálcio-caseína (Morçol *et al.*, 2004) foram também utilizados para a administração oral de insulina.

Porém, as linhas de avanço da micro e da nanotecnologia apontam para a procura de polímeros de origem natural como, por exemplo, o alginato. O primeiro trabalho com alginato e insulina foi desenvolvido por Gray em 1988 (Gray e Dowsett, 1988), seguido mais tarde, pelo grupo de Sharma, em 1996. A insulina foi encapsulada em macroesferas de alginato pelo método extrusão/gelificação que, posteriormente, foram revestidas com quitosano (Hari *et al.*, 1996). Infelizmente, este último sistema polimérico conduziu a EE baixas (11%) e, por essa razão, foram adoptadas alterações baseadas na manipulação do pH (Moses *et al.*, 1999), complexação com ciclodextrinas (Dileep *et al.*, 1998; Moses *et al.*, 1999; Jerry *et al.*, 2001; Timmy *et al.*, 2002), encapsulação em lipossomas (Ramadas *et al.*, 2000), aplicando diferentes métodos de preparação de microesferas (Jerry *et al.*, 2001; Timmy *et al.*, 2002), recorrendo a reforços da matriz polimérica (Sajeesh e Sharma, 2004; Kumar *et al.*, 2005), etc. Um exemplo deste progresso foi observado com macroesferas de alginato preparadas por extrusão/gelificação externa e revestidas com quitosano (Onal e Zihnioglu, 2002). Neste caso, a EE obtida foi de 97% e a resistência enzimática da insulina foi de 5,8% e 12,3% para a pepsina e tripsina, respectivamente. Outros trabalhos foram, entretanto, publicados com macroesferas de alginato e demonstraram sucesso em termos de EE (Wang e He, 2002). Mais recentemente, surgiram estudos com microesferas de alginato produzidas pelo método de emulsificação/gelificação interna (Silva *et al.*, 2006b; Silva *et al.*, 2006c).

Outro polímero natural, igualmente interessante, é o quitosano. Um dos trabalhos pioneiros com quitosano e insulina e que demonstrou algum sucesso, foi desenvolvido por Pan e colaboradores (Pan *et al.*, 2002). Neste caso, o efeito hipoglicémico, observado após administração oral das nanopartículas com insulina, foi prolongado durante 15 h e a biodisponibilidade média obtida foi de 14,9%. Em outros trabalhos, observaram-se valores mais baixos de biodisponibilidade (entre 5,58 e 8,3%) com nanopartículas de quitosano preparadas por gelificação ionotrópica, após administração oral em ratos diabéticos (Cui *et al.*, 2004). Num outro trabalho, o efeito hipoglicémico oral observado foi dependente do pH de preparação das nanopartículas (Ma *et al.*, 2005). O quitosano foi ainda utilizado em associação

com outros compostos como, por exemplo, com o PEG (Prego *et al.*, 2006b), com o PMMA e o PEG (Sajeesh e Sharma, 2005), com as ciclodextrinas (Sajeesh e Sharma, 2006a) ou com monómeros de metacrilato, hidrocloreto de n-dimetilaminoetilmetacrilato e cloreto de N-trimetilaminoetilmetacrilato (Qian *et al.*, 2006). Um outro estudo envolveu microesferas de ftalato de quitosano (Ubaidulla *et al.*, 2007). Esta formulação demonstrou uma protecção significativa da insulina relativamente ao ataque proteolítico da pepsina mas, até ao momento presente, não foram apresentados ensaios *in vivo* com esta formulação. Um outro estudo desenvolvido por Lin e colaboradores (Lin *et al.*, 2007) que envolveu nanopartículas de quitosano e ácido poli(γ -glutâmico) demonstrou uma redução significativa da glicémia em cerca de 55% dos níveis basais e esse efeito prolongou-se durante 10 h.

Para além do alginato e do quitosano, também outros materiais naturais têm sido usados para a encapsulação da insulina, entre os quais, a gelatina (Narayani e Rao, 1995) e a pectina (Musabayane *et al.*, 2000; Cheng e Lim, 2004).

3.1.5. *Sistemas bioadesivos*

Geralmente, os sistemas bioadesivos são utilizados em associação com outras estratégias. Os sistemas bioadesivos permitem o contacto íntimo entre a mucosa intestinal e o fármaco, sendo possível obter concentrações elevadas do fármaco no local de absorção. Por outro lado, estes sistemas permitem uma administração vectorizada do fármaco para o local específico de absorção (Krauland *et al.*, 2004). Todavia, estes sistemas podem afectar o *turnover* do muco intestinal e alterar a fisiologia da mucosa intestinal. Alguns dos polímeros bioadesivos utilizados na administração oral de insulina, foram: o ácido poliacrílico ligado ao glicol divinílico (*polycarbophil*[®]) e o quitosano (Gowthamarajan e Kulkarni, 2003; Bernkop-Schnürch *et al.*, 2004; Krauland *et al.*, 2004).

3.1.6. Células

Uma outra forma de veicular insulina oralmente consiste na encapsulação da insulina em células como, por exemplo, os eritrócitos. Os eritrócitos têm surgido como sistemas de administração de fármacos peptídicos, principalmente, devido à selectividade apresentada, à eficácia na administração de fármacos, à própria biodegradabilidade e à não imunogenicidade (Hamidi *et al.*, 2007). Al-Achi e Greenwood desenvolveram diferentes formas de membranas eritrocitárias para veicular fármacos e outras substâncias (Al Achi e Greenwood, 1993a). As membranas eritrocitárias utilizadas foram de dois tipos: eritrócitos-fantasma (*erythrocyte-ghost*) e eritrócitos-vesículas (*erythrocyte-vesicles*). A insulina foi adicionada aos eritrócitos-fantasma e após administração oral desta formulação, a glicémia diminuiu em ratos diabéticos (Al Achi e Greenwood, 1993b).

3.1.7. Modificações químicas da insulina

A modificação química da estrutura de um péptido ou proteína é outra alternativa para aumentar a sua biodisponibilidade e a estabilidade face à degradação enzimática e permeabilidade membranar (Gowthamarajan e Kulkarni, 2003).

Esta alternativa foi posta em prática pelo grupo de Asada e colaboradores (Asada *et al.*, 1994) em 1994, com a modificação química de péptidos com ácidos gordos. Estes novos compostos, quando incubados no intestino a 37°C, demonstraram uma proteólise reduzida, principalmente, devido ao aumento do número de carbonos dos ácidos gordos ligados à fenilalanina na posição B₁ da molécula de insulina. Esta especificidade de modificação química revelou-se importante no grau de associação da molécula de insulina (Asada *et al.*, 1995). Além disso, esta abordagem demonstrou ser preferível à aplicação de inibidores enzimáticos e promotores de absorção, uma vez que, os derivados da insulina não demonstraram danos a nível da mucosa intestinal e não causaram fenómenos de irritação local, como se verificou nas estratégias anteriores (Asada *et al.*, 1995). Para além deste

trabalho, foram estudadas diversas hipóteses de modificação química da molécula de insulina como, por exemplo: derivados de insulina com o ácido palmítico (Hashizume *et al.*, 1992), insulina com a fenilalanina monoglucosilada na posição B₁ (Hashimoto *et al.*, 2000), derivados insulina-monoetoxi(polietilenoglicol) (Calceci *et al.*, 2004), insulina com PEG (Hinds *et al.*, 2005), ligação não covalente da insulina com o N-8[2-(hidroxibenzoilo) amino] caprilato de sódio (Malkov *et al.*, 2005) e, mais recentemente, a modificação da insulina pela ligação covalente de oligómeros anfífilicos de baixo PM. Este último sistema foi desenvolvido pela companhia farmacêutica Nobex Corporation (Still, 2002) e foi designado de HIM2. O design dos oligómeros anfífilicos associou uma ligação da parte alquil lipofílica com a parte hidrofílica do PEG. O resultante oligómero (hexilo) foi, depois, adicionado na posição 29 do aminoácido lisina da insulina. Este tipo de alteração química permitiu um aumento da permeabilidade da insulina na mucosa intestinal e conduziu a uma localização da insulina à superfície das células. Estudos em cães demonstraram que a biodisponibilidade oral foi de, aproximadamente, 8%. Até ao momento presente, os resultados dos ensaios clínicos de fase I e II sugerem que a biodisponibilidade se situa próxima de 5%. O mecanismo proposto para esse aumento da biodisponibilidade da insulina relaciona-se com um possível impedimento estérico ao ataque enzimático na molécula de insulina. Por outro lado, foi proposto que a ligação de oligómeros à insulina poderá inibir a degradação da molécula em tecidos alvo ou mesmo no sangue e, desta forma, prolongar o tempo de semi-vida da insulina. Um estudo realizado em humanos saudáveis e em doentes com diabetes do tipo 1 e 2 demonstrou que a administração do HIM2 resultou num rápido aumento da absorção de insulina (o pico máximo de insulina plasmática foi alcançado após 60 min e voltou aos níveis basais após 2 h) e subsequente diminuição dos níveis de glicémia. A produção endógena de glucose foi suprimida durante 3 h, mesmo quando a insulina plasmática voltou aos seus níveis basais (Cernea e Raz, 2006).

Foi desenvolvido, ainda, um outro estudo que também adoptou a estratégia de modificação química da insulina (Shah e Shen, 1996). Neste caso, realizou-se uma reacção de acilação com o anidrido dimetilmaleico e, posteriormente, conjugação com a transferrina via ligação dissulfureto. Este conjugado foi testado em cultura celular Caco-2 e demonstrou que a

captação do conjugado ocorreu por transcitose mediada pelo receptor de transferrina e não mediada pelo receptor da insulina. Observou-se que o transporte em células Caco-2 da insulina conjugada com a transferrina foi cinco a quinze vezes superior, quando comparado com a insulina não conjugada (Shah e Shen, 1996). Este estudo revelou, ainda, uma outra particularidade, quando foi adicionado um outro composto designado por *Brefeldin A*^a. Esta alteração modificou o transporte em células Caco-2 da insulina conjugada com a transferrina para quarenta e cinco vezes superior, quando comparado com a insulina não conjugada (Shah e Shen, 1996). Estes resultados foram motivo de satisfação para comunidade científica e foram muitos os trabalhos que se dedicaram ao conjugado de insulina com a transferrina (Xia *et al.*, 2000; Xia e Shen, 2001).

3.1.8. Formulações farmacêuticas para administração vectorizada

3.1.8.1 Administração específica no cólon

A administração específica no cólon pode ser encarada como uma forma alternativa de administração da insulina, principalmente, devido ao facto do cólon apresentar uma baixa actividade enzimática e uma drenagem linfática muito desenvolvida (Hoffman e Ziv, 1997).

O estudo pioneiro nesta área foi desenvolvido por Saffran e colaboradores (Saffran *et al.*, 1986), que produziram *pellets* de insulina revestidos com azopolímeros. A dose de insulina administrada variou entre 11 e 66 UI/kg, mas a biodisponibilidade da insulina obtida foi inferior a 1%. O efeito hipoglicémico observado foi atribuído à resistência enzimática, isto porque, o polímero de revestimento foi apenas degradado pelas bactérias presentes do cólon (Narayani, 2001).

Um estudo posterior (Tozaki *et al.*, 2001) utilizou um outro azopolímero como material de revestimento dos *pellets* de insulina e observou-se um valor de biodisponibilidade

^aMetabolito do fungo *Eupenicillium brefeldianum*. Este composto é utilizado na terapêutica como antibiótico.

de 0,89% mas, mesmo assim, consideravelmente baixo quando se compara com outras estratégias orais descritas nesta dissertação.

3.1.8.2 Administração específica no íleo

Tanto quanto se pôde perceber nesta pesquisa, são poucos os trabalhos que se dedicaram à administração oral de insulina específica no íleo. Os estudos que existem baseiam-se em dois tipos de sistemas: sistemas difusão da insulina (sistemas insolúveis) ou sistemas poliméricos de dissolução controlada (McPhillips *et al.*, 1997). Os sistemas poliméricos de dissolução controlada apresentam vantagens em relação aos sistemas de difusão devido à sua maior distribuição e flexibilidade. Exemplo disso foi um estudo desenvolvido por McPhillips e colaboradores (McPhillips *et al.*, 1997), no qual se produziram *pellets* de celulose e polivinilpirrolidona revestidos com Eudragit[®]. Este estudo revelou que a biodisponibilidade da insulina foi muito baixa, sendo 0,042% o valor mais elevado obtido.

3.1.9. *Resumo das combinações de estratégias*

A combinação das estratégias descritas anteriormente é utilizada para aumentar a biodisponibilidade oral da insulina. A Tabela I-2 descreve alguns exemplos de estudos desenvolvidos que recorreram a duas ou mais estratégias associadas.

Tabela I-2. Combinação de estratégias e seus efeitos observados.

1 ^a	Estratégias		Efeitos observados	Referências
	2 ^a	3 ^a		
Cápsula	Promotor de absorção (lauril sulfato de sódio)	Inibidor enzimático (aprotinina)	Redução da glicemia (n.d.)	(Kraeling e Ritschel, 1992)
Microencapsulação Micropartículas de Eudragit [®]	Inibidor enzimático (n.d.)		Redução de 10-20% da glicemia	(Morishita <i>et al.</i> , 1992a; Morishita <i>et al.</i> , 1992b)
Promotor de absorção (EDTA)	Inibidor enzimático (glicolato de sódio)		Redução da glicemia (n.d.)	(Geary e Schlameus, 1993)
Microencapsulação e sistemas gastrorresistentes Micropartículas revestidas com Eudragit [®] L	Promotor de absorção (colato de sódio)	Inibidor enzimático (inibidor da tripsina de soja)	Redução de 40% da glicemia	(Ziv <i>et al.</i> , 1994)
Microencapsulação Cápsula de gelatina revestida com Eudragit [®]	Promotor de absorção (salicilato de sódio)		Biodisponibilidade de 13-14%	(Hosny <i>et al.</i> , 1995)
Sistema colônico Comprimidos de pectinato de cálcio	Inibidor enzimático (colato de sódio e inibidor da tripsina de soja)		Redução fraca da glicemia (n.d.)	(Rubinstein e Radai, 1995)
Sistema bioadesivo Hidroxipropilcelulose	Promotor de absorção (<i>Brij</i> [®] 35 e salicilato de celulose)		Redução da glicemia apenas com salicilato de celulose (n.d.)	(Mesiha e Sidhöm, 1995)
Microencapsulação Esferas de álcool polivinílico	Inibidor enzimático (aprotinina e bacitracina)		Biodisponibilidade de 1,8% com bacitracina Biodisponibilidade de 2,0% com aprotinina	(Kimura <i>et al.</i> , 1996)
Promotor de absorção (oleato de sódio e n-dodecil-β-D-maltopiranosídeo)	Vários inibidores enzimáticos		Biodisponibilidade de 1,6%	(Tozaki <i>et al.</i> , 1997)
Microencapsulação Lipossomas	Modificação química da insulina (dietilamino etil-dextrano)	Encapsulação lipossomas em microcápsulas	Aumento da estabilidade no TGI	(Manosroi e Manosroi, 1997)
Sistema colônico Cápsulas de gelatina revestidas com azopolímero	Promotor de absorção (5-metoxisalicilato)		Redução fraca da glicemia (n.d.)	(Saffran <i>et al.</i> , 1997)

1 ^a	Estratégias		Efeitos observados	Referências
	2 ^a	3 ^a		
Sistema colônico Cápsulas de quitosano revestidas com azopolímero	Promotor de absorção (glicolato de sódio e n-dodecil-β-D- maltopiranosido)		Aumento de biodisponibilidade de 1,60% para 3,49%	(Tozaki <i>et al.</i> , 1997)
Sistema gastroresistente Cápsulas de gelatina revestidas com Eudragit [®]	Promotor de absorção (salicilato de sódio)	Inibidor enzimático (colato de sódio)	Redução de 27-30% da glicemia	(Hosny <i>et al.</i> , 1998)
Emulsão	Promotor de absorção (n.d.)		Actividade farmacológica de 10%	(Morishita <i>et al.</i> , 1998)
Emulsão múltipla	Promotor de absorção (taurocolato de sódio)	Inibidor enzimático (aprotinina)	Ausência de efeito na biodisponibilidade	(Silva-Cunha <i>et al.</i> , 1998)
Microencapsulação Lipossomas	Encapsulação de lipossomas em microcápsulas		Libertação sustentada de insulina	(Ramadas <i>et al.</i> , 2000)
Emulsão múltipla	Promotor de absorção (ácido eicosapentanóico e docosahexanóico)		Actividade farmacológica de 43,2%	(Morishita <i>et al.</i> , 2000)
Nanoencapsulação Nanopartículas PLGA e ácido fumárico	Sistema bioadesivo		Biodisponibilidade de 11,4%	(Carino <i>et al.</i> , 2000)
Nanoencapsulação Nanopartículas PIBCA	Promotor de absorção (<i>Pluronic</i> [®] F68 e colato de sódio)		Actividade farmacológica de 49,2%	(Radwan, 2001)
Sistema colônico <i>Pellets</i> revestidos com azopolímeros	Inibidor enzimático (mesilato de camostato)		Aumento da biodisponibilidade de 0,9% para 3,4%	(Tozaki <i>et al.</i> , 2001)
Sistemas gastroresistentes Cápsulas de gelatina revestidas com Eudragit [®]	Sistemas bioadesivos (HPMC, <i>polycarbophil</i> [®] , Carbopol [®] 934)		Redução da glicemia (n.d.)	(Hosny <i>et al.</i> , 2002)
Nanoencapsulação Nanopartículas PIBCA	Nanocápsulas dispersas numa microemulsão		Redução significativa dos níveis de glucose e absorção facilitada	(Watnasirichaikul <i>et al.</i> , 2002)
Nanoencapsulação Nanopartículas PECA	Promotor de absorção (n.d.)	Inibidor enzimático (aprotinina)	Actividade farmacológica entre 0,5% e 1%	(Radwan e Aboul- -Enein, 2002)

1 ^a	Estratégias		Efeitos observados	Referências
	2 ^a	3 ^a		
Nanoencapsulação Nanopartículas de quitosano	Sistema gastrorresistente (ftalato de HPMC)		Aumento da biodisponibilidade para 5,6-8,3%	(Cui <i>et al.</i> , 2004)
Sistemas bioadesivos Comprimidos de quitosano	Modificação química do quitosano (n.d.)	Inibidor enzimático (Bowman-Birk e elastatinal)	Eficácia farmacológica de 1,69%	(Krauland <i>et al.</i> , 2004)
Nanoencapsulação Nanopartículas de fosfato de cálcio	Inibidor enzimático (caseína)	Modificação química da insulina (PEG)	Redução de 50% da glicemia basal	(Morçol <i>et al.</i> , 2004)
Modificação química da insulina com PEG	Sistema bioadesivo (derivados de insulina mono-, di- e terbutilcarbonato)		Redução para 40% da glicemia basal	(Calceti <i>et al.</i> , 2004)
Microencapsulação Micropartículas de alginato	Sistema bioadesivo (lectinas)		Redução de 50% da glicemia basal	(Kim <i>et al.</i> , 2005)
Microencapsulação Micropartículas P(MAA-g-EG)	Modificação química da insulina (transferrina)		Aumento da permeabilidade em células Caco-2 (aumento de vinte e duas vezes)	(Kavimandan <i>et al.</i> , 2006)
Nanoencapsulação Nanopartículas de PLGA	Modificação química da insulina (fosfatidilcolina de soja)		Biodisponibilidade de 7,7%	(Cui <i>et al.</i> , 2006)
Nanoencapsulação Nanopartículas sólidas lipídicas	Sistemas bioadesivos (lectinas)		Aumento de biodisponibilidade de 4,99% para 7,11%	(Zhang <i>et al.</i> , 2006a)
Nanoencapsulação e sistema gastrorresistente Nanopartículas PCL	Sistemas bioadesivos (Eudragit [®] RS)		Biodisponibilidade de 13,2%	(Damgé <i>et al.</i> , 2007)

Nota: n.d. significa não determinado ou valor variável e dependente dos processos de formulação estudados e HPMC significa hidroxipropilmetilcelulose.

3.2. Limitações da administração oral da insulina

A combinação de estratégias parece ser francamente vantajosa uma vez que, em algumas situações, conseguiu aumentar a biodisponibilidade oral da insulina. Contudo,

convém não esquecer que alguns destes estudos, quando desenvolvidos em humanos, têm revelado uma variabilidade muito significativa nas respostas anteriores devido à dificuldade de adaptação da dose administrada para um doente específico.

Além disso, as diferentes tentativas apresentadas anteriormente têm algumas limitações. Sabe-se que, por exemplo, as formulações de insulina com inibidores de proteases têm, em certos casos, efeitos imprevisíveis em ensaios *in vivo* e *in vitro*; as formulações com promotores de absorção demonstraram falta de especificidade e podem conduzir a casos de toxicidade a longo prazo; ou ainda, os agentes emulsivos podem conduzir à lise da mucosa da membrana e provocar danos nas células epiteliais do TGI (Gowthamarajan e Kulkarni, 2003). Por outro lado, e como referido anteriormente, os sistemas bioadesivos podem afectar, significativamente, o *turnover* do muco do TGI e, conseqüentemente, alterar a fisiologia da mucosa intestinal. Para além disso, e mais especificamente, o mecanismo de absorção das nanopartículas suscita algumas dúvidas do ponto de vista toxicológico, especialmente quando se trata de administração crónica.

Assim, algumas das técnicas anteriormente descritas foram completamente abandonadas, outras continuam em forte desenvolvimento e outras, só agora, começam a serem desenvolvidas. Seja como for, a insulina oral constitui uma realidade próxima e, supõe-se que, serão poucos os anos que faltam para obter uma forma de administração alternativa viável e vantajosa.

4. MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO/GELIFICAÇÃO INTERNA

A encapsulação de fármacos tem atraído um interesse considerável como uma tecnologia vanguarda na área da indústria farmacêutica, mas também o seu desenvolvimento tem desencadeado a exploração de novos sistemas terapêuticos. Um dos métodos para a preparação de sistemas terapêuticos, nomeadamente partículas poliméricas, é o método de emulsificação/gelificação interna. Até à presente data, este método foi, única e exclusivamente, utilizado para preparação de micropartículas e partículas de dimensões milimétricas. A presente dissertação propõe-se adaptar este método à produção de nanopartículas. Assim, é oportuno fazer-se uma abordagem sobre este método, referindo, sucintamente, o estado actual da técnica.

4.1. Enquadramento do método de emulsificação/gelificação interna

Grande parte dos métodos de encapsulação envolve o recurso a solventes orgânicos ou outros reagentes incompatíveis com o material de natureza biológica a encapsular, contrariamente ao que acontece com o método de emulsificação/gelificação interna. A evolução do método de emulsificação foi muito lenta. Um dos processos iniciais envolvia o aquecimento da solução do polímero até uma temperatura entre 40-60°C, seguido da adição do agente a encapsular. Por fim, através de arrefecimento iniciava-se o processo de solidificação. Contudo, facilmente se deduz que este método não poderia ser aplicado a agentes termolábeis (Lencki *et al.*, 1989). Então, para contornar este problema, surgiu uma outra técnica mais simples e menos agressiva que envolvia a extrusão de uma solução, contendo o polímero (geralmente um polissacárido) e o agente a encapsular, para uma solução contendo um catião divalente (por exemplo o ião cálcio). O catião difundia-se, rapidamente na solução, formando uma rede polimérica com o polímero. Todavia, este método de extrusão apresentou, pelo menos, três desvantagens, designadamente: a incapacidade de diminuição da granulometria da partícula, uma vez que este é limitado pelo diâmetro da agulha e a

viscosidade da solução do polímero; a dificuldade de transposição de escala, uma vez que, para obter uma operacionalidade simultânea seriam necessárias centenas de agulhas a trabalhar simultaneamente e, por último, a forma das partículas. As partículas apresentavam-se disformes e não esféricas.

Na tentativa de responder às questões levantadas anteriormente, muitas técnicas foram realizadas, nomeadamente o uso de um sistema múltiplo de agulhas, processos que envolviam sistemas que recorriam a forças electrostáticas e vibracionais, entre outras. As técnicas de atomização foram também realizadas, mas o *stress* elevado que lhes está associado impediu a sua aplicação para agentes de natureza mais sensível. A nível industrial, surgiram equipamentos altamente sofisticados mas, mesmo estes, apresentavam limitações, em termos da incapacidade de redução do diâmetro da partícula resultante e em termos da transposição para a escala industrial.

Alguns destes problemas foram, parcialmente, solucionados através de técnicas de emulsão/gelificação (Lim e Sun, 1980; Lacroix *et al.*, 1990). Mas, mais uma vez, os processos propostos recorriam a condições que não eram compatíveis com agentes de natureza biológica, devido às temperaturas elevadas utilizadas. Por outro lado, e mais uma vez, assistiu-se a uma incapacidade de redução do diâmetro e a uma forte tendência de aglomeração das partículas (Poncelet *et al.*, 1999).

Mais tarde, foi apresentado um outro método de produção de redes poliméricas (Pelaez e Karel, 1981) designado por gelificação interna. Este método utilizou o alginato como polímero base. Na indústria, surgiram muitos métodos baseados nesta gelificação *in situ* do alginato. Um dos mais conhecidos e utilizado na indústria alimentar (Johansen e Flink, 1986; Mouquet *et al.*, 1997) envolvia a mistura de alginato de sódio com um complexo de cálcio. Por outras reacções químicas que conduziram à diminuição do pH, o ião cálcio era libertado do complexo e reagia com o alginato (Toft, 1982). No entanto, observou-se que durante este processo, em particular, formaram-se produtos de reacção tóxicos e, por este motivo, esta técnica foi abandonada.

O conceito de gelificação interna foi, então, adaptado para a produção de microgotículas sob a forma de gel e, só nesta altura, surgiu o termo emulsificação/gelificação

interna. Os microcristais de cálcio insolúveis eram dispersos na solução aquosa de polissacárido, antes de serem formadas as partículas. Por este motivo, se designou gelificação interna (quando o cálcio é adicionado, após a formação das partículas, designa-se por gelificação externa). Então, a mistura polissacárido-sal de cálcio era emulsionada numa fase oleosa, contendo um agente emulsivo. Por um mecanismo dependente do pH, o cálcio era libertado do sal insolúvel e conduzia à gelificação do polissacárido (Liu *et al.*, 2002b). Fundamentalmente, este *cross-linking* entre o cálcio e o polissacárido permitia encapsular materiais de natureza biológica, como o ADN (Alexakis *et al.*, 1995; Quong *et al.*, 1996) e proteínas (Vandenberg e Nouè, 2001; Liu *et al.*, 2002a). Mais tarde, surgiram variantes do protocolo base e, desde então, têm surgido inúmeras publicações sobre o método de emulsificação/gelificação interna, quer sob a forma de patentes (Lencki *et al.*, 1989; Price e Monshipouri, 1998) quer sob a forma de artigos (Poncelet *et al.*, 1992; Poncelet *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1996; Esquisabel *et al.*, 1997; Tin *et al.*, 1997; Quong e Neufeld, 1998; Quong *et al.*, 1998; Poncelet *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2000; Poncelet, 2001; Vandenberg e Nouè, 2001; Liu *et al.*, 2002b; Liu *et al.*, 2004b; Silva *et al.*, 2006a; Silva *et al.*, 2006b; Silva *et al.*, 2006c).

4.2. Tipo de polissacárido

Ao longo das últimas décadas, a indústria farmacêutica tem vindo a mostrar um grande interesse pelos biopolímeros. De facto, os polímeros obtidos a partir de fontes naturais e renováveis mostram-se, cada vez mais, importantes por vários factores de diversas ordens, particularmente o baixo custo, a fácil e a rápida aquisição, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a capacidade de gelificação.

O agár e a agarose, polímeros extraídos das algas vermelhas, são normalmente utilizados na solidificação de meios de cultura na área da microbiologia e nas novas aplicações biotecnológicas. A grande desvantagem destes polímeros relaciona-se com a relativa dificuldade de aquisição (McLachlan, 1985). Este factor desencadeou a procura de polímeros substitutos e surgiu, por exemplo, o carragenano. Contudo e apesar dos geles de carragenano serem reologicamente estáveis e acessíveis, estes requerem uma grande

quantidade de níveis de potássio para gelificarem, o que os torna não adaptáveis para aplicações médicas (Poncelet *et al.*, 1992).

Consequentemente, surgiu o alginato como alternativa aos polímeros anteriores. O alginato foi ganhando importância na área da indústria alimentar; na área da medicina, da medicina dentária, da nutrição e da cosmética; na área da indústria têxtil, da cerâmica, da agricultura, dos plásticos, da gráfica e na indústria do papel. Na área da indústria farmacêutica, o alginato tem sido utilizado, principalmente, como excipiente em formas farmacêuticas convencionais ou como polímero-matriz para a encapsulação de fármacos ou outras substâncias. Como agente encapsulante, o alginato tem vindo a ser aplicado para os mais diversos materiais, incluindo células vegetais (Redenbaugh *et al.*, 1986), células mamíferas (Lim e Sun, 1980), leveduras (Shiotani e Yamane, 1981), bactérias (Provost *et al.*, 1985), proteínas (Lim, 1983) e outros produtos não biológicos (Canon, 1984; Burns *et al.*, 1985).

O alginato apresenta propriedades singulares que tornam possível a sua aplicação como material de matriz para a encapsulação de uma variedade de proteínas e células, uma vez que tem a particularidade de formar um gel na presença de catiões multivalentes, sob condições não agressivas para o agente encapsulado. Por outro lado, além de ser considerado economicamente vantajoso e facilmente acessível, o alginato é um polímero biodegradável. Este polímero sofre degradação parcial no TGI humano, sendo, por isso, considerado por muitos investigadores como uma fibra alimentar solúvel (Burting, 2003). Além disso, é considerado um polímero desprovido de imunogenicidade e de toxicidade (Gombotz e Wee, 1998). A existir imunogenicidade, esta está relacionada com as impurezas existentes nos alginatos comerciais e não com as características do polímero (George e Abraham, 2006), uma vez que os alginatos são extraídos de fontes de origem natural e, por esse motivo, é possível que estejam presentes outras substâncias como, por exemplo, metais pesados, endotoxinas, proteínas, outros hidratos de carbono e polifenóis (Gombotz e Wee, 1998). Para além de não ser imunogénico, o alginato demonstrou ser biocompatível (Lim e Sun, 1980; Becker *et al.*, 2001; Dornish *et al.*, 2001; Orive *et al.*, 2005) sendo vulgarmente designado como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*). A

biocompatibilidade do alginato depende da sua pureza e composição. Para além disso, o alginato é considerado um polímero aniónico forte e bioadesivo (Gombotz e Wee, 1998; George e Abraham, 2006). As propriedades bioadesivas do alginato podem ser vantajosas na administração de fármacos encapsulados dirigidos para as mucosas. As interações do alginato com a mucosa foram atribuídas à elevada concentração de grupos carboxílicos, que estabelecem ligações de hidrogénio com as glicoproteínas do muco intestinal (George e Abraham, 2006). Por outro lado, o alginato apresenta uma sensibilidade característica ao pH do meio. Esta característica físico-química pode ser outra vantagem quando se pretende uma libertação controlada do fármaco encapsulado (George e Abraham, 2006). Finalmente, é igualmente descrito na literatura que o alginato é capaz de reduzir a actividade *in vitro* da pepsina, dependendo da concentração e segundo um mecanismo não competitivo (Strugala *et al.*, 2005).

É por isso que, ao longo dos tempos, o número de novos fornecedores de alginatos no mercado é cada vez maior; a qualidade do polímero e o grau de pureza têm vindo a aumentar e, presentemente, a maioria dos alginatos que se encontra disponível está parcial ou completamente caracterizada, em termos das suas propriedades físico-químicas.

4.3. Origem, composição e concentração de alginato

O alginato é um polímero natural extraído das algas castanhas (*Phaeophyceae*) (Aslani e Kennedy, 1996). Depois da celulose, o alginato é considerado o biopolímero marinho mais abundante. Para fins comerciais, as três espécies mais utilizadas para extracção do alginato são a *Macrocystis pyrifera*, a *Laminaria hyperborea* e a *Ascophyllum nodosum*. Outras espécies menos utilizadas incluem a *Eclonia maxima*, a *Laminaria japonica*, a *Lesonia negrescens* e as espécies de *Sargassum* (Smidsrød e Skjåk-Bræk, 1990; Gombotz e Wee, 1998). Quanto à origem do alginato, é igualmente descrito que também pode ser extraído a partir de bactérias, mais especificamente da *Azotobacter vinelandii* e de várias espécies de *Pseudomonas* (Gombotz e Wee, 1998).

O alginato é o principal polissacárido em todos estes tipos de algas, podendo mesmo representar cerca de 40% do seu peso seco (Gombotz e Wee, 1998) e, geralmente, encontra-se conjugado com vários catiões (George e Abraham, 2006). O alginato, no seu estado nativo, encontra-se ligado ao ião cálcio sob a forma de sal insolúvel (Gombotz e Wee, 1998). Para extrair o alginato das algas, estas são inicialmente secas e pulverizadas em moinhos (Gombotz e Wee, 1998). Posteriormente, são tratadas com um ácido mineral diluído para remover ou degradar os homopolissacáridos neutros associados como, por exemplo, a laminarina e a fucoidina. Neste processo de hidrólise, o alginato é convertido em ácido algínico. O ácido algínico é depois transformado num sal solúvel pela adição de carbonato de sódio a pH inferior a 10. Após a extracção, o alginato pode ser mais purificado e convertido em sal ou ácido (Gombotz e Wee, 1998).

Quimicamente, o alginato é um polissacárido não ramificado composto por dois tipos de ácido poliurónico, o ácido β -D-manurónico (bloco M) e o ácido α -L-gulurónico (bloco G), ligados por ligações (1,4)-glicosídicas (Wang *et al.*, 1994). Estas unidades monoméricas, tal como mostra a Figura I-14, podem dispor-se de três maneiras diferentes: unidades alternadas de G e M (MGM), designadas por unidades heteropoliméricas ou em unidades constituídas por cada um dos resíduos (GGG ou MMM), denominadas homopoliméricas (Gacesa, 1988). Os blocos G e M apresentam diferenças de conformação e, conseqüentemente, de flexibilidade. Os blocos M são planos, devido a ligações equatoriais, enquanto os blocos G são pregueados, devido a ligações glicosídicas axiais entre os resíduos. As diferenças de flexibilidade são devidas a restrições nas ligações carbono-oxigénio entre os monómeros. Os resíduos M ligam-se por ligações $\beta(1,4)$ entre os resíduos e permitem uma maior flexibilidade, enquanto os resíduos G se ligam por ligações $\alpha(1,4)$. Este último tipo de ligação conduz a um impedimento estérico à rotação da ligação (Amsden e Turner, 1999).

Os alginatos podem ser classificados em alginatos de elevado teor em resíduos G e neste caso, serão designados por *high G* ou *low M*. Quando o contrário acontece, os alginatos designam-se por *low G* ou *high M*.

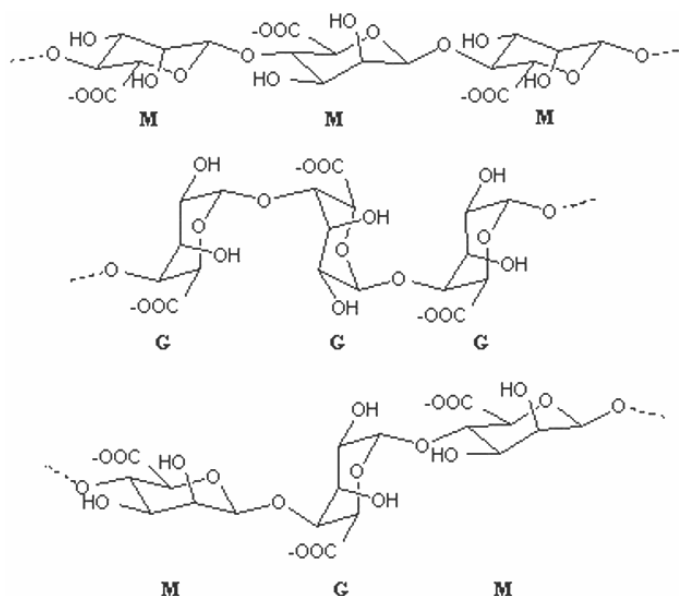


Figura I-14. Estruturas do alginato com os resíduos G e M.

O conteúdo em resíduos G e M varia com as estações do ano, condições de crescimento, momento da colheita e da parte da alga da qual o alginato é extraído. A composição em resíduos M e G (razão M/G), a extensão das sequências de resíduos e o PM determinam as propriedades físico-químicas dos alginatos. Além disso, a actividade inibitória para a pepsina, descrita anteriormente, está associada à proporção relativa dos blocos MG do alginato e inversamente relacionada com o conteúdo em blocos G (Strugala *et al.*, 2005).

A viscosidade do alginato varia proporcionalmente com o teor de resíduos G no alginato e depende, primariamente, do PM do polímero. As soluções aquosas de alginato preparadas a 1% (m/V) podem apresentar viscosidades que variam entre 20 e 400 mPa·s a 20°C (Shilpa *et al.*, 2003).

O alginato tem a capacidade de gelificar, dando origem a dois tipos de gel: um gel ácido e um gel ionotrópico. O gel ácido forma-se a baixos valores de pH, quando o alginato sofre protonação, originando o ácido algínico. Este gel ácido é muito viscoso, devido ao estabelecimento de ligações intermoleculares entre as cadeias. Por outro lado, na presença de alguns catiões divalentes ou trivalentes, o alginato sofre reticulação, originando um hidrogel ionotrópico translúcido (Shilpa *et al.*, 2003) que permite reter, no seu interior, fármacos e/ou outras substâncias. A forma de gel relaciona-se com a grande quantidade de água retida na estrutura do alginato durante a gelificação. As moléculas de água ficam fisicamente

aprisionadas no interior da estrutura por forças capilares, embora possam migrar livremente (Tonnesen e Karlsen, 2002).

A composição do alginato é um parâmetro muito importante a considerar na etapa da gelificação, uma vez que a extensão do *cross-linking* entre o alginato e o catião influencia a capacidade de intumescimento do alginato e a capacidade de aprisionamento de substâncias (Sartori *et al.*, 1996). Durante a gelificação do alginato, os catiões divalentes ligam-se, preferencialmente, aos resíduos G e de uma forma altamente cooperativa (Walsh *et al.*, 1996). Alguns estudos referem que, quanto maior for o teor em resíduos G, maior será a rigidez do gel resultante (Gombotz e Wee, 1998). No entanto, é sabido que elevados teores em resíduos G desencadeiam uma gelificação prematura do alginato, resultando em partículas de grande granulometria e com uma elevada polidispersividade (Poncelet, 2001). Por outro lado, alginatos de elevado teor em resíduos G originam geles mais porosos (Poncelet, 2001). Pelo contrário, é descrito que alginatos com elevados teores em resíduos M produzem geles, apesar de mais fracos, mais elásticos e com maior estabilidade ao congelamento/descongelamento (Liu *et al.*, 2004a).

A solubilidade do alginato em soluções aquosas depende dos catiões utilizados, da temperatura, da concentração de co-solutos presentes no meio e do pH (Shilpa *et al.*, 2003). O alginato é insolúvel em etanol, em soluções hidroalcoólicas contendo mais de 30% (V/V) de etanol ou em outros solventes orgânicos (Shilpa *et al.*, 2003). É considerado um polímero hidrofílico de dissolução lenta em água fria mas, depois de dissolvido, forma soluções coloidais viscosas. A dissolução do alginato em água é mais difícil quando estão presentes determinados compostos previamente dissolvidos como, por exemplo, açúcares, amidos ou proteínas. Estes compostos competem com o alginato para a água necessária para a hidratação do polímero e, por conseguinte, mais prolongado será o tempo de dissolução do alginato. A solubilidade do alginato depende do pH do meio. Neste campo, sabe-se que os valores pK_a do alginato são 3,38 e 3,65 para os resíduos M e G, respectivamente (Draget *et al.*, 1994) e que a valores de pH acima deste valor, o alginato encontra-se carregado negativamente. Quando o pH é inferior ao pK_a do alginato, este precipita sob a forma de ácido algínico, que é, por sua vez, insolúvel em água.

Finalmente, a concentração de alginato de sódio utilizada nas técnicas de micro e nanoencapsulação encontra-se compreendida entre 1-3% (m/V). Estudos anteriores demonstraram que na presença de concentrações de alginato abaixo de 1% (m/V) dificilmente se formam partículas esféricas, devido à falta de grupos carboxílicos suficientes para a gelificação. Por sua vez, quando a concentração de alginato foi superior a 3% (m/V), observou-se um grande aumento na viscosidade e, conseqüente aumento na granulometria das partículas e com uma elevada polidispersividade (Liu *et al.*, 2004a). Por este motivo, a concentração de alginato deve ser rigorosamente controlada, uma vez que este parâmetro influencia em larga medida a granulometria e a forma da partícula.

4.4. Tipo, forma e concentração do catião divalente

A gelificação depende do ião que sofre *cross-linking* com o alginato. O alginato gelifica na presença de catiões divalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+}) ou trivalentes (Fe^{3+} e Al^{3+}). Esses geles são translúcidos. Outros catiões como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , também têm capacidade de formar uma rede com o alginato, mas a sua utilização na área da tecnologia farmacêutica é limitada, devido à sua potencial toxicidade. Na presença de iões monovalentes ou de Mg^{2+} , não se forma um gel de alginato (Gombotz e Wee, 1998).

Apesar de alguns estudos terem recorrido ao zinco como catião gelificante do alginato, como se mostra na Tabela I-3, o cálcio é o catião mais utilizado, devido ao facto de ser seguro para as aplicações clínicas, facilmente acessível e económico. Comparativamente com o zinco, o cálcio é mais selectivo e forma redes poliméricas consideravelmente mais densas (Aslani e Kennedy, 1996).

Tabela I-3. Exemplos de vectores com iões cálcio e zinco.

Vector	Agente encapsulado	Referências
Cálcio		
Carbonato	ADN	(Alexakis <i>et al.</i> , 1995; Tin <i>et al.</i> , 1997)
	Dextrano	(Quong e Neufeld, 1998; Quong <i>et al.</i> , 1998)
	Hemoglobina	(Poncelet, 2001)
	Albumina	(Liu <i>et al.</i> , 2002b)
	Óleo de soja	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1999)
	Riboflavina	(Chen e Subirade, 2007)
	Hemoglobina	(Silva <i>et al.</i> , 2006d)
Citrato	Óleo de milho	(Lencki <i>et al.</i> , 1989)
	Células vegetais	
	Magnetite	
	Óleo de milho e leveduras	
	<i>Lactococcus lactis</i>	(Larisch <i>et al.</i> , 1994)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 1996)
Sulfato	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	(Esquisabel <i>et al.</i> , 1997, Esquisabel <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Achromobacter</i>	(Price e Monshipouri, 1998)
	Dipiridamol	(Gürsoy <i>et al.</i> , 1998; Gürsoy <i>et al.</i> , 1999)
	Diclofenac de sódio	(Gürsoy e Çevik, 2000)
	Insulina	(Timmy <i>et al.</i> , 2002)
Zinco		
Acetato	Dipiridamol	(Gürsoy <i>et al.</i> , 1999)

Estruturalmente, os iões cálcio encontram-se localizados nas cavidades electronegativas do alginato, empacotados entre os blocos G. Por analogia, esta estrutura foi designada por modelo caixa-de-ovos (em inglês, *egg-box*) (Martinsen *et al.*, 1989), tal como está representado na Figura I-15.

O mecanismo de gelificação do alginato tem sido intensivamente estudado, através do dicroísmo circular (DC) e ressonância magnética nuclear (RMN) (Braccini e Perez, 2001). As interacções ocorrem preferencialmente entre as unidades de guluronato e iões cálcio e provocam a formação de um gel forte e termoestável com propriedades dependentes das características do polímero e do método de preparação das partículas. A ligação entre o cálcio e o alginato não se baseia apenas em interacções electrostáticas, mas também em ligações com cerca de 7-9 átomos de oxigénio dos grupos carboxilo e hidroxilo de quatro monómeros diferentes (Braccini e Perez, 2001). Por outro lado, cada cadeia de alginato pode dimerizar

para formar ligações entre as cadeias polissacáridas, resultando um gel sólido (Gombotz e Wee, 1998). A estas zonas com ligações intercadeias, dá-se o nome de zonas de junção. A zona de junção consiste num alinhamento de hélices com duas unidades de ácido anidrogulurónico por volta, sendo que as hélices se mantêm juntas, devido à quelação pelo cálcio. Também é possível a formação de zonas de junção multiméricas, se bem que estas são menos estáveis do que as zonas diméricas (Shilpa *et al.*, 2003; Silva, 2007).

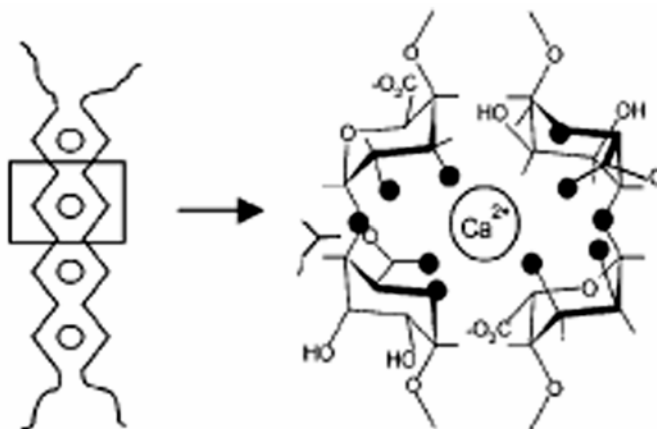


Figura I-15. Esquema representativo do modelo caixa-de-ovos, onde é apresentada a ligação das cadeias do alginato com os íons cálcio. Os pontos a negro representam os átomos do oxigênio envolvidos na coordenação com os íons cálcio (Braccini e Perez, 2001).

A selecção de um vector de cálcio para a gelificação interna do alginato depende do intervalo de pH desejado. Dentro desse intervalo de pH, a concentração livre de íons cálcio deve ser inicialmente baixa com uma rápida libertação do íon, à medida que se reduz o pH. Podem ser utilizados vários sais de cálcio, nomeadamente oxalato, tartarato, fosfato, carbonato e citrato (Poncelet *et al.*, 1995). Um estudo anterior descreveu que, quando se recorreu à utilização de oxalato e tartarato de cálcio, o cálcio não foi devidamente libertado destes complexos num intervalo de pH adequado e, conseqüentemente, as partículas não se formaram (Poncelet *et al.*, 1995). O fosfato de cálcio também revelou problemas tecnológicos, devido ao elevado tamanho do grão do sal de cálcio (Poncelet *et al.*, 1995; Poncelet *et al.*, 1999). O tamanho elevado do grão conduziu à formação de aglomerados no centro da partícula, resultando numa gelificação incompleta e, conseqüentemente, na ruptura da partícula (Poncelet *et al.*, 1995). O sal de cálcio na forma citrato conduziu a formação de partículas de elevada polidispersividade e demonstrou alguma instabilidade para determinados

valores de pH (Poncelet *et al.*, 1995). Pelo contrário, a suspensão de carbonato de cálcio-alginato permaneceu estável numa larga gama de pH, tendo sido originadas partículas mais esféricas e estáveis do que as anteriores e com uma distribuição granulométrica unimodal.

Outro parâmetro igualmente importante diz respeito à concentração do íon cálcio. Um estudo anterior demonstrou que a razão entre o cálcio e o alginato necessária para a produção de partículas foi de 1:4, isto é, cálcio a 25 mM e alginato a 100 mM (Poncelet, 2001). Neste estudo, observou-se que razões mais elevadas resultaram numa elevada quantidade de cálcio residual à superfície das partículas.

Finalmente, foi demonstrado que o tamanho do grão do sal de cálcio influenciou o aspecto, a resistência e a granulometria das partículas (Quong *et al.*, 1996). Estima-se que, quanto menor for o tamanho do grão do sal de cálcio, maior será a quantidade de cálcio difundida entre as cadeias do alginato e a rede polimérica resultante será, francamente, mais estável. As partículas resultantes serão mais esféricas e com menor tendência para aglomeração. Por isso, é frequente promover a sonicação do sal de cálcio durante um determinado período de tempo que varia para cada aplicação.

4.5. Valor de pH

O intervalo de pH para o método de emulsificação/gelificação interna depende de vários parâmetros, nomeadamente o tipo de polímero, o sal de cálcio e o agente a encapsular. Os valores neutros de pH são geralmente adequados para a encapsulação de células. No entanto, tal não se aplica na encapsulação de todos os microrganismos. Sabe-se, por exemplo, que as bactérias do ácido láctico preferem intervalos de pH mais baixos (Poncelet, 2001). Quando se pretende aplicar este método a fármacos peptídicos, o intervalo de pH deverá ter em conta o pI dos mesmos.

4.6. Tipo de óleo

O óleo usado na emulsificação/gelificação interna pode ser de origem natural ou mineral, conforme se refere na Tabela I-4. Na escolha do tipo de óleo deve considerar-se a aplicação a que se destina. De qualquer modo, sabe-se que os óleos minerais trazem algumas limitações, nomeadamente em termos ambientais (Price e Monshipouri, 1998).

A razão entre as fases aquosa e oleosa também deve ser considerada, uma vez que influencia a granulometria das partículas resultantes (Silva *et al.*, 2006c). Tipicamente, esta razão encontra-se compreendida entre 1:1 e 1:5 (V/V).

Tabela I-4. Tipo de óleos utilizados no método de emulsificação/gelificação interna.

Tipo de óleos	Referências
Origem natural	
Milho	(Lencki <i>et al.</i> , 1989)
Canola	(Alexakis <i>et al.</i> , 1995; Tin <i>et al.</i> , 1997; Price e Monshipouri, 1998; Poncelet, 2001; Yi <i>et al.</i> , 2002)
Soja	(Gürsoy <i>et al.</i> , 1998; Price e Monshipouri, 1998; Gürsoy <i>et al.</i> , 1999; Chen e Subirade, 2007)
Azeite	(Price e Monshipouri, 1998)
Sésamo, amêndoas doces, camomila, perhidroesqualeno e jojoba	(Esquisabel <i>et al.</i> , 1997; Esquisabel <i>et al.</i> , 2000)
Avelãs	(Timmy <i>et al.</i> , 2002)
Amendoim	(Lencki <i>et al.</i> , 1989; Price e Monshipouri, 1998)
Palma	(Lencki <i>et al.</i> , 1989)
Canola e algodão	(Price e Monshipouri, 1998)
Côco	(Jerry <i>et al.</i> , 2001)
Origem mineral	
Parafina	(Liu <i>et al.</i> , 2002a; Liu <i>et al.</i> , 2002b; Silva <i>et al.</i> , 2006d)
Silicone	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1999)
Isooctano	(Chan, 2002)

4.7. Tipo e concentração do agente emulsivo

Em qualquer processo de emulsificação, o agente emulsivo é necessário por duas principais razões. A primeira tem a ver com o facto de diminuir a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa e facilitar a dispersão de fases. A segunda relaciona-se com a acção estabilizante, no sentido de evitar a coalescência das gotículas (Liu *et al.*, 2004a). Um dos requisitos mais importantes a exigir de um agente emulsivo é que este agente deve ser capaz de formar, rapidamente, um filme à volta de cada gotícula da fase interna, de modo a constituir uma barreira que evite a coalescência das gotículas, quando contactem umas com as outras (Prista *et al.*, 1995). É de notar que tal filme pode ser representado por uma camada monomolecular, multimolecular ou partículas sólidas finamente divididas, características que dependem da natureza do agente emulsivo. No método de emulsificação/gelificação interna foi já utilizada uma variedade de agentes emulsivos, como se mostra na Tabela I-5.

Tabela I-5. Agentes emulsivos utilizados no método de emulsificação/gelificação interna.*Nome comercial.

Origem	Referências
Natural	
Lecitinas	(Price e Monshipouri, 1998; Esquisabel <i>et al.</i> , 2000)
Sintética	
Monoleato de sorbitano: Span [®] 80*	(Poncelet <i>et al.</i> , 1992; Poncelet <i>et al.</i> , 1995; Poncelet <i>et al.</i> , 1999; Alexakis <i>et al.</i> , 1995; Tin <i>et al.</i> , 1997; Liu <i>et al.</i> , 2002a; Liu <i>et al.</i> , 2002b; Silva <i>et al.</i> , 2006d)
Trioleato de sorbitano: Span [®] 85*	(Chan, 2002; Yi <i>et al.</i> , 2002)
Monoleato de polioxietilenossorbitano: Tween [®] 80*	(Gürsoy <i>et al.</i> , 1998; Quong e Neufeld, 1998; Gürsoy <i>et al.</i> , 1999; Vandenberg e Nouè, 2001)
Mistura de Span [®] 80* com Tween [®] 80*	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1999)

A concentração dos agentes emulsivos é um factor importante no método de emulsificação/gelificação interna (Silva *et al.*, 2006c). Na presença de baixas concentrações de agente emulsivo (< 0,5%, V/V), o filme formado em redor das gotículas poderá ser incompleto, resultando numa diminuição da estabilidade das gotículas que coalescem e aumentam de dimensão (Liu *et al.*, 2004a). Por outro lado, concentrações de agente emulsivo superiores a 2,0% (V/V) apresentaram algumas desvantagens. Sabe-se que no método de emulsificação/gelificação interna, para que ocorra a solubilização do complexo de cálcio, é necessário diminuir o pH. Os ácidos utilizados são geralmente solúveis em óleo. Se a concentração do agente emulsivo for excessiva pode causar, de alguma forma, alguma resistência à transferência de protões, prolongando o tempo de gelificação e diminuindo o rendimento do processo (Liu *et al.*, 2004a).

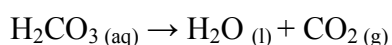
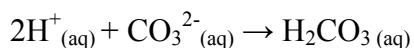
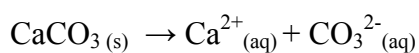
4.8. Tipo de ácido

Existem vários ácidos solúveis em óleo que poderão ser utilizados no método de emulsificação/gelificação interna, designadamente os ácidos: acético, cítrico e láctico. Em estudos anteriores, o ácido acético foi considerado vantajoso face aos anteriores (Lencki *et al.*, 1989). O ácido é adicionado ao óleo e, quando estes são dispersos na fase aquosa, provoca uma diminuição instantânea do pH, solubilizando o complexo de cálcio que disponibiliza os catiões para a gelificação do alginato (Lencki *et al.*, 1989). A concentração do ácido deve ser rigorosamente estudada e controlada para promover a solubilização do sal do cation gelificante sem um efeito de sobredosagem, caso contrário pode danificar-se o agente a encapsular.

4.9. Mecanismo de reacção

No processo de gelificação ocorrem duas reacções químicas principais. Os protões provenientes do ácido adicionado difundem-se para a fase aquosa e solubilizam os microcristais de cálcio uniformemente dispersos (equação 1). O alginato gelifica *in situ* com os iões cálcio livres, formando uma rede polimérica homogénea (equação 2) (Liu *et al.*, 2002b).

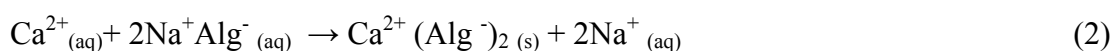
Sendo,



A reacção global da solubilização do sal de cálcio é dada por:



A reacção da gelificação do alginato é dada por:



4.10. Vantagens do método de emulsificação/gelificação interna

O método de emulsificação/gelificação interna é seguro, simples e económico (Esquisabel *et al.*, 2000). O baixo *stress* envolvido no processo de emulsificação permite a aplicação deste método a agentes de natureza frágil. Mais, sendo um método livre de solventes orgânicos, os problemas de toxicidade não se colocam contrariamente a muitos dos métodos de encapsulação descritos na primeira secção deste capítulo. Além disso, a

transposição deste método para a escala industrial é facilitada, uma vez que o mesmo produz elevadas quantidades de partículas, sem a necessidade de recorrer a um equipamento altamente sofisticado (Poncelet *et al.*, 1992). Trata-se, ainda, de um método no qual é possível controlar o diâmetro das partículas obtidas. Finalmente, nas partículas formadas por gelificação interna, a distribuição de alginato e iões cálcio é mais homogénea do que com a gelificação externa, resultando em geles mais homogéneos (Quong *et al.*, 1998).

4.11. Desvantagens do método de emulsificação/gelificação interna

A porosidade das partículas de alginato obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna poderá ser considerado um factor limitante. De facto, em estudos anteriores, as partículas preparadas por gelificação interna revelaram-se mais porosas do que partículas obtidas pelas gelificação externa, provavelmente devido à rapidez do processo de gelificação interna (Quong *et al.*, 1998). Na gelificação externa, observou-se uma maior concentração de polímero à superfície das partículas que, mesmo heterogéneas, conduziram a uma maior resistência à difusão do agente encapsulado do que aquela oferecida pelas partículas homogéneas (Quong *et al.*, 1998). Desta forma, é previsível que uma maior porosidade nas microesferas gelificadas internamente possa conduzir a uma menor EE e a uma libertação mais rápida do agente encapsulado nos fluidos do TGI (Vandenberg e Nouè, 2001). Por fim, Vandenberg e Nouè (Vandenberg e Nouè, 2001) descreveram a possibilidade de perda ou inactivação dos agentes encapsulados quando se utilizou o método de emulsificação/gelificação interna, principalmente, durante as etapas de emulsificação e recuperação das partículas. No entanto, esta possibilidade de perda poderá estar relacionada com o próprio agente encapsulado e com os parâmetros de formulação e de processo adoptados.

5. OBJECTIVOS E BREVE DESCRIÇÃO DO TRABALHO

O principal objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma formulação para administração oral de um fármaco peptídico, neste caso a insulina, recorrendo ao método de emulsificação/gelificação interna. O veículo da insulina escolhido foi um sistema polimérico, mais especificamente nanopartículas ou partículas poliméricas com diâmetro inferior a 10 μm , utilizando o alginato de sódio como polímero da matriz.

A produção das partículas de dimensões reduzidas foi realizada, pela primeira vez, por emulsificação/gelificação interna e compreende a formação de uma emulsão A/O (água em óleo), seguida da solubilização de um complexo de cálcio e consequente gelificação do polímero disperso na fase interna por reticulação com os iões cálcio. Finalmente, as partículas gelificadas e dispersas na emulsão A/O são recuperadas. O método de produção bem como o processo de recuperação foram otimizados. A bioactividade de insulina, após encapsulação e recuperação, foi testada *in vitro* e *in vivo*. Em seguida, foram realizadas diversas estratégias, quer de revestimento quer de reforço da matriz polimérica, de forma a obter um perfil de libertação controlado da insulina nos fluidos gástrico e intestinal. Foram realizados ensaios adicionais, no sentido de analisar a resistência enzimática da insulina encapsulada após incubação com a pepsina. Numa fase seguinte, procedeu-se à investigação do efeito terapêutico da formulação otimizada após administração oral, bem como a uma análise quantitativa e qualitativa da absorção intestinal da insulina. Por fim, procedeu-se à realização de ensaios metabólicos e toxicológicos da formulação otimizada.

Atendendo aos objectivos propostos, bem como à descrição anteriormente efectuada, o trabalho experimental foi estruturado da seguinte forma:

- Transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica (Capítulo II).
- Redução da libertação da insulina durante a incubação das nanoesferas em meio ácido (Capítulo III).

- Avaliação da bioactividade da insulina libertada das nanoesferas (Capítulo IV).
- Controlo do perfil de libertação da insulina encapsulada a pH intestinal (Capítulo V).
- Efeito terapêutico oral da insulina após prevenção do ataque proteolítico a nível gástrico (Capítulo VI).
- Caracterização do sistema nanométrico, efeito terapêutico oral e estudo da absorção intestinal (Capítulo VII).
- Ensaio toxicológicos e estudos do metabolismo do sistema nanométrico optimizado (Capítulo VIII).
- Conclusões gerais (Capítulo IX).

6. BIBLIOGRAFIA

- ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., STAINMESSE, S. e FESSI, H. (2006) Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 58, 1688-1713.
- AGARWAL, V. (2001) Current status of the oral delivery of insulin. **Pharm. Technol.**, 76-90.
- AGARWAL, V., NAZZAL, S., REDDY, I. K. e KHAN, M. A. (2001a) Transport studies of insulin across rat jejunum in the presence of chicken and duck ovomucoids. **J. Pharm. Pharmacol.** 53, 1131-1138.
- AGARWAL, V., REDDY, I. K. e KHAN, M. A. (2000) Oral delivery of proteins: effect of chicken and duck ovomucoid on the stability of insulin in the presence of alfa-chymotripsin and trypsin. **Pharm. Pharmacol. Commun.** 6, 223-227.
- AGARWAL, V., REDDY, I. K. e KHAN, M. A. (2001b) Polymethylacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: preparation and *in vitro* dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors. **Int. J. Pharm.** 225, 31-39.
- AHMAD, Z., PANDEY, R., SHARMA, S. e KHULLER, G. K. (2006) Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. **Int. J. Antimicrob. Ag.** 27, 409-416.
- AL ACHI, A. e GREENWOOD, R. (1993a) Human insulin binding to erythrocyte-membrane. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 19, 673-684.
- AL ACHI, A. e GREENWOOD, R. (1993b) Intraduodenal administration of biocarrier-insulin systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 19, 1303-1315.
- AL KHOURI FALLOUH, N., ROBLOT-TREUPEL, L., FESSI, H., DEVISSAGUET, J. P. e PUISIEUX, F. (1986) Development of a new process for the manufacture of poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules. **Int. J. Pharm.** 28, 125-132.
- ALEXAKIS, T., BOADI, D. K., QUONG, D., GROBOILLOT, A., O'NEILL, I., PONCELET, D. e NEUFELD, R. J. (1995) Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and

- cross-linked chitosan membranes for *in vivo* application. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 50, 93-106.
- ALLÉMANN, E., GURNY, R. e DOEKLER, E. (1993a) Drug-loaded nanoparticles - preparation methods and drug targeting issues. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 39, 173-191.
- ALLÉMANN, E., GURNY, R. e DOELKER, E. (1992) Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. **Int. J. Pharm.** 87, 247-253.
- ALLÉMANN, E., LEROUX, J. C. e GURNY, R. (1998) Polymeric nano-microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 34, 171-189.
- ALLÉMANN, E., LEROUX, J. C., GURNY, R. e DOEKLER, E. (1993b) *In vitro* extended-release properties of drug loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by salting-out procedure. **Pharm. Res.** 10, 1732-1737.
- AMIDI, M., ROMEIJN, S. G., BORCHARD, G., JUNGINGER, H. E., HENNINK, W. E. e JISKOOT, W. (2006) Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. **J. Control. Rel.** 111, 107-116.
- AMMOURY, N., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.-P., DUBRASQUET, M. e BENITA, S. (1991) Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate) nanocapsules in rats. **Pharm. Res.** 8, 101-105.
- AMMOURY, N., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.-P., PUISIEUX, F. e BENITA, S. (1990) *In vitro* release pattern of indomethacin from poly(DL-lactide) nanocapsules. **J. Pharm. Sci.** 79, 763-767.
- AMSDEN, B. e TURNER, N. (1999) Diffusion characteristics of calcium alginate gels. **Biotechnol. Bioeng.** 65, 605-610.
- APRAHAMIAN, M., MICHEL, C., HUMBERT, W., DEVISSAGUET, J.-P. e DAMGÉ, C. (1987) Transmucosal passage of poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine. **Biol. Cell** 61, 69-76.

- ARBÓS, P., WIRTH, M., ARANGO, M. A., GABOR, F. e IRACHE, J. M. (2002) Gantrez[®] AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. **J. Control. Rel.** 83, 321-330.
- ARNEDO, A., ESPUELAS, S. e IRACHE, J. M. (2002) Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. **Int. J. Pharm.** 244, 59-72.
- ARNEDO, A., IRACHE, J. M., MERODIO, M. e MILLÁN, M. S. E. (2004) Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. **J. Control. Rel.** 94, 217-227.
- ASADA, H., DOUEN, T., MIZOKOSHI, Y., FUJITA, T., MURAKAMI, M., YAMAMOTO, A. e MURANISHI, S. (1994) Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine: relative importance of insulin association characteristics in aqueous solution. **Pharm. Res.** 11, 1115-1120.
- ASADA, H., DOUEN, T., WAKI, M., ADACHI, S., FUJITA, T., YAMAMOTO, A. e MURANISHI, S. (1995) Absorption characteristics of chemically modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine. **J. Pharm. Sci.** 84, 682-687.
- ASLANI, P. e KENNEDY, R. A. (1996) Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. **J. Control. Rel.** 42, 75-82.
- AYNIÉ, I., VAUTHIER, C., CHACUN, H., FATTAL, E. e COUVREUR, P. (1999) Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. **Ant. Nucl. Acid Drug Dev.** 9, 301-312.
- BARICHELLO, J. M., MORISHITA, M., TAKAYAMA, K. e NAGAI, T. (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 25, 471-476.
- BECK, P., KREUTER, J., RESZKA, R. e FICHTNER, I. (1993) Influence of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles and liposomes on the efficacy and toxicity of the anticancer drug mitoxantrone in murine tumour models. **J. Microencapsul.** 10, 101-114.

- BECKER, T. A., KIPKE, D. R. e BRANDON, T. (2001) Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. **J. Biomed. Mat. Res.** 54, 76-86.
- BEHAN, N., O'SULLIVAN, C. e BIRKINSHAW, C. (2002) Synthesis and *in vitro* drug release of insulin-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. **Macromol. Biosci.** 2, 336-340.
- BENOIT, J. P., COUVREUR, P., DEVISSAGUET, J.-P., FESSI, H., PUISIEUX, F. e ROBLOT-TREUPEL, L. (1986) Les formes vectorisées ou distribution modulée, nouveaux systèmes d'administration des médicaments. **J. Pharm. Belg.** 41, 319-329.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A., CLAUSEN, A. E. e GUGGI, D. (2005) The use of auxiliary agents to improve the mucosal uptake of peptides. **Med. Chem. Rev.** 1, 1-10.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A., KRAULAND, A. H., LEITNER, V. M. e PALMBERGER, T. (2004) Thiomers: potential excipients for non-invasive peptide delivery systems. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 58, 253-263.
- BINDER, C., LAURITZEN, T., FABER, O. e PRAMMING, S. (1984) Insulin pharmacokinetics. **Diabetes Care** 7, 188-199.
- BODMEIER, R. e CHEN, H. (1990) Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfluidization. **J. Control. Rel.** 12, 223-233.
- BORGES, O., CORDEIRO-DA-SILVA, A., ROMEIJN, S. G., AMIDI, M., DE SOUSA, A., BORCHARD, G. e JUNGINGER, H. E. (2006) Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. **J. Control. Rel.** 114, 348-358.
- BRACCINI, I. e PEREZ, S. (2001) Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules** 2, 1089-1096.
- BRANGE, J., SKELBAEK-PEDERSEN, B., LANGKJAER, L., DAMGAARD, U., EGE, H., HAVELUND, S., HEDING, L. G., JØRGENSEN, K. H., LYKKEBERG, J., MARKUSSEN, J., PINGEL, M. e RASMUSSEN, E. (1987) **Galenics of insulin: the physico-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.

- BRASSEUR, F., COUVREUR, P., KANTE, B., DECKERS-PASSAU, L., ROLAND, M., DECKERS, C. e SPEISER, P. (1980) Actinomycin D absorbed on poly(methylcyanoacrylate) nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor. **Eur. J. Cancer** 16, 1441-1445.
- BRIDGES, P. A. e TAYLOR, K. M. G. (1998) Nebulisers for the generation of liposomal aerosols. **Int. J. Pharm.** 173, 117-152.
- BURNS, M. A., KVESITADZE, G. I. e GRAVES, D. J. (1985) Dried calcium alginate/magnetite spheres: a new support for chromatographic separations and enzyme immobilization. **Biotechnol. Bioeng.** 27, 137-145.
- BURTING, P. (2003) Nutritional value of seaweeds. **EJEAFChe** 2, 498-503.
- CALCETI, P., SALMASO, S., WALKER, G. e BERNKOP-SCHNÜRCH, A. (2004) Development and *in vivo* evaluation of an oral insulin-PEG delivery system. **Eur. J. Pharm. Sci.** 22, 315-323.
- CALICETI, P., SALMASO, S., ELVASSORE, N. e BERTUCCO, A. (2004) Effective protein release from PEG/PLA nanoparticles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques. **J. Control. Rel.** 94, 195-205.
- CALVO, P., REMUÑAN-LOPEZ, C., VILLA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. (1997) Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharm. Res.** 14, 1431-1436.
- CALVO, P., SÁNCHEZ, A., MARTINEZ, J., LOPEZ, M. I., CALONGE, M., PASTOR, J. C. e ALONSO, M. J. (1996) Polyester nanocapsules as new topical ocular delivery systems for cyclosporin A. **Pharm. Res.** 13, 311-315.
- CAMPOS, A. M., DIEBOLD, Y., CARVALHO, E. L. S., SÁNCHEZ, A. e ALONSO, M. J. (2004) Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: *in vitro* stability, *in vivo* fate, and cellular toxicity. **Pharm. Res.** 21, 803-810.
- CANON, K. (1984) Electrostatic image development toners, Patente Japão 59170853.
- CARINO, G. P., JACOB, J. S. e MATHIOWITZ, E. (2000) Nanosphere based oral insulin delivery. **J. Control. Rel.** 65, 261-269.

- CARINO, G. P. e MATHIOWITZ, E. (1999) Oral insulin delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 35, 249-257.
- CERNEA, S. e RAZ, I. (2006) Non-injectable methods of insulin administration. **Drugs of Today** 42, 405-424.
- CHAN, L. W. (2002) Production of alginate microspheres by internal gelation using emulsification method. **Int. J. Pharm.** 242, 259-262.
- CHAN, L. W., LIM, L. T. e HENG, P. W. (2000) Microencapsulation of oils using sodium alginate. **J. Microencapsul.** 17, 757-766.
- CHAVANPATIL, M. e KHDAIR, A. (2007) Surfactant-polymer nanoparticles: a novel platform for sustained and enhanced cellular delivery of water-soluble molecules. **Pharm. Res.** 24, 803-810.
- CHEN, F., ZHANG, Z.-R. e HUANG, Y. (2007) Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. **Int. J. Pharm.** 336, 166-173.
- CHEN, H., TORCHILIN, V. e LANGER, R. (1996) Polymerized liposomes as potential oral vaccine carrier: stability and bioavailability. **J. Control. Rel.** 42, 263-272.
- CHEN, L. e SUBIRADE, M. (2007) Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 65, 354-362.
- CHEN, Y., MOHANRAJ, V. J. e PARKIN, J. E. (2003) Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide. **Lett. Pept. Sci.** 10, 621-629.
- CHENG, K. e LIM, L.-Y. (2004) Insulin-loaded calcium pectinate nanoparticles: effects of pectin molecular weight and formulation pH. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 30, 359-367.
- CHIEN, Y. W. (1996) Human insulin: basic sciences to therapeutic uses. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 22, 753-789.
- CHOUDHARI, K. B., LABHASETWAR, V. e DORLE, A. K. (1994) Liposomes as a carrier for oral administration of insulin: effect of formulation factor. **J. Microencapsul.** 11, 319-325.

- CILEK, A., CELEBI, N., TIRNAKSIZ, F. e TAY, A. (2005) A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 298, 176-185.
- CIRSTOIU-HAPCA, A., BOSSY-NOBS, L., BUCHEGGER, F., GURNY, R. e DELIE, F. (2007) Differential tumor cell targeting of anti-HER2 (Herceptin(R)) and anti-CD20 (Mabthera(R)) coupled nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 331, 190-196.
- COURNARIE, F., AUCHERE, D., CHEVENNE, D., LACOUR, B., SEILLER, M. e VAUTHIER, C. (2002) Absorption and efficiency of insulin after oral administration of insulin-loaded nanocapsules in diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 242, 325-328.
- COUVREUR, P. (1988) Poly(alkylcyanoacrylates) as colloidal drug carriers. **CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.** 5, 1-20.
- COUVREUR, P., DUBERNET, C. e PUISIEUX, F. (1995) Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 41, 2-13.
- COUVREUR, P., KANTE, B., LENAERTS, V., SCAILTEUR, V., ROLAND, M. e SPEISER, P. (1980a) Tissue distribution of antitumor drugs associated with poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **J. Pharm. Sci.** 69, 199-202.
- COUVREUR, P., LENAERTS, V., KANTE, B., ROLAND, M. e SPEISER, P. P. (1980b) Oral and parenteral administration of insulin associated to hydrolysable nanoparticles. **Acta Pharm. Technol.** 26, 220-222.
- COUVREUR, P. e PUISIEUX, F. (1993) Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 10, 141-162.
- CUI, F., SHI, K., ZHANG, L., TAO, A. e KAWASHIMA, Y. (2006) Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation. **J. Control. Rel.** 114, 242-250.
- CUI, F., ZHANG, L., ZHENG, J. e KAWASHIMA, Y. (2004) A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. **J. Drug Del. Sci. Tech.** 14, 435-439.

- CUI, Z. e MUMPER, R. J. (2002) Intranasal administration of plasmid DNA-coated nanoparticles results in enhanced immune responses. **J. Pharm. Pharmacol.** 54, 1195-1203.
- DAMGÉ, C., APRAHAMIAN, M., HUMBERT, W. e PINGET, M. (2000) Ileal uptake of poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.** 52, 1049-1056.
- DAMGÉ, C., MAINCENT, P. e UBRICH, N. (2007) Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **J. Control. Rel.** 117, 163-170.
- DAMGÉ, C., MICHEL, C., APRAHAMIAN, M. e COUVREUR, P. (1988) New approach for oral administration of insulin with poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules as drug carrier. **Diabetes** 37, 246-251.
- DAMGÉ, C., MICHEL, C., APRAHAMIAN, M., COUVREUR, P. e DEVISSAGUET, J.-P. (1990) Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. **J. Control. Rel.** 13, 233-239.
- DAMGÉ, C., VONDERSCHER, J., MARBACH, P. e PINGET, M. (1997a) Poly(alkyl cyanoacrylate) nanocapsules as a delivery system in the rat for octreotide, a long-acting somatostatin analogue. **J. Pharm. Pharmacol.** 49, 949-954.
- DAMGÉ, C., VRANCKX, H., BALSCHMIDT, P. e COUVREUR, P. (1997b) Poly(alkylcyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. **J. Pharm. Sci.** 86, 1403-1409.
- DAPERGOLAS, G. e GERGORIADIS, G. (1976) Hypoglycaemic effect of liposome entrapped insulin administered intragastrically. **Lancet** 2, 824-827.
- DAS, D. e LIN, S. (2005) Double-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticulate delivery systems for brain targeting of dalargin via oral administration. **J. Pharm. Sci.** 94, 1343-1353.
- DAVIS, S. S. (1990) Overcoming barriers to the oral administration of peptide drugs. **Trends Pharmacol. Sci.** 11, 353-355.
- DE CAMPOS, A. M., SÁNCHEZ, A. e ALONSO, M. J. (2001) Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **Int. J. Pharm.** 224, 159-168.

- DE, S. e ROBINSON, D. (2003) Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine - alginate nanospheres. **J. Control. Rel.** 89, 101-112.
- DEGIM, Z., UNAL, N., EYSIZ, D. e ABBASOGLU, U. (2004) The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer. **Life Sci.** 75, 2819-2827.
- DIEPOLD, R., KREUTER, J., HIMBER, J., GURNY, R., LEE, V. H., ROBINSON, J. R., SAETTONE, M. F. e SCHNAUDIGEL, O. E. (1989) Comparison of different models for the testing of pilocarpine eyedrops using conventional eyedrops and a novel depot formulation (nanoparticles). **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, 227, 188-193.
- DILEEP, K. J., MOSES, L. R. e SHARMA, C. P. (1998) Modulation of insulin release from chitosan-alginate microsphere. **Trends Biomater. Artif. Org.** 12, 42-46.
- DIMITROVA, B., IVANOV, I. B. e NAKACHE, E. (1988) Mass transport effects on the stability of emulsion films with acetic acid and acetone diffusing across the interface. **J. Disp. Sci. Technol.** 9, 321-341.
- DONG, Y. e FENG, S.-S. (2005) Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials** 26, 6068-6076.
- DORNISH, M., KAPLAN, D. e SKAUGRUD, O. (2001) Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides. American Society for Testing and Materials. **Ann. New York Acad. Sci.** 944, 388-397.
- DOUGLAS, K. L. e TABRIZIAN, M. (2005) Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. **J. Biomater. Sci. Polym. Edn.** 16, 43-56.
- DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G. e SMIDSRØD, O. (1994) Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydr. Polym.** 25, 31-38.
- DRASAR, B. S. e HILL, M. J. (1974) Bacterial glycosidase. In: Drasar, B. S. e Hill, M. J. (eds) **Human intestinal flora**. Academic Press, London, p. 54-71.

- DREIS, S., ROTHWEILER, F., MICHAELIS, M., JR, J. C., KREUTER, J. e LANGER, K. (2007) Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 341, 207-214.
- DUARTE, R. (1997) Insulina. In: Duarte, R. (ed.) **Diabetologia Clínica**. Lidel-Edições Técnicas, Lda., Lisboa, p. 139-151.
- DUARTE, R. e CALDEIRA, J. (1997) Terapêutica da diabetes não insulino-dependente (DNID). In: Duarte, R. (ed.) **Diabetologia Clínica**. 2ª ed. Lidel, Edições Técnicas, Lda., Lisboa, p. 114-137.
- DUBERNET, C., FATTAL, E. e COUVREUR, P. (2000) Nanoparticulate controlled release system for cancer therapy. In: Wise, D. L. (ed.) **Handbook of pharmaceutical controlled release technology**. Marcel Dekker, Basel, New York, p. 287-300.
- DYER, A. M., HINCHCLIFFE, M., WATTS, P., CASTILLE, J., JABBAL-GILL, I., NANKERVIS, R., SMITH, A. e ILLUM, L. (2002) Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. **Pharm. Res.** 19, 998-1008.
- EAIMTRAKAN, S., PRASAD, Y. V. R., OHNO, T., KONISHI, T., YOSHIKAWA, Y., SHIBATA, N. e TAKADA, K. (2002) Absorption-enhancing effect of labrasol on the intestinal absorption of insulin in rats. **J. Drug Target.** 10, 255-260.
- EKMAN, B. e SJÖHOLM, I. (1978) Improved stability of proteins immobilized in microparticles prepared by modified emulsion polymerization technique. **J. Pharm. Sci.** 67, 693-696.
- ELDRIDGE, J. H., HAMMOND, C. J., MEULBROEK, J. A., STAAS, J. K., GILLEY, R. M. e TICE, T. R. (1990) Controlled vaccine in gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. **J. Control. Rel.** 11, 205-214.
- ELEY, J. G. e MATHEW, P. (2007) Preparation and release characteristics of insulin and insulin-like growth factor-one from polymer nanoparticles. **J. Microencapsul.** 24, 225-234.
- ELEY, J. G. e TRIUMALASHETTY, P. (2001) *In vitro* enhancement of alkylglycosides as permeability enhancers. **AAPS Pharm. Sci. Technol.** 2, 1-7.

- EL-SAMALIGY, M. S. e ROHDEWALD, P. (1983) Reconstituted collagen nanoparticles, a novel drug carrier delivery system. **J. Pharm. Pharmacol.** 35, 537-539.
- EL-SAMALIGY, M. S., ROHDEWALD, P. e MAHMOUD, H. A. (1986) Poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules. **J. Pharm. Pharmacol.** 38, 216-218.
- EL-SHABOURI, M. H. (2002) Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. **Int. J. Pharm.** 249, 101-108.
- ELVASSORE, N., BERTUCCO, A. e CALICETI, P. (2001) Production of insulin-loaded poly(ethylene glycol)/poly(L-lactide) (PEG/PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques. **J. Pharm. Sci.** 90, 1628-1636.
- ESPUELAS, M. S., LEGRAND, P., IRACHE, J. M., GAMAZO, C., ORECCHIONI, A.-M., DEVISSAGUET, J.-P. e YGARTUA, P. (1997) Poly(ϵ -caprolactone) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **Int. J. Pharm.** 158, 19-27.
- ESQUISABEL, A., HERNÁNDEZ, R. M., IGARTUA, M., GASCÓN, A. R., CALVO, B. e PEDRAZ, J. L. (1997) Production of BCG alginate-PLL microcapsules by emulsification/internal gelation. **J. Microencapsul.** 14, 627-638.
- ESQUISABEL, A., HERNÁNDEZ, R. M., IGARTUA, M., GASCÓN, A. R., CALVO, B. e PEDRAZ, J. L. (2000) Effect of lecithins on BCG-alginate-PLL microcapsule particle size and stability upon storage. **J. Microencapsul.** 17, 363-372.
- FASANO, A. e UZZAU, S. (1997) Modulation of intestinal tight junctions by *zonula occuldens* toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. **J. Clin. Invest.** 99, 1158-1164.
- FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R., CALVO, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. **Pharm. Res.** 16, 1576-1581.
- FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.-P., AMMOURY, N. e BENITA, S. (1989) Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm.** 55, R1-R4.
- FLORENCE, A. T. (1997) The oral absorption of micro and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. **Pharm. Res.** 14, 259-266.

- FLORENCE, A. T., HILLERY, A. M., HUSSAIN, N. e JANI, P. U. (1995) Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: studies on particle uptake and fate. **J. Control. Rel.** 36, 39-46.
- FOSS, A. C., GOTO, T., MORISHITA, M. e PEPPAS, N. A. (2004) Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 57, 163-169.
- FOSS, A. C. e PEPPAS, N. A. (2004) Investigation of the cytotoxicity and insulin transport of acrylic-based copolymer protein delivery systems in contact with Caco-2 cultures. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 57, 447-455.
- FREY, A., NEUTRA, M. R. e ROBEY, F. A. (1997) Peptomer aluminum oxide nanoparticle conjugates as systemic and mucosal vaccine candidates: synthesis and characterization of a conjugate derived from the C4 domain of HIV-1MN gp 120. **Bioconjug. Chem.** 8, 424-433.
- FUJII, S., YOKOYAMA, T., IKEGAYA, K., SATO, F. e YOKOO, N. (1985) Promoting effect of the new chymotrypsin inhibitor FK-448 on the intestinal absorption of insulin in rats and dogs. **J. Pharm. Pharmacol.** 37, 545-549.
- FUKUNAGA, M., MILLER, M. M. e DEFTOS, L. J. (1991) Liposome-entrapped calcitonin and parathyroid hormone are orally effective in rats. **Horm. Metab. Res.** 23, 166-167.
- GACESA, P. (1988) Alginates. **Carbohydr. Polym.** 8, 161-182.
- GALINDO-RODRIGUEZ, S., ALLÉMANN, E., FESSI, H. e DOELKER, E. (2004) Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharm. Res.** 21, 1428-1439.
- GANACHAUD, F. e KATZ, J. L. (2005) Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. **Chem. Phys. Chem.** 6, 209-216.
- GARCÍA-FUENTES, M., TORRES, D. e ALONSO, M. J. (2005) New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. **Int. J. Pharm.** 296, 122-132.
- GARCÍA-FUENTES, M., TORRES, D. e ALONSO, M. J. (2003) Design and lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. **Coll. Surf. B Biointerf.** 27, 159-168.

- GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R. e DELIE, F. (2007) Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** *in press*.
- GAUTIER, J. C., GRANGIER, J. L., BARBIER, A., DUPONT, P., DUSSOSSOY, D., PASTOR, G. e COUVREUR, P. (1992) Biodegradable nanoparticles for subcutaneous administration of growth hormone releasing factor (hGRF). **J. Control. Rel.** 20, 67-78.
- GEARY, R. S. e SCHLAMEUS, H. W. (1993) Vancomycin and insulin used as models for oral delivery of peptides. **J. Control. Rel.** 23, 65-74.
- GEORGE, M. e ABRAHAM, T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. **J. Control. Rel.** 114, 1-14.
- GILLIGAN, C. A. e PO, A. L. W. (1991) Oral vaccines: design and delivery. **Int. J. Pharm.** 75, 1-24.
- GOMBOTZ, W. R. e WEE, S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 31, 267-285.
- GOMEZ, A., BINGHAM, D., JUAN, L. e TANGT, K. (1998) Production of protein nanoparticles by electrospray drying. **J. Aerosol Sci.** 29, 561-574.
- GOWTHAMARAJAN, K. e KULKARNI, G. T. (2003) Oral insulin – fact or fiction? Possibilities of achieving oral delivery for insulin. **Resonance**, 38-46.
- GRANGIER, J. L., PUYGRENIER, M., GAUTHIER, J. C. e COUVREUR, P. (1991) Nanoparticles as carriers for growth hormone releasing factors (GRF). **J. Control. Rel.** 15, 3-13.
- GRAY, C. J. e DOWSETT, J. (1988) Retention of insulin in alginate gel beads. **Biotechnol. Bioeng.** 31, 607-612.
- GREF, R., MINAMITAKE, Y., PERACCHIA, M. T., TRUBETSKOY, V., TORCHILIN, V. e LANGER, R. (1994) Biodegradable long circulating nanospheres. **Science** 263, 1600-1603.
- GULSEN, D. e CHAUHAN, A. (2004) Ophthalmic drug delivery through contact lenses. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 45, 2342-2347.
- GURNY, R., BANKER, G. S. e BURI, P. (1977) Développement d'une injectable de testostérone à action prolongée à base de latex biodégradable. **Proc. of Congr. hispano-français biopharm. pharmacocin.**, 173-179.

- GURNY, R., PEPPAS, N. A., HARRINGTON, D. D. e BANKER, G. S. (1981) Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 7, 1-25.
- GURNY, R. e TAYLOR, D. (1980) Development and evaluation of a prolonged acting drug delivery system for the treatment of glaucoma. In: Rubinstein, M. H. (ed.) **Proceedings of the International symposium of the british pharmaceutical technology conference- Solid Dosage Research Unit**, Liverpool.
- GÜRISOY, A. e ÇEVİK, S. (2000) Sustained release properties of alginate microspheres and tableted microspheres of diclofenac sodium. **J. Microencapsul.** 17, 565-575.
- GÜRISOY, A., EROGLU, L., ULUTIN, S., TASYÜREK, M., FESSI, H., PUISIEUX, F. e DEVISSAGUET, J.-P. (1989) Evaluation of indomethacin nanocapsules for their physical stability and inhibitory activity on inflammation and platelet aggregation. **Int. J. Pharm.** 52, 101-108.
- GÜRISOY, A., KALKAN, F. e OKAR, I. (1998) Preparation and tableting of dipyridamole alginate-Eudragit microspheres. **J. Microencapsul.** 15, 621-628.
- GÜRISOY, A., KARAKUS, D. e OKAR, I. (1999) Polymers for sustained release formulations of dipyridamole-alginate microspheres and tableted microspheres. **J. Microencapsul.** 16, 439-452.
- HAMIDI, M., ZAREI, N., ZARRIN, A. H. e MOHAMMADI-SAMANI, S. (2007) Preparation and *in vitro* characterization of carrier erythrocytes for vaccine delivery. **Int. J. Pharm.** 338, 70-78.
- HARI, P. R., CHANDY, T. e SHARMA, C. P. (1996) Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin. **J. Appl. Polym. Sci.** 59, 1795-1801.
- HARMIA-PULKKINEN, T., TUOMI, A. e KRISTOFFERSSON, E. (1989) Manufacture of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles with pilocarpine and timolol by micelle polymerization: factors influencing particle formation. **J. Microencapsul.** 6, 87-93.
- HASHIMOTO, T., NOMOTO, M., KOMATSU, K., HAGA, M. e HAYASHI, M. (2000) Improvement of intestinal absorption of peptides: adsorption of B1-Phe monoglucosylated insulin to

rat intestinal brush-border membrane vesicles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 50, 197-204.

HASHIZUME, M., DOUEN, T., MURAKAMI, M., YAMAMOTO, A., TAKADA, K. e MURANISHI, S. (1992) Improvement of large intestinal absorption of insulin by chemical modification with palmitic acid in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** 44, 555-559.

HENG, W., YUXIU, L., QI, S. e GUOHUA, Y. (2000) Oral administration of insulin to female nonobese diabetic mice inhibited diabetes and induced Fas ligand expression on islets of Langerhans. **Chin. Med. J.** 113, 433-436.

HILLERY, A. M., TOTH, I. e FLORENCE, A. T. (1996a) Co-polymerised peptide particles II: oral uptake of a novel co-polymeric nanoparticulate delivery system for peptides. **J. Control. Rel.** 42, 65-73.

HILLERY, A. M., TOTH, I., SHAW, A. J. e FLORENCE, A. T. (1996b) Co-polymerised peptide particles (CPP) I: synthesis, characterization and *in vitro* studies on a novel oral nanoparticulate delivery system. **J. Control. Rel.** 41, 271-281.

HINDS, K. D., CAMPBELL, K. M., HOLLAND, K. M., LEWIS, D. H., PICHE, C. A. e SCHMIDT, P. G. (2005) Pegylated insulin in PLGA microparticles. *In vivo* and *in vitro* analysis. **J. Control. Rel.** 104, 447-460.

HIRAI, S., YASHIKI, T. e MIMA, H. (1978) Nasal absorption of insulin in dogs. **Diabetes** 27, 296-299.

HO, H. O., HSIAO, C. C. e SHEU, M. T. (1996) Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **J. Pharm. Sci.** 85, 138-143.

HOCHMAN, J. e ARTURSSON, P. (1994) Mechanism of absorption enhancement and tight junction regulation. **J. Control. Rel.** 29, 253-267.

HOFFMAN, A. e ZIV, E. (1997) Pharmacokinetic considerations of new insulin formulations and routes of administration. **Clin. Pharmacokinet.** 33, 285-301.

HOLMGREN, J. e LYCKE, N. (1986) Immune mechanisms in enteric infections. In: Holmgren, J., Linderberg, A. e Molby, R. E. (eds) **Development of vaccines and drugs against diarrhea**. Studentlitteratur, Lund, p. 9-22.

- HOSNY, E. A., AL-SHORA, H. I. e ELMAZAR, M. M. (2002) Effect of bioadhesive polymers, sodium salicylate, polyoxyethylene-9-lauryl ether, and method of preparation on the relative hypoglycemia produced by insulin enteric-coated capsules in diabetic beagle dogs. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 28, 563-570.
- HOSNY, E. A., GHILZAI, N. M. K. e AL-DHAWALIE, A. H. (1995) Effective intestinal absorption of insulin in diabetic rats using enteric coated capsules containing sodium salicylate. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 21, 1583-1589.
- HOSNY, E. A., GHILZAI, N. M. K. e ELMAZAR, M. M. (1997) Promotion of oral insulin absorption in diabetic rabbits using pH-dependent coated capsules containing sodium cholate. **Pharm. Acta Helv.** 72, 203-207.
- HOSNY, E. A., GHILZAI, N. M. K., NAJAR, T. A. A. e ELMAZAR, M. M. (1998) Hypoglycemic effect of oral insulin in diabetic rabbits using pH-dependent coated capsules containing sodium salicylate without and with sodium cholate. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 24, 307-311.
- HUANG, Y.-Y. e WANG, C.-H. (2006) Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. **J. Control. Rel.** 113, 9-14.
- HUBERT, B., ATKINSON, J., GUERRET, M., HOFFMAN, M., DEVISSAGUET, J.-P. e MAINCENT, P. (1991) The preparation and acute antihypertensive effects of a nanocapsular form of darodipine, a dihydropyridine calcium entry blocker. **Pharm. Res.** 8, 734-738.
- HUSSAIN, N. (2001) Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 50, 107-142.
- IBRAHIM, H., BINDSCHAEDLER, C., DOELKER, E., BURI, P. e GURNY, R. (1992) Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. **Int. J. Pharm.** 87, 239-246.
- ILLUM, L., FARRAJ, N. F. e DAVIS, S. S. (1994) Chitosan as novel nasal delivery system for peptide drugs. **Pharm. Res.** 11, 1186-1189.
- IRACHE, J. M., HUICI, M., KONECNY, M., ESPUELAS, S., CAMPANERO, M. A. e ARBÓS, P. (2005) Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. **Molecules** 10, 126-145.

- ITALIA, J. L., BHATT, D. K., BHARDWAJ, V., TIKOO, K. e KUMAR, M. N. V. R. (2007) PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral[®]. **J. Control. Rel.** 119, 197-206.
- IWANAGA, K., ONO, S., NARIOKA, K., KAKEMI, M., MORIMOTO, K., YAMASHITA, S., NAMBA, Y. e OKU, N. (1999) Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. **J. Pharm. Sci.** 88, 248-252.
- IWANAGA, K., ONO, S., NARIOKA, K., MORIMOTO, K., KAKEMI, M., YAMASHITA, S., NANGO, M. e OKU, N. (1997) Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: improvement of stability of insulin in GI tract. **Int. J. Pharm.** 157, 73-80.
- JAEHERE, F. D., DOELKER, E. e GURNY, R. (1999) Nanoparticles. In: Mathiowitz, E. (ed.) **The encyclopedia of controlled drug delivery**. Wiley and Son, Inc., New York, p. 641-664.
- JAIWAL, J., GUPTA, S. K. e KREUTER, J. (2004) Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. **J. Control. Rel.** 96, 169-178.
- JANES, K. A., FRESNEAU, M. P., MARAZUELA, A., FABRA, A. e ALONSO, M. J. (2001) Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **J. Control. Rel.** 73, 255-267.
- JANI, P., FLORENCE, A. T. e MCCARTHY, D. (1991) Polystyrene nanosphere and microsphere uptake and translocation via the gut mucosa after a single oral dose. **J. Pharm. Pharmacol.** 43 suppl., 27P.
- JANI, P., FLORENCE, A. T. e MCCARTHY, D. E. (1992a) Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene nanospheres in the rat. **Int. J. Pharm.** 84, 245-252.
- JANI, P., HALBERT, G. W., LANGRIDGE, J. e FLORENCE, A. T. (1990) Nanoparticle uptake by rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particles size dependency. **J. Pharm. Pharmacol.** 42, 821-826.

- JANI, P., MCCARTHY, D. E. e FLORENCE, A. T. (1992b) Nanosphere and microsphere uptake via Peyer's patches: observation on the rate of uptake in the rat after a single oral dose. **Int. J. Pharm.** 86, 239-246.
- JERRY, N., ANITHA, Y., SHARMA, C. P. e SONY, P. (2001) *In vivo* absorption studies of insulin from an oral delivery system. **Drug Deliv.** 8, 19-23.
- JEURISSON, S. H. M., KRAAL, G. e SMINIA, T. (1987) The role of Peyer's patches in intestinal humoral immune responses is limited to memory formation. **Adv. Exp. Med. Biol.** 216A, 257-265.
- JINTAPATANAKIT, A., JUNYAPRASERT, V. B., MAO, S., SITTERBERG, J., BAKOWSKY, U. e KISSEL, T. (2007) Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 342, 240-249.
- JOHANSEN, A. e FLINK, J. M. (1986) Immobilization of yeast cells by internal gelation of alginate. **Enz. Microb. Technol.** 8, 145-149.
- JUNG, T., KAMM, W., BREITENBACH, A., KAISERLING, E., XIAO, J. X. e KISSEL, T. (2000) Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 50, 147-160.
- KATAVOICH, M. J. e MELDRUM, M. J. (1993) Effect of insulin and acarbose alone and in combination with the female streptozotocin-induced diabetic rat. **J. Pharm. Sci.** 82, 1209-1213.
- KATSUMA, M., WATANABE, S., KAWAI, H., TAKEMURA, S. e SAKO, K. (2006) Effects of absorption promoters on insulin absorption through colon-targeted delivery. **Int. J. Pharm.** 307, 156-162.
- KAVIMANDAN, N. J., LOSI, E. e PEPPAS, N. A. (2006) Novel delivery system based on complexation hydrogels as delivery vehicles for insulin-transferrin conjugates. **Biomaterials** 27, 3846-3854.
- KIM, A., YUN, M.-O., OH, Y.-K., AHN, W.-S. e KIM, C.-K. (1999) Pharmacodynamics of insulin in polyethylene glycol-coated liposomes. **Int. J. Pharm.** 180, 75-81.

- KIM, B.-Y., JEONG, J. H., PARK, K. e KIM, J.-D. (2005) Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system. **J. Control. Rel.** 102, 525-538.
- KIMURA, T., SATO, K., SUGIMOTO, K., TAO, R., MURAK, T., KUROSAKI, Y. e NAKAYAMA, T. (1996) Oral administration of insulin as poly(vinyl alcohol) gel spheres in diabetic rats. **Biol. Pharm. Bull.** 19, 897-900.
- KING, M. W. (2006) <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/diabetes.html>, consultado em 14/07/2007.
- KISEL, M. A., KULIK, L. N., TSYBOVSKY, I. S., VLASOV, A. P., VOROB'YOV, M. S., KHOLODOVA, E. A. e ZABAROVSKAYA, Z. V. (2001) Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. **Int. J. Pharm.** 216, 105-114.
- KOMMAREDDY, S. e AMIJI, M. (2007) Poly(ethylene glycol)-modified thiolated gelatin nanoparticles for glutathione-responsive intracellular DNA delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 3, 32-42.
- KONAN, Y. N., BERTON, M., GURNY, R. e ALLÉMANN, E. (2003) Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub- 200 nm nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Sci.** 18, 241-249.
- KONAN, Y. N., GURNY, R. e ALLÉMANN, E. (2002) State of the art in the delivery of photosensibilizers for photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol., B: Biol.** 66, 89-106.
- KOOSHA, F., MÜLLER, R. H., DAVIS, S. S. e DAVIES, M. C. (1989) The surface chemical structure of poly(β -hydroxybutyrate) microparticles produced by solvent evaporation process. **J. Control. Rel.** 9, 149-157.
- KOOSHA, F., MÜLLER, R. H. e WASHINGTON, C. (1987) Production of polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for drug targeting. **J. Pharm. Pharmacol.** 39, 136P.
- KRAELING, M. E. K. e RITSCHER, W. A. (1992) Development of a colonic release capsule dosage form and the absorption of insulin. **Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.** 14, 199-209.

- KRAUEL, K., DAVIES, N. M., HOOK, S. e RADES, T. (2005) Using different structure types of microemulsions for the preparation of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles by interfacial polymerization. **J. Control. Rel.** 106, 76-87.
- KRAULAND, A. H., GUGGI, D. e BERNKOP-SCHNÜRCH, A. (2004) Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. **J. Control. Rel.** 95, 547-555.
- KRAUSE, H. J., SCHWARZ, A. e ROHDEWALD, P. (1986) Interfacial polymerization, a useful method for the preparation of poly(methylcyanoacrylate) nanoparticles. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 12, 527-552.
- KREUTER, J. (1982) On the mechanism of termination in heterogeneous polymerization. **J. Polym. Sci. Polym. Lett.** 20, 543-545.
- KREUTER, J. (1990) Large-scale production problems and manufacturing of nanoparticles. In: Tyle, P. (ed.) **Specialized drug delivery system**. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 257-266.
- KREUTER, J. (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 47, 65-81.
- KREUTER, J., HEKMATARA, T., DREIS, S., VOGEL, T., GELPERINA, S. e LANGER, K. (2007) Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. **J. Control. Rel.** 118, 54-58.
- KREUTER, J., MAULER, R., GRUSCHKAU, H. e SPEISER, P. P. (1976) The use of new poly(methylmethacrylate) adjuvants for split influenza vaccines. **Exp. Cell. Biol.** 44, 12-19.
- KREUTER, J., MÜLLER, U. e MUNZ, K. (1989) Quantitative and microautoradiographic study on mouse intestinal distribution of poly(cyanoacrylate) nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 55, 39-45.
- KREUTER, J., NEFZGER, M., LIEHL, E., CZOK, R. e VOGES, R. (1983) Distribution and elimination of poly(methyl methacrylate) nanoparticles after subcutaneous administration to rats. **J. Pharm. Sci.** 72, 1146-1149.

- KUBIAK, C., MANIL, L. e COUVREUR, P. (1988) Sorbtive properties of antibodies onto cyanoacrylic nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 41, 181-187.
- KUMAR, M. N. V. R. (2000) Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **J. Pharm. Sci** 3, 234-258.
- KUMAR, T. M., PAUL, W., SHARMA, C. P. e KURIACHAN, M. A. (2005) Bioadhesive, pH responsive micromatrix for oral delivery of insulin. **Trends Biomater. Artif. Org.** 18, 198-202.
- LACROIX, C., PAQUIN, C. e ARNAUD, J.-P. (1990) Batch fermentation with entrapped growing cells of *lactobacillus casei*; optimization of rheological properties of the entrapment gel matrix. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32, 403-408.
- LALLEMAND, F., O. FELT-BAEYENS, BESSEGHIR, K., BEHAR-COHENC, F. e GURNY, R. (2003) Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 56, 307-318.
- LAMBERT, G., FATTAL, E., PINTO-ALPHANDARY, H., GULIK, A. e COUVREUR, P. (2000) Poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. **Pharm. Res.** 17, 707-714.
- LANDRY, F. B., BAZILE, D. V., SPENLEHAUER, G., VEILLARD, M. e KREUTER, J. (1996) Influence of coating agents on the degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles in model digestive fluids (USP XXII). **S.T.P. Pharma Sci.** 6, 195-202.
- LANGER, K., BALTHASAR, S., VOGEL, V., DINAUER, N., VON BRIESEN, H. e SCHUBERT, D. (2003) Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 257, 169-180.
- LANGER, R. (1998) Drug delivery and targeting. **Nature** 386, 410-414.
- LARISCH, B. C., PONCELET, D., CHAMPAGNE, C. P. e NEUFELD, R. J. (1994) Microencapsulation of *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. **J. Microencapsul.** 11, 189-195.
- LE BOURLAIS, C. A., CHEVANNE, F., TURLIN, B., ACAR, L., ZIA, H., SADO, P., NEEDHAM, T. E. e LEVERGE, R. (1997) Effect of cyclosporine A formulations on bovine corneal absorption: *ex-vivo* study. **J. Microencapsul.** 14, 457-467.

- LEE, V. H., DODDA-KASHI, S., M.GRASS, O. e RUBAS, W. (1991) Oral route of peptide and protein drug delivery. In: Lee, V. H. L. (ed.) **Protein and peptide drug delivery**. Marcel Dekker, New York, p. 691-738.
- LEE, V. H. K., WOOD, R. W., KREUTER, J., HARMIA, T. e ROBINSON, J. R. (1986) Ocular drug delivery of progesterone using nanoparticles. **J. Microencapsul.** 3, 213-218.
- LEMARCHAND, C., GREF, R., PASSIRANI, C., GARCION, E., PETRI, B., MÜLLER, R., COSTANTINI, D. e COUVREUR, P. (2006) Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. **Biomaterials** 27, 108-118.
- LENAERTS, V., LABIB, A., CHOUINARD, F., ROUSSEAU, J., ALI, H. e LIER, J. V. (1995) Nanocapsules with a reduced liver uptake: targeting of phthalocyanines to EMT-6 mouse mammary tumour *in vivo*. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 41, 38-43.
- LENCKI, R. W. J., NEUFELD, R. J. e SPINNEY, T. (1989) Method of producing microspheres, Patente EUA 4822534.
- LESCURE, F., ZIMMER, C., ROY, D., TEULON, J. M. e COUVREUR, P. (1991) Synthesis and evaluation of a new biodegradable monomer. **Proc. of the Int. symp. contr. rel. bioact. mat.** 18, 325-326.
- LEUNG, K. K. M., BRIDGES, P. A. e TAYLOR, K. M. G. (1996) The stability of liposomes to ultrasonic nebulization. **Int. J. Pharm.** 145, 95-102.
- LI, C.-L. e DENG, Y.-J. (2004) Oil-based formulations for oral delivery of insulin. **J. Pharm. Pharmacol.** 56, 1101-1107.
- LI, Y.-P., PEI, Y.-Y., ZHANG, X.-Y., GU, Z.-H., ZHOU, Z.-H., YUAN, W.-F., ZHOU, J.-J., ZHU, J.-H. e GAO, X.-J. (2001a) Pegylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. **J. Control. Rel.** 71, 203-211.
- LI, Y. -P., ZHOU, Z. H., PEI, Y. Y., ZHANG, X. Y., GU, Z. H. e YUAN, W. F. (2001b) Pegylated poly(cyanoacrylate) nanoparticles as salivine carriers: synthesis, preparation, and *in vitro* characterization. **Acta Pharmacol. Sin.** 22, 645-650.
- LIM, F. (1983) Microcapsules containing viable tissue cells, Patente EUA 4391909.
- LIM, F. e SUN, A. M. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. **Science** 210, 908-910.

- LIN, C., GOKHALE, R., TRIVEDI, J. S. e RANADE, V. (2004) Recent strategies and methods for improving insulin delivery. **Drug Dev. Res.** 63, 151-160.
- LIN, W., GARNETT, M. C., DAVIS, S. S., SCHACHT, E., FERRUTI, P. e ILLUM, L. (2001) Preparation and characterisation of rose bengal-loaded surface-modified albumin nanoparticles. **J. Control. Rel.** 71, 117-126.
- LIN, Y.-H., MI, F.-L., CHEN, C.-T., CHANG, W.-C., PENG, S.-F., LIANG, H.-F. e SUNG, H.-W. (2007) Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. **Biomacromolecules** 8, 146-152.
- LIU, X., MA, Z., XING, J. e LIU, H. (2004a) Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. **J. Magnetism Magnet. Mat.** 270, 1-6.
- LIU, X., XUE, W., LIU, Q., YU, W., FU, Y., XIONG, X., MA, X. e YUAN, Q. (2004b) Swelling behaviour of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. **Carbohydr. Polym.** 56, 459-464.
- LIU, X. D., BAO, D. C., XUE, W. M., XIONG, Y., YU, W. T., YU, X. J., MA, X. J. e YUAN, Q. (2002a) Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. **J. Appl. Polym. Sci.** 87, 848-852.
- LIU, X. D., YU, W. Y., ZHANG, Y., XUE, W. M., YU, W. T., XIONG, Y., MA, X. J., CHEN, Y. e YUAN, Q. (2002b) Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. **J. Microencapsul.** 19, 775-782.
- LONGO, W. E., IWATA, H., LINDHEIMER, T. A. e GOLDBERG, E. P. (1982) Preparation of hydrophilic albumin microspheres using polymeric dispersing agents. **J. Pharm. Sci.** 71, 1323-1328.
- LOWE, P. J. e TEMPLE, C. S. (1994) Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** 46, 547-552.
- LOWMAN, A. M., MORISHITA, M., KAJITA, M., NAGAI, T. e PEPPAS, N. A. (1999) Oral delivery of insulin using pH responsive complexation gels. **J. Pharm. Sci.** 88, 933-937.

- LU, B., XIONG, S.-B., YANG, H., YIN, X.-D. e ZHAO, R.-B. (2006) Mitoxantrone-loaded BSA nanospheres and chitosan nanospheres for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. II: Tissue distribution and pharmacodynamics. **Int. J. Pharm.** 307, 175-181.
- LU, W., ZHANG, Y., TAN, Y.-Z., HU, K.-L., JIANG, X.-G. e FU, S.-K. (2005) Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery. **J. Control. Rel.** 107, 428-448.
- LUPPI, B., CERCHIARA, T., BIGUCCI, F., CAPONIO, D. e ZECCHI, V. (2005) Bovine serum albumin nanospheres carrying progesterone inclusion complexes. **Drug Deliv.** 12, 281-287.
- MA, L. (2003) DNA vaccines: a review. **J. Intern. Med.** 253, 402-410.
- MA, X. Y., PAN, G. M., LU, Z., HU, J. S., BEI, J. Z., JIA, J. H. e WANG, S. G. (2000) Preliminary study of oral polylactide microcapsulated insulin *in vitro* and *in vivo*. **Diabetes, Obesity and Metabol.** 2, 243-250.
- MA, Z., LIM, T. M. e LIM, L.-Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 293, 271-280.
- MAINARDES, R. M. e EVANGELISTA, R. C. (2005) PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **Int. J. Pharm.** 290, 137-144.
- MAINCENT, P., LE VERGE, R., SADO, P., COUVREUR, P. e DEVISSAGUET, J. P. (1986) Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamine-loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **J. Pharm. Sci.** 75, 955-958.
- MALKOV, D., ANGELO, R., WANG, H. Z., FLANDERS, E., TANG, H. e GOMEZ-ORELLANA, I. (2005) Oral delivery of insulin with the Eligen[®] technology: mechanistic studies. **Curr. Drug Deliv.** 2, 191-197.
- MANOSROI, A. e BAUER, K. H. (1990) Effects of gastrointestinal administration of human insulin and a human insulin-DEAE-dextran complex entrapped in different compound liposomes on blood glucose in rats. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 16, 1521-1538.

- MANOSROI, A. e MANOSROI, J. (1997) Microencapsulation of human insulin DEAE-dextran complex and the complex in liposomes by the emulsion non-solvent addition method. **J. Microencapsul.** 14, 761-768.
- MANSOURI, S., LAVIGNE, P., CORSI, K., BENDERDOUR, M., BEAUMONT, E. e FERNANDES, J. C. (2004) Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 57, 1-8.
- MAO, H.-Q., ROY, K., TROUNG-LE, V. L., JANES, K. A., LIN, K. Y., WANG, Y., AUGUST, J. T. e LEONG, K. W. (2001) Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. **J. Control. Rel.** 70, 399-421.
- MARSCHUTZ, M. K., CALICETI, P. e BERNKOP-SCHNÜRCH, A. (2000) Design and *in vivo* evaluation of an oral delivery system for insulin. **Pharm. Res.** 17, 1468-1474.
- MARTINSEN, A., SKJÅK-BRÆK, G. e SMIDSRØD, O. (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate beads. **Biotechnol. Bioeng.** 33, 79-89.
- MARTY, J. J. (1977) The preparation, purification and properties of nanoparticles. Tese de Doutorado. Colégio de Farmácia Victorian, Parkville, Austrália.
- MARTY, J. J., OPPENHEIM, R. C. e SPEISER, P. (1978) Nanoparticles – a new colloidal drug system delivery system. **Pharm. Acta. Helv.** 53, 17-23.
- MATHIOWITZ, E., JACOB, J. S., JONG, Y. S., CARINO, G. P., CHICKERING, D. E., CHATURVERDI, P., SANTOS, C. A., VIJAYARAGHAVAN, K., MONTGOMERY, S., BASSET, M. e MORREL, C. (1997) Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. **Nature** 386, 410-414.
- MATSUZAWA, A., MORISHITA, M., TAKAYAMA, K. e NAGAI, T. (1995) Absorption of insulin using water-in-oil-in-water emulsion from enteral loop in rats. **Biol. Pharm. Bull.** 18, 1718-1723.
- MBELA, T. K. M., POUPAERT, J. H. e DUMONT, P. (1992) Poly(diethylmethyldene malonate) nanoparticles as primaquine delivery system to liver. **Int. J. Pharm.** 79, 29-38.

- MCCAFFREY, G. e JAMIESON, J. C. (1993) Evidence for the role of a cathepsin D-like activity in the release of Gal beta 1-4GlcNAcAlpha 2-6 sialyltransferase from rat and mouse liver in whole-cell systems. **Comp. Biochem. Physiol. B.** 104, 91-94.
- MCCALLION, O. N., TAYLOR, K. M. G., THOMAS, M. e TAYLOR, A. J. (1995) Nebulization of fluids of different physicochemical properties with air-jet and ultrasonic nebulizers. **Pharm. Res.** 12, 1682-1688.
- MCCLEAN, S., PROSSES, E., MEEHAN, E., O'MALLEY, D., CLARKE, N., RAMTOOLA, Z. e BRAYDEN, D. (1998) Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. **Eur. J. Pharm. Sci.** 6, 153-163.
- MCLACHLAN, J. (1985) Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization. **Plant and Soil** 89, 137-157.
- MCPHILLIPS, A., URAIZEE, S., RITSCHER, W. e SAKR, A. (1997) Evaluation of fluid-bed applied acrylic polymers for the targeted peroral delivery of insulin. **S.T.P. Pharma Sci.** 7, 476-482.
- MEI, L., SUN, H., JIN, X., ZHU, D., SUN, R., ZHANG, M. e SONG, C. (2007) Modified paclitaxel-loaded nanoparticles for inhibition of hyperplasia in a rabbit arterial balloon injury model. **Pharm. Res.** 24, 955-962.
- MEMISOGLU, E., BOCHOT, A., ÖZALP, M., SEN, M., DOMINIQUE DUCHÊNE e HINCAL, A. A. (2003) Direct formation of nanospheres from amphiphilic beta-cyclodextrin inclusion complexes. **Pharm. Res.** 20, 117-125.
- MERODIO, M., ARNEDO, A., RENEDO, M. J. e IRACHE, J. M. (2001) Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and *in vitro* release properties. **Eur. J. Pharm. Sci.** 12, 251-259.
- MESIHA, M., PLAKOGIANNIS, F. e VEJOSOTH, S. (1994) Enhanced oral absorption of insulin from desolvated fatty-acid sodium glycocholate emulsions. **Int. J. Pharm.** 111, 213-216.
- MESIHA, M. e SIDHÖM, M. (1995) Increased oral absorption enhancement of insulin by medium viscosity hydroxypropylcellulose. **Int. J. Pharm.** 114, 137-140.

- MESIHA, M. S. e EL-BITAR, H. I. (1981) Hypoglycemic effect of oral insulin preparation containing Brij 35, 52, 58, or 92 and stearic acid. **J. Pharm. Pharmacol.** 33, 733-734.
- MESIHA, M. S., SIDHÖM, M. B. e FASIPE, B. (2005) Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 288, 289-293.
- MICHEL, C. (1991) Administration orale d'insuline par les nanocapsules et nanoparticules d'alkylcyanoacrylate. Tese de Doutorado. Universidade Louis Pasteur, Strasbourg.
- MICHEL, C., APRAHAMANIAN, M., DEFONTAINE, L., COUVREUR, P. e DAMGÉ, C. (1991) The effect of site of administration in the gastrointestinal tract on the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats. **J. Pharm. Pharmacol.** 43, 1-5.
- MICHEL, C., DEFONTAINE, L., APRAHAMANIAN, M., COUVREUR, P. e DAMGÉ, C. (1992) Insulin nanocapsules: variations in the biological response depending on the administration site along the digestive tract. In: Whateley, T. L. (ed.) **Microencapsulation of drugs**. Hardwood Academic Publishers, Chur- Switzerland, p. 233-242.
- MISHRA, V., MAHOR, S., RAWAT, A., GUPTA, P. N., DUBEY, P., KHATRI, K. e VYAS, S. P. (2006) Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. **J. Drug Target.** 14, 45-53.
- MO, Y., BARNETT, M. E., TAKEMOTO, D., DAVIDSON, H. e KOMPELLA, U. B. (2007) Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene. **Mol. Vis.** 23, 746-757.
- MO, Y. e LIM, L.-Y. (2005) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin. **J. Control. Rel.** 108, 244-262.
- MOLPECERES, J., GUZMÁN, M., ABERTURAS, M. R., CHACON, M. e BERGES, L. (1996) Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. **J. Pharm. Sci.** 85, 206-213.
- MORÇOL, T., NAGAPPAN, P., NERENBAUM, L., MITCHELL, A. e BELL, S. J. D. (2004) Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin. **Int. J. Pharm.** 277, 91-97.

- MORISHITA, I., MORISHITA, M., TAKAYAMA, K., MACHIDA, Y. e NAGAI, T. (1992a) Hypoglycemic effect of novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor in normal and diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 78, 9-16.
- MORISHITA, I., MORISHITA, M., TAKAYAMA, K., MACHIDA, Y. e NAGAI, T. (1993) Enteral insulin delivery by microspheres in 3 different formulations using Eudragit L-100 and S-100. **Int. J. Pharm.** 91, 29-37.
- MORISHITA, M., KAJITA, M., SUZUKI, A., TAKAYAMA, K., CHIBA, Y., TOKIWA, S. e NAGAI, T. (2000) The dose-related hypoglycemic effects of insulin emulsions incorporating highly purified EPA and DHA. **Int. J. Pharm.** 201, 175-185.
- MORISHITA, M., MATSUZAWA, A., TAKAYAMA, K. e ISOWA, K. (1998) Improving insulin enteral absorption using water-in-oil-in-water emulsion. **Int. J. Pharm.** 172, 189-198.
- MORISHITA, M., MORISHITA, I., TAKAYAMA, K., MACHIDA, Y. e NAGAI, T. (1992b) Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. **Int. J. Pharm.** 78, 1-7.
- MOSES, R., DILEEP, K. J. e SHARMA, C. P. (1999) Beta cyclodextrin-insulin-encapsulated chitosan/alginate matrix: oral delivery system. **J. Appl. Polym. Sci.** 75, 1089-1096.
- MOUQUET, C., AYMARD, C., GUILBERT, S., CUVELIER, G. e LAUNAY, B. (1997) Influence of initial pH on gelation kinetics of texturized passion fruit pulp. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** 30, 129-134.
- MUSABAYANE, C. T., MUNJERI, O., BWITITI, P. e OSIM, E. E. (2000) Orally administered, insulin-loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats. **J. Endocrinol.** 164, 1-6.
- MUSUMECI, T., VENTURA, C. A., GIANNONE, I., RUOZI, B., MONTENEGRO, L., PIGNATELLO, R. e PUGLISI, G. (2006) PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. **Int. J. Pharm.** 325, 172-179.
- NARAYANI. (2001) Oral delivery of insulin making needles needless. **Trends Biomat. Artif. Org.** 15, 12-16.

- NARAYANI, R. e RAO, K. P. (1995) Hypoglycemic effect of gelatin microspheres with entrapped insulin and protease inhibitor in normal and diabetic rats. **Drug Deliv. J. Deliv. Targ. Ther. Ag.** 2, 29-38.
- NÉMATI, F., DUBERNET, C., FESSI, H., VERDIÈRE, A. C., POUPON, M. F., PUISIEUX, F. e COUVREUR, P. (1996) Reversion of multidrug resistance using nanoparticles *in vitro*: influence of the nature of the polymer. **Int. J. Pharm.** 138, 237-246.
- NISHIHATA, T., RYTTING, J. H., KAMADA, A. e HIGUCHI, T. (1981) Enhanced intestinal absorption of insulin in rats in the presence of sodium 5-methoxysalicylate. **Diabetes** 30, 1065-1067.
- NOBS, L., BUCHEGGER, F., GURNY, R. e ALLEMANN, E. (2004) Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. **J. Pharm. Sci.** 93, 1980-1992.
- NORRIS, D. A., PURI, N. e SINKO, P. J. (1998) Effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 34, 135-154.
- O'HAGAN, D. T., PALIN, K. J. e DAVIS, S. S. (1987) Intestinal absorption of proteins and macromolecules and the immunological response. **CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.** 4, 197-220.
- ONAL, S. e ZIHNIÖGLU, F. (2002) Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: oral therapeutic peptide delivery. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.** 30, 229-237.
- OPPENHEIM, R. C., STEWART, N. F., GORDON, L. e PATEL, H. M. (1982) Production and evaluation of orally administered insulin nanoparticles. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 8, 531-546.
- ORIVE, G., CARCABOSO, A. M., HERNÁNDEZ, R. M., GASCÓN, A. R. e PEDRAZ, J. L. (2005) Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. **Biomacromolecules** 6, 927-931.
- OTSUKI, M., OHKI, A., OKABAYASHI, Y., SUEHIRO, I. e BABA, S. (1987) Effect of synthetic protease inhibitor camostate on pancreatic exocrine function in rats. **Pancreas** 2, 164-169.

- PAN, Y., LI, Y., ZHAO, H., ZHENG, J., XU, H., WEI, G., HAO, J. e CUI, F. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin *in vivo*. **Int. J. Pharm.** 249, 139-147.
- PANYAM, J. e LABHASETWAR, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 55, 329-347.
- PATEL, H. M. e RYMAN, B. E. (1976) Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes. **FEBS Lett.** 62, 60-63.
- PATEL, H. M. e RYMAN, B. E. (1977) Orally administered liposomally entrapped insulin. **Biochem. Soc. Trans.** 5, 1739-1741.
- PATIL, G. V. (2003) Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. **Drug Dev. Res.** 58, 219-247.
- PELAEZ, C. e KAREL, M. (1981) Improved method for preparation of fruit-simulating alginate gels. **J. Food Proc. Preserv.** 5, 63-81.
- PEPPAS, N. A. e KAVIMANDAN, N. J. (2006) Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. **Eur. J. Pharm. Sci.** 29, 183-197.
- PEREZ, C. (2001) Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. **J. Control. Rel.** 75, 211-224.
- PIÑÓN-SEGUNDO, E., GANEM-QUINTANAR, A., GARIBAY-BERMÚDEZ, J. R., ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J., LÓPEZ-CERVANTES, M. e QUINTANAR-GUERRERO, D. (2006) Preparation of nanoparticles by solvent displacement using a novel recirculation system. **Pharm. Dev. Technol.** 11, 493-501.
- PINTO-ALPHANDARY, H. (2003) Visualization of insulin-loaded nanocapsules: *in vitro* and *in vivo* studies after oral administration to rats. **Pharm. Res.** 20, 1071-1084.
- PLATE, N. A., VALUEV, I. L., SYTOV, G. A. e VALUEV, L. I. (2002) Mucoadhesive polymers with immobilized proteinase inhibitors for oral administration of protein drugs. **Biomaterials** 23, 1673-1677.
- PONCELET, D. (2001) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. **Ann. New York Acad. Sci.** 944, 74-82.

- PONCELET, D., BABAK, V., DULIEU, C. e PICOT, A. (1999) A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. **Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.** 155, 171-176.
- PONCELET, D., LENCKI, R., BEAULIEU, C., HALLÉ, J. P., NEUFELD, R. J. e FOURNIER, A. (1992) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38, 39-45.
- PONCELET, D., SMET, B. P. D., BEAULIEU, C., HUGUET, M. L., FOURNIER, A. e NEUFELD, R. J. (1995) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43, 644-650.
- PRABHA, S., ZHOU, W.-Z., PANYAM, J. e LABHASETWAR, V. (2002) Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection studies with fractionated nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 244, 105-115.
- PREGO, C., FABRE, M., TORRES, D. e ALONSO, M. (2006a) Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. **Pharm. Res.** 23, 549-556.
- PREGO, C., TORRES, D., FERNANDEZ-MEGIA, E., NOVOA-CARBALLAL, R., QUIÑOÁ, E. e ALONSO, M. J. (2006b) Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan pegylation degree. **J. Control. Rel.** 111, 299-308.
- PRICE, R. R. e MONSHIPOURI, M. (1998) Internal gelation method for forming multilayer microspheres and product thereof, Patente EUA 5744337.
- PRISTA, L. N., ALVES, A. C. e MORGADO, R. (1995) Formas farmacêuticas obtidas por dispersão mecânica. In: Prista, L. N., Alves, A. C. e Morgado, R. (eds) **Tecnologia Farmacêutica**. 5ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 597-776.
- PROVOST, H., DIVIES, C. e ROUSSEAU, E. (1985) Continuous production with *Lactobacillus bulgarius* and *Streptococcus termophilus* entrapped in calcium alginate. **Biotechnol. Lett.** 7, 247-252.
- QI, R. e PING, Q. N. (2004) Gastrointestinal absorption enhancement of insulin by administration of enteric microspheres and SNAC to rats. **J. Microencapsul.** 21, 37-35.

- QIAN, F., CUI, F., DING, J., TANG, C. e YIN, C. (2006) Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization. **Biomacromolecules** 7, 2722-2727.
- QUINTANAR-GUERRERO, D., ALLÉMANN, E., FESSI, H. e DOELKER, E. (1998) Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 24, 1113-1128.
- QUONG, D. e NEUFELD, R. J. (1998) DNA protection from extracapsular nuclease, within chitosan-or poly-L-lysine-coated alginate beads. **Biotechnol. Bioeng.** 60, 124-134.
- QUONG, D. e NEUFELD, R. J. (1999) DNA encapsulation within co-guanidine membrane coated alginate beads and protection from extracapsular nuclease. **J. Microencapsul.** 16, 573-585.
- QUONG, D., NEUFELD, R. J., SKJÅK-BRÆK, G. e PONCELET, D. (1998) External *versus* internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. **Biotechnol. Bioeng.** 57, 438-446.
- QUONG, D., O'NEIL, I. K., PONCELET, D. e NEUFELD, R. J. (1996) Gastrointestinal protection of cellular component DNA within an artificial cell system for environment carcinogen biomonitoring. In: Wijffels, R. J., Buitelaar, R. M., Bucke, C. e Tramper, J. (eds) **Immobilized cells: basics and applications**. European Chitin Society, p. 405-410.
- RADWAN, M. A. (2001) Enhancement of absorption of insulin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 27, 981-989.
- RADWAN, M. A. e ABOUL-ENEIN. (2002) The effect of the oral absorption enhancers on the *in vivo* performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats. **J. Microencapsul.** 19, 225-235.
- RAJAONARIVONY, M., VAUTHIER, C., COUARRAZE, G., PUISIEUX, F. e COUVREUR, P. (1993) Development of a new drug carrier made from alginate. **J. Pharm. Sci.** 82, 912-917.

- RAMADAS, M., PAUL, W., DILEEP, K. J., ANITHA, Y. e SHARMA, C. P. (2000) Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats. **J. Microencapsul.** 17, 405-411.
- RAMKISSOON-GANORKAR, C., LIU, F., BAUDYS, M. e KIM, S. W. (1999) Modulating insulin-release profile from pH/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight. **J. Control. Rel.** 59, 287-298.
- REDENBAUGH, K., PAASCH, B. D., NICHOL, J. W., KOSSLER, M. E., VISS, P. R. e WALKER, K. A. (1986) Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. **Bio. Technol.** 4, 797-801.
- RIBEIRO, A. J., NEUFELD, R. J., ARNAUD, P. e CHAUMEIL, J. C. (1999) Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. **Int. J. Pharm.** 187, 115-123.
- ROLLAND, A., GIBASSIER, D., SADO, P. e LE VERGE, R. (1986) Purification et propriétés physico-chimiques des suspensions de nanoparticules de polymère. **J. Pharm. Belg.** 41, 94-105.
- ROQUES, M., DAMGÉ, C., MICHEL, C., STAEDEL, C., CRÉMEL, G. e HUBERT, P. (1992) Encapsulation of insulin for oral administration preserves interaction of the hormone with its receptor *in vitro*. **Diabetes** 41, 451-456.
- RUBINSTEIN, A. e RADAI, R. (1995) *In vitro* and *in vivo* analysis of colon specificity of calcium pectinate formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 41, 291-295.
- SACCA, L., OROFINO, G., PETRONE, A. e VIGORITO, A. C. (1984) Direct assessment of splanchnic uptake and metabolic effects of human and porcine insulin. **Clin. Endocrinol. Metab.** 59, 191-196.
- SAFFRAN, M., KUMAR, G. S., SAVARIAR, C., BURNHAM, J. C., WILLIAMS, F. e NECKERS, D. C. (1986) A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. **Sci. Reports** 233, 1081-1084.
- SAFFRAN, M., PANSKY, B., BUDD, G. C. e WILLIAMS, F. E. (1997) Insulin and the gastrointestinal tract. **J. Control. Rel.** 46, 89-98.

- SAJEESH, S. e SHARMA, C. P. (2004) Poly(methacrylic acid)-alginate semi-IPN microparticles for oral delivery of insulin: a preliminary investigation. **J. Biomat. Appl.** 19, 35-45.
- SAJEESH, S. e SHARMA, C. P. (2005) Novel pH responsive poly(methacrylic acid)-chitosan-polyethylene glycol nanoparticles for oral peptide delivery. **J. Biomed. Mater. Res. Pt. B. Appl. Biomater.** 76, 299-305.
- SAJEESH, S. e SHARMA, C. P. (2006a) Cyclodextrin-insulin complex encapsulated poly(methacrylic acid) based nanoparticles for oral insulin delivery. **Int. J. Pharm.** 325, 147-154.
- SAJEESH, S. e SHARMA, C. P. (2006b) Interpolymer complex microparticles based on poly(methacrylic acid)-chitosan for oral insulin delivery. **J. Appl. Polym. Sci.** 99, 506-512.
- SAJJADI, S. (2007) Nanoparticle formation by monomer-starved semibatch emulsion polymerization. **Langmuir** 23, 1018-1024.
- SAKUMA, S. (1997) Oral peptide delivery using nanoparticles composed of novel graft copolymers having hydrophobic backbone and hydrophilic branches. **Int. J. Pharm.** 149, 93-106.
- SÁNCHEZ, A., VILA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. (1993) Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled-release of ciclosporine. **Int. J. Pharm.** 99, 263-273.
- SARMENTO, B., RIBEIRO, A., VEIGA, F., FERREIRA, D. e NEUFELD, R. J. (2007) Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. **Biomacromolecules** 8, 3054-3060.
- SARTORI, C., FINCH, D. S. e RALPH, A. B. (1996) Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy. **Polymer** 38, 43-51.
- SAXENA, V., SADOQI, M. e SHAO, J. (2004) Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* release. **Int. J. Pharm.** 278, 293-301.

- SCHOUG, A., OLSSON, J., CARLFORS, J., SCHNURER, J. e HAKANSSON, S. (2006) Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3-effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. **Cryobiology** 53, 119-127.
- SCHROEDER, U., SOMMERFELD, P. e SABEL, B. A. (1998) Efficacy of oral dalargin-loaded nanoparticle delivery across the blood-brain barrier. **Peptides** 19, 777-780.
- SEGURA, S., ESPUELAS, S., RENEDO, M. J. e IRACHE, J. M. (2005) Potential of albumin nanoparticles as carriers for interferon gamma. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 31, 271-280.
- SEIJO, B., FATTAL, E., ROBLLOT-TREUPEL, L. e COUVREUR, P. (1990) Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. **Int. J. Pharm.** 62, 1-7.
- SEYLER, I., APPEL, M., DEVISSAGUET, J.-P., LEGRAND, P. e BARRATT, G. (1999) Macrophage activation by a lipophilic derivative of muramyldipeptide within nanocapsules: investigation of the mechanism of drug delivery. **J. Nanoparticle Res.** 1, 91-97.
- SHAH, D. e SHEN, W.-C. (1996) Transcellular delivery of an insulin-transferrin conjugate in enterocyte-like Caco-2 cells. **J. Pharm. Sci.** 85, 1306-1311.
- SHAH, L. e AMIJI, M. (2006) Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS. **Pharm. Res.** 23, 2638-2645.
- SHAO, Z., LI, Y., CHERMAK, T. e MITRA, A. K. (1994) Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. Part 2. Effects of beta-cyclodextrin derivatives on alpha-chymotryptic degradation and enteral absorption of insulin in rats. **Pharm. Res.** 11, 1174-1179.
- SHAO, Z., LI, Y., KRISHNAMOORTHY, R., CHERMAK, T. e MITRA, A. K. (1993) Differential effects of anionic, cationic, nonionic, and physiologic surfactants on the dissociation, alpha-chymotryptic degradation, and enteral absorption of insulin hexamers. **Pharm. Res.** 10, 243-251.
- SHILPA, A., AGRAWAL, S. S. e RAY, A. R. (2003) Controlled delivery of drugs from alginate matrix. **J. Macromol. Sci.** 43, 187-221.

- SHIM, J., KANG, H. S., PARK, W.-S., HAN, S.-H., KIM, J. e CHANG, I.-S. (2004) Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **J. Control. Rel.** 97, 477-484.
- SHIOTANI, T. e YAMANE, T. (1981) A horizontal packed-bed bioreactor to reduce carbon dioxide gas holdup in the continuous production of ethanol in immobilized yeast cells. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 13, 96-101.
- SILVA, C. (2007) Aumento da biodisponibilidade oral de fármacos peptídicos recorrendo à encapsulação com alginato e quitosano. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- SILVA, C., RIBEIRO, A., ZERROUK, N., ARNAUD, P. e VEIGA, F. (2006a) Effect of chitosan-coated alginate microspheres on the permeability of Caco-2 cell monolayers. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 32, 1079-1088.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2006b) Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. **Eur. J. Pharm. Sci.** 29, 148-159.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FIGUEIREDO, I. V., GONCALVES, A. R. e VEIGA, F. (2006c) Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. **Int. J. Pharm.** 311, 1-10.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FIGUEIREDO, M., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2006d) Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **AAPS J.** 7, E903-E913.
- SILVA-CUNHA, A., CHERON, M., GROSSIORD, J. L., PUISIEUX, F. e SEILLER, M. (1998) W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: biological activity after oral administration to normal and diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 169, 33-44.
- SILVA-CUNHA, A., GROSSIORD, J. L., PUISIEUX, F. e SEILLER, M. (1997a) Insulin in w/o/w multiple emulsions: preparation, characterization and determination of stability towards proteases *in vitro*. **J. Microencapsul.** 14, 311-319.

- SILVA-CUNHA, A., GROSSIORD, J. L., PUISIEUX, F. e SEILLER, M. (1997b) W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: preparation, characterization and determination of stability towards proteases *in vitro*. **Int. J. Pharm.** 158, 79-89.
- SIMÕES, S., FILIPE, A., FANCA, H., MANO, M., PENACHO, N., DÜZGÜNES, N. e LIMA, M. P. (2005) Cationic liposomes for gene delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.** 2, 237-254.
- SMIDSRØD, O. e SKJÅK-BRÆK, G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. **TIBTECH** 8, 71-78.
- SONG, Y., WANG, Y., THAKUR, R., MEIDAN, V. M. e MICHNIAK, B. (2004) Mucosal drug delivery: membranes, methodologies, and applications. **CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.** 21, 195-256.
- SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R. e RUDZINSKI, W. E. (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **J. Control. Rel.** 70, 1-20.
- STILL, J. G. (2002) Development of oral insulin: progress and current status. **Diabetes Metabol. Res. Rev.** 18, S29-S37.
- STRUGALA, V., KENNINGTON, E. J., CAMPBELL, R. J., SKJÅK-BRÆK, G. e DETTMAR, P. W. (2005) Inhibition of pepsin activity by alginates *in vitro* and the effect of epimerization. **Int. J. Pharm.** 304, 40-50.
- SULLIVAN, C. O. e BIRKINSHAW, C. (2004) *In vitro* degradation of insulin-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. **Biomaterials** 25, 4375-4382.
- SUZUKI, A., MORISHITA, M., KAJITA, M., TAKAYAMA, K., ISOWA, K., CHIBA, Y., TOKIWA, S. e NAGAI, T. (1998) Enhanced colonic and rectal absorption of insulin using a multiple emulsion containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **J. Pharm. Sci.** 87, 1196-1202.
- TABATA, J. e IKADA, Y. (1989) Protein precoating of polylactide microspheres containing a lipophilic immunopotentiator for enhancement of macrophage phagocytosis and activation. **Pharm. Res.** 6, 296-301.

- TAKEUCHI, H., YAMAMOTO, H., NIWA, T., HINO, T. e KAWASHIMA, Y. (1996) Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. **Pharm. Res.** 13, 896-901.
- TENHOOR, C. e DRESSMAN, J. (1992) Oral absorption of peptides and proteins. **S.T.P. Pharma Sci.** 2, 301-312.
- TIMMY, S. A., VICTOR, S. P., SHARMA, C. P. e KUMARI, V. (2002) Betacyclodextrin complexed insulin loaded alginate microspheres-oral delivery system. **Trends Biomater. Artif. Org.** 15, 48-53.
- TIN, S. S. H., BOADI, D. K. e NEUFELD, R. J. (1997) DNA encapsulation by an air-agitated liquid-liquid mixer. **Biotechnol. Bioeng.** 56, 464-470.
- TOBÍO, M., GREF, R., SÁNCHEZ, A., LANGER, R. e ALONSO, M. J. (1998) Stealth PLA-PEG nanoparticles as proteins carriers for nasal administration. **Pharm. Res.** 15, 270-275.
- TOFT, K. (1982) Interactions between pectins and alginates. **Prog. Food Nutr. Sci.** 6, 89-96.
- TOKUMITSU, H., ICHIKAWA, H., FUKUMORI, Y., HIRATSUKA, J., SAKURAI, Y. e KOBAYASHI, T. (1998) Preparation of gadopentetate-loaded chitosan nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer using a novel emulsion droplet coalescence technique. 2nd World meeting on pharmaceutics, biopharmaceutics and pharmaceutical technology, A. P. G. I./ A. P. V. Paris, p. 641-642.
- TONNESEN, H. H. e KARLSEN, J. (2002) Alginate in drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 28, 621-630.
- TOORISAKA, E., ONO, H., ARIMORI, K., KAMIYA, N. e GOTO, M. (2003) Hypoglycemic effect of surfactant-coated insulin solubilized in a novel solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion. **Int. J. Pharm.** 252, 271-274.
- TOUITOU, E., DONBROW, M. e RUBINSTEIN, A. (1980) Effective intestinal absorption of insulin in diabetic rats using new formulation approach. **J. Pharm. Pharmacol.** 32, 108-110.
- TOUITOU, E. e RUBINSTEIN, A. (1986) Targeted enteral delivery of insulin to rats. **Int. J. Pharm.** 30, 95-99.

- TOZAKI, H., KOMOIKE, J., TADA, C., MARUYAMA, T., TERABE, A., SUZUKI, T., YAMAMOTO, A. e MURANISHI, S. (1997) Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. **J. Pharm. Sci.** 86, 1016-1021.
- TOZAKI, H., NISHIOKA, J., KOMOIKE, J., OKADA, N., FUJITA, T., MURANISHI, S., KIM, S. I., TERASHIMA, H. e YAMAMOTO, A. (2001) Enhanced absorption of insulin and (Asu(1,7))eel-calcitonin using novel azopolymer-coated pellets for colon-specific drug delivery. **J. Pharm. Sci.** 90, 89-97.
- TSAKIRIDIS, T., TONG, P., MATTHEWS, B., TSIANI, E., BILAN, P. J., KLIP, A. e DOWNEY, G. P. (1999) Role of the actin cytoskeleton in insulin action. **Microscop. Res. Techn.** 47, 79-92.
- TUROS, E., SHIM, J.-Y., WANG, Y., GREENHALGH, K., REDDY, G. S. K., DICKEY, S. e LIM, D. V. (2007) Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: new opportunities for development of anti-MRSA agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 17, 53-56.
- UBAIDULLA, U., SULTANA, Y., AHMED, F. J., KHAR, R. K. e PANDA, A. K. (2007) Chitosan phthalate microspheres for oral delivery of insulin: preparation, characterization, and *in vitro* evaluation. **Drug Del.** 14, 19-23.
- UCHIYAMA, T., SUGIYAMA, T., QUAN, Y.-S., KOTANI, A., OKADA, N., FUJITA, T., MURANISHI, S. e YAMAMOTO, A. (1999) Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-lauryl- β -D-maltopyranoside. **J. Pharm. Pharmacol.** 51, 1241-1250.
- UCHIYAMA, T., YAMAMOTO, A., HATANO, H., FUJITA, T. e MURANISHI, S. (1996) Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers in the large intestine: intestinal absorption of phenol red and protein and phospholipid release from the intestinal membrane. **Biol. Pharm. Bull.** 19, 1618-1621.
- UEDA, H. e KREUTER, J. (1997) Optimization of the preparation of loperamide-loaded poly(L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification solvent evaporation. **J. Microencapsul.** 14, 593-605.

- UEDA, M., IWARA, A. e KREUTER, J. (1998) Influence of the preparation methods on the drug release behaviour of loperamide-loaded nanoparticles. **J. Microencapsul.** 15, 361-372.
- VANDENBERG, G. W. e NOUË, J. D. L. (2001) Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation. **J. Microencapsul.** 18, 433-441.
- VANDERVOORT, J. e LUDWIG, A. (2004) Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 57, 251-261.
- VARGAS, A., PEGAZ, B., DEBEFVE, E., KONAN-KOUAKOU, Y., LANGE, N., BALLINI, J.-P., VANDEN BERGH, H., GURNY, R. e DELIE, F. (2004) Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an *in vivo* evaluation using chick embryos. **Int. J. Pharm.** 286, 131-145.
- VARSHOVAZ, J., PARDAKHTY, A., HAJHASHEMI, V. e NAJAFABADI, A. R. (2003) Development and physical characterization of sorbitan monoester niosomes for insulin oral delivery. **Drug Deliv.** 10, 251-262.
- VAUTHIER, C. e COUVREUR, P. (2000) Development of polysaccharide nanoparticles as novel drug carrier systems. In: Wise, D. L. (ed.) **Handbook of pharmaceutical controlled release technology**. Marcel Dekker, Basel, New York, p. 413-429.
- VAUTHIER, C., DUBERNET, C., FATTAL, E., PINTO-ALPHANDARY, H. e COUVREUR, P. (2003) Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 55, 519-548.
- VEGA, E., EGEEA, M. A., VALLS, O., ESPINA, M. e GARCÍA, M. L. (2006) Flurbiprofen loaded biodegradable nanoparticles for ophthalmic administration. **J. Pharm. Sci.** 95, 2393-2405.
- VILA, A., SÁNCHEZ, A., JANES, K. A., BEHRENS, I., KISSEL, T., VILA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. (2004) Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 57, 123-131.

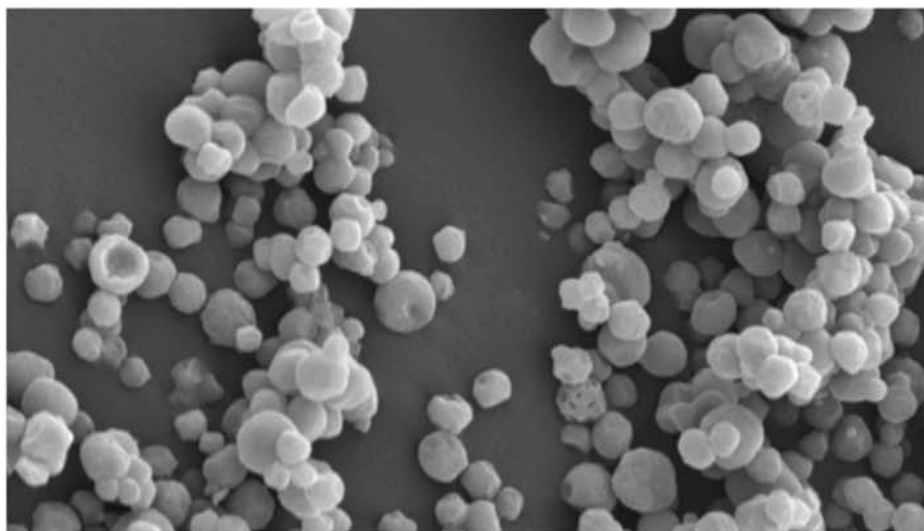
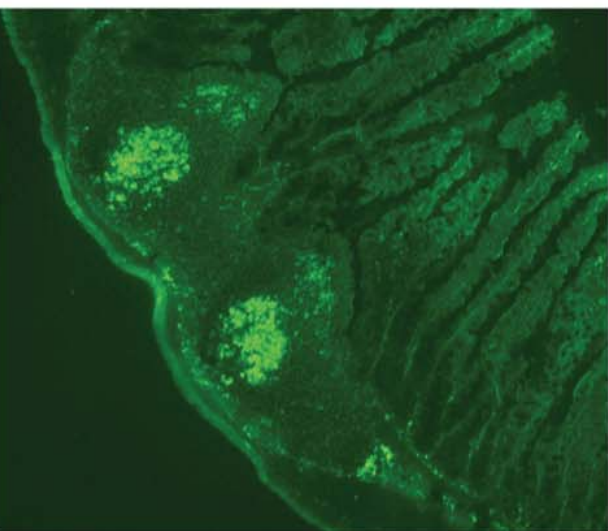
- VRANCHX, H., DEMOUSTIER, M. e DELEERS, M. (1996a) A new nanocapsule formulation with hydrophilic core: application to the oral administration of salmon calcitonin. **Eur. J. Pharm. Sci.** 42, 345-347.
- VRANCHX, H., DEMOUSTIER, M. e DELEERS, M. (1996b) Pharmaceutical compositions containing nanocapsules, Patente EUA 5500224.
- WALKER, R. I. e OWEN, R. L. (1988) Intestinal barriers to bacteria and their toxins. **Ann. Rev. Med.** 41, 393-400.
- WALSH, P. K., ISDELL, F. V., NOONE, S. M., O'DONOVAN, M. G. e MALONE, D. M. (1996) Growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* microcolonies in alginate and carrageenan gel particles: effect of physical and chemical properties of gels. **Enz. Microb. Technol.** 18, 366-372.
- WANG, K. e HE, Z. (2002) Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. **Int. J. Pharm.** 244, 117-126.
- WANG, N. e WU, X. S. (1997) Preparation and characterization of agarose hydrogel nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Pharm Dev Technol.** 2, 135-142.
- WANG, N., WU, X. S. e MESIHA, M. (1995) A new method for preparation of protein-loaded agarose nanoparticles. **Pharm. Res.** 12, S257.
- WANG, Y., DAVE, R. N. e PFEFFER, R. (2004) Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process. **J. Supercrit. Fluids** 28, 85-99.
- WATNASIRICHAIKUL, S., DAVIES, N. M., RADES, T. e TUCKER, I. G. (2000) Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions. **Pharm. Res.** 17, 684-689.
- WATNASIRICHAIKUL, S., RADES, T. e TUCKER, I. G. (2002) *In vitro* release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion. **J. Pharm. Pharmacol.** 54, 473-480.
- WEBER, C., COESTER, C., KREUTER, J. e LANGER, R. (2000) Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 194, 91-102.

- WEHRLE, P., MAGENHEIM, B. e BENITA, S. (1995) Influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design. **Eur J Pharm Biopharm** 41, 19-26.
- WEINER, N., WILLIAMS, N., BIRCH, G., RAMACHANDRAN, C., SHIPMAN, C. J. e FLYNN, G. (1989) Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in a cutaneous herpes guinea-pig model. **Antimicrobi. Agents Chemother.** 33, 1217-1221.
- WIDDER, K. J., FLOURET, G. e SENYE, A. (1979) Magnetic microspheres: synthesis of a novel parental drug carrier. **J. Pharm. Sci.** 68, 79-82.
- WU, Z. H., PING, Q. N., LAI, J. M. e WEI, Y. (2003) Hypoglycemic effect of polysaccharide-coated insulin liposomes after oral administration in mice. **Acta Pharm. Sin.** 38, 138-142.
- XIA, C. Q. e SHEN, W. C. (2001) Tyrphostin-8 enhances transferrin receptor-mediated transcytosis in Caco-2 cells and increases hypoglycemic effect of orally administered insulin-transferrin conjugate in diabetic rats. **Pharm. Res.** 18, 191-195.
- XIA, C. Q., WANG, J. e SHEN, W. C. (2000) Hypoglycemic effect of insulin-transferrin conjugate in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 295, 594-600.
- YAMAMOTO, A., TANIGUCHI, T., RIKYUU, K., TSUJI, T., FUJITA, T., MURAKAMI, M. e MURANISHI, S. (1994) Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. **Pharm. Res.** 11, 1496-1500.
- YI, Y., KERMASHA, S., L'HOCINE, L. e NEUFELD, R. J. (2002) Encapsulation of chlorophyllase in hydrophobically modified hydrogel. **J. Mol. Cat. B: Enzymatic** 19-20, 319-325.
- YOO, H. S., OH, J. E., LEE, K. H. e PARK, T. G. (1999) Biodegradable nanoparticles containing-PLGA conjugate for sustained release. **Pharm. Res.** 16, 1114-1118.
- YOSHIOKA, T., HASHIDA, M., MURANISHI, S. e SEZAKI, H. (1981) Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen, and lung: nano- and microspherical carriers of gelatine. **Int. J. Pharm.** 8, 131-141.

- YU, W. P., BARRAT, G., DEVISSAGUET, J.-P. e PUISIEUX, F. (1991) Anti-metastatic activity *in vivo* of MDP-L-alanyl-cholesterol (MTP-chol) entrapped in nanocapsules. **Int. J. Immunopharmacol.** 13, 167-173.
- ZAHOOR, A., SHARMA, S. e KHULLER, G. K. (2005) Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. **Int. J. Antimicrob. Ag.** 26, 298-303.
- ZHANG, N., PING, Q., HUANG, G., XU, W., CHENG, Y. e HAN, X. (2006a) Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **Int. J. Pharm.** 327, 153-159.
- ZHANG, N., PING, Q. N., HUANG, G. H. e XU, W. F. (2005) Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. **Int. J. Pharm.** 294, 247-259.
- ZHANG, Q., ZACONG, S. e TSUNEJI, N. (2001) Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. **Int. J. Pharm.** 218, 75-80.
- ZHANG, Q. Z., ZHA, L. S., ZHANG, Y., JIANG, W. M., LU, W., SHI, Z. Q., JIANG, X. G. e FU, S. K. (2006b) The brain targeting efficiency following nasally applied MPEG-PLA nanoparticles in rats. **J. Drug Target.** 14, 281-290.
- ZHANG, Z. e FENG, S.-S. (2006) Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: synthesis, formulation, characterization and *in vitro* drug release. **Biomaterials** 27, 262-270.
- ZHOU, X. H. (1994) Overcoming enzymatic and absorption barriers to non-parenterally administered protein and peptide drugs. **J. Control. Rel.** 29, 239-252.
- ZILLIES, J. e COESTER, C. (2004) Evaluating gelatin based nanoparticles as a carrier system for double stranded oligonucleotides. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 7, 17-21.
- ZIMMER, A., KREUTER, J. e ROBINSON, J. R. (1991) Studies on the transport pathway of PBCA nanoparticles in ocular tissues. **J. Microencapsul.** 8, 497-504.
- ZIV, E., KIDRON, M., RAZ, I., KRAUSZ, M., BLATT, Y., ROTMAN, A. e BAR-ON, H. (1994) Oral administration of insulin in solid form to nondiabetic and diabetic dogs. **J. Pharm. Sci.** 83, 792-794.

ZIV, E., LIOR, O. e KIDRON, M. (1987) Absorption of protein via the intestinal wall. A quantitative model. **Biochem. Pharmacol.** 36, 1035-1039.

ZWIOREK, K., KLOECKNER, J., QAGNER, E. e COESTER, C. (2004) Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. **J. Pharm. Pharm. Sci.** 7, 22-28.



TRANSPOSIÇÃO DO MÉTODO DE
EMULSIFICAÇÃO/GELIFICAÇÃO
INTERNA À ESCALA NANOMÉTRICA

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO

Um dos métodos para a preparação de partículas poliméricas, é o método de emulsificação/gelificação interna. A escolha desta metodologia foi baseada nas vantagens por ela oferecidas, principalmente na possibilidade de controlar a granulometria das partículas poliméricas resultantes. Até à presente data, este método foi, única e exclusivamente, utilizado na preparação de partículas de dimensões milimétricas ou micrométricas. A presente dissertação propõe-se, como descrito no capítulo anterior, adaptar este método à produção de partículas com dimensões inferiores ao limite crítico necessário para estas serem absorvidas após administração oral. O diâmetro crítico necessário para que ocorra a absorção intestinal de partículas assume-se como 10 μm como limite máximo (Jung *et al.*, 2000). Sabe-se que a absorção intestinal das partículas é afectada por vários factores sendo a granulometria um dos mais decisivos (Desai *et al.*, 1996; Norris *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2000; Saez *et al.*, 2000). Além da absorção intestinal (Morishita *et al.*, 2004; Rieux *et al.*, 2005), a granulometria também é um factor determinante na distribuição corporal (Jani *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 2000), no perfil de libertação (Ritger e Peppas, 1987), nas propriedades de mucoadesivas (Gombotz e Wee, 1998; Lamprecht *et al.*, 2001; Morishita *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2006) e na transfecção (Prabha *et al.*, 2002). Existem várias relações matemáticas que relacionam a granulometria com alguns dos factores anteriormente descritos. Uma dessas equações matemáticas (Equação II-1) estabelece a relação entre o número e granulometria das partículas captadas pelo tecido intestinal, linfóide (placas de Peyer) ou não linfóide (Desai *et al.*, 1996).

$$\text{Número de partículas captadas} = \frac{W \times K \times 10^9}{d^3} \quad \text{Equação II-1}$$

sendo W a massa da partícula captada em μg por área de tecido intestinal em mm^2 , d o diâmetro das partículas em μm e K um factor conhecido (1,426) que tem em consideração a densidade do polímero utilizado (g/cm^3).

Outro estudo sugeriu uma outra relação mas, neste caso, entre a granulometria e a difusão da partícula através da mucina intestinal segundo a lei de Stokes-Einstein (Norris *et al.*, 1998). A Equação II-2 relaciona o coeficiente de difusão D com o raio r da partícula, onde K é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio, P a permeabilidade e, finalmente, h a espessura da camada do muco intestinal.

$$D = \frac{KT}{6\eta\pi r} \quad \text{ou} \quad P = \frac{KT}{6\eta\pi r h} \qquad \text{Equação II-2}$$

Resumidamente, o método em estudo, emulsificação/gelificação interna, envolve a preparação de uma suspensão de um sal insolúvel de cálcio como, por exemplo o carbonato de cálcio, numa solução de alginato. Esta mistura, alginato-sal insolúvel de cálcio, é dispersa num óleo, que pode conter ou não um agente emulsivo, resultando uma emulsão A/O. Após a formação da emulsão, segue-se a solubilização do sal insolúvel de cálcio por adição de um ácido lipossolúvel e conseqüente gelificação do alginato, dissolvido na fase interna, por reticulação com os íons cálcio livres. As reacções químicas relativas às etapas anteriores encontram-se descritas no capítulo anterior.

Finalmente, as partículas gelificadas e dispersas na emulsão A/O são recuperadas por adição de um meio de lavagem adequado. Normalmente, e para partículas de dimensões milimétricas e micrométricas ($> 10 \mu\text{m}$), a recuperação das partículas é conseguida através da adição de um meio de lavagem aquoso que perturba o equilíbrio da emulsão A/O e causa uma inversão de fases. Esta inversão de fases é favorável à migração das partículas da fase oleosa para a aquosa. Todavia, os parâmetros relacionados com esta etapa deverão ser estritamente controlados porque, caso contrário, o risco de formação de uma emulsão O/A muito estável é elevado e a extracção das partículas é praticamente impossível (Poncelet *et al.*, 1999).

No capítulo anterior foi feita uma abordagem histórica do método de emulsificação/gelificação interna, aplicando o alginato como polímero base. Este método tem vindo a sofrer ramificações do protocolo base (Lencki *et al.*, 1989). Essas ramificações encontram-se publicadas sob a forma de patentes e artigos conforme o indicado no Capítulo I. Porém, verificou-se que nos documentos citados, as partículas poliméricas produzidas

apresentaram um diâmetro superior a 10 μm e, em algumas situações, com uma distribuição granulométrica polimodal.

Para além da dificuldade de obtenção de partículas poliméricas de granulometria inferior a 10 μm com o método de emulsificação/gelificação interna, existe uma outra associada à transposição do método à escala nanométrica e que se relaciona com o processo de recuperação das partículas. De uma forma geral e depois de fraccionada a emulsão, partículas poliméricas acima de 10 μm são isoladas por decantação ou filtração (Arshady, 1990), mas à medida que o diâmetro diminui, os problemas de recuperação aumentam (Magenheim e Benita, 1991), sendo, neste último caso, a centrifugação o método mais utilizado (Arshady, 1990).

O presente trabalho propõe-se ultrapassar estas duas dificuldades: a obtenção de partículas poliméricas com menos de 10 μm e a sua recuperação. Foram estudados parâmetros de processo e de formulação no sentido de obter a menor granulometria possível. Todavia, por uma questão de prudência na nomenclatura das partículas obtidas, uma vez que ainda não sabíamos se a transposição de escala seria possível, optou-se, nesta primeira fase, pela designação de *partículas* em vez de *nanoesferas*. Na transposição à escala nanométrica, o critério de selecção de um ou outro parâmetro de processo ou formulação foi baseado exclusivamente na granulometria obtida. Existiram, contudo, parâmetros que foram fixos desde o início da transposição da metodologia, uma vez que a bibliografia existente sugere inequivocamente a sua adopção (Poncelet *et al.*, 1992; Poncelet *et al.*, 1995). Por exemplo, a escolha do vector de cálcio foi baseada em estudos anteriores (Poncelet *et al.*, 1995) que demonstraram que o carbonato de cálcio possui um comportamento mais adequado que outros sais de cálcio, principalmente, devido às características morfológicas das partículas obtidas e rapidez de reacção. O agente emulsivo escolhido foi o monoleato de sorbitano, comercialmente conhecido por Span[®] 80, devido às suas características físico-químicas e à disponibilidade imediata. Os Spans são obtidos por reacções de esterificação dos sorbitanos com ácidos gordos de elevado PM. Estes compostos são predominantemente lipófilos e têm um equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de 4,3, pelo que originam emulsões do tipo A/O (Prista *et al.*, 1995). O Span[®] 80 tem sido frequentemente utilizado na área da microencapsulação

(Alexakis *et al.*, 1995; Quong *et al.*, 1996; Tin *et al.*, 1997; You *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b; Moslemy *et al.*, 2002), como indicado no capítulo anterior.

A escolha do equipamento utilizado para a obtenção da emulsão foi baseada no trabalho de Poncelet e colaboradores (Poncelet *et al.*, 1992), no qual se estudou a influência da geometria do reactor cilíndrico, representados na Figura II-1, e do tipo de hélices, representadas na Figura II-2, na granulometria das partículas de alginato e no rendimento do lote. No estudo anterior, a utilização de um reactor de fundo redondo aumentou o rendimento do lote, uma vez que esta geometria evitou o aparecimento de volumes mortos durante a agitação, responsáveis pela acumulação da solução de alginato e pela formação de agregados. Relativamente às hélices, a lâmina de rede produziu partículas de dimensões reduzidas; contudo, resultou num aumento de formação de agregados, devido à aderência do alginato à rede. Pelo contrário, a hélice marinha permitiu obter emulsões homogêneas e sem os inconvenientes da aderência e agregação observados com a lâmina em rede. A utilização da turbina de seis lâminas revelou-se menos vantajosa em termos de homogeneidade da emulsão comparativamente à hélice marinha. Com base nestes resultados, seleccionou-se para a etapa de emulsificação um reactor cilíndrico de fundo redondo (Figura II-1, c) e uma hélice marinha de três lâminas (Figura II-2, d).

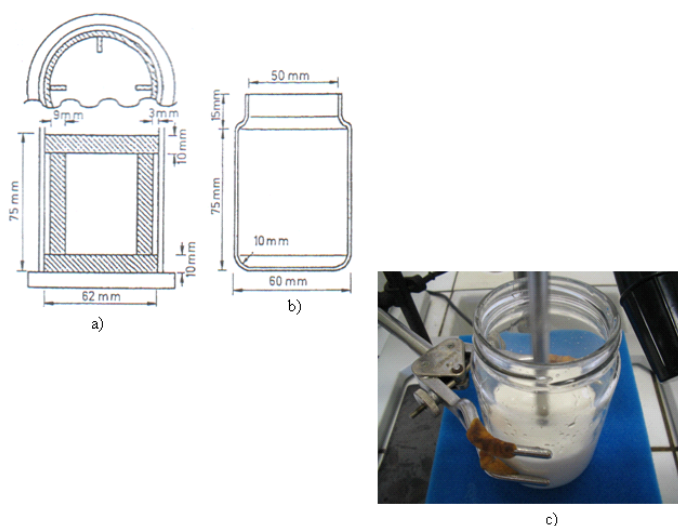


Figura II-1. Reactores utilizados na preparação das partículas de alginato pelo método de emulsificação/gelificação interna: a) reactor cilíndrico de fundo plano, b) reactor cilíndrico de fundo redondo (tipo de reactores *a* e *b* adaptados a partir de Poncelet *et al.*, 1992) e c) reactor utilizado no presente trabalho.

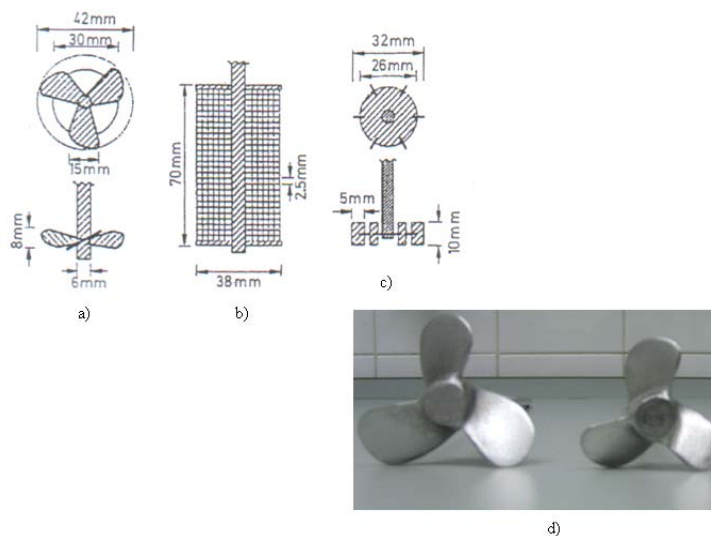


Figura II-2. Hélices utilizadas na preparação das partículas de alginato por emulsificação/gelificação interna: a) hélice marinha de três lâminas, b) lâmina de rede, c) turbina de seis lâminas (tipos de hélices *a*, *b* e *c* adaptadas a partir de Poncelet *et al.*, 1992) e, finalmente, d) as hélices que foram utilizadas no presente trabalho.

Ultrapassada a fase de preparação das partículas poliméricas, foram estudados diferentes protocolos de recuperação das mesmas. Nesta segunda fase, a selecção do melhor protocolo de recuperação das partículas poliméricas foi realizada através da análise de vários parâmetros, nomeadamente granulometria, morfologia das partículas, número de ciclos de lavagem, facilidade de eliminação do óleo residual, rendimento de recuperação (RR), EE, perfil de libertação *in vitro* da insulina a partir das partículas poliméricas e, finalmente, a estabilidade físico-química da insulina encapsulada.

A insulina, tal como outros fármacos peptídicos, é sensível a determinados factores, nomeadamente a temperaturas elevadas, humidade elevada, solventes orgânicos, agitação mecânica, ultra-sons, interfaces água-solvente, interfaces ar-água, situações de adsorção da proteína ao polímero e tensão superficial (Bilati *et al.*, 2005; Ibrahim *et al.*, 2005). Estes factores podem provocar degradação molecular, desnaturação ou agregação da insulina. Além disso, outros factores poderão influenciar a estabilidade da proteína, designadamente a fonte e a pureza da proteína, o tipo de polímero envolvido na encapsulação e a presença ou não de aditivos (por exemplo: outras proteínas, sais, álcoois, agentes emulsivos ou açúcares) (Bilati *et al.*, 2005). Além disso, após a etapa de recuperação, recorre-se à liofilização como método

de secagem das partículas poliméricas e, este passo pode condicionar a estabilidade da proteína. De facto, seja qual for o material de encapsulação, o processo de recuperação e de secagem, estes devem contribuir para a manutenção da estabilidade da insulina encapsulada, de forma que, após encapsulação e libertação, uma fracção significativa do fármaco permaneça biologicamente activa. A estabilidade físico-química da insulina foi avaliada através de três métodos analíticos: cromatografia líquida de alta resolução com espectrofotómetro UV (HPLC-UV), cromatografia líquida de alta resolução com espectrómetro de massa (HPLC-MS) e dicroísmo circular (DC).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O alginato de sódio (Algogel 3541, extraído da *Laminaria hyperborea*) foi fornecido pela Degussa Texturant Systems (Boulogne-Billancourt, França). O carbonato de cálcio micronizado (Setacarb[®]; 97% de partículas com menos de 2 µm) foi fornecido pela Omya (Orgon, França). O agente emulsivo lipofílico Span[®] 80 (monoleato de sorbitano, EHL = 4,3) foi adquirido à Fluka Biochemika (Steinheim, Alemanha). A parafina líquida (viscosidade = 190 mPa·s) e o Tween[®] 80 (monoleato de polioxietilenossorbitano, EHL = 15) foram adquiridos à Klaus Dahleke KG (Hamburgo, Alemanha) e à Uniqema (Gouda, Holanda), respectivamente. O óleo de amêndoas doces (viscosidade = 67,1 mPa·s (Esquisabel *et al.*, 2002)) foi adquirido aos laboratórios Overpharma, Produtos Médicos e Farmacêuticos (Lisboa, Portugal). A insulina humana, de origem recombinante e de acção rápida (Actrapid[®] 100 UI/mL), da Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Dinamarca), foi fornecida pelos Hospitais da Universidade de Coimbra. A água desionizada utilizada na preparação de soluções foi obtida a partir de um sistema Millipore Elix 5 (Bedford, MA, EUA). O acetonitrilo, o ácido trifluoroacético (TFA) e a água utilizados no sistema de HPLC foram de qualidade adequada. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Preparação das partículas de alginato

O estudo dos parâmetros de processo e formulação necessários para a transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica foi realizado apenas com partículas poliméricas vazias, isto é, sem adição do fármaco. O protocolo base conducente à obtenção das partículas foi baseado num trabalho anterior (Silva, 2007) e este englobava a preparação de uma solução de alginato de sódio a 2% (m/V) por dissolução do polímero em 30 mL de água desionizada a pH 6,4, sob agitação lenta (100 rpm, 16-18 h), num agitador de

movimento orbital. Após dissolução do alginato de sódio, a solução foi deixada, pelo menos, 1 h em repouso para desgaseificar. Uma suspensão aquosa de carbonato de cálcio ultrafino a 5% (m/V) foi sujeita a sonicação (20 KHz, output 70, Vibra-Cell[®] VC 130, Sonics, Newton, CT, EUA) durante 10 min e 5 mL desta suspensão foram adicionados à solução de alginato de sódio, de modo a obter uma razão cálcio/alginato de 16,7% (m/m). Após homogeneização, a mistura foi transferida para um reactor de fundo redondo, contendo 70 mL de parafina líquida (razão A/O de 30/70, V/V) e um agente emulsivo (Span[®] 80) a 0,5% (V/V). A dispersão das duas fases foi conseguida por agitação a uma velocidade de 400 rpm, utilizando um agitador Ika[®] Eurostar (Staufen, Alemanha) provido de uma hélice marinha de três lâminas. O período de emulsificação foi de 15 min, após o qual se adicionaram 20 mL de parafina líquida, contendo ácido acético glacial (razão molar ácido/cálcio de 3,5) para solubilizar o carbonato de cálcio e permitir a gelificação do alginato. As partículas recém-formadas e dispersas na fase oleosa foram recuperadas após adição de 100 mL de tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII). Antes da adição do meio de lavagem ao reactor, a velocidade de agitação foi reduzida para 200 rpm e o contacto com o meio de lavagem foi permitido a esta velocidade durante 2-5 min. Após este período, o conteúdo do reactor foi vertido para tubos de plástico de 50 mL e centrifugado (3000 rpm, 10 min) para promover a deposição das partículas poliméricas e a separação de fases. A fase oleosa foi aspirada para um kitasato, utilizando um sistema de vácuo, e rejeitada. As partículas depositadas foram ressuspensas em novo meio de lavagem e transferidas para um copo de precipitação para serem sujeitas a agitação orbital (100 rpm, 10 min). Em seguida, as partículas poliméricas foram novamente centrifugadas e o processo foi repetido até eliminação completa do óleo. A cada ciclo de adição da solução de lavagem seguida de centrifugação dá-se o nome de ciclo de lavagem. As partículas poliméricas foram liofilizadas a 0°C durante 48 h (Lyph-Lock 6, Labconco, Kansas City, MS, EUA), após congelamento da suspensão de partículas poliméricas a -50°C num banho de etanol a 96% (V/V) (Benchtop Shell Freezer, Freezone[®] modelo 79490, Labconco).

Os parâmetros estudados incluíram a velocidade de agitação (400 a 1800 rpm), tempo de sonicação do sal carbonato de cálcio, diâmetro da hélice utilizada, tipo de óleo, concentração de agente emulsivo (0 a 2,0%, V/V), concentração de alginato (1,5 e 2,0%,

m/V) e razão A/O (30/70 e 50/50, V/V). O estudo foi sequencial, sendo que a adoção de um novo parâmetro a estudar foi realizada com base nos melhores resultados anteriores obtidos, no que respeita exclusivamente à granulometria das partículas.

Numa segunda fase, mais especificamente, no estudo da melhor estratégia de recuperação das partículas poliméricas, o protocolo de preparação sofreu algumas alterações de acordo com os resultados anteriores obtidos na fase da preparação das partículas. Para além das partículas poliméricas vazias, foram também preparadas partículas contendo insulina. Neste último caso, foram realizados os mesmos passos do protocolo base, com excepção da incorporação de 10 mL de uma solução de insulina a 100 UI/mL na solução de alginato (já dissolvido o alginato) e do protocolo de recuperação das partículas poliméricas. O passo da degaseificação da solução de alginato foi igualmente realizado (1 h em repouso), mas após a mistura da insulina com a solução de alginato. Os vários protocolos de recuperação estudados encontram-se descritos na Tabela II-1.

Tabela II-1. Composição do primeiro meio de lavagem utilizado no processo de recuperação das partículas poliméricas. Em todos os protocolos foi utilizado um volume total de 100 mL.

Protocolo de recuperação	Composição	% (V/V)
A	Tampão acetato de pH 4,5	100
B1	Acetona e tampão acetato de pH 4,5	40: 60
B2	Acetona, isopropanol, Tween [®] 80 a 1% (V/V) e tampão acetato de pH 4,5	30: 10: 1: 59
B3	Acetona, isopropanol, n-hexano e tampão acetato de pH 4,5	15: 10: 5: 70
B4	Acetona, isopropanol, éter petróleo e tampão acetato de pH 4,5	15: 10: 5: 70
C	Tampão acetato de pH 4,5 contendo cloreto de cálcio a 50 mM e Tween [®] 80 a 1% (V/V)	99:1

No protocolo de recuperação A, as partículas recém-formadas e dispersas na fase oleosa foram recuperadas após adição de 100 mL de tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII).

Antes da adição do meio de lavagem ao reactor, a velocidade de agitação foi reduzida para 200 rpm e o contacto com o meio de lavagem foi permitido a esta velocidade durante 2-5 min. Após este período, o conteúdo do reactor foi vertido para um copo de precipitação de capacidade de 600 mL e conservado a 4°C. Decorridas 24 h, o conteúdo do copo de precipitação foi dividido para tubos de plástico de 50 mL e centrifugado recorrendo a três distintas velocidades de centrifugação (12.500, 55.000 e 80.000 $\times g$, 30 min). A fase oleosa foi aspirada para um kitasato, utilizando um sistema de vácuo, e rejeitada. As partículas depositadas foram ressuspensas em novo meio de lavagem (50 mL de tampão acetato de pH 4,5) e transferidas para um copo de precipitação para serem sujeitas a agitação orbital (100 rpm, 10 min). Em seguida, as partículas poliméricas foram novamente centrifugadas e o processo foi repetido o número de vezes necessário até eliminação completa do óleo.

Nos protocolos B e C, o procedimento de recuperação foi semelhante ao anterior, à excepção da composição do primeiro meio de lavagem (Tabela II-1). Nestes casos, a força centrífuga foi fixa a 12.500 $\times g$ durante 30 min para todos os ciclos de lavagem. As restantes lavagens decorreram, tal como descrito para o protocolo A, utilizando apenas o tampão acetato de pH 4,5 como meio de lavagem (Tabela II-1).

Em todos os protocolos, depois de recuperadas, as partículas poliméricas foram liofilizadas a 0°C durante 48 h recorrendo ao equipamento descrito anteriormente.

2.3. Caracterização granulométrica das partículas de alginato

A distribuição granulométrica das partículas de alginato foi determinada por difracção laser (modelo de Fraunhofer) em tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII). O aparelho utilizado (Coulter LS130, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EUA) determina a distribuição de tamanhos entre 0,1 e 1000 μm . A distribuição granulométrica das partículas foi apresentada em número.

A polidispersividade foi determinada pelo factor SPAN (Liu *et al.*, 2002a) expresso por:

$$SPAN = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$

Equação II-3

em que D_{90} , D_{10} e D_{50} são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das partículas de alginato totais. Um valor elevado de factor SPAN indica uma elevada polidispersividade.

2.4. Monitorização da presença do óleo residual

Durante o processo de recuperação, foram recolhidas alíquotas da suspensão de partículas poliméricas após recuperação e observadas por microscopia óptica. O microscópio óptico (Olympus BH2-UMA), equipado com um analisador de imagem Cue-2 (Olympus, Tokyo, Japão), permitiu monitorizar a presença de óleo no meio de suspensão das partículas poliméricas. A eficácia dos protocolos de recuperação (A, B e C) foi avaliada pelo número de ciclos de lavagem necessários para assegurar a eliminação completa de óleo.

2.5. Caracterização morfológica das partículas de alginato

A morfologia das partículas recuperadas pelos diferentes protocolos de recuperação (A, B e C) foi avaliada por microscopia electrónica de varrimento (SEM). O microscópio utilizado foi o modelo JEOL-JSM-840 (Tokyo, Japão), utilizando um potencial eléctrico de excitação de 10 kV. As amostras foram fixas a suportes metálicos, através de fita adesiva de dupla face, secas ao ar e revestidas com ouro, sob vácuo, de modo a tornarem-se electricamente condutoras.

2.6. Rendimento de recuperação (RR) das partículas de alginato

O RR foi calculado segundo a Equação II-4 que relaciona a quantidade de partículas liofilizadas recuperadas e a massa inicial dos componentes sólidos, incluindo alginato, insulina e carbonato de cálcio.

$$RR (\%) = \frac{\text{Massa das partículas liofilizadas}}{\text{Massa inicial de sólidos}} \times 100 \quad \text{Equação II-4}$$

2.7. Determinação do teor e da eficiência de encapsulação (EE) da insulina

Uma quantidade de partículas de alginato liofilizadas (10 mg) foi incubada em 10 mL de tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXVIII) sob agitação magnética (100 rpm, 2 h). De seguida, a suspensão foi centrifugada (12.500 × g, 10 min) e as partículas poliméricas depositadas foram transferidas para 10 mL de tampão fosfato de pH 6,8 (USP XXVIII) e submetidas a agitação magnética (100 rpm, 1 h) até dissolução completa. A quantidade de insulina libertada no sobrenadante, após as incubações em tampão de pH 1,2 e 6,8, foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce, Pittsburgh, EUA), utilizando um comprimento de onda de 595 nm. A explicação do método espectrofotométrico encontra-se descrita no Anexo I. O teor (%) e a EE (%) da insulina foram calculados com base na Equação II-5 e na Equação II-6, respectivamente.

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\text{Quantidade de insulina (mg) em 10 mg de partículas}}{10 \text{ mg de partículas}} \times 100 \quad \text{Equação II-5}$$

$$EE (\%) = \frac{\text{Insulina libertada (\mu g) em 10 mg de partículas}^*}{\text{Insulina teórica (\mu g) em 10 mg de partículas}} \times 100 \quad \text{Equação II-6}$$

* Insulina libertada após incubação a pH 1,2 e pH 6,8.

2.8. Perfil de libertação *in vitro*

No sentido de caracterizar o comportamento de insulina encapsulada em partículas de alginato em condições que simulam o gradiente de pH no TGI, uma quantidade partículas de alginato contendo insulina (10 mg) foi incubada em 10 mL de tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXVIII), sob agitação magnética (100 rpm, 2 h) numa placa de agitação magnética com múltiplos focos (Variomag[®] Telesystem, H+P Labortechnik AG, Oberschleissheim, Alemanha). Ao fim desse período, procedeu-se a uma centrifugação (12.500 × g, 10 min) e aspiração do sobrenadante. As partículas poliméricas foram transferidas para 10 mL de tampão fosfato de pH 6,8 (USP XXVIII) e submetidas a agitação magnética (100 rpm, 1 h). Foram recolhidas alíquotas de ambos os meios a tempos pré-determinados. O volume dos meios foi constante, uma vez que as amostras recolhidas foram substituídas pelo mesmo volume em tampão fresco. A quantidade de insulina nessas amostras foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Bradford e a libertação cumulativa de insulina foi calculada de acordo com a Equação II-7, onde C_n é a concentração da amostra ao tempo n (T_n) sendo V o volume total do meio de incubação, V_i o volume recolhido ao tempo i (T_i) e C_i a concentração da amostra ao T_i (V_o e C_o são iguais a zero). Os ensaios foram realizados em triplicado. As partículas vazias foram submetidas às mesmas condições e serviram como controlos negativos.

$$\text{Insulina libertada (\%)} = \frac{\left(C_n \times V + V_i \sum_{T_i=0}^{T_{n-1}} C_i \right)}{\text{Massa das partículas no ensaio} \times \text{Teor}} \times 100 \quad \text{Equação II-7}$$

2.9. Estabilidade físico-química da insulina após preparação e recuperação das partículas de alginato

2.9.1. HPLC-UV e HPLC-MS

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, *High performance liquid chromatography*) é um método sensível e capaz de detectar clivagens de ligações peptídicas.

Com o objectivo de analisar transformações ao nível da estrutura da molécula de insulina através da formação de produtos de degradação de baixo PM (fragmentos proteicos) ou os produtos de degradação de elevado PM, recorreu-se a dois métodos de HPLC: HPLC-UV ou HPLC-MS. No primeiro caso, foi utilizado um sistema de HPLC (modelo HP1100, Hewlett Packard, Waldbronn, Alemanha) equipado com um injector automático (Agilent série 1100, Waldbronn, Alemanha) com uma coluna de fase reversa X-Terra C18 (5 μ m, 250 mm \times 4,6 mm; Waters Corporation, Milford, MA, EUA) acoplado com uma pré-coluna (Purospher STAR RP-18, 5 μ m, 4 \times 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel A consistiu em água, contendo ácido trifluoroacético (TFA) a 0,04% (V/V), e a fase móvel B em acetonitrilo, contendo TFA a 0,04% (V/V). Aplicou-se um gradiente linear de 30 a 40% de B durante 5 min com um fluxo de 1,2 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μ L e a análise foi efectuada a 27°C. O tempo de retenção da insulina foi de 4,8 min num tempo total de análise igual a 12 min. A validação do método de HPLC encontra-se descrita no Anexo II. As amostras contendo insulina para análise por HPLC foram preparadas após dissolução da matriz de alginato em tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM, sob agitação magnética 100 rpm (ver Anexo II).

As amostras analisadas por HPLC-UV foram ainda sujeitas a uma análise por HPLC-MS, recorrendo a um sistema Surveyor equipado com um desgaseificador, bomba quaternária, injector automático e forno para a coluna (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) e um detector de díodo (LCQ Advantage, ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA). A coluna necessária para a separação da insulina foi uma coluna de fase reversa X-Terra MS C18 (5 μ m, 250 mm \times 2,1 mm; Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Aplicou-se um gradiente linear de 30 a 50% de B (acetonitrilo com 0,04% de TFA, V/V) no solvente A (água bidestilada com 0,04% de TFA, V/V) durante 5 min com um fluxo de 1,2 mL/min. O tempo de análise foi de 12 min. A análise foi efectuada a 27°C e os resultados analisados através do software do equipamento XCALIBUR (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA).

2.9.2. Dicroísmo circular (DC)

A estrutura secundária da insulina libertada das partículas poliméricas, obtidas através do método de emulsificação/gelificação interna e recuperadas pelos diferentes protocolos de recuperação (A, B e C), foi ainda analisada por DC. Os espectros foram obtidos com espectropolarímetro Jasco J-720 (Tokyo, Japão) equipado com um controlador de temperatura. A temperatura foi mantida constante a 25°C. O comprimento de onda utilizado esteve compreendido entre 200 e 260 nm. A célula apresentava a dimensão de 0,1 cm. A resolução utilizada foi de 0,2 nm e a velocidade de varrimento de 50 nm min⁻¹, com um tempo de resposta de 4 s. Cada espectro representa a média de três análises consecutivas. A eliminação do ruído, subtração do branco e a análise de dados foram realizados utilizando o software do equipamento (Jasco, Tokyo, Japão). As amostras contendo insulina e para análise DC foram obtidas após a sua dissolução das partículas de alginato em tampão PBS, do inglês *phosphate buffer saline*, preparado segundo a USP XXVIII. As concentrações de insulina de todas as amostras a analisar foram normalizadas para 10 µM e comparadas com igual concentração de insulina não encapsulada.

2.10. Análise estatística

Cada valor é apresentado como a média ± D.P.. As diferenças estatísticas foram avaliadas por análise da variância (ANOVA), seguida de um pós-teste Student-Newman-Keuls recorrendo a análise estatística do programa Sigma Stat (versão 2.03; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para um valor de *P* inferior a 0,05, considerou-se que a diferença era significativa.

3. RESULTADOS

3.1. Processo de produção: influência dos parâmetros de processo e formulação na granulometria das partículas de alginato

3.1.1. Velocidade de agitação

As partículas de alginato produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna foram caracterizadas em termos de distribuição granulométrica através de difracção laser. Nesta fase, o protocolo base foi mantido, tal como descrito anteriormente na Secção 2.2., com excepção da velocidade de agitação que variou entre 400 e 1800 rpm. O aumento da velocidade de agitação durante a formação da emulsão influenciou significativamente a distribuição granulométrica das partículas obtidas (Figura II-3), especialmente quando a velocidade de agitação durante a emulsificação aumentou de 400 para 800 rpm. A 400 rpm, cerca de 90% das partículas apresentavam um diâmetro médio, em número, de 85 μm e, este parâmetro diminuiu para 14 μm com uma velocidade de agitação de 800 rpm. A distribuição granulométrica voltou a sofrer uma nova alteração quando a velocidade de agitação aumentou para 1400 rpm, tendo sido observada uma diminuição significativa na granulometria das partículas. A distribuição granulométrica foi unimodal em todas as formulações. Contudo, a curva da distribuição granulométrica relativa à velocidade de agitação a 1400 rpm revelou alguma assimetria. As curvas da distribuição granulométrica mais estreitas e com menor granulometria foram obtidas com as velocidades de agitação a 1600 e 1800 rpm. Contudo, a velocidade de 1800 rpm não apresentou aplicabilidade prática, uma vez que a elevada força de dispersão causou a projecção da emulsão contra as paredes do reactor e, inclusive, para o exterior do reactor, tornando incompatível a sua aplicação ao equipamento disponível.

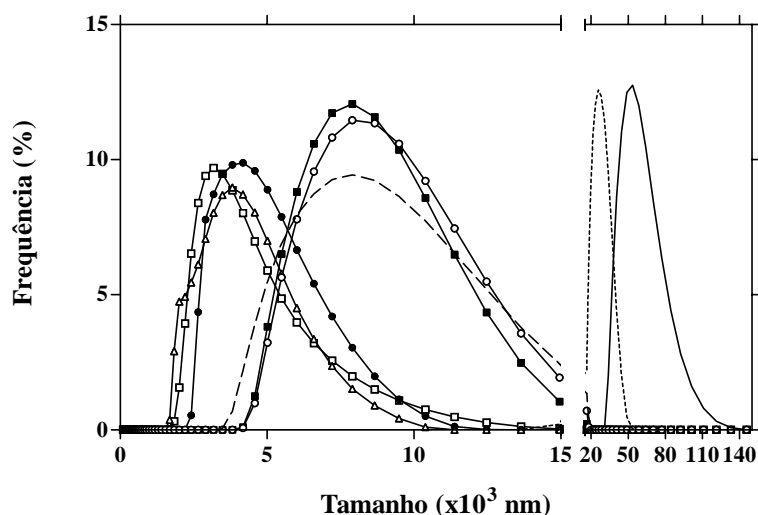


Figura II-3. Distribuição granulométrica, expressa em número, das partículas obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, recorrendo a velocidade de agitação de: 400 (—), 600 (---), 800 (—), 1000 (—○—), 1200 (—■—), 1400 (—△—), 1600 (—●—) e 1800 rpm (—□—).

No que respeita à análise granulométrica e à polidispersividade das partículas de alginato, os resultados encontram-se descritos na Tabela II-2. Verificou-se que, à medida que a granulometria diminuiu, a polidispersividade aumentou. O melhor compromisso entre os dois parâmetros de avaliação foi obtido com a velocidade de agitação a 1600 rpm.

Tabela II-2. Influência da velocidade de agitação na distribuição granulométrica, expressa em número, das partículas de alginato.

Velocidade de agitação (rpm)	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
400	44,60 × 10 ³	58,61 × 10 ³	84,36 × 10 ³	0,68
600	19,65 × 10 ³	28,29 × 10 ³	40,72 × 10 ³	0,74
800	5,49 × 10 ³	8,66 × 10 ³	13,65 × 10 ³	0,94
1000	6,02 × 10 ³	8,66 × 10 ³	13,65 × 10 ³	0,88
1200	6,02 × 10 ³	8,66 × 10 ³	12,47 × 10 ³	0,74
1400	2,42 × 10 ³	3,82 × 10 ³	6,59 × 10 ³	1,09
1600	3,18 × 10 ³	4,58 × 10 ³	7,22 × 10 ³	0,88
1800	2,65 × 10 ³	3,82 × 10 ³	7,22 × 10 ³	1,20

3.1.2. Diâmetro da hélice

O protocolo base de preparação das partículas de alginato manteve-se constante em todos os parâmetros de processo e de formulação à excepção do diâmetro da hélice marinha (Figura II-2) e da velocidade de agitação. Neste último caso, a velocidade de agitação adoptada foi baseada nos resultados granulométricos anteriores, tendo sido seleccionada a velocidade de agitação a 1600 rpm.

No que respeita ao diâmetro da hélice, o valor inicial no protocolo base foi de 4 cm, tendo sido avaliado o efeito do aumento do diâmetro para 5,2 cm. A distribuição granulométrica das partículas obtidas com a nova hélice encontra-se representada na Figura II-4. A utilização de uma hélice com um diâmetro de 5,2 cm conduziu a uma menor granulometria. Em relação à polidispersividade (Tabela II-3), as partículas de alginato preparadas com uma hélice com diâmetro de 5,2 cm apresentaram um factor de SPAN ligeiramente superior ao obtido com a hélice marinha de três lâminas com diâmetro de 4 cm.

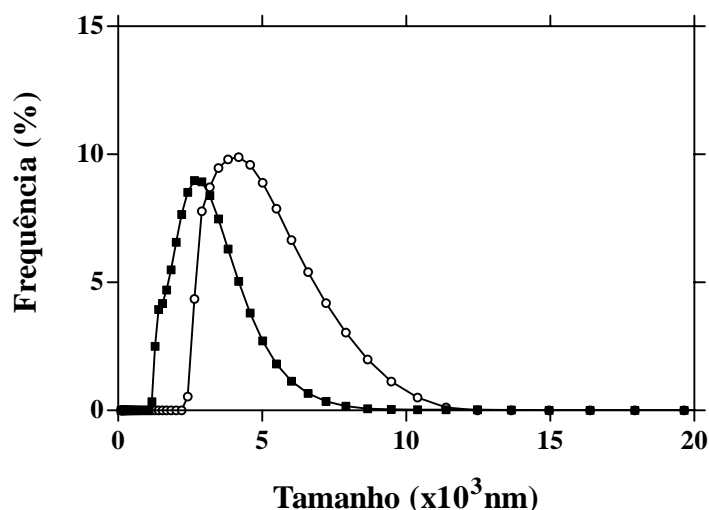


Figura II-4. Distribuição granulométrica, expressa em número, das partículas de alginato obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, recorrendo a uma hélice marinha de três lâminas com 4 (—○—) e 5,2 cm de diâmetro (—■—).

Tabela II-3. Influência do diâmetro da hélice marinha utilizada no método de emulsificação/gelificação interna nas características granulométricas, expressas em número, das partículas de alginato.

Diâmetro da hélice (cm)	D₁₀ (nm)	D₅₀ (nm)	D₉₀ (nm)	Factor SPAN
4,0	$3,18 \times 10^3$	$4,58 \times 10^3$	$7,22 \times 10^3$	0,88
5,2	$1,68 \times 10^3$	$2,91 \times 10^3$	$4,58 \times 10^3$	0,99

3.1.3. Tipo de óleo

O protocolo base de preparação das partículas de alginato manteve-se constante em todos os parâmetros de processo e de formulação, à excepção do tipo de óleo, do diâmetro da hélice marinha (diâmetro 5,2 cm) e da velocidade de agitação (1600 rpm). Em alternativa à parafina líquida descrita no protocolo base foi utilizado o óleo de amêndoas doces.

A distribuição granulométrica foi muito diferente para os dois tipos de óleos (Figura II-5). As partículas de alginato preparadas com óleo de parafina apresentaram uma granulometria inferior às partículas de alginato preparadas com o óleo de amêndoas doces. Em relação à polidispersividade, o valor do factor SPAN mais baixo foi observado com o óleo de amêndoas doces (Tabela II-4).

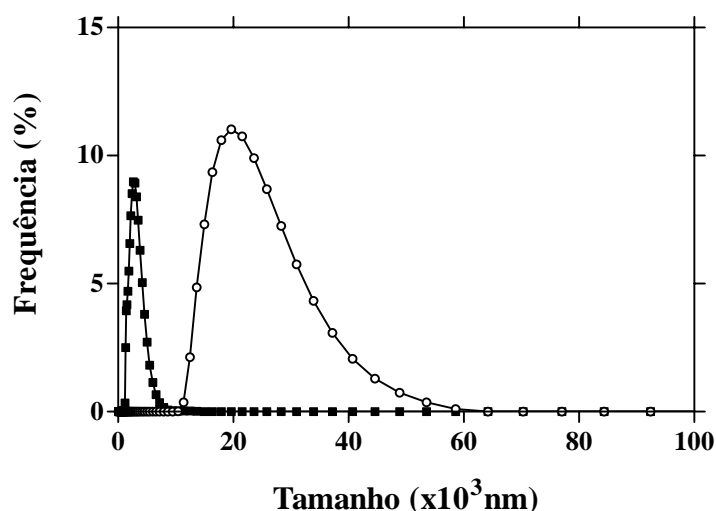


Figura II-5. Distribuição granulométrica, expressa em número, das partículas obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, utilizando o óleo de amêndoas doces (—○—) e óleo de parafina (—■—).

Tabela II-4. Influência do tipo de óleo utilizado no método de emulsificação/gelificação interna nas características granulométricas, expressas em número, das partículas de alginato.

Tipo de óleo	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
Parafina	$1,68 \times 10^3$	$2,91 \times 10^3$	$4,58 \times 10^3$	0,99
Amêndoas doces	$16,38 \times 10^3$	$23,58 \times 10^3$	$37,17 \times 10^3$	0,88

3.1.4. Tempo de sonicação do carbonato de cálcio

Para avaliação do tempo de sonicação do carbonato de cálcio, o protocolo base de preparação das partículas de alginato manteve-se constante em todos os parâmetros de processo e de formulação à exceção do tempo de sonicação do carbonato de cálcio, que constitui o alvo de estudo desta fase, e dos parâmetros estudados e seleccionados em fase anteriores, nomeadamente a velocidade de agitação (1600 rpm), o diâmetro da hélice marinha (diâmetro de 5,2 cm) e o tipo de óleo (óleo de parafina).

A Figura II-6 mostra que o tempo de sonicação do carbonato de cálcio influenciou a distribuição granulométrica das partículas de alginato, sendo que a menor granulometria foi alcançada com o tempo de 30 min. No que respeita à polidispersividade, a Tabela II-5

demonstra que as partículas preparadas com o tempo de sonicação de 30 min apresentaram um factor SPAN ligeiramente inferior.

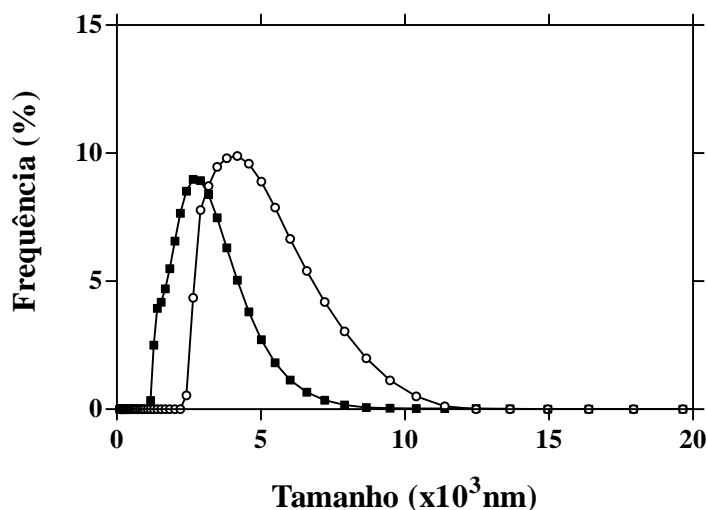


Figura II-6. Distribuição granulométrica, expressa em número, das partículas obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, recorrendo a dois tempos de sonicação do carbonato de cálcio: 10 (—○—) e 30 min (—■—).

Tabela II-5. Influência do tempo de sonicação do carbonato de cálcio nas características granulométricas, expressas em número, das partículas de alginato.

Tempo de sonicação do carbonato de cálcio (min)	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
10	1,68 × 10 ³	2,91 × 10 ³	4,58 × 10 ³	0,99
30	1,68 × 10 ³	2,02 × 10 ³	3,58 × 10 ³	0,94

3.1.5. Concentração do agente emulsivo

Para avaliação da concentração do agente emulsivo, o protocolo base de preparação das partículas de alginato manteve-se constante em todos os parâmetros de processo e de formulação, à excepção da concentração do agente emulsivo, Span[®] 80 e dos parâmetros seleccionados anteriormente, especificamente a velocidade de agitação (1600 rpm), o diâmetro da hélice marinha (diâmetro de 5,2 cm), o tipo de óleo (óleo de parafina) e o tempo de sonicação do carbonato de cálcio (30 min).

A granulometria diminuiu com o aumento da concentração de agente emulsivo até 1,5% (V/V) (Figura II-7). Acima de 1,5% (V/V), a granulometria começou novamente a aumentar. A granulometria e a polidispersividade (Tabela II-6) das partículas preparadas com concentrações de Span[®] 80 a 1,5 e 1% (V/V) foram muito semelhantes, embora a formulação com a concentração do agente emulsivo a 1,5% (V/V) tenha apresentado uma granulometria e polidispersividade relativamente inferior.

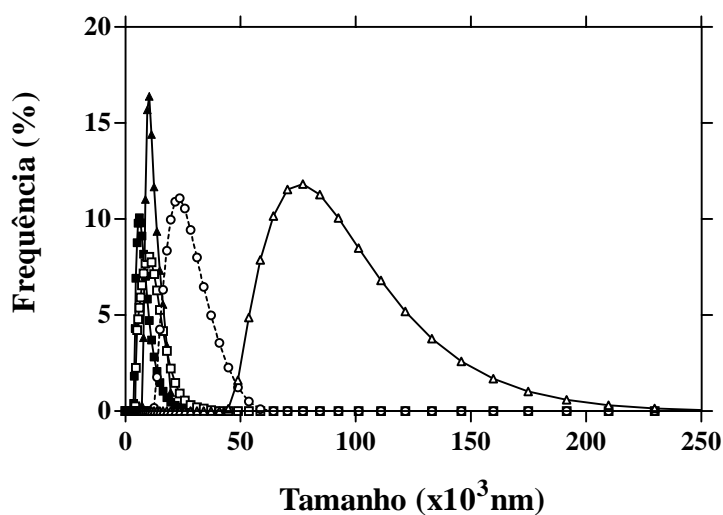


Figura II-7. Distribuição granulométrica das partículas obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, sem recorrer ao agente emulsivo (—△—) e recorrendo ao Span[®] 80 a: 0,5% (---○---), 1,0% (—□—), 1,5% (—■—) e 2,0% (—▲—) (V/V).

Tabela II-6. Influência da concentração do agente emulsivo nas características granulométricas, expressas em número, das partículas de alginato.

Span [®] 80 (% V/V)	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
--	64,20 × 10 ³	84,36 × 10 ³	133,00 × 10 ³	0,82
0,5	3,49 × 10 ³	5,02 × 10 ³	7,91 × 10 ³	0,88
1,0	1,17 × 10 ³	2,02 × 10 ³	3,49 × 10 ³	1,15
1,5	974	1,40 × 10 ³	2,42 × 10 ³	1,03
2,0	1,84 × 10 ³	2,21 × 10 ³	3,18 × 10 ³	0,61

3.1.6. Concentração de alginato

Para a avaliação da concentração de alginato, o protocolo base de preparação das partículas de alginato manteve-se constante em todos os parâmetros de processo e de formulação, à excepção da concentração de alginato, que variou entre 1,5 e 2% (m/V), e dos parâmetros seleccionados previamente.

A distribuição granulométrica sofreu uma ligeira alteração com a diminuição da concentração de alginato 2% para 1,5% (m/V) (Figura II-8). A distribuição granulométrica com esta última concentração de alginato foi polimodal, contrariamente ao que aconteceu com a concentração de alginato a 2% (m/V) (Tabela II-7).

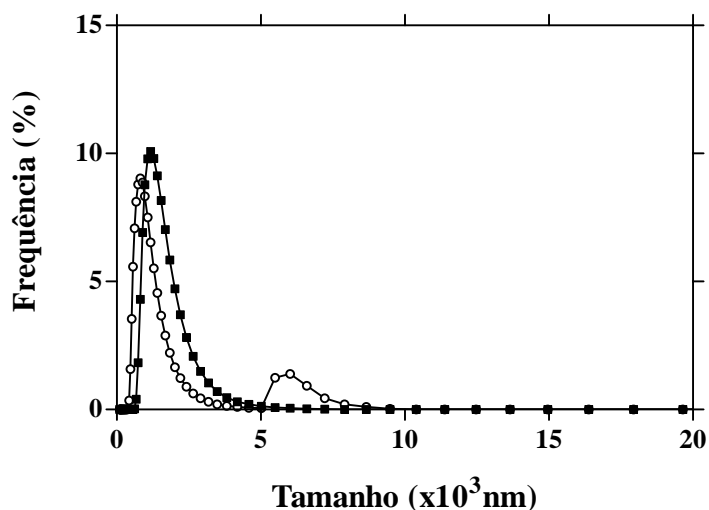


Figura II-8. Distribuição granulométrica das partículas obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, recorrendo a uma concentração de alginato de: 1,5 (—○—) e 2,0% (—■—) (m/V).

Tabela II-7. Influência da concentração do alginato nas características granulométricas, expressas em número, das partículas de alginato obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna.

Alginato (% m/V)	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
1,5	618	$1,07 \times 10^3$	$3,21 \times 10^3$	2,42
2,0	974	$1,40 \times 10^3$	$2,42 \times 10^3$	1,03

3.1.7. Razão A/O

Para avaliação da razão A/O, o protocolo base de preparação das partículas de alginato manteve-se constante em todos os parâmetros de processo e de formulação à exceção da razão A/O, que constitui alvo de estudo nesta fase, e dos parâmetros seleccionados nas fases anteriores.

Relativamente aos resultados obtidos, a Figura II-9 mostra que a granulometria das partículas de alginato diminuiu com o aumento da razão A/O de 30/70 para 50/50 (V/V), apesar do factor SPAN ter sido igual entre as duas razões utilizadas (Tabela II-8).

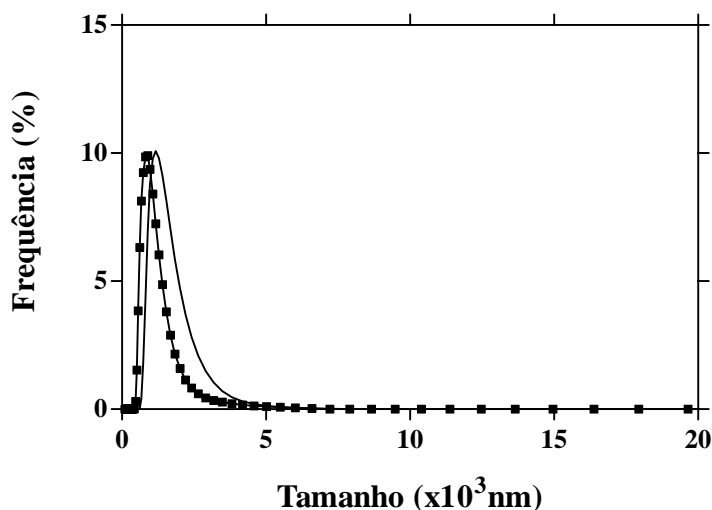


Figura II-9. Distribuição granulométrica das partículas obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, utilizando uma razão A/O de: 30/70 (—) e 50/50 (—■—) (V/V).

Tabela II-8. Influência da razão A/O nas características granulométricas, expressas em número, das partículas de alginato obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna.

Razão A/O (V/V)	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
30/70	974	1,40 × 10 ³	2,42 × 10 ³	1,03
50/50	677	974	1,68 × 10 ³	1,03

3.2. Processo de recuperação das partículas de alginato

Ultrapassada a fase de produção de partículas de alginato, partículas vazias, a metodologia anterior foi adaptada de forma a incorporar insulina. Tal como tinha ocorrido com as partículas vazias, observou-se uma relativa dificuldade relacionada com o processo de recuperação. Verificou-se que, à medida que a granulometria das partículas diminuía, aumentava a dificuldade na recuperação das partículas. Para superar o problema foram adoptados vários protocolos de recuperação conforme o descrito na Tabela II-1.

3.2.1. Caracterização granulométrica das partículas de alginato

A granulometria das partículas foi estudada para todos os protocolos de recuperação (A, B e C) e observou-se que, para os diferentes protocolos, a curva da distribuição granulométrica foi idêntica (Figura II-10), à excepção dos protocolos A_{55.000} e A_{80.000} onde foram aplicadas forças centrífugas mais elevadas. Observou-se, ainda, que o aumento da força centrífuga resultou num ligeiro desvio da curva da distribuição granulométrica. Relativamente à análise granulométrica e da polidispersividade, todos os protocolos de recuperação apresentaram valores muito semelhantes entre si.

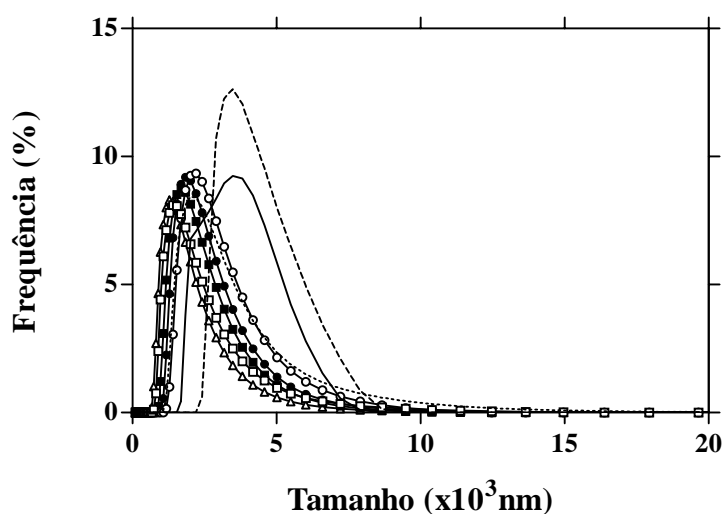


Figura II-10. Distribuição granulométrica das partículas obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, recorrendo aos protocolos de recuperação: A_{12.500} (---), A_{55.000} (—), A_{80.000} (—), B1 (-□-), B2 (-○-), B3 (-■-), B4 (-●-) e C (-Δ-).

3.2.2. Monitorização da presença do óleo residual

A eficácia de recuperação dos diferentes protocolos foi avaliada através da sua capacidade de eliminação do óleo residual (Figura II-11). A presença de óleo na suspensão de partículas foi monitorizada por microscopia óptica ao longo dos vários ciclos de lavagem.

O número de ciclos de lavagem variou para os diferentes protocolos. O protocolo de recuperação A necessitou de 7 a 9 ciclos de lavagem, consoante a força centrífuga utilizada, sendo que a força centrífuga mais elevada ($80.000 \times g$) foi a que requereu um menor número de ciclos de lavagem. Observou-se, ainda, que ciclos de lavagem adicionais não apresentaram qualquer benefício tecnológico devido à diminuição do rendimento de recuperação. O número de ciclos de lavagem para o protocolo de recuperação B foi inferior ao protocolo de recuperação anterior. Para obter resultados idênticos de eficácia de lavagem, o número de ciclos de lavagem variou para as diferentes variantes do protocolo B, designadamente 6, 5, 4 e 5, para B1, B2, B3 e B4, respectivamente. Finalmente, o protocolo de recuperação C necessitou de 9 ciclos de lavagem. Na Figura II-12 são apresentados exemplos de partículas recuperadas por dois tipos de protocolos.

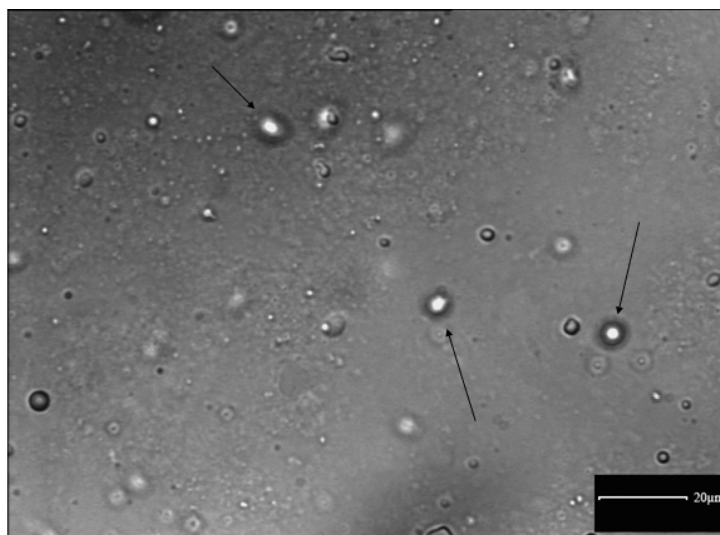


Figura II-11. Exemplo de gotículas de óleo observadas ao longo do processo de recuperação das partículas de alginato (ampliação $200 \times$).

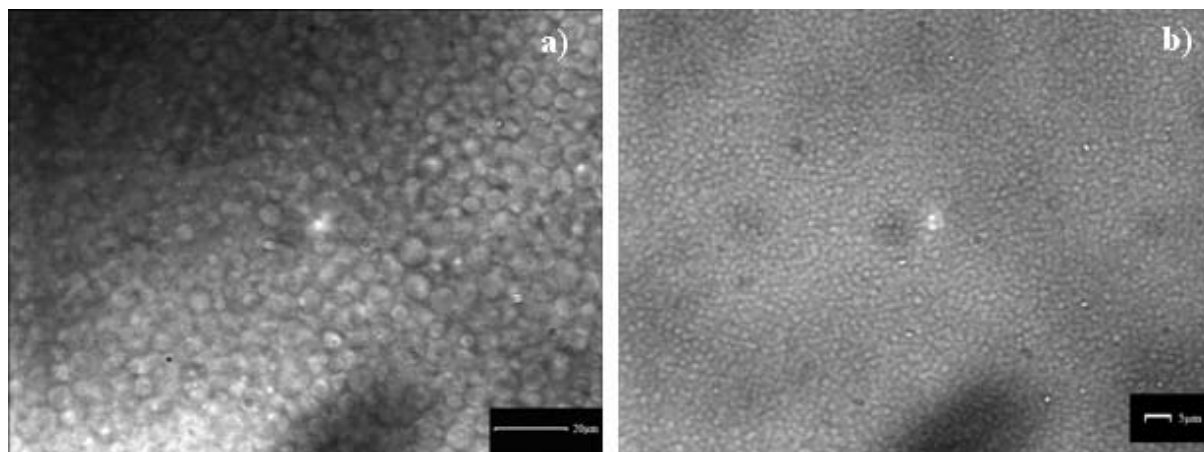


Figura II-12. Fotografia de microscopia óptica evidenciando a ausência de gotículas de óleo nas partículas de alginato recuperadas com: a) o protocolo A_{80,000} (ampliação 200 ×) e b) com o protocolo B3 (ampliação 500 ×).

3.2.3. Caracterização morfológica das partículas de alginato

A morfologia das partículas de alginato recuperadas pelos diferentes protocolos foi examinada por SEM. O uso exclusivo de tampão acetato pH 4,5, protocolo A, não alterou a forma esférica das partículas de alginato, como mostra a Figura II-13.

Os protocolos B1 e B2 provocaram uma alteração morfológica significativa, quer ao nível da forma quer ao nível da superfície das partículas poliméricas (Figura II-14). As partículas perderam a sua forma esférica e apresentaram uma superfície rugosa.

No protocolo B2 é difícil distinguir que tipo de estrutura se trata: se uma partícula disforme ou aglomerados de várias partículas de pequena dimensão. Os protocolos de recuperação B3 e B4 mantiveram a esfericidade das partículas de alginato mas provocaram alterações ao nível da superfície das partículas poliméricas (Figura II-14). Por outro lado, o protocolo de recuperação B4 conduziu à formação de aglomerados.

Por último, a aplicação do protocolo de recuperação C resultou em partículas com uma boa esfericidade e uma superfície lisa, como mostra a Figura II-15.

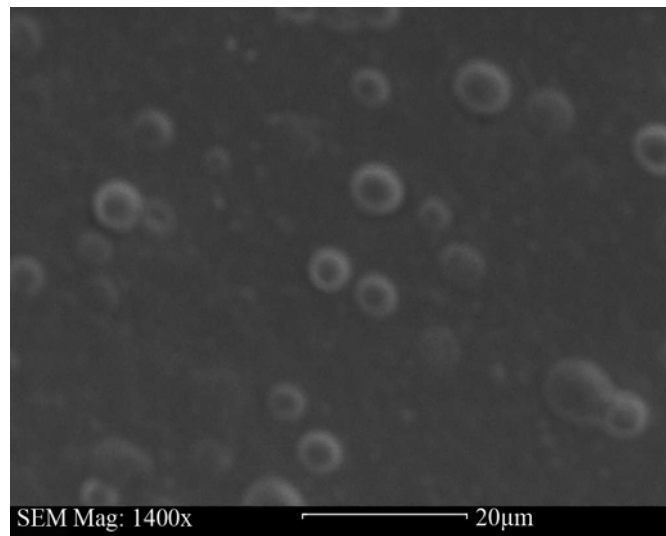


Figura II-13. Fotografia de SEM, evidenciando a morfologia das partículas de alginato recuperadas com o protocolo A (ampliação 1400 ×).

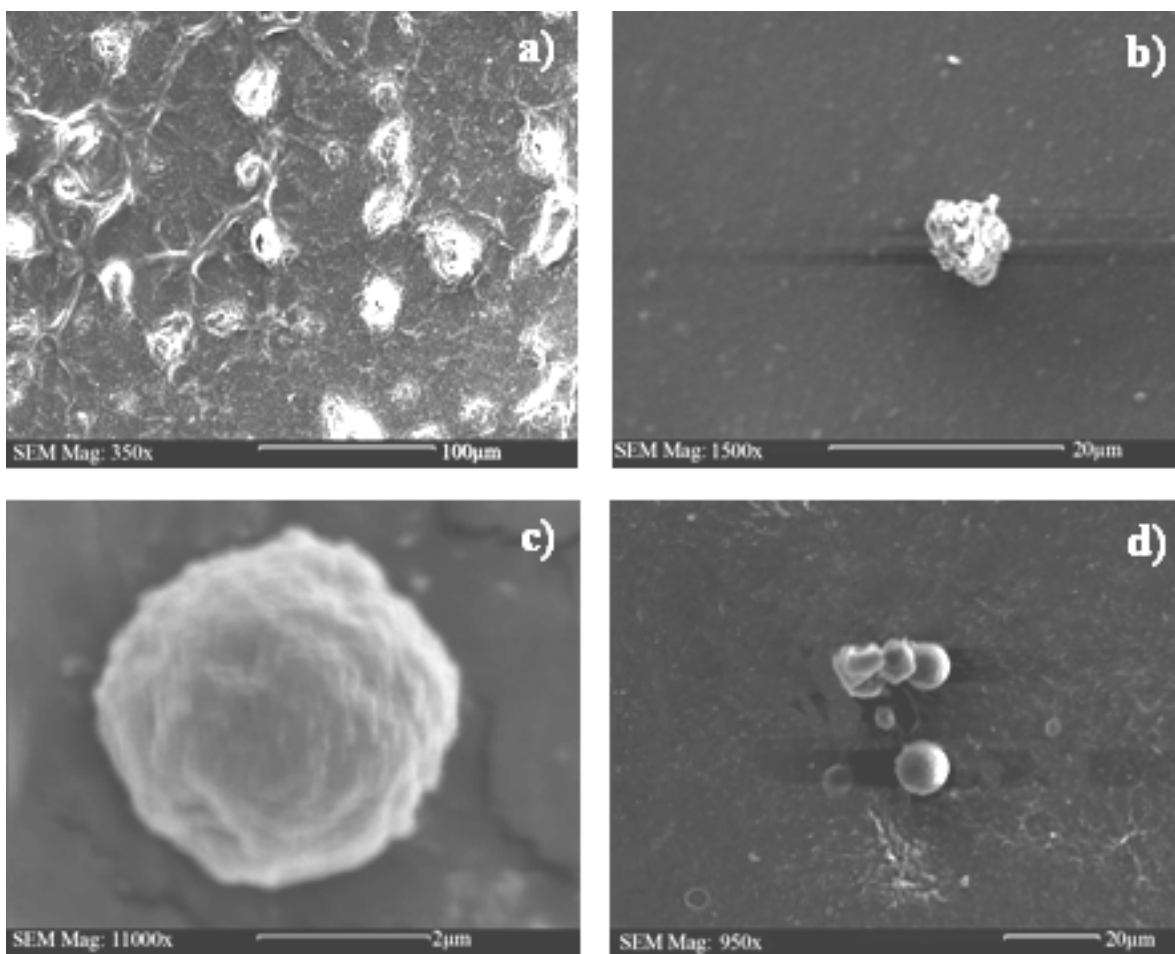


Figura II-14. Fotografias de SEM, evidenciando a morfologia das partículas de alginato recuperadas através dos protocolos: a) B1 (ampliação 350 ×), b) B2 (ampliação 1500 ×), c) B3 (ampliação 11.000 ×) e d) B4 (ampliação 950 ×).

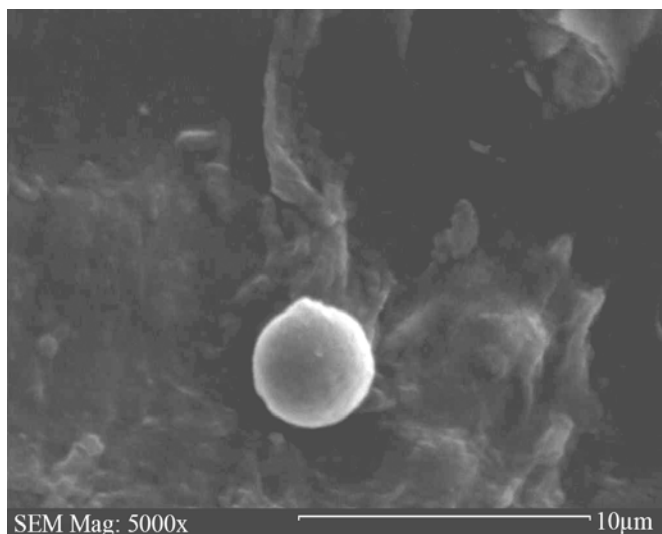


Figura II-15. Fotografia de SEM, evidenciando a morfologia das partículas de alginato recuperadas com o protocolo C (ampliação 5000 ×).

3.2.4. Rendimento de recuperação (RR) das partículas de alginato

O RR para os diferentes protocolos utilizados na recuperação das partículas de alginato foi muito variável, tal como mostra a Figura II-16. O menor RR foi observado com o protocolo de recuperação A (< 50%). Neste protocolo, observou-se uma ligeira proporcionalidade entre RR e o aumento da força centrífuga, mas sem significado estatístico. No protocolo de recuperação B, os valores de RR foram significativamente superiores (60 a 70%), comparativamente com o protocolo A ($P = 0,0011$). Finalmente, o protocolo C apresentou um RR semelhante ao protocolo A, particularmente ao do sub-grupo A_{12.500}.

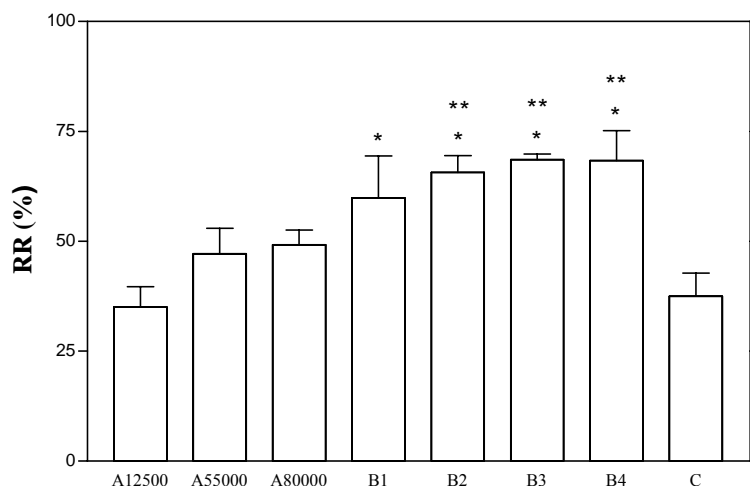


Figura II-16. RR das partículas de alginato obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, recorrendo aos diferentes protocolos de recuperação. Os dados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P.. * $P < 0,05$ por comparação com A_{12.500} e C. ** $P < 0,05$ por comparação com A_{55.000} e A_{80.000}.

3.2.5. Teor e eficiência de encapsulação (EE) da insulina

Os resultados anteriores possibilitaram a aplicação do método de emulsificação/gelificação interna à encapsulação de insulina. A força centrífuga no protocolo de recuperação A influenciou ligeiramente a EE de insulina como evidencia a Figura II-17. Os teores de insulina (%) utilizando o protocolo de recuperação A variaram entre $1,51 \pm 0,01\%$ e $2,03 \pm 0,02\%$. No protocolo de recuperação B, os valores de EE foram muito diferentes entre si, especialmente entre B3 e B2 ($P = 0,0365$). Da mesma forma, o teor de insulina nas partículas de alginato sofreu algumas modificações, tendo este variado desde $1,25 \pm 0,01\%$ a $2,74 \pm 0,04\%$. A EE e o teor de insulina, no caso do protocolo C, não foram significativamente diferentes dos valores alcançados pelo protocolo A.

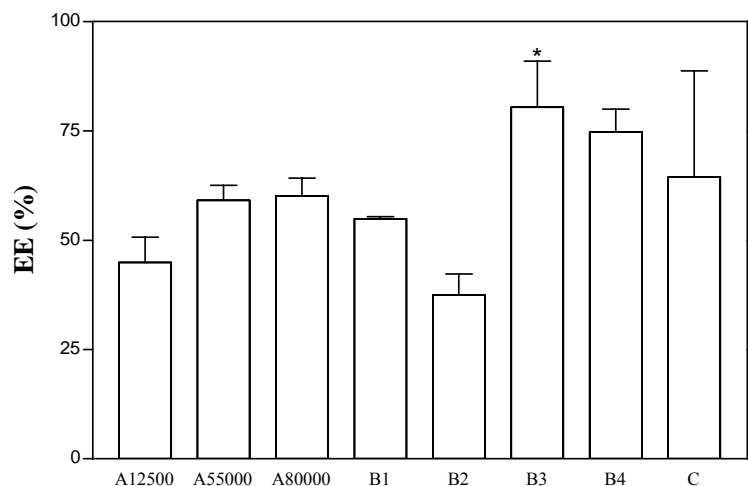


Figura II-17. EE das partículas de alginato obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna, recorrendo aos diferentes protocolos de recuperação. Os dados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P.. * $P < 0,05$ por comparação com B2.

3.2.6. Perfil de libertação *in vitro*

A Figura II-18 representa o perfil de libertação da insulina, a partir das partículas de alginato, em gradiente de pH semelhante ao do TGI. Porém, este ensaio decorreu na ausência das enzimas gástricas e intestinais. Cerca de 100 % de insulina foi instantaneamente libertada de todas as formulações ao fim de 5 min e em tampão HCl/KCl de pH 1,2, independentemente do tipo de protocolo de recuperação envolvido. Graficamente, a curva relativa à libertação de insulina foi semelhante para todas as formulações.

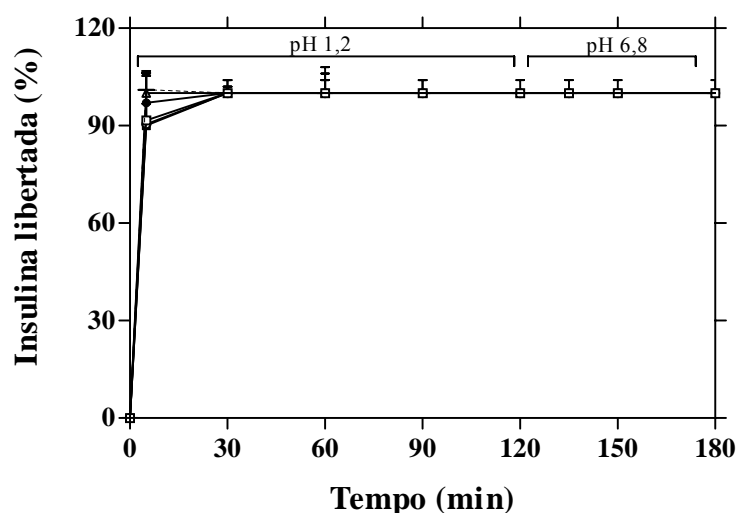


Figura II-18. Perfil de liberação *in vitro* de insulina a partir das partículas de alginato contendo insulina e obtidas através do método de emulsificação/gelificação interna, sendo protocolo A (---), B1 (—□—), B2 (—○—), B3 (—■—), B4 (—●—) e C (—△—). Cada ponto corresponde à média de 3 determinações \pm D.P..

3.2.7. Estabilidade físico-química da insulina após preparação e recuperação das partículas de alginato

A preservação da estabilidade físico-química da insulina é crucial para a sua aplicação na terapêutica da Diabetes *Mellitus*. Foram utilizadas três técnicas que, em conjunto, permitiram avaliar se a estrutura da molécula de insulina encapsulada se manteve ou não estável, após o processo de preparação, recuperação e liofilização das partículas de alginato.

3.2.7.1 HPLC-UV e HPLC-MS

Tal como descrito anteriormente, pretendeu-se observar a alteração ou a preservação estrutural da molécula de insulina. Como controlo positivo foi utilizada uma solução de insulina, preparada extemporaneamente numa mistura de tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM. Pela técnica de HPLC-UV, a solução de insulina apresentou um pico único característico da insulina, sem arrastamento e com tempo de retenção de 4,8 min, tal como mostra a Figura II-19. A insulina libertada de todas as formulações testadas apresentou um tempo de retenção idêntico ao da solução controlo.

Relativamente aos dados obtidos pela técnica de HPLC-MS, os espectros obtidos com a solução controlo de insulina e com a insulina libertada a partir das partículas de alginato revelaram uma sobreposição dos produtos resultantes da ionização da insulina, como mostra a Figura II-20. O tempo de retenção da insulina encapsulada foi muito similar ao da solução controlo de insulina.

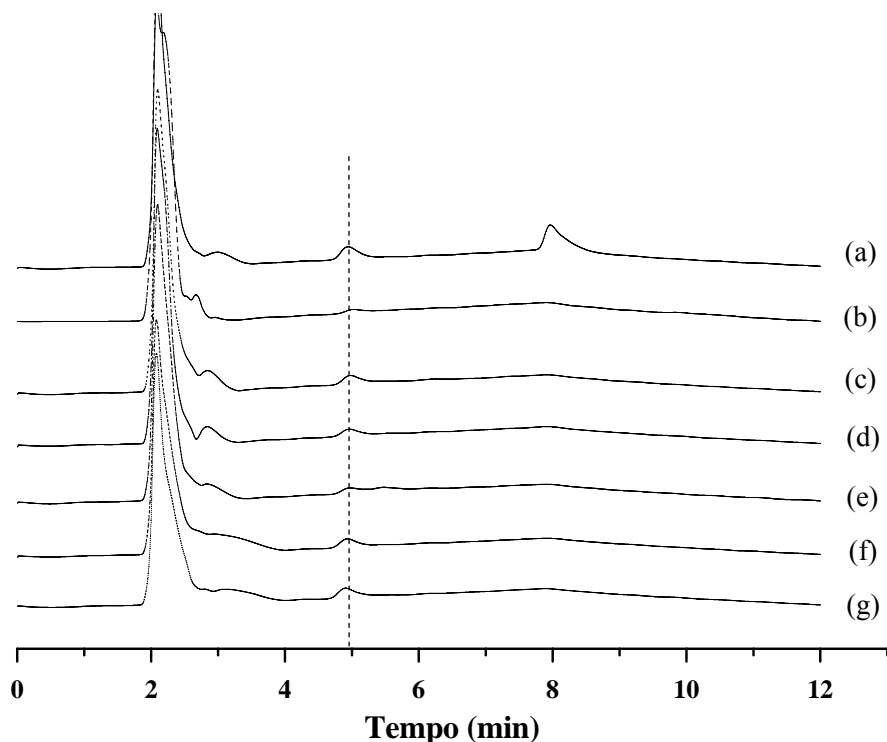


Figura II-19. Cromatogramas de HPLC-UV: a) solução controlo de insulina não encapsulada em tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM e insulina libertada a partir das partículas de alginato, recorrendo ao protocolo b) A, c) B1, d) B2, e) B3, f) B4 e g) C. O pico de insulina encontra-se assinalado a tracejado. A solução controlo de insulina não encapsulada apresentou, ainda, um pico adicional próximo dos 8 min. Este pico corresponde ao conservante: meta-cresol. Porém, este composto é eliminado durante as lavagens das nanoesferas e, por essa razão, não aparece nos cromatogramas correspondentes.

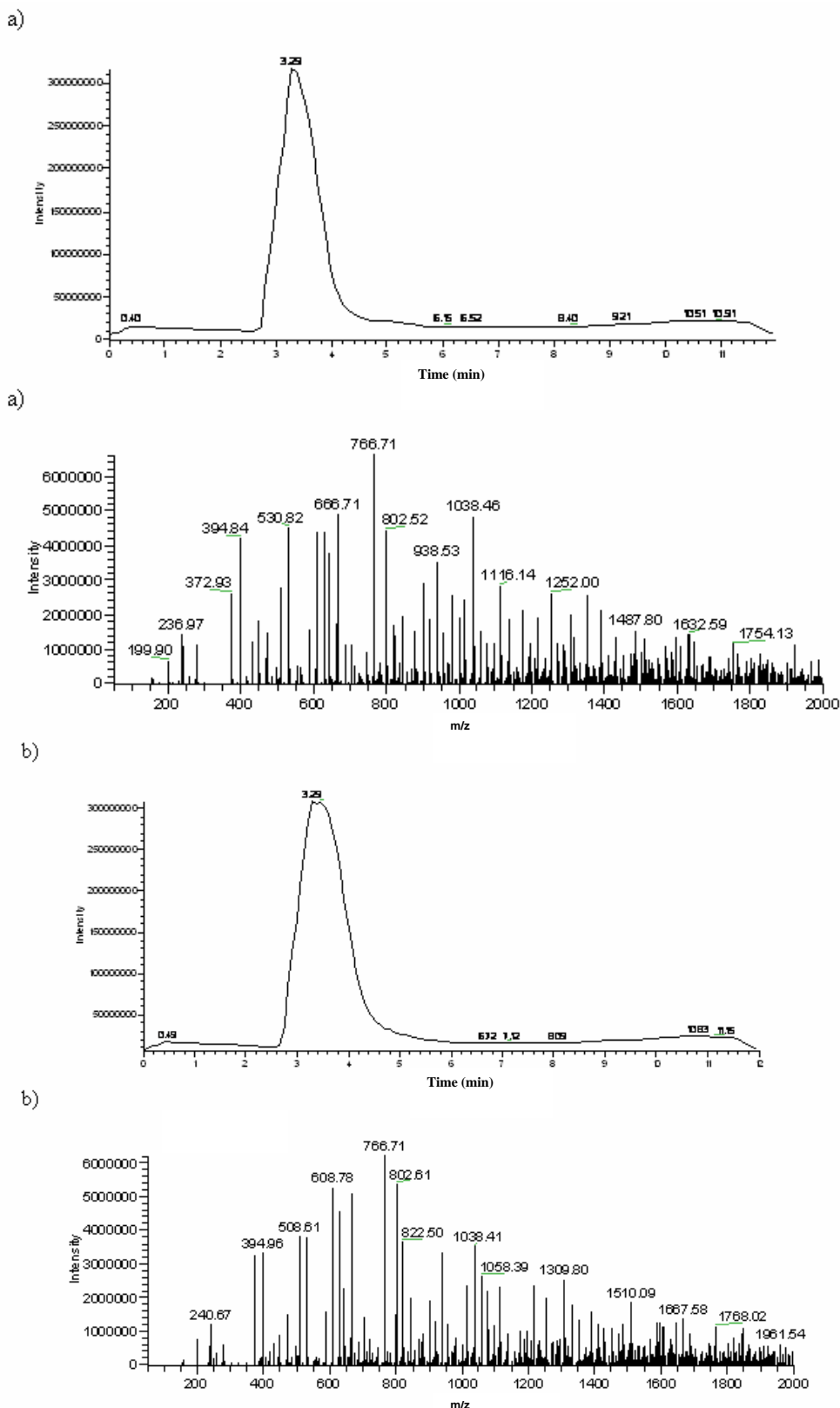


Figura II-20. Cromatogramas de HPLC-MS: a) solução controlo de insulina não encapsulada em tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM e b) um exemplo de um cromatograma de insulina libertada a partir das partículas de alginato recorrendo ao protocolo de recuperação B3. O ensaio decorreu em triplicado e com boa reprodutibilidade e, por essa razão, apenas um dos ensaios se encontra graficamente representado.

3.2.7.2 Dicroísmo circular (DC)

Os espectros obtidos por DC encontram-se representados na Figura II-21. Este ensaio foi realizado com uma solução de insulina (controlo positivo) e a insulina libertada das partículas de alginato. Especificamente, o espectro da insulina não encapsulada (controlo positivo) em PBS demonstrou a existência de dois mínimos a 209 e 224 nm. O espectro relativo ao protocolo de recuperação A apresentou um desvio significativo do pico de 209 para 212 nm e o pico de 224 para 216 nm. Os protocolos B1, B2, B4 e C originaram espectros muito semelhantes ao espectro da insulina controlo mas, nestes casos, o pico mínimo a 224 nm apresentou-se atenuado. O espectro de insulina relativo ao protocolo B3 foi sobreponível ao espectro da insulina controlo.

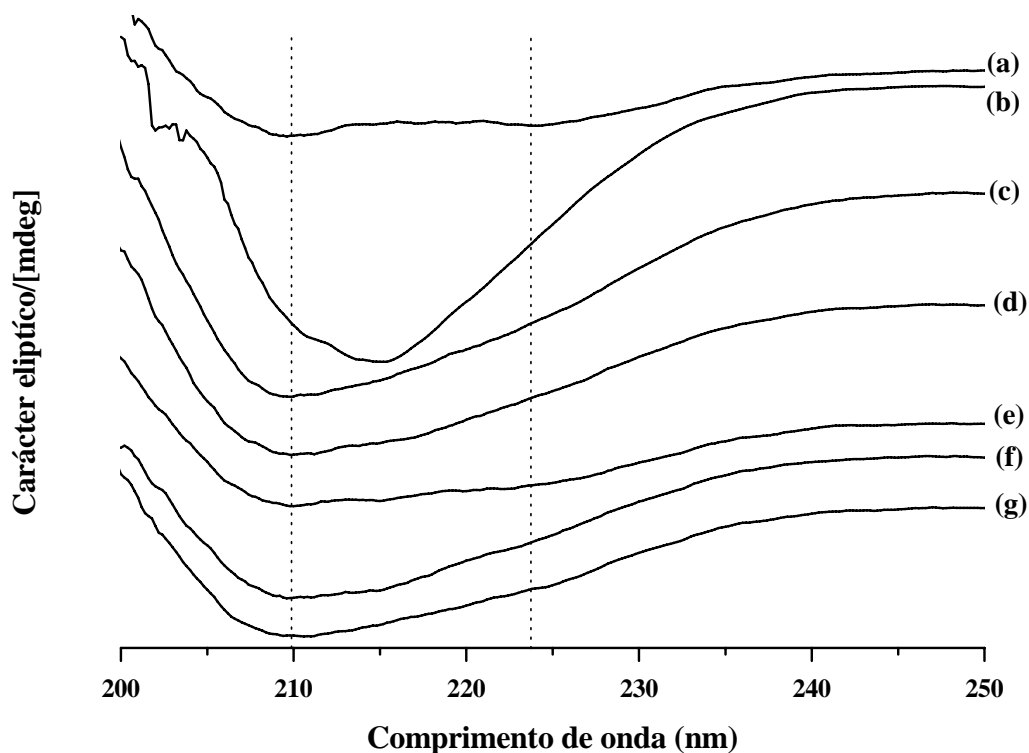


Figura II-21. Influência dos protocolos de recuperação no espectro de DC: a) solução de insulina não encapsulada em PBS e insulina libertada das partículas de alginato recuperadas com o protocolo b) A, c) B1, d) B2, e) B3, f) B4 e g) C.

4. DISCUSSÃO

4.1. Transposição do método de emulsificação/gelificação à escala nanométrica: processo de produção das partículas de alginato

O método de emulsificação/gelificação interna é um método utilizado na preparação de partículas poliméricas de dimensões milimétricas ou micrométricas. No presente trabalho, foram estudados vários parâmetros de processo e de formulação com o objectivo de transpor este método à escala de partículas mais pequenas, especificamente com dimensões inferiores ao limite crítico necessário para estas serem absorvidas após administração oral.

A granulometria das partículas é considerado um factor crucial para a sua absorção intestinal (Desai *et al.*, 1996). Geralmente, a redução da granulometria está associada a uma maior área de superfície e ao aumento das propriedades bioadesivas das partículas poliméricas (Kawashima *et al.*, 2000). Além disso, o alginato é um polímero bioadesivo (Gåserød *et al.*, 1998). Este aumento de bioadesividade das partículas, pela maior área de superfície e pela presença de alginato, pode resultar, por um lado, numa libertação do fármaco encapsulado mais próxima do epitélio membranar e por outro lado, numa maior interacção fármaco/mucosa intestinal, devido ao aumento do tempo de residência intestinal (Pan *et al.*, 2002).

A granulometria das partículas obtidas por métodos baseados em emulsões pode ser controlada por vários parâmetros (Arshady, 1990) e está fortemente relacionada com a distribuição dos tamanhos das gotas de fase interna da emulsão, podendo variar desde 100 nm a 2 mm (Arshady, 1991). A granulometria da partícula depende do tamanho das gotículas formadas na emulsificação, antes de iniciar a solidificação (Tin *et al.*, 1997). Segundo a Equação II-8 (Arshady, 1990), é possível relacionar qualitativamente uma série de parâmetros e controlar o diâmetro médio da partícula resultante:

$$\text{Diâmetro médio gotícula (partícula)} \propto K \frac{D_R R V_i \gamma}{D_A N V_e C_e} \quad \text{Equação II-8}$$

onde K simboliza parâmetros, tais como, o tipo de aparelho, o tipo de agitador e a auto-estabilização, D_R o diâmetro do reactor, D_A o diâmetro do agitador, R a razão em volume entre fases interna e externa, V_i a viscosidade da fase interna, V_e viscosidade da fase externa, C_e refere-se à concentração do agente emulsivo (%), N é a velocidade de agitação durante a emulsificação e, finalmente, γ é a tensão superficial entre as duas fases imiscíveis.

Esta relação pressupõe que as partículas atinjam, ou pelo menos se aproximem, de uma distribuição de equilíbrio antes do processo de solidificação, isto é, que a distribuição granulométrica permaneça estacionária sob agitação constante. O período necessário para atingir um tal estado estacionário poderá ser extenso, mas é geralmente conseguido entre 10 a 30 min (Arshady, 1990).

Entre os parâmetros apresentados na Equação II-8, o único que se manteve constante em todo o estudo do presente trabalho foi o diâmetro do reactor.

O estudo granulométrico realizado na primeira parte do estudo apresentado neste capítulo foi realizado de modo sequencial, sendo que o primeiro parâmetro sujeito a variação foi a velocidade de agitação durante a emulsificação. Esta ordem de selecção foi baseada em trabalhos anteriores (Silva, 2007). Observou-se que o aumento da velocidade da agitação conduziu a uma diminuição significativa da granulometria das partículas de alginato, principalmente, quando a velocidade aumentou de 400 para 800 rpm. A granulometria das partículas voltou a diminuir de 1200 para 1400 rpm, estabilizando à velocidade de 1400 rpm. Não foram estudadas velocidades de agitação superiores a 1800 rpm, uma vez que a essa velocidade de agitação a emulsão sob agitação ultrapassou a capacidade volumétrica do reactor pré-definido, extravasando-o.

Os resultados obtidos no presente trabalho relativamente à influência da velocidade de agitação na granulometria das partículas encontram-se de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores (Poncelet *et al.*, 1992; Shu e Zhu, 2001; Moslemy *et al.*, 2002; Misirli *et al.*, 2005). Durante a emulsificação, as gotículas são deformadas por uma dada força de dispersão e ruptura. A deformação é oposta à pressão de Laplace (Moslemy *et al.*, 2002) e,

normalmente, tem lugar quando as forças de agitação fornecidas pela agitação mecânica conseguem ultrapassar essa mesma pressão (Equação II-9).

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \qquad \text{Equação II-9}$$

onde P é a pressão exercida, γ é a tensão interfacial entre duas fases e r o raio da gotícula esférica.

Geralmente, velocidades de agitação elevadas resultam numa dispersão mais homogénea, devido à aplicação de forças de agitação maiores e, por consequência, na diminuição da granulometria das gotículas obtidas (Moslemy *et al.*, 2002). Por outro lado, nos processos baseados em emulsificações, a diferença de viscosidades existente entre as fases interna e externa aumenta a dificuldade de homogeneização. Essa dificuldade pode ser ultrapassada pelo aumento de força de contacto entre as duas fases e, por conseguinte, pelo aumento da velocidade de agitação. Desta forma, resultarão partículas mais homogéneas e mais pequenas (Groboillot *et al.*, 1993).

A polidispersividade também variou com a velocidade de agitação. O melhor compromisso entre granulometria obtida e polidispersividade foi obtido com a velocidade de agitação a 1600 rpm e, por conseguinte, foi seleccionada para estudos posteriores.

Escolhida a velocidade de agitação, o passo seguinte do presente trabalho incidiu na escolha do diâmetro da hélice marinha. Foram estudados dois diâmetros, 4 e 5,2 cm. Verificou-se que, para o mesmo reactor, a hélice marinha de maior diâmetro apresentava uma área menor para espaços mortos. É descrito na literatura que quanto menor for a área para espaços mortos, maior será a uniformidade de homogeneização e, por conseguinte, maior será a probabilidade de obtenção de partículas mais uniformes (Lim *et al.*, 1997). Além disso, para a mesma velocidade de agitação, a dispersão da fase interna na fase externa foi facilitada com a hélice de diâmetro 5,2 cm. Pelas razões expostas, foi seleccionada a hélice marinha com um diâmetro de 5,2 cm para os estudos subsequentes.

A Equação II-8 evidencia ainda uma outra proporcionalidade entre o diâmetro da partícula e a viscosidade da fase externa. Segunda a mesma equação, quanto maior for a viscosidade da fase oleosa, menor será o diâmetro das partículas obtidas. Foram estudados dois óleos de natureza distinta e com viscosidade diferentes. O óleo de amêndoas doces é um óleo de origem natural e rico em ésteres de ácidos gordos. Apresenta uma viscosidade de 67,1 mPa·s (Esquisabel *et al.*, 1997). Um estudo elaborado por Esquisabel e colaboradores teve como objectivo a escolha do melhor tipo de óleo para a produção de partículas poliméricas (Esquisabel *et al.*, 1997). Neste estudo, foram utilizados 5 tipos de óleos na preparação das microcápsulas de alginato revestidas com poli-L-lisina (PLL): amêndoas doces, sésamo, camomila, jojoba e, finalmente, perhidroesqualeno. O óleo de amêndoas doces foi aquele que conferiu menor granulometria. Observou-se que o diâmetro das microcápsulas diminuiu linearmente com o aumento da viscosidade do óleo utilizado como fase externa da emulsão. Este grupo sugeriu uma correlação linear entre a viscosidade e o diâmetro da gotícula de emulsão (Equação II-10 com $r^2 = 0,943$) e que corrobora com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho.

$$\text{Diâmetro } (\mu\text{m}) = 76,669 - (0,628) \times \eta \text{ (mPa} \cdot \text{s)} \quad \text{Equação II-10}$$

sendo η a viscosidade do óleo utilizado.

O óleo de parafina apresenta uma viscosidade superior ao óleo de amêndoas doces, cerca de 110-230 mPa·s (Farmacopeia Portuguesa VII). De facto, no presente estudo, verificou-se essa relação entre a viscosidade da fase externa e a granulometria. Quanto à polidispersividade, o tipo de óleo parece não apresentar uma influência tão significativa, como se verificou com a granulometria das partículas.

Pela granulometria obtida, optou-se pelo óleo de parafina para os estudos seguintes. O óleo de parafina é um derivado do petróleo (óleo mineral) e é muito utilizado na preparação de partículas de alginato (Gohel e Amin, 1998; Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b; Silva *et al.*, 2006b), microcápsulas de quitosano (Aiedeh *et al.*, 1997), microesferas de alginato e

quitosano (Kumar *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006a; Silva *et al.*, 2006c), microesferas de quitosano e gelatina (Kumar, 2000), microesferas de quitosano e glutaraldeído (Dini *et al.*, 2003), microesferas de albumina (Kumar, 2000), cápsulas de agarose (Sakai *et al.*, 2005), micropartículas de pectina (Esposito *et al.*, 2001; Rabanel e Hildgen, 2004), microesferas de PCL (Ramesh *et al.*, 2002) e microesferas de PLGA (Leach *et al.*, 2005).

O tempo de sonicação do carbonato de cálcio também influenciou a granulometria das partículas de alginato obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna. A menor granulometria das partículas foi obtida com o tempo de sonicação de 30 min. Um estudo desenvolvido por Poncelet e colaboradores (Poncelet *et al.*, 1995) refere que as partículas produzidas na presença de carbonato de cálcio sujeito a um processo de sonicação apresentaram maior resistência mecânica e esfericidade e, não apresentaram grãos de cálcio residuais (Poncelet *et al.*, 1995). No presente estudo, o carbonato de cálcio foi sujeito a sonicação por um período de tempo superior ao preconizado no protocolo base (cerca de três vezes superior). A explicação para a menor granulometria das partículas baseia-se na maior fragmentação dos microcristais de cálcio. De facto, a menor granulometria dos grãos de cálcio pode ser responsável pela formação de uma rede polimérica mais compacta. O tempo de sonicação de 30 min foi baseado em trabalhos anteriores (Quong e Neufeld, 1998). Contudo, estão descritos outros trabalhos que recorreram a um menor tempo de sonicação do sal de cálcio como, por exemplo, 90 s (Liu *et al.*, 2005) ou 15 min (Monshipouri e Price, 1995) mas, nestes estudos, não foi investigada a influência do tempo de sonicação na granulometria das partículas de alginato. Pelas razões expostas, o tempo de sonicação do carbonato de cálcio de 30 min foi seleccionado para as etapas seguintes. Os restantes períodos de tempo, que decorrem durante os processos de emulsificação e gelificação, foram baseados em trabalhos anteriores e mantidos constantes. De salientar que não existe nenhum valor pré-definido relativamente ao tempo de emulsificação, podendo este valor situar-se entre 5 (Ribeiro *et al.*, 1999) e 20 min (Tin *et al.*, 1997). Mas, um estudo demonstrou que partículas de quitosano se apresentavam mais pequenas mas com uma estrutura frágil quando se utilizava mais de 30 min como tempo de emulsificação (Lim *et al.*, 1997). Por outro lado, pela anterior experiência desenvolvida no Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Silva *et al.*, 2006c) e outro trabalho descrito na literatura (Liu *et al.*, 2002a), o tempo de emulsificação estipulado foi de 15 min. De um modo semelhante, o tempo de gelificação é variável, podendo ser de 5 (Tin *et al.*, 1997), 6 (Kim e Lee, 1992) e 30 min (Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b) ou, até mesmo, de 24 h (Liu *et al.*, 2002b). Neste caso e ponderando os resultados anteriores, optou-se por utilizar 60 min como tempo de gelificação, no sentido de assegurar a gelificação completa do alginato.

O efeito da concentração de agente emulsivo na granulometria das partículas foi concordante com a Equação II-8. O aumento da concentração do agente emulsivo, até 1,5% (V/V) inclusive, resultou numa diminuição significativa da granulometria das partículas. É descrito que os agentes emulsivos desempenham um papel importante na emulsificação, não só por facilitarem a obtenção da emulsão através da diminuição da tensão interfacial entre a fase interna e externa, devido à diminuição da pressão de Laplace, mas também porque concorrem para a estabilização da emulsão, impedindo a coalescência das gotículas da fase interna (Liu *et al.*, 2002a). Assim, é de esperar que, na presença de concentrações crescentes de agente emulsivo, menor será a energia mecânica necessária para obter a dispersão de um líquido num outro e mais fácil será o passo da emulsificação (Moslemy *et al.*, 2002). Considerando que o agente emulsivo permanece adsorvido à superfície da fase interna para formar um filme, evitando, assim, a coalescência das gotas da fase interna, baixas concentrações de agente emulsivo não deverão ser, portanto, suficientes para revestir completamente essa mesma superfície e, por conseguinte, não serão suficientes para estabilizar a emulsão. Desta forma, a coalescência ocorre e formam-se partículas com grandes dimensões (Liu *et al.*, 2002a). No entanto, não poderemos esquecer que durante a difusão do ácido lipossolúvel através da interface de fases para iniciar a gelificação do alginato, elevadas concentrações do agente emulsivo podem causar fenómenos de resistência à difusão dos H⁺, retardando o processo de gelificação e contribuindo para uma baixa produção de partículas (Liu *et al.*, 2002a). Assim, pela menor granulometria e pelas características granulométricas, a concentração do agente emulsivo adoptada nos estudos posteriores foi de 1,5% (V/V).

O estudo granulométrico avaliou, ainda, a influência da concentração do alginato na granulometria das partículas. A concentração de alginato é um parâmetro de formulação, mas simultaneamente, é um parâmetro de processo, porque a concentração de polímero influencia a viscosidade da fase interna durante a etapa da emulsificação. De acordo com a Equação II-8, seria de esperar uma diminuição da granulometria das partículas com a diminuição da concentração de alginato de 2 para 1,5%, devido à menor viscosidade da fase interna. De facto, esta correlação verificou-se no presente trabalho. Contudo, observou-se que a diminuição da concentração de alginato conduziu à obtenção de uma distribuição granulométrica polimodal. O aparecimento de um novo pico na curva da distribuição granulométrica para a concentração de alginato a 1,5% poderá estar relacionado com a formação de agregados de partículas, provavelmente, devido a uma gelificação incompleta (Tin *et al.*, 1997). Desta forma se justifica a não utilização de concentrações de alginato inferiores a 1,5%. A opção da concentração de alginato a 2% baseou-se, ainda, com a aplicação destas partículas à encapsulação de fármacos peptídicos. Estudos anteriores demonstraram que a capacidade de retenção de proteínas em matrizes de alginato era maior com o aumento da concentração do polímero (Vandenberg *et al.*, 2001). Importa, no entanto, referir que o intervalo de concentrações de alginato estudado no presente trabalho se baseou em estudos anteriores. De uma forma geral, é descrito que concentrações de alginato abaixo de 1,0% (m/V) originaram partículas disformes (menos esféricas), provavelmente devido à insuficiência de grupos carboxílicos do alginato necessários para a gelificação do polímero (Liu *et al.*, 2002a) ou à baixa viscosidade da fase interna (You *et al.*, 2001). Pelo contrário, concentrações de alginato elevadas (acima de 2%, m/V) foram associadas a um aumento da viscosidade da fase interna (You *et al.*, 2001) e a uma menor eficácia de homogeneização da emulsão (Li *et al.*, 1999), com o conseqüente aumento da granulometria das partículas.

Por fim, o estudo granulométrico incluiu a avaliação da influência da razão A/O na granulometria das partículas. Nesta fase, verificou-se que o aumento da razão A/O de 30/70 para 50/50 conduziu a uma ligeira diminuição da granulometria. No entanto, a polidispersividade não foi alterada, uma vez que os valores de SPAN foram iguais. Contudo, a diminuição do diâmetro das partículas, que foi observada com o aumento da razão A/O, não

é concordante com a Equação II-8 nem com os resultados obtidos num estudo desenvolvido por Tin e colaboradores (Tin *et al.*, 1997). Segundo este estudo, o aumento da fase interna de 20 para 30% provoca um aumento da granulometria das microesferas devido à maior proximidade entre as gotículas da emulsão que resulta num aumento da frequência de coalescência e, por conseguinte, num acréscimo do número de agregados. O mesmo estudo refere que volumes de fase interna superiores a 40% conduzem a uma inversão de fases, isto é, a fase oleosa torna-se a fase interna e, as microesferas não se formam. Entre 30 e 40%, a inversão de fases pode igualmente ocorrer mas em menor extensão. As diferentes conclusões, entre o estudo anterior e o presente trabalho, podem ser justificadas pelas diferentes metodologias ou características dos materiais utilizados. Por exemplo, no trabalho de Tin (Tin *et al.*, 1997), utilizou-se o óleo de canola como fase externa da emulsão que apresenta uma menor viscosidade do que o óleo de parafina, logo é menos eficaz para evitar a coalescência das gotículas de fase interna. Por outro lado, no mesmo trabalho é ainda referido que não se formam microesferas para volumes de fase interna superiores a 40%. Esta última observação também não se encontra em conformidade com o presente trabalho. Mais recentemente, surgiram outros trabalhos nos quais foi utilizada uma metodologia semelhante (Urbano, 2004; Silva *et al.*, 2006b) ou foram utilizadas características de materiais semelhantes (Silva *et al.*, 2006b), tendo sido observados resultados concordantes com os obtidos no presente trabalho.

Em suma, os resultados anteriores apontam para a possibilidade de transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica. A formulação final desta fase foi preparada utilizando a velocidade de agitação a 1600 rpm, uma hélice marinha com diâmetro de 5,2 cm, o óleo de parafina como fase externa, um tempo de sonicação do carbonato de cálcio de 30 min, uma concentração de Span[®] 80 de 1,5% (V/V), uma concentração de alginato de 2% (m/V) e, finalmente, uma razão A/O de 50/50 (V/V). Não foram estudados outros parâmetros de formulação e de processo que pudessem influenciar adicionalmente a granulometria das partículas porque se verificou que, à medida que diminuía a granulometria das partículas, o processo de recuperação do protocolo base tornava-se cada vez menos eficiente. Neste sentido, importa referir que seriam inúteis as tentativas de

diminuição da granulometria das partículas, se fosse inexecutável a sua recuperação. Optou-se, então, por estudar a melhor estratégia de recuperação.

4.2. Transposição do método de emulsificação/gelificação à escala nanométrica: processo de recuperação das partículas de alginato

No protocolo base foi prevista a recuperação das partículas poliméricas recém-formadas através da adição de tampão acetato de pH 4,5, como meio de lavagem, e da utilização de uma velocidade de centrifugação a 3000 rpm. Este procedimento foi aplicado no estudo granulométrico mas, verificou-se que com a diminuição da granulometria, a sua eficácia diminuiu. As estratégias para otimizar o processo de recuperação foram baseadas em duas vertentes: a primeira, baseou-se na aplicação de uma maior força centrífuga durante a recuperação das partículas e tampão acetato de pH 4,5 como meio de lavagem e, a segunda estratégia associou o tampão acetato de pH 4,5 e agentes desidratantes com uma menor força centrífuga. O tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII) foi escolhido como meio de lavagem com base em estudos anteriores (Silva *et al.*, 2006b). A escolha de um tampão com este valor de pH esteve relacionada com a aplicação das partículas de alginato à encapsulação da insulina, tendo como intuito favorecer a interação entre o polímero e o fármaco encapsulado. Por esse motivo, foi escolhido um valor de pH situado entre os valores de pK_a do alginato (3,38 e 3,65) (Draget *et al.*, 1994) e o pI da insulina (5,3) (Chien, 1996). A pH 4,5, a insulina apresenta-se carregada positivamente, podendo interagir com o alginato carregado negativamente. A escolha dos agentes desidratantes baseou-se em estudos anteriores (Esquisabel *et al.*, 1997; Esquisabel *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Chan, 2002; Chen *et al.*, 2003; Schubert e Müller-Goymann, 2003; Zhi *et al.*, 2005; Vladisavljevic e Williams, 2005).

No presente estudo, foi realizado, adicionalmente, um protocolo de recuperação (protocolo C) que se baseou na utilização de um agente emulsivo, Tween[®] 80, e cloreto de cálcio no meio de lavagem. Este procedimento baseou-se em estudos anteriores (Poncelet *et al.*, 1992; Poncelet *et al.*, 1995; Quong *et al.*, 1996; Quong e Neufeld, 1998; Quong *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999; Poncelet, 2001; Moslemy *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005), nos quais

o meio de lavagem era composto apenas por Tween[®] 80 e cloreto de cálcio sem tampão acetato de pH 4,5 e, a deposição das partículas, ao contrário do presente estudo, foi realizada por deposição gravitacional durante o repouso. Noutros estudos, a eliminação do óleo foi realizada, alternativamente, com Tween[®] 80 sem cloreto de cálcio (Tin *et al.*, 1997; Vandenberg e Nouè, 2001) ou, então, com cloreto de cálcio sem Tween[®] 80 (Lencki *et al.*, 1989; Chan, 2002).

4.2.1. Caracterização granulométrica das partículas de alginato

A primeira estratégia para recuperação de partículas de alginato consistiu na aplicação de uma força centrífuga crescente, 12.500, 55.000 e 80.000 $\times g$, tendo-se verificado um ligeiro aumento na granulometria, quando foram aplicadas elevadas forças centrífugas. Este facto poderá estar relacionado com uma maior compactação do sedimento das partículas e, consequentemente, com uma difícil ressuspensão das partículas após centrifugação. Por outro lado, a nível prático, assistiu-se à formação de uma emulsão cada vez mais difícil de fraccionar, à medida que o número de ciclos de lavagem ia avançando, até que foi completamente impossível a recuperação das partículas. Este efeito foi mais evidente, quando foram aplicadas as forças centrífugas de 55.000 e 80.000 $\times g$.

Na segunda estratégia de recuperação optou-se pela utilização de agentes desidratantes associados ao meio de lavagem do protocolo base mantendo a força centrífuga a 12.500 $\times g$. Nesta etapa, foi observado um desvio da curva da distribuição granulométrica para a esquerda mas, em certos casos, formaram-se aglomerados. Esses aglomerados revelaram-se reversíveis mas fortemente relacionados, principalmente, com o volume utilizado de acetona. Devido a essa tendência de aglomeração, procurou-se substituir a acetona por outro solvente de características físico-químicas e aceitabilidade semelhantes: o isopropanol ou 2-propanol. Para além das descritas, foram estudadas várias combinações entre estes dois solventes, sendo a melhor razão volumétrica entre estes dois solventes de 3:2 para acetona e isopropanol, respectivamente. Além da acetona e do isopropanol, foram associados ao meio de lavagem outros solventes, nomeadamente o n-hexano e o éter de petróleo. A sua utilização deve-se à

sua afinidade para fase oleosa e à elevada volatilidade. No âmbito dos resultados obtidos em termos de granulometria, contrariamente ao que se verificou com o n-hexano, o éter de petróleo conduziu à formação de aglomerados. A natureza dos aglomerados foi, contudo e mais uma vez, reversível. Finalmente, a presença de Tween[®] 80 e cloreto de cálcio no meio de lavagem não demonstrou qualquer influência na granulometria das partículas comparativamente aos outros protocolos.

4.2.2. Monitorização da presença do óleo residual

A utilização de agentes desidratantes diminuiu o número de ciclos de lavagem durante a recuperação das partículas. Supõe-se que a adição de um meio de lavagem aquoso com agentes desidratantes perturbou o equilíbrio da emulsão A/O através de uma desidratação das partículas e de uma inversão de fases que foi favorável à migração das partículas da fase oleosa para a fase aquosa. O menor número de ciclos de lavagem foi obtido com o protocolo B3, provavelmente devido a uma capacidade extractiva do óleo residual por parte do n-hexano (Farmacopeia Portuguesa VIII). Esta propriedade não foi observada com o éter de petróleo, talvez pela sua maior densidade relativa à água (0,88 *versus* 0,7) e solubilidade em água (0,18 *versus* 0,0013 g/100 mL a 20°C). Além disso, o *log* do coeficiente de partilha (octanol/água) do éter de petróleo é inferior ao do n-hexano (2,13 *versus* 3,9) e, por conseguinte, o éter de petróleo apresentou menor afinidade para a fase oleosa (INCHEM, 2007). Nos restantes protocolos B, B1 e B2, o número de ciclos de lavagem foi sempre inferior aos protocolos A e C.

4.2.3. Caracterização morfológica das partículas de alginato

Relativamente à caracterização morfológica, os resultados de SEM revelaram que o uso de volumes elevados de acetona nos protocolos B1 e B2 provocou uma perda da esfericidade das partículas, provavelmente devido a uma perda massiva de água e consequente alteração da organização da rede polimérica. As partículas de alginato são constituídas,

maioritariamente, por água e os processos de remoção de água devem ser rigorosamente controlados, uma vez que a estrutura do gel de alginato de cálcio pode sofrer alterações cuja reversibilidade não é conjecturável. Pelo contrário, o facto de nos protocolos B3 e B4 se ter mantido a esfericidade das partículas de alginato é um indicador de que a proporção dos agentes desidratantes foi adequada. De referir, no entanto, que no protocolo B4 ocorreu uma ligeira tendência para a aglomeração.

No que respeita à superfície das partículas, a utilização de agentes desidratantes no processo de recuperação das partículas de alginato resultou num aumento de rugosidade das partículas, provavelmente associado à desidratação da rede polimérica. Na ausência de agentes desidratantes, como se verificou com os protocolos A e C, as partículas apresentaram-se esféricas e de superfície lisa.

4.2.4. Rendimento de recuperação (RR) das partículas de alginato

Entre os aspectos mais importantes a considerar na escolha da melhor estratégia de recuperação das partículas, encontra-se o RR. O aumento da força centrífuga aumentou o RR. No entanto, o aumento da força de centrífuga conduziu a uma maior compactação das partículas.

Os protocolos que envolveram agentes desidratantes associados a uma força centrífuga de $12.500 \times g$ (protocolos B) permitiram alcançar valores ligeiramente superiores (60 a 70%), comparativamente com os protocolos A e C. Os solventes utilizados nos protocolos B, acetona e isopropanol, são agentes desidratantes e miscíveis com a água presente nas partículas e com o meio hidrofóbico envolvente (Arshady, 1990). Supõe-se que as partículas depois de desidratadas, perderam a afinidade com a interface da emulsão e precipitaram. O RR não variou com a aplicação de n-hexano ou éter de petróleo, uma vez que a finalidade da sua utilização se deve à acção extractiva do óleo residual (Ramdas *et al.*, 1999; Miyazaki *et al.*, 2003) e não ao aumento de RR.

Por fim, a ausência de agentes desidratantes no protocolo C conduziu a valores de RR inferiores ao protocolo B.

4.2.5. Teor e eficiência de encapsulação (EE) da insulina

A EE também variou para os diferentes protocolos, principalmente para os protocolos B1, B2, B3 e B4 e C. Comparativamente com o protocolo A, o protocolo B requereu menos ciclos de lavagem, o que poderia sugerir uma menor probabilidade de perda de proteína durante o processo de recuperação e, conseqüentemente, uma maior EE da insulina. Por outro lado, e tal como descrito em estudos anteriores (Vandenberg *et al.*, 2001), a superfície das partículas de alginato foi modificada com a utilização de agentes desidratantes. A desidratação parece ter conferido alguma protecção à insulina encapsulada. A aplicação de agentes desidratantes poderá afectar a permeabilidade das partículas, através da redução da sua porosidade (Vandenberg *et al.*, 2001). Porém, observou-se que o efeito dos agentes desidratantes na EE foi dependente do volume relativo na composição do meio de lavagem, especialmente para os protocolos B1 e B2 onde a EE da insulina foi menor. O mecanismo de perda de insulina não é claro, mas pensa-se que, durante a recuperação, alguma insulina pode difundir-se para o exterior das partículas durante a perda massiva de água. Assim, na presença de um volume de agente desidratante elevado, poderia haver uma maior difusão de insulina encapsulada para o exterior e, conseqüente, diminuição da EE. Por fim, no protocolo B2, a presença de Tween[®] 80 conduziu a uma turvação do sobrenadante durante este ensaio de determinação do teor e de EE. Este facto provocou uma perda de partículas durante a sua transferência do tampão de pH 1,2 para tampão pH 6,8, resultando num valor de EE menor.

O protocolo C conduziu a valores de EE elevados mas com um grande desvio padrão. O aumento da EE da insulina neste protocolo em relação ao protocolo A pode ser explicado pela adição de uma fonte de iões cálcio no meio de lavagem. Este enriquecimento de cálcio conduz a reacções de reticulação adicionais entre os grupos carboxílicos do alginato e os iões cálcio (Braccini e Perez, 2001). Desta forma, a “compactação” da matriz polimérica permite um maior aprisionamento da insulina no alginato e conduz a um aumento dos valores de EE de insulina. Esta hipótese foi baseada em trabalhos anteriores, em que a utilização de cálcio no meio de lavagem teve como objectivo a diminuição do intumescimento da partícula e da difusão do agente encapsulado para o exterior da mesma (Vandenberg *et al.*, 2001). O valor

de desvio padrão obtido no protocolo C pode estar, igualmente, relacionado com a presença de Tween[®] 80 e justificado pela razão exposta anteriormente.

Interessa também referir a importância do pH do meio de lavagem. O pH é determinante para controlar a difusão da proteína encapsulada para o meio de recuperação, uma vez que influencia o grau de ionização da proteína e, desse modo, a interação com polímeros de carga oposta (Dumitriu e Chornet, 1998). A pH 4,5, as interações químicas entre o alginato e a insulina são favorecidas, uma vez que estes apresentam cargas opostas. O pH ideal do meio de lavagem deverá estar compreendido entre 4 e 5,3 por duas distintas razões: o pH deverá ser superior a 4, porque próximo de 4, cerca de 50% dos grupos carboxílicos do alginato já não se encontram ionizados (Huguet *et al.*, 1996); por outro lado, e tendo em consideração o pI, a pH abaixo de 5,3, a insulina apresenta carga positiva e facilmente interage com o alginato com carga oposta (Figura II-22).

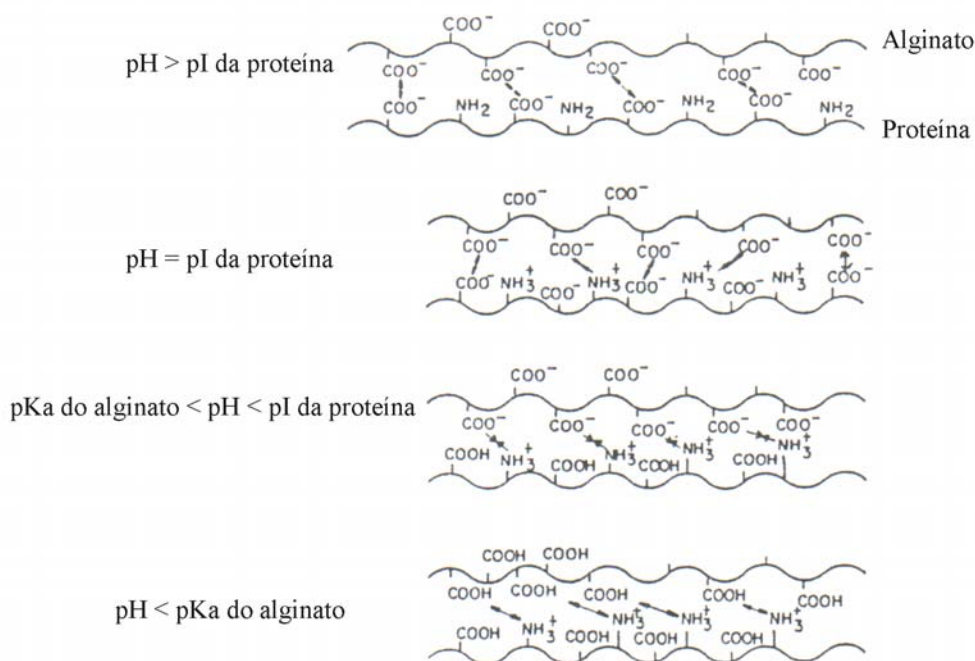


Figura II-22. Modelo esquemático da interação alginato-proteína adaptado de Thakur *et al.*, 1997. Apenas aplicável a proteínas com pI superiores ao pK_a do alginato. Nota: O símbolo ↔ refere-se às forças repulsivas e o símbolo →← às forças atractivas.

Por fim, a natureza intrínseca desta metodologia baseada numa emulsão do tipo A/O e a natureza hidrofílica da insulina poderá igualmente explicar, de uma forma geral, e para todos os protocolos, os elevados valores de EE obtidos.

4.2.6. Perfil de libertação *in vitro*

No que diz respeito ao perfil de libertação, observou-se que as partículas colocadas a pH 1,2 libertaram nos primeiros minutos a totalidade de insulina encapsulada, independentemente do protocolo de recuperação. Este comportamento sugere que o perfil de libertação *in vitro* da insulina a partir das partículas de alginato seja dependente do pH. A pH 1,2, a interacção entre a proteína carregada positivamente e o alginato carregado negativamente é perdida com a conversão do alginato em ácido algínico (Draget *et al.*, 1994; George e Abraham, 2006). Este efeito de libertação rápida (cerca de 80%), designadamente conhecido por efeito *burst release* (libertação instantânea) foi igualmente observado em estudos anteriores, envolvendo partículas de alginato (Silva *et al.*, 2006b). Tendo em conta a granulometria e as diferenças de superfície entre as partículas de alginato recuperadas pelos diferentes protocolos, seria de esperar alguma divergência no perfil de libertação de insulina entre si. Tal não aconteceu, provavelmente devido à concomitância de outros factores. A fraca retenção de insulina nas partículas de alginato a pH 1,2 poderá estar relacionada com a estrutura extremamente porosa das partículas de alginato de cálcio e com as rápidas trocas iónicas entre o ião cálcio presentes nas partículas e os protões do tampão HCl/KCl de pH 1,2 (Østberg *et al.*, 1994) e não tanto com os factores que foram referidos previamente. Por outro lado, a formação de CO₂ durante a solubilização do carbonato de cálcio pode aumentar a porosidade da matriz polimérica e, mais tarde, facilitar a libertação da insulina no tampão de pH 1,2. A problemática da libertação instantânea da insulina a pH 1,2 será abordada no capítulo seguinte.

Finalmente, quando as partículas de alginato sob a forma de ácido algínico são transferidas para o tampão a pH 6,8, forma-se o sal solúvel de alginato de sódio e a matriz é completamente desintegrada.

4.2.7. Estabilidade físico-química da insulina após preparação e recuperação das partículas de alginato

Seja qual for o sistema de encapsulação e o processo de recuperação e de liofilização, estes devem preservar a estabilidade da insulina encapsulada, de forma que, permaneça uma grande fracção do fármaco biologicamente activo no interior da partícula de alginato. A integridade estrutural da molécula de insulina pode ser avaliada por diferentes técnicas, conforme será descrito no trabalho do Capítulo IV. No presente trabalho, a integridade estrutural foi avaliada por três técnicas distintas: HPLC-UV, HPLC-MS e DC, tendo a sua escolha sido baseada em estudos anteriores (Brange *et al.*, 1992b; Yamamoto *et al.*, 1994; Silva-Cunha *et al.*, 1998; Sadhale e Shah, 1999; Bouchard *et al.*, 2000; Leobandung, 2002; Tiyaboonchai *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2004; Ibrahim *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2006).

Na técnica de HPLC-UV, os cromatogramas revelaram que a insulina libertada das partículas de alginato manteve o seu tempo de retenção, independentemente do protocolo de recuperação utilizado, sugerindo a preservação da integridade estrutural da molécula de insulina. Geralmente, na presença de uma modificação estrutural de insulina como, por exemplo, a agregação, ocorre um desvio no tempo de retenção da insulina no cromatograma de HPLC. A preservação da integridade estrutural da molécula de insulina foi ainda confirmada por HPLC-MS. Esta última técnica demonstrou não só a manutenção do tempo de retenção mas também a ausência de produtos de degradação, quer de baixo PM (fragmentos proteicos) quer de elevado PM (produtos de dimerização e polimerização covalente). A formação destes produtos pode condicionar a actividade da proteína (Brange *et al.*, 1987; Brange *et al.*, 1992a; Brange *et al.*, 1992b).

A integridade estrutural da molécula de insulina foi ainda avaliada por DC. Os resultados apontaram para uma ligeira alteração dos picos mínimos nos espectros de insulina com a aplicação de forças centrífugas mais elevadas durante o processo de recuperação (protocolo A). O espectro de insulina apenas foi sobreponível ao da solução de insulina controlo quando foi utilizado o protocolo B3 e, por essa razão, o protocolo B3 foi o seleccionado como protocolo de recuperação das partículas para trabalhos subsequentes. Todavia, a alteração dos espectros, com maior ou menor desvio ou com atenuação nos picos

mínimos característicos de insulina, não reflecte a perda de bioactividade de insulina, mas sim, são resultados sugestivos de que a estrutura secundária da insulina (conformação nativa proteica) pode ter sofrido alguma alteração estrutural detectável por DC. Este desvio poderá ter sido devido, por exemplo, à própria complexação da proteína com o polímero alginato.

5. CONCLUSÕES

O método de emulsificação/gelificação interna demonstrou ser adequado na preparação de partículas com dimensões inferiores a 10 μm destinadas à encapsulação de insulina. A transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica foi possível devido, principalmente, a dois factores *major*: velocidade de agitação durante a emulsificação e presença de agente emulsivo. Os outros parâmetros de formulação e de processo estudados nesta fase de transposição do método influenciaram a granulometria das partículas, mas em menor extensão e, por isso, foram considerados factores *minor*. Por análise dos resultados obtidos, a formulação com uma reduzida granulometria, pode ser preparada, utilizando uma velocidade de agitação de 1600 rpm, uma hélice marinha de diâmetro 5,2 cm, um tempo de sonicação do carbonato de cálcio de 30 min, o óleo de parafina como fase externa, uma concentração de agente emulsivo de 1,5% (V/V), uma concentração de alginato de 2% (m/V) e, finalmente, uma razão A/O de 50/50 (V/V), mantendo os restantes parâmetros do protocolo base.

Ultrapassada a fase de transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica, surgiu uma outra dificuldade relacionada com o processo de recuperação. Foram estudadas várias estratégias baseadas em duas principais vertentes: a primeira, relacionada com a aplicação de forças centrífugas elevadas (12.500, 55.000 e 80.000 $\times g$) e, a segunda estratégia através da aplicação de agentes desidratantes seguida de centrifugação. Ambas as vertentes recorreram ao tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII) como meio de lavagem.

A granulometria das partículas foi ligeiramente influenciada pelos protocolos de recuperação adoptados. Além disso, o tipo de protocolo aplicado condicionou a maior ou menor ocorrência de aglomerados. A natureza dos aglomerados em todas as situações foi reversível. O número de ciclos de lavagem, também, variou para os diferentes protocolos, sendo o protocolo B3 o que permitiu menor número de ciclos de lavagem. Nos restantes protocolos B, o número de ciclos de lavagem foi sempre inferior aos protocolos A e C.

Relativamente à caracterização morfológica, os resultados de SEM revelaram que o uso excessivo de agentes desidratantes nos protocolos B1 e B2 provocou uma perda da esfericidade das partículas, provavelmente devido a uma perda massiva de água e à alteração da rede polimérica. Pelo contrário, os protocolos B3 e B4 mantiveram a esfericidade das partículas de alginato. No que respeita à superfície, a utilização de agentes desidratantes no processo de recuperação das partículas de alginato resultou num aumento de rugosidade das partículas, isto porque, sem agentes desidratantes, como se verificou com os protocolos A e C, as partículas apresentaram uma superfície lisa.

O valor de RR dependeu do protocolo de recuperação utilizado. Os protocolos que envolveram agentes desidratantes associados a uma força centrífuga menor de $12.500 \times g$ (protocolos B) permitiram alcançar valores ligeiramente mais elevados (60 a 70%), comparativamente com os protocolos A e C, nos quais não foram utilizados agentes desidratantes.

A EE também variou para os diferentes protocolos de recuperação. O protocolo B requereu menos ciclos de lavagem em relação ao protocolo A, o que pode sugerir uma menor probabilidade de perda de proteína durante o processo de recuperação. Por outro lado, a aplicação de agentes desidratantes pode ter afectado a permeabilidade da partícula polimérica e resultar numa maior EE de insulina. O volume de agentes desidratantes influenciou a EE, possivelmente porque, durante a desidratação a insulina se difundiu, tal como aconteceu com a água presente nas partículas. O protocolo C conduziu a valores de EE igualmente elevados. O pH do meio de lavagem parece ser determinante no controlo da difusão da proteína encapsulada para o meio de recuperação, uma vez que influencia o grau de ionização da proteína e, desse modo, a interacção com polímeros de carga oposta. Por outro lado, a própria natureza intrínseca desta metodologia baseada em emulsões e a natureza hidrofílica da insulina poderão igualmente, explicar, de uma forma geral e para todos os protocolos, os valores de EE de insulina obtidos.

No que diz respeito ao perfil de libertação, observou-se que, quando as partículas foram colocadas em tampão HCl/KCl de pH 1,2, estas libertaram a totalidade de insulina encapsulada nos primeiros minutos, independentemente do protocolo de recuperação. Este

comportamento sugere que o perfil de libertação da insulina a partir das partículas de alginato seja dependente do pH.

No que respeita à estabilidade da insulina encapsulada, as técnicas de HPLC revelaram que a insulina mantém a sua integridade estrutural, após a encapsulação e o processo de recuperação, pela manutenção do seu tempo de retenção e pela ausência de produtos de degradação, quer de baixo PM (fragmentos proteicos) quer de elevado PM (produtos de dimerização e polimerização covalente), independentemente do protocolo de recuperação utilizado. Os resultados obtidos por DC demonstraram uma ligeira alteração estrutural para os diferentes protocolos à excepção do B3, mas este desvio poderá ser devido, em última instância, à própria complexação da proteína com o polímero alginato e não reflectir a perda de bioactividade da insulina.

6. BIBLIOGRAFIA

- AGUIAR, M. M. G., RODRIGUES, J. M. e SILVA-CUNHA, A. (2004) Encapsulation of insulin-cyclodextrin complex in PLGA microspheres: a new approach for prolonged pulmonary insulin delivery. **J. Microencapsul.** 21, 553-564.
- AIEDEH, K., GIANASI, E., ORIENTI, I. e ZECCHI, V. (1997) Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin. **J. Microencapsul.** 14, 567-576.
- ALEXAKIS, T., BOADI, D. K., QUONG, D., GROBOILLOT, A., O'NEILL, I., PONCELET, D. e NEUFELD, R. J. (1995) Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and cross-linked chitosan membranes for *in vivo* application. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 50, 93-106.
- ARSHADY, R. (1990) Albumin microspheres and microcapsules: methodology of manufacturing techniques. **J. Control. Rel.** 14, 111-131.
- ARSHADY, R. (1991) Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules. Part 2. Polyactides and related polyesters. **J. Control. Rel.** 17, 1-21.
- BILATI, U., ALLÉMANN, E. e DOELKER, E. (2005) Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 59, 375-388.
- BOUCHARD, M., ZURDO, J., NETTLETON, E. J., DOBSON, C. M. e ROBINSON, C. V. (2000) Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. **Prot. Sci.** 9, 1960-1967.
- BRACCINI, I. e PEREZ, S. (2001) Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules** 2, 1089-1096.
- BRANGE, J., HAVELUND, S. e HOUGAARD, P. (1992a) Chemical stability of insulin. 2. Formation of higher molecular weight transformation products during storage of pharmaceutical preparations. **Pharm. Res.** 9, 727-734.
- BRANGE, J., LANGKJAER, L., HAVELUND, S. e VOLUND, A. (1992b) Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations. **Pharm. Res.** 9, 715-726.

- BRANGE, J., SKELBAEK-PEDERSEN, B., LANGKJAER, L., DAMGAARD, U., EGE, H., HAVELUND, S., HEDING, L. G., JØRGENSEN, K. H., LYKKEBERG, J., MARKUSSEN, J., PINGEL, M. e RASMUSSEN, E. (1987) **Galenics of insulin: the physico-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- CHAN, L. W. (2002) Production of alginate microspheres by internal gelation using emulsification method. **Int. J. Pharm.** 242, 259-262.
- CHEN, F., XU, G.-Q. e HOR, T. S. A. (2003) Preparation and assembly of colloidal gold nanoparticles in CTAB-stabilized reverse microemulsion. **Mat. Lett.** 57, 3282-3286.
- CHIEN, Y. W. (1996) Human insulin: basic sciences to therapeutic uses. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 22, 753-789.
- DESAI, M. P., LABHASETWAR, V., AMIDON, G. L. e LÉVY, R. J. (1996) Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. **Pharm. Res.** 13, 1838-1845.
- DINI, E., ALEXANDIDROU, S. e KIPARISSIDES, C. (2003) Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. **J. Microencapsul.** 20, 375-385.
- DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G. e SMIDSRØD, O. (1994) Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydr. Polym.** 25, 31-38.
- DUMITRIU, S. e CHORNET, E. (1998) Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 31, 223-246.
- ESPOSITO, E., CORTESI, R., LUCA, G. e NASTRUZZI, C. (2001) Pectin-based microspheres. **Ann. New York Acad. Sci.** 944, 160-179.
- ESQUISABEL, A., HERNÁNDEZ, R. M., IGARTUA, M., GASCÓN, A. R., CALVO, B. e PEDRAZ, J. L. (2002) Preparation and stability of agarose microcapsules containing BCG. **J. Microencapsul.** 19, 237-244.
- ESQUISABEL, A., HERNÁNDEZ, R. M., IGARTUA, M., GASCÓN, A. R., CALVO, B. e PEDRAZ, J. L. (1997) Production of BCG alginate-PLL microcapsules by emulsification/internal gelation. **J. Microencapsul.** 14, 627-638.

- ESQUISABEL, A., HERNÁNDEZ, R. M., IGARTUA, M., GASCÓN, A. R., CALVO, B. e PEDRAZ, J. L. (2000) Effect of lecithins on BCG-alginate-PLL microcapsule particle size and stability upon storage. **J. Microencapsul.** 17, 363-372.
- FURTADO, S., ABRAMSON, D., SIMHKAY, L., WOBBEKIND, D. e MATHIOWITZ, E. (2006) Subcutaneous delivery of insulin loaded poly(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres to type 1 diabetic rats. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 63, 229-236.
- GÅSERØD, O., JOLLIFFE, I. G., HAMPSON, F. C., DETTMAR, P. W. e SKJÅK-BRÆK, G. (1998) The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate beads by coating with chitosan. **Int. J. Pharm.** 175, 237-246.
- GEORGE, M. e ABRAHAM, T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. **J. Control. Rel.** 114, 1-14.
- GOHEL, M. C. e AMIN, A. F. (1998) Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design. **J. Control. Rel.** 51, 115-122.
- GOMBOTZ, W. R. e WEE, S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 31, 267-285.
- GOTO, M., MORISHITA, M., KAVIMANDAN, N., TAKAYAMA, K. e PEPPAS, N. A. (2006) Gastrointestinal transit and mucoadhesive characteristics of complexation hydrogels in rats. **J. Pharm. Sci.** 95, 462-469.
- GROBOILLOT, A., CHAMPAGNE, C. P., DARLING, G. D., PONCELET, D. e NEUFELD, R. J. (1993) Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. **Biotechnol. Bioeng.** 42, 1157-1163.
- HUGUET, M. L., NEUFELD, R. J. e DELLACHERIE, E. (1996) Calcium-alginate beads coated with polycationic polymers: comparison of chitosan and DEAE-dextran. **Proc. Biochem.** 31, 347-353.
- IBRAHIM, M. A., ISMAIL, A., FETOUH, M. I. e GOPFERICH, A. (2005) Stability of insulin during the erosion of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. **J. Control. Rel.** 106, 241-252.
- INCHEM (2007) <http://www.inchem.org>, consultado em 28/11/07.

- JANI, P., HALBERT, G. W., LANGRIDGE, J. e FLORENCE, A. T. (1990) Nanoparticle uptake by rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particles size dependency. **J. Pharm. Pharmacol.** 42, 821-826.
- JUNG, T., KAMM, W., BREITENBACH, A., KAISERLING, E., XIAO, J. X. e KISSEL, T. (2000) Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 50, 147-160.
- KAWASHIMA, Y., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, H. e KUNO, Y. (2000) Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin. **Pharm. Dev. Technol.** 5, 77-85.
- KIM, C.-K. e LEE, E.-J. (1992) The controlled release of blue dextran from alginate beads. **Int. J. Pharm.** 79, 11-19.
- KUMAR, M. N. V. R. (2000) Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **J. Pharm. Sci** 3, 234-258.
- KUMAR, T. M., PAUL, W., SHARMA, C. P. e KURIACHAN, M. A. (2005) Bioadhesive, pH responsive micromatrix for oral delivery of insulin. **Trends Biomater. Artif. Org.** 18, 198-202.
- LAMPRECHT, A., SCHÄFER, U. e LEHR, C. M. (2001) Size dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. **Pharm. Res.** 18, 788-793.
- LEACH, W. T., SIMPSON, D. T., VAL, T. N., YU, Z., LIM, K. T., PARK, E. J., ROBERT O. WILLIAMS, I. e JOHNSTON, K. P. (2005) Encapsulation of protein nanoparticles into uniform-sized microspheres formed in a spinning oil film. **AAPS Pharm. Sci.Tech.** 6, E605-E617.
- LENCKI, R. W. J., NEUFELD, R. J. e SPINNEY, T. (1989) Method of producing microspheres, Patente EUA 4822534.
- LEOBANDUNG. (2002) Preparation of stable insulin-loaded nanospheres of poly(ethylene glycol) macromers and N-isopropyl acrylamide. **J. Control. Rel.** 80, 357-363.

- LI, X., DENG, X., YUAN, M., XIONG, C., HUANG, Z., ZHANG, Y. e JIA, W. (1999) Investigation on process parameters involved in preparation of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing *Leptospira Interrogans* antigens. **Int. J. Pharm.** 178, 245-255.
- LIM, L. Y., WAN, L. S. e THAI, P. Y. (1997) Chitosan microspheres prepared by emulsification and ionotropic gelation. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 23, 981-985.
- LIU, X. D., BAO, D. C., XUE, W. M., XIONG, Y., YU, W. T., YU, X. J., MA, X. J. e YUAN, Q. (2002a) Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. **J. Appl. Polym. Sci.** 87, 848-852.
- LIU, X. D., YU, W. Y., ZHANG, Y., XUE, W. M., YU, W. T., XIONG, Y., MA, X. J., CHEN, Y. e YUAN, Q. (2002b) Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. **J. Microencapsul.** 19, 775-782.
- LIU, Z. M., BECKER, T. e NEUFELD, R. (2005) Spherical alginate granules formulated for quick-release active subtilisin. **Biotechnol. Progr.** 21, 568-574.
- MAGENHEIM, B. e BENITA, S. (1991) Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S.T.P. Pharma Sci.** 1, 221-241.
- MISIRLI, Y., OZTURK, E., KURSAKLIOGLU, H. e DENKBAS, E. B. (2005) Preparation and characterization of mitomycin-C loaded chitosan-coated alginate microspheres. **J. Microencapsul.** 22, 167-178.
- MIYAZAKI, Y., YAKOU, S., NAGAI, T. e TAKAYAMA, K. (2003) Release profiles of theophylline from microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate: effect of polyion complex formation. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 29, 795-804.
- MONSHIPOURI, M. e PRICE, R. R. (1995) Emulsification preparation of calcium alginate beads in the presence of sequesterant. **J. Microencapsul.** 12, 255-262.
- MORISHITA, M., GOTO, T., PEPPAS, N. A., JOSEPH, J. I., TORJMAN, M. C., MUNSICK, C., NAKAMURA, K., YAMAGATA, T., TAKAYAMA, K. e LOWMAN, A. M. (2004) Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: effect of particle size on insulin enteral absorption. **J. Control. Rel.** 97, 115-124.

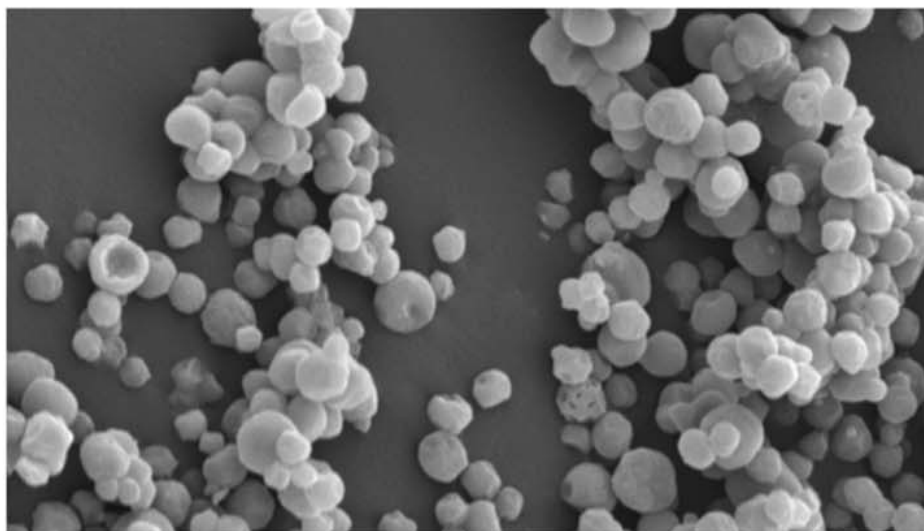
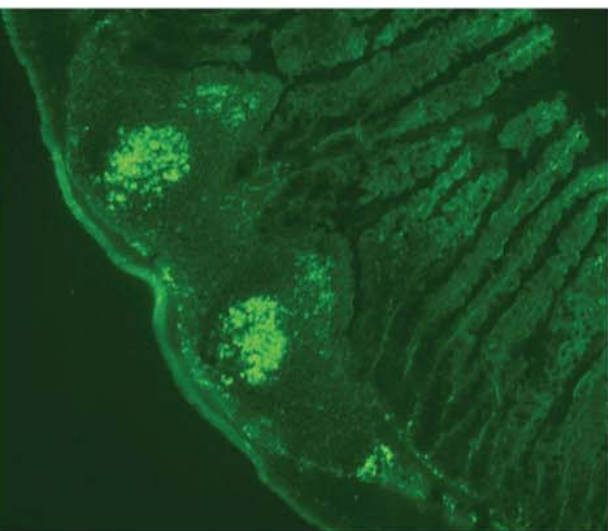
- MOSLEMY, P., GUIOT, S. R. e NEUFELD, R. J. (2002) Production of size-controlled gellan gum microbeads encapsulating gasoline-degrading bacteria. **Enz. Microb. Technol.** 30, 10-18.
- NORRIS, D. A., PURI, N. e SINKO, P. J. (1998) Effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 34, 135-154.
- ØSTBERG, T., LUND, E. M. e GRAFFNER, C. (1994) Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: IV. Release characteristics in different media. **Int. J. Pharm.** 112, 241-248.
- PAN, Y., ZHENG, J. M., ZHAO, H. Y., LI, Y. J., XU, H. e WEI, G. (2002) Relationship between drug effects and particle size of insulin-loaded bioadhesive microspheres. **Acta Pharmacol. Sin.** 23, 1051-1056.
- PATIL, G. V. (2003) Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. **Drug Dev. Res.** 58, 219-247.
- PONCELET, D. (2001) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. **Ann. New York Acad. Sci.** 944, 74-82.
- PONCELET, D., BABAK, V., DULIEU, C. e PICOT, A. (1999) A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. **Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.** 155, 171-176.
- PONCELET, D., LENCKI, R., BEAULIEU, C., HALLÉ, J. P., NEUFELD, R. J. e FOURNIER, A. (1992) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38, 39-45.
- PONCELET, D., SMET, B. P. D., BEAULIEU, C., HUGUET, M. L., FOURNIER, A. e NEUFELD, R. J. (1995) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43, 644-650.
- PRABHA, S., ZHOU, W.-Z., PANYAM, J. e LABHASETWAR, V. (2002) Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection studies with fractionated nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 244, 105-115.

- PRISTA, L. N., ALVES, A. C. e MORGADO, R. (1995) Formas farmacêuticas obtidas por dispersão mecânica. In: Prista, L. N., Alves, A. C. e Morgado, R. (eds) **Tecnologia Farmacêutica**. 5ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 597-776.
- QUONG, D. e NEUFELD, R. J. (1998) DNA protection from extracapsular nuclease, within chitosan-or poly-L-lysine-coated alginate beads. **Biotechnol. Bioeng.** 60, 124-134.
- QUONG, D., NEUFELD, R. J., SKJÅK-BRÆK, G. e PONCELET, D. (1998) External *versus* internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. **Biotechnol. Bioeng.** 57, 438-446.
- QUONG, D., O'NEIL, I. K., PONCELET, D. e NEUFELD, R. J. (1996) Gastrointestinal protection of cellular component DNA within an artificial cell system for environment carcinogen biomonitoring. In: Wijffels, R. J., Buitelaar, R. M., Bucke, C. e Tramper, J. (eds) **Immobilized cells: basics and applications**. European Chitin Society, p. 405-410.
- RABANEL, J.-M. e HILDGEN, P. (2004) Preparation of hydrogel hollow particles for cell encapsulation by a method of polyester core degradation. **J. Microencapsul.** 21, 413-431.
- RAMDAS, M., DILEEP, K. J., ANITHA, Y., PAUL, W. e SHARMA, C. P. (1999) Alginate encapsulated bioadhesive chitosan microspheres for intestinal drug delivery. **J. Biomater. Appl.** 13, 290-296.
- RAMESH, D. V., MEDLICOTT, N., RAZZAK, M. e TUCKER, I. G. (2002) Microencapsulation of FTIC-BSA into poly(ϵ -caprolactone) by a water-in-oil-in-oil solvent evaporation technique. **Trends Biomater. Artif. Org.** 15, 31-36.
- RIBEIRO, A. J., NEUFELD, R. J., ARNAUD, P. e CHAUMEIL, J. C. (1999) Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. **Int. J. Pharm.** 187, 115-123.
- RIEUX, A. D., RAGNARSSON, E. G. E., GULLBERG, E., PRÉAT, V., SCHNEIDER, Y.-J. e ARTURSSON, P. (2005) Transport of nanoparticles across an *in vitro* model of the human intestinal follicle associated epithelium. **Eur. J. Pharm. Sci.** 25, 455-465.

- RITGER, P. L. e PEPPAS, N. A. (1987) A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **J. Control. Rel.** 5, 23-36.
- SADHALE, Y. e SHAH, J. C. (1999) Stabilization of insulin against agitation-induced aggregation by the GMO cubic phase gel. **Int. J. Pharm.** 191, 51-64.
- SAEZ, A., GUZMÁN, M., MOLPECERES, J. e ABERTURAS, M. R. (2000) Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 50, 379-387.
- SAKAI, S., KAWABATA, K., ONO, T., IJIMA, H. e KAWAKAMI, K. (2005) Development of mammalian cell-enclosing subsieve-size agarose capsules (<100 µm) for cell therapy. **Biomaterials** 26, 4786-4792.
- SCHUBERT, M. A. e MÜLLER-GOYMANN, C. C. (2003) Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles-evaluation of a method and process parameters. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 55, 125-131.
- SHU, X. Z. e ZHU, K. J. (2001) Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. **J. Microencapsul.** 18, 237-245.
- SILVA, C. (2007) Aumento da biodisponibilidade oral de fármacos peptídicos recorrendo à encapsulação com alginato e quitosano. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2006a) Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. **Eur. J. Pharm. Sci.** 29, 148-159.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FIGUEIREDO, I. V., GONCALVES, A. R. e VEIGA, F. (2006b) Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. **Int. J. Pharm.** 311, 1-10.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FIGUEIREDO, M., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2006c) Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **AAPS J.** 7, E903-E913.

- SILVA-CUNHA, A., CHERON, M., GROSSIORD, J. L., PUISIEUX, F. e SEILLER, M. (1998) W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: biological activity after oral administration to normal and diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 169, 33-44.
- TAKEUCHI, H., MATSUI, Y., SUGIHARA, H., YAMAMOTO, H. e KAWASHIMA, Y. (2005) Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. **Int. J. Pharm.** 303, 160-170.
- TIN, S. S. H., BOADI, D. K. e NEUFELD, R. J. (1997) DNA encapsulation by an air-agitated liquid-liquid mixer. **Biotechnol. Bioeng.** 56, 464-470.
- TIYABOONCHAI, W., WOISZWILLO, J., SIMS, R. C. e MIDDGAUGH, C. R. (2003) Insulin containing polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 255, 139-151.
- URBANO, A. P. A. (2004) Microencapsulação de fármacos peptídicos em pectina pelo método emulsificação/gelificação interna: a albumina como fármaco modelo. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- VANDENBERG, G. W., DROLET, C., SCOTT, S. L. e NOUÈ, J. D. L. (2001) Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. **J. Control. Rel.** 77, 297-307.
- VANDENBERG, G. W. e NOUÈ, J. D. L. (2001) Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation. **J. Microencapsul.** 18, 433-441.
- VLADISAVLJEVIC, G. T. e WILLIAMS, R. A. (2005) Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. **Adv. Coll. Interf. Sci.** 113, 1-20.
- WANG, C. Y., JIANG, W. Q., ZHOU, Y., WANG, Y. N. e CHEN, Z. Y. (2000) Synthesis of [alpha]-Fe ultrafine particles in a saturated salt solution/isopropanol/PVP microemulsion and their structural characterization. **Mat. Res. Bull.** 35, 53-58.

- YAMAMOTO, A., TANIGUCHI, T., RIKYUU, K., TSUJI, T., FUJITA, T., MURAKAMI, M. e MURANISHI, S. (1994) Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. **Pharm. Res.** 11, 1496-1500.
- YOU, J. O., PARK, S. B., PARK, H. Y., HAAM, S., CHUNG, C. H. e KIM, W. S. (2001) Preparation of regular sized Ca-alginate microspheres using membrane emulsification method. **J. Microencapsul.** 18, 521-532.
- ZHI, J., WANG, Y. e LUO, G. (2005) Adsorption of diuretic furosemide onto chitosan nanoparticles prepared with a water-in-oil nanoemulsion system. **React. Funct. Polym.** 65, 249-257.



REDUÇÃO DA LIBERTAÇÃO DA
INSULINA DURANTE A INCUBAÇÃO
DAS NANOESFERAS EM MEIO ÁCIDO

CAPÍTULO III

1. INTRODUÇÃO

No trabalho exposto no capítulo anterior, verificou-se ser possível a transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica. Pelos resultados obtidos no capítulo anterior e para os estudos que se seguem, o termo de *partícula* será substituído pelo de *nanoesferas*.

No entanto, durante a transposição de escala, surgiu uma outra dificuldade relacionada com a percentagem de insulina libertada em meio ácido (tampão HCl/KCl de pH 1,2). De facto, é importante que os sistemas de administração de insulina apresentem uma elevada EE, mas, também é importante que estes sistemas apresentem uma grande estabilidade para impedirem ou, pelo menos, limitarem a libertação do fármaco encapsulado antes do seu local de acção. Os ensaios de libertação *in vitro* anteriores demonstraram claramente a incapacidade de retenção da insulina nas nanoesferas de alginato em meio ácido. A ser assim, a insulina seria libertada das nanoesferas precocemente no estômago, mesmo antes de chegar à mucosa intestinal que deverá ser o seu local de absorção.

Tornou-se, assim, essencial desenvolver uma ou várias estratégias que reduzissem a libertação da insulina até esta chegar ao seu local de absorção. Na literatura estão descritos variadíssimos factores que influenciam a libertação de fármacos a partir de partículas de alginato (Al-Zahrani, 1999; Liew *et al.*, 2006). Existem, contudo, alternativas que permitem modular essa libertação e que consistem na alteração do próprio polímero de alginato (George e Abraham, 2006) ou na alteração de outros parâmetros de processo e/ou formulação (Silva *et al.*, 2006a).

No presente trabalho, a estratégia inicial para controlar a libertação de fármacos a partir de partículas poliméricas consistiu na alteração do tipo de alginato. Tal como descrito no Capítulo I, a composição do monómero de alginato tem um grande impacto nas propriedades de libertação de fármacos a partir de partículas poliméricas (Takka e Acarturk, 1999). A libertação de fármacos, a partir de partículas de alginato, é geralmente modulada por um processo de difusão através de um intumescimento da matriz e da dissolução/erosão da matriz (Tonnesen e Karlsen, 2002). Dependendo do teor de resíduos M e G no alginato, este

forma, com menor ou maior facilidade, geles quando contacta com iões divalentes. A razão entre os resíduos M e G condiciona, em larga medida, a reticulação com iões cálcio (Takka e Acarturk, 1999). Por outro lado, a viscosidade é um parâmetro igualmente relevante para a gelificação, uma vez que a afinidade para os iões cálcio e as propriedades do gel resultante estão normalmente relacionadas com a viscosidade do alginato. No presente trabalho, pretende-se estudar a influência do tipo de alginato na granulometria, no teor de insulina, na EE mas, principalmente, na percentagem de libertação de insulina em meio ácido. É, ainda, apresentado um estudo adicional da determinação do PM dos tipos de alginatos que demonstraram a menor granulometria em relação ao alginato utilizado no protocolo base.

A segunda estratégia para controlar a libertação de fármacos a partir de partículas poliméricas consistiu em adicionar outros polímeros à matriz de alginato. Esta estratégia foi baseada em estudos anteriores, nos quais a matriz de alginato foi reforçada com derivados celulósicos, designadamente a hidroxipropilmetilcelulose (Heng *et al.*, 2000; Kidane *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006), a hidroxipropilcelulose (Tonnesen e Karlsen, 2002), a metilcelulose (Kidane *et al.*, 2002; El-Kamel *et al.*, 2003), a etilcelulose (Bodmeier e Wang, 1993; Chan e Heng, 1998; Chan e Heng, 2002; Tonnesen e Karlsen, 2002), o acetofalato de celulose (Pillay *et al.*, 2002) e o acetato-butirato de celulose (Miyazaki *et al.*, 2003); polímeros acrílicos (Gürsoy *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Sajeesh e Sharma, 2004); gomas de origem natural como, por exemplo, a goma xantana (Elcin, 1995), a goma guar (Roy *et al.*, 2005) e o glucomanano de konjac (Wang e He, 2002); e outros polímeros, como a pectina (Liu e Krisham, 1999; Tonnesen e Karlsen, 2002; Pillay *et al.*, 2005), a gelatina (Almeida e Almeida, 2004), o sulfato de dextrano (Tiyaboonchai *et al.*, 2003), a polivinilpirrolidona (Chan e Heng, 1998; Chan e Heng, 2002), o sulfato de condroitina (Murata *et al.*, 1996; Sinha e Kumria, 2001) e o quitosano (Sezer e Akbugaea, 1999; Lee *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2003).

Relativamente a partículas de alginato contendo insulina, também estão descritos alguns estudos relacionados com o reforço da matriz polimérica e, neste caso, exclusivamente para macro e micropartículas. O polímero glucomanano de konjac foi utilizado no reforço de macroesferas de alginato (Wang e He, 2002). A EE de insulina com a matriz de alginato

reforçada aumentou ligeiramente (cerca de 5%) e a libertação de insulina, durante incubação em meio ácido, foi ligeiramente inferior (cerca de 13% ao fim de 4 h de incubação). Foram ainda preparadas macropartículas de insulina constituídas por alginato com glutaraldeído e revestidas com quitosano (Onal e Zihnioglu, 2002), em que cerca de 40% da insulina foi libertada ao final de 6 h em meio ácido (Onal e Zihnioglu, 2002). A insulina foi, ainda, encapsulada em micropartículas de ácido polimetacrílico e alginato (Sajeesh e Sharma, 2004) e nos ensaios de libertação *in vitro*, observou-se que cerca de 30% da insulina foi libertada em meio ácido 2 h após o início do ensaio.

Os polímeros para o reforço da matriz de alginato deverão apresentar carga eléctrica negativa por duas razões. Uma dessas razões é o facto de possuírem a mesma carga do alginato e, conseqüentemente, a formação de complexos entre as duas espécies químicas será praticamente improvável. Se ocorresse interacção entre os dois polímeros através, por exemplo, da manipulação de pH, a formação de complexos polielectrolíticos poderia condicionar a EE de insulina. Por outro lado, a outra razão relaciona-se com a interacção polímero-fármaco. Sabe-se que a interacção entre a insulina e o alginato é maioritariamente de natureza electrostática e é precisamente esse facto que condiciona a elevada EE descrita no trabalho do capítulo anterior. A adição de outro polímero aniónico poderia aumentar a retenção da insulina na matriz de alginato, uma vez que esta seria mais densa e a difusão do fármaco encapsulado seria mais dificultada (Chan *et al.*, 1997).

Os polímeros aniónicos seleccionados para o presente estudo foram: a carboximetilcelulose sódica, o polifosfato de sódio, o sulfato de celulose e o sulfato de dextrano. Os parâmetros estudados foram a granulometria e a morfologia das partículas, EE e a percentagem de libertação da insulina durante incubação das nanoesferas em meio ácido. Numa fase seguinte, foi realizado um estudo relativo à optimização da concentração do polímero aniónico com os melhores resultados nos parâmetros anteriores.

A carboximetilcelulose sódica é um polímero semi-sintético e hidrossolúvel. Quimicamente, trata-se do sal sódico de um policarboximetiléter da celulose, com um PM que varia entre 90 a 700 kDa e um valor de pK_a de 4,3. A carboximetilcelulose sódica foi utilizada em trabalhos anteriores (Gürsoy *et al.*, 1999) como polímero aniónico na área da

encapsulação devido aos seus grupos COO^- livres que interagiram com o fármaco encapsulado na matriz de alginato. Já o polifosfato de sódio é um composto, com um comprimento de cadeia de, em média, 12 monómeros e um PM inferior à carboximetilcelulose sódica (cerca de 1,3 kDa). O polifosfato de sódio possui grupos fosfato livres que poderão interagir com o fármaco encapsulado na matriz de alginato. O polifosfato de sódio foi utilizado na microencapsulação da insulina em micropartículas de alginato (Timmy *et al.*, 2002). O sulfato de celulose é um derivado da celulose, sulfatado com um grau de substituição que pode variar de 0,3 a 2,5 grupos sulfato por resíduo glicosídico. O PM está normalmente compreendido entre 2000-3000 kDa. É geralmente solúvel em água e utiliza-se, com frequência, como agente encapsulante de células (Dautzenberg *et al.*, 1999; Canaple *et al.*, 2002). O sulfato de celulose possui grupos sulfato livres que poderão interagir com o fármaco encapsulado na matriz de alginato. Por fim, o sulfato de dextrano é um polímero derivado da glucose, obtido a partir da *Leuconostoc mesenteroides*. É ramificado, contém aproximadamente 2,3 grupos de sulfato por resíduo glicosídico e possui um PM de cerca de 5 kDa. O sulfato de dextrano, tal como sulfato de celulose, possui grupos sulfato livres que poderão interagir com o fármaco encapsulado. É considerado um ácido forte (Kamiya e Klibanov, 2003). De uma forma geral, o sulfato de dextrano possui elevada pureza e estabilidade, comportando-se de maneira muito semelhante a mucopolissacáridos naturais como, por exemplo, o sulfato de condroitina. Este polímero é muito utilizado para precipitar selectivamente lipoproteínas, reacções de hibridização e em reacções de estabilização de proteínas. É considerado um polímero aniónico forte que interage com iões isolados como, por exemplo, o cálcio, ou com outros polímeros de natureza policatiónica. O sulfato de dextrano foi utilizado como polímero aniónico na produção de nanopartículas de polietilenimina (Tiyaboonchai *et al.*, 2003).

Complementar ao objectivo do presente trabalho, estudou-se também a melhor razão de cálcio/alginato (m/m). Sabe-se que no trabalho descrito no capítulo anterior, a razão cálcio/alginato foi de 16,7% (m/m). A concentração de cálcio em excesso foi realizada propositadamente de forma a assegurar a gelificação completa do alginato. Nesta fase, pretendeu-se estudar a melhor razão de cálcio/alginato após o reforço da matriz do alginato

com sulfato de dextrano. Os parâmetros estudados (descritos separadamente na secção dos métodos) foram: a granulometria das nanoesferas, o aspecto e a variação da viscosidade do gel de alginato de cálcio, o doseamento do ião cálcio por absorção atômica, o teor e a EE da insulina e, finalmente, a percentagem de libertação da insulina durante incubação das nanoesferas em meio ácido. Além da necessidade de identificar a melhor razão de massa entre o cálcio e o alginato, a concentração de ácido necessário para solubilizar o sal de cálcio foi também alvo de estudo. Foram avaliados os seguintes parâmetros: a granulometria das nanoesferas, o teor e a EE da insulina, a percentagem de libertação da insulina durante incubação das nanoesferas em meio ácido e a variação de pH ao longo da gelificação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os diferentes tipos de alginatos de sódio estudados encontram-se descritos na Tabela III-1. O carbonato de cálcio ultrafino, o agente emulsivo (Span[®] 80), a parafina líquida e a insulina foram os indicados no Capítulo II. A carboximetilcelulose sódica, o polifosfato de sódio, o sulfato de celulose e o sulfato de dextrano foram adquiridos à Akzo Nobel (Amersfoot, Holanda), Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha), Acros Organic (Geel, Bélgica) e Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), respectivamente. A água desionizada utilizada na preparação de soluções foi obtida a partir de um sistema Millipore Elix 5 (Bedford, MA, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico, já indicados no Capítulo II.

Tabela III-1. Diferentes tipos de alginato, fornecedores e algumas características físico-químicas.

Nome	Fornecedor	Teor em resíduos G	Viscosidade
Algogel 3541	Degussa Texturant Systems (Boulogne-Billancourt, França)	Elevado	Média
Manugel DMB	ISP (San Diego, EUA)	Elevado	Elevada
Manucol LB	ISP (San Diego, EUA)	Baixo	Baixa
Keltone HVCR	ISP (San Diego, EUA)	Médio	Elevada
Keltone LVCR	ISP (San Diego, EUA)	Médio	Baixa
A0682*	Sigma (St. Louis, MO, EUA)	Baixo	Baixa

*Código do produto no fornecedor. O produto A0682 é o ácido alginico sob a forma de sal sódico.

2.2. Preparação das nanoesferas de alginato

Numa primeira fase, as nanoesferas de alginato foram preparadas segundo o protocolo descrito no trabalho do Capítulo II (após a transposição do método à escala nanométrica, englobando as fases de produção e recuperação das partículas de alginato), variando o tipo de alginato de acordo com a Tabela III-1. Resumidamente, foi preparada uma solução de alginato por dissolução do polímero a 2% (m/V) em 40 mL de água desionizada a pH 6,4 sob agitação lenta (100 rpm, 16-18 h), num agitador de movimento orbital. Após dissolução do alginato de sódio, uma solução de insulina a 100 UI/mL (10 mL) foi adicionada, lentamente, à solução anterior. Depois da homogeneização, a solução foi deixada em repouso, pelo menos, 1 h para desgaseificar.

Uma suspensão aquosa de carbonato de cálcio ultrafino a 5% (m/V) foi sujeita a sonicação (20 KHz, output 70, Vibra-Cell[®] VC 130, Sonics, Newton, CT, EUA) durante 30 min, e 8,3 mL desta suspensão foram adicionados à solução de alginato de sódio-insulina, de modo a obter uma razão cálcio/alginato de 16,7% (m/m). Após homogeneização, a mistura foi transferida para um reactor de fundo redondo, contendo 50 mL de parafina líquida (razão A/O de 50/50, V/V) e um agente emulsivo (Span[®] 80) a 1,5% (V/V). A dispersão das duas fases foi conseguida por agitação a uma velocidade de 1600 rpm, utilizando um agitador Ika[®] Eurostar (Staufen, Alemanha) provido de uma hélice marinha de três lâminas (diâmetro 5,2 cm). O período de emulsificação foi de 15 min e, seguidamente, adicionaram-se 20 mL de parafina líquida contendo 833 µL de ácido acético glacial (razão molar ácido/cálcio de 3,5) para solubilizar o carbonato de cálcio e permitir a gelificação do alginato. As nanoesferas de alginato resultantes e dispersas na fase oleosa foram recuperadas, segundo o protocolo descrito no Capítulo II, por adição de 100 mL de uma solução contendo tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII) e agentes desidratantes (tampão acetato de pH 4,5, acetona, isopropanol e n-hexano, 70:15:10:5 (V/V)), seguida de centrifugação (12.500 × g, 10 min). O tempo de centrifugação foi mais curto em relação ao indicado no trabalho do capítulo anterior por uma questão de operacionalidade e rapidez do processo. Essa alteração do período de centrifugação não modificou nenhum dos parâmetros analisados no capítulo anterior. O ciclo

de lavagem foi efectuado mais três vezes, mas adicionando à emulsão fraccionada apenas 50 mL de tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII).

As nanoesferas de alginato foram liofilizadas a 0°C durante 48 h (Lyph-Lock 6, Labconco, Kansas City, MS, EUA), após congelamento da suspensão de nanoesferas de alginato a -50°C num banho de etanol a 96% (V/V) (Benchtop Shell Freezer, Freezone® modelo 79490, Labconco). Analogamente, foram preparadas nanoesferas de alginato vazias, isto é, sem adição de insulina.

Numa segunda fase, o protocolo de preparação das nanoesferas de alginato foi semelhante ao anterior mas à solução do tipo de alginato otimizado foi adicionado um polímero aniónico a 0,5% (m/V). Os polímeros adjuvantes utilizados foram: carboximetilcelulose sódica, polifosfato de sódio, sulfato de celulose e sulfato de dextrano. A formulação com os melhores resultados em termos de granulometria, EE e percentagem de insulina libertada em meio ácido foi sujeita a um estudo adicional de optimização da concentração do polímero aniónico compreendida entre 0 a 1% (m/V).

Foi ainda realizado um estudo complementar sobre a razão cálcio/alginato (m/m) na formulação, contendo o tipo de alginato de sódio otimizado, o tipo polímero aniónico otimizado e à concentração otimizada. O único parâmetro que se alterou foi a razão cálcio/alginato, a qual esteve compreendida entre 2,5% e 16,7% (m/m). Numa última fase, foi realizado um outro estudo sobre a concentração de ácido necessária para solubilizar o carbonato de cálcio na formulação. Variou-se apenas a razão molar de ácido/cálcio (1,5 a 3,5), mantendo o tipo de alginato, o tipo e a concentração do polímero aniónico e a razão cálcio/alginato (m/m) otimizados.

2.3. Caracterização granulométrica das nanoesferas de alginato

A distribuição granulométrica e a polidispersividade das nanoesferas de alginato foram determinadas de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

2.4. Caracterização morfológica das nanoesferas de alginato

A morfologia das nanoesferas de alginato com a matriz reforçada foi determinada de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

2.5. Peso molecular (PM) do alginato de sódio das nanoesferas com a menor granulometria

O método utilizado para calcular o PM do alginato baseou-se na determinação da viscosidade intrínseca, recorrendo a um viscosímetro capilar denominado por Ubbelohde (Canon Instruments, Corporation, State College, Canadá). O viscosímetro encontra-se representado na Figura III-1.

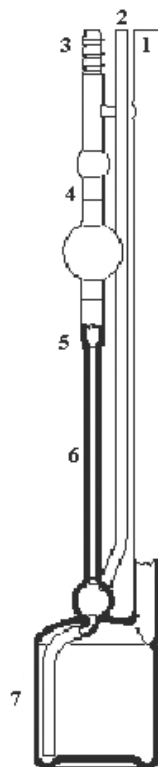


Figura III-1. Viscosímetro capilar de Ubbelohde com uma pressão de $2,564 \times 10^{-3} \text{ mm}^2\text{s}^{-2}$. Componentes: 1) tubo a preencher, 2) tubo de saída, 3) tubo com capilar, 4) local de medição do tempo de percurso, 5) capilar, 6) tubo com *dome-shaped* e 7) vaso reservatório.

A relação entre o PM e a viscosidade pode ser expressa pela Equação III-1, de Mark-Houwink (Martinsen *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1997). A viscosidade intrínseca é

afectada, não só pelo PM, mas também pela flexibilidade das cadeias do polímero, sendo esta última determinada pela composição química (Johnson *et al.*, 1997). O viscosímetro Ubbelohde determina a viscosidade relativa de acordo com o tempo que um líquido demora a percorrer um determinado capilar. No presente trabalho, utilizou-se o valor de a de 1. Este valor foi baseado em estudos anteriores (Smidsrød e Haug, 1968). Quando a é 1, assume-se que não existem interações hidrodinâmicas entre as macromoléculas e o solvente. As amostras foram preparadas a 0,1% (m/V) em NaCl a 0,1 M. A partir desta solução, foram preparadas diluições consecutivas para obter concentrações mais baixas. Para este solvente, o valor de K é 2×10^{-5} (Smidsrød e Haug, 1968; Johnson *et al.*, 1997). O ensaio foi realizado em triplicado e a viscosidade foi determinada segundo a Equação III-2.

$$(\eta) = k \times (PM)^a \quad \text{Equação III-1}$$

em que η é a viscosidade intrínseca, PM é o peso molecular do polímero e K e a são coeficientes empíricos dependentes da temperatura e do solvente.

$$(\eta) = 2 \times 10^{-5}(PM) \quad \text{Equação III-2}$$

A viscosidade específica, η_{sp} , foi determinada de acordo com a Equação III-3, em que V_c e V_o são as viscosidades cinemáticas das soluções de alginato e do solvente, respectivamente. A viscosidade intrínseca η determinou-se por regressão linear, de acordo com a equação de Huggins (Equação III-4), em que C é a concentração de alginato e k' é a constante de Huggins (Østberg *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994).

$$(\eta_{sp}) = \frac{V_c - V_o}{V_o} \quad \text{Equação III-3}$$

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = \eta + k' \times (\eta)^2 \times C \quad \text{Equação III-4}$$

2.6. Determinação do teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

O teor e EE da insulina foram determinados segundo as condições descritas no Capítulo II. Uma quantidade de nanoesferas de alginato liofilizadas (10 mg) foi incubada em 10 mL de tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXVIII) sob agitação magnética (100 rpm, 2 h). De seguida, a suspensão foi centrifugada ($12.500 \times g$, 10 min) e as nanoesferas de alginato depositadas foram transferidas para 10 mL de tampão fosfato de pH 6,8 (USP XXVIII) e submetidas a agitação magnética (100 rpm, 1 h) até dissolução completa. A quantidade de insulina libertada no sobrenadante, após as incubações em tampão de pH 1,2 e 6,8, foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce, Pittsburgh, EUA) utilizando um comprimento de onda de 595 nm. O teor (%) e a EE (%) da insulina foram calculados com base na Equação II-5 e Equação II-6, respectivamente. A insulina libertada a pH 1,2 (%) foi calculada através da Equação III-5.

$$\text{Insulina libertada a pH 1,2 (\%)} = \frac{\text{Insulina libertada a pH 1,2}}{\text{Total insulina libertada (pH 1,2 + pH 6,8)}} \times 100 \quad \text{Equação III-5}$$

Estudo complementar:

2.7. Influência da razão cálcio/alginato (m/m) na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano

2.7.1. Granulometria das nanoesferas

A granulometria e a polidispersividade das nanoesferas de alginato foram determinadas de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

2.7.2. Aspecto e viscosidade do gel de alginato de cálcio

Inicialmente, foi determinada a viscosidade de soluções compostas apenas por alginato a 2% (m/V) (*alginato*); alginato a 2% (m/V) e cálcio a diferentes razões (2,5, 5,0, 7,0, 10,0 e 16,7%, m/m) (*alginato-cálcio*) e o gel de alginato de cálcio (*gel alginato-cálcio*) com diferentes razões cálcio/alginato (m/m). Em todas as situações, a razão molar de ácido/cálcio foi de 3,5. Nestes estudos de viscosidade recorreu-se a um viscosímetro rotacional (Visco Star plus, Fungilab, S.A., Barcelona, Espanha), a uma temperatura constante de 22°C. A mesma experiência foi realizada na presença do polímero aniônico e na concentração otimizada. As diferentes etapas à semelhança das anteriores foram designadas de *alginato-polímero aniônico*, *alginato-cálcio-polímero aniônico* e finalmente, *gel de alginato-cálcio-polímero aniônico*. Foram obtidas fotografias de todas as soluções descritas anteriormente.

2.7.3. Determinação do teor de cálcio

O teor de cálcio foi determinado através de absorção atômica, recorrendo a um espectrofotómetro de absorção atômica (Analytical Jena, modelo AAS 5 FL, Jena, Alemanha) com uma linha de emissão do cálcio de 422,7 nm, equipado com uma lâmpada de cátodo oco de cálcio e chama de protóxido de azoto/acetileno. O fluxo de combustível foi de 197 nL/h com um fluxo de injeção de 5 mL/min. Foram preparadas soluções padrão com concentrações conhecidas de cálcio (1, 2, 3, 4 e 5 µg de cálcio/mL), a partir de uma solução stock de cálcio de 1000 µg/mL. O solvente utilizado na análise continha ácido clorídrico concentrado a 5% (V/V) e cloreto de lantânio (protocolo interno do UCQFarma). As nanoesferas de alginato (10 mg), contendo diferentes razões cálcio/alginato (m/m), foram incubadas em 10 mL de tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM e sob agitação magnética (100 rpm, 1 h). De seguida, a suspensão resultante foi diluída com o mesmo solvente das soluções padrão.

2.7.4. Determinação do teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

O teor, EE e a percentagem de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido foram determinados de acordo com as condições descritas no Capítulo II e na Secção 2.6. do presente capítulo.

2.8. Influência da razão molar ácido/cálcio na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano e com a razão cálcio/alginato (m/m) otimizada

2.8.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

A granulometria e a polidispersividade das nanoesferas de alginato foram determinadas de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

2.8.2. Variação de pH ao longo do processo de gelificação

A variação de pH da solução foi determinada, através de um potenciómetro (pH 526, WTW, Weilheim, Alemanha), ao longo de todo o processo de preparação das nanoesferas de alginato, desde a mistura dos polímeros na concentração otimizada, seguida da dispersão do sal de cálcio (concentração de cálcio otimizada) na solução dos polímeros e durante a gelificação do alginato. Foram estudadas as razões molares de ácido/cálcio de 1,5, 2, 3 e 3,5.

2.8.3. Determinação do teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

O teor, EE e a percentagem de libertação da insulina durante a incubação das nanoesferas em meio ácido foram determinados de acordo com as condições descritas no Capítulo II e na Secção 2.6. do presente capítulo.

2.9. Análise estatística

O teor de insulina, EE e percentagem de insulina libertada durante em incubação em meio ácido é apresentado como a média \pm D.P.. As diferenças estatísticas foram avaliadas por análise da variância (ANOVA), seguida de um pós-teste de Dunnett. Para um valor de P inferior a 0,05, considerou-se que a diferença era significativa. O programa informático utilizado foi o Prisma Version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Tipo de alginato

3.1.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

As nanoesferas de alginato produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna foram caracterizadas em termos de distribuição granulométrica, através de difracção laser, como mostra a Figura III-2. Os resultados obtidos revelaram que o tipo de alginato influenciou a distribuição granulométrica das nanoesferas resultantes. As nanoesferas preparadas com alginato de baixo teor em resíduos G e de baixa viscosidade apresentaram granulometrias inferiores e uma curva da distribuição granulométrica mais estreita em relação aos restantes alginatos. A distribuição granulométrica foi unimodal em todas as formulações. Entre os dois alginatos de baixo teor em G e de baixa viscosidade, o alginato A0682 apresentou uma menor polidispersividade comparativamente com o Manucol LB (Tabela III-2).

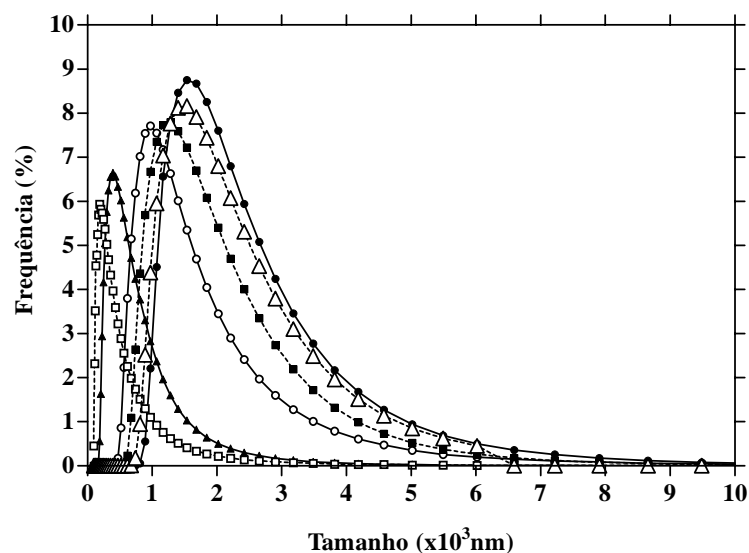


Figura III-2. Distribuição granulométrica das nanoesferas obtidas com diferentes tipos de alginatos: Allogel 3541 (--Δ--), Manugel DMB (--■--), Manucol LB (--□--), Keltone HVCR (—●—), Keltone LVCR (—○—) e alginato A0682 (—▲—).

Tabela III-2. Influência do tipo de alginato nas características granulométricas, expressas em número, das nanoesferas de alginato contendo insulina.

Alginato	D₁₀ (nm)	D₅₀ (nm)	D₉₀ (nm)	Factor SPAN
Algogel 3541	1168	1842	3485	1,26
Manugel DMB	974	1536	3181	1,44
Manucol LB	144	272	741	2,19
Keltone HVCR	1280	2018	3817	1,26
Keltone LVCR	741	1280	2652	1,49
A0682	272	515	1168	1,74

Nota: D₉₀, D₁₀ e D₅₀ são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das nanoesferas de alginato totais.

3.1.2. Peso molecular (PM) do alginato das nanoesferas com a menor granulometria

O PM médio do alginato, com os quais foi obtida a menor granulometria das nanoesferas, foi determinado através da viscosidade intrínseca e calculado com base nas Equações III-1 a III-4. Os alginatos analisados foram Algogel 3541 (utilizado no Capítulo II), Manucol LB e o alginato A0682. Os pesos moleculares obtidos foram 593, 253 e 267 kDa, respectivamente.

3.1.3. Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

De acordo com a Tabela III-3, os diferentes tipos de alginatos apresentaram um teor e uma EE muito semelhantes. O teor de insulina variou proporcionalmente com a EE, uma vez que a razão fármaco/polímero foi mantida constante. Os valores de insulina libertada em meio ácido estavam compreendidos entre 48 a 66% da quantidade inicial contida nas nanoesferas de alginato. Os alginatos de baixa viscosidade e baixo teor em resíduos G libertaram menos

insulina durante a incubação das nanoesferas em meio ácido. As diferenças foram significativas em relação ao Algogel 3541 ($P = 0,0094$).

Tabela III-3. Teor de insulina, EE e quantidade de insulina libertada a pH 1,2 das nanoesferas de alginato preparadas com diferentes tipos de alginatos (valor médio \pm D.P., $n = 3$). * $P < 0,05$ por comparação com as nanoesferas de alginato com Algogel 3541.

Alginato	Teor (%, m/m)	EE (%)	Insulina libertada a pH 1,2 (%)
Algogel 3541	2,72 \pm 0,20	80,37 \pm 10,60	65,14 \pm 9,70
Manugel DMB	2,85 \pm 0,50	84,39 \pm 4,98	64,72 \pm 5,54
Manucol LB	2,47 \pm 0,08	73,37 \pm 1,58	50,81 \pm 6,89*
Keltone HVCR	2,64 \pm 0,30	78,49 \pm 0,42	60,25 \pm 3,47
Keltone LVCR	2,43 \pm 0,66	71,79 \pm 5,78	65,82 \pm 2,42
A0682	2,55 \pm 0,12	74,72 \pm 5,55	47,74 \pm 5,30*

Nota: A quantidade de insulina libertada a pH 1,2 é baseada no valor do teor de insulina presente nas nanoesferas.

3.2. Tipo de polímero aniónico

3.2.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

Atendendo aos resultados obtidos, nomeadamente o factor SPAN, a EE e a percentagem de insulina libertada a pH 1,2, o tipo de alginato a utilizar nas etapas subsequentes foi o alginato de baixo teor em resíduos G e de baixa viscosidade, especificamente, o alginato A0682.

No que diz respeito ao reforço da matriz com polímeros aniónicos, a Figura III-3 mostra que a distribuição granulométrica foi muito semelhante às nanoesferas de alginato sem a matriz reforçada, à excepção da carboximetilcelulose sódica e do sulfato de celulose, cuja curva da distribuição granulométrica se apresentou ligeiramente desviada para a direita.

Graficamente, a curva da distribuição granulométrica das nanoesferas de alginato com polifosfato de sódio encontrava-se sobreposta relativamente às nanoesferas de alginato sem a matriz reforçada.

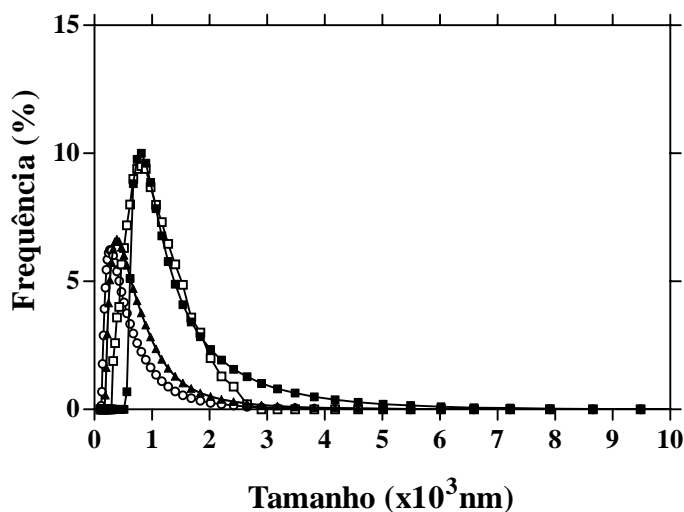


Figura III-3. Distribuição granulométrica das nanoesferas sem polímero aniônico (—) e nanoesferas de alginato com diferentes polímeros aniônicos na matriz: carboximetilcelulose sódica (—□—), polifosfato de sódio (—▲—), sulfato de celulose (—■—) e sulfato de dextrano (—○—).

A distribuição granulométrica foi unimodal para todas as formulações. O factor SPAN das nanoesferas de alginato com a matriz reforçada com o polímero aniônico foi ligeiramente inferior, comparativamente às nanoesferas de alginato sem a matriz reforçada (Tabela III-4), à exceção do polifosfato de sódio.

Tabela III-4. Influência do polímero aniônico nas características granulométricas, expressas em número, das nanoesferas de alginato contendo insulina.

Polímero aniônico	D₁₀ (nm)	D₅₀ (nm)	D₉₀ (nm)	Factor SPAN
-----	272	515	1168	1,74
Carboximetilcelulose sódica	741	1067	2210	1,38
Polifosfato de sódio	298	564	1280	1,74
Sulfato de celulose	677	1402	2652	1,41
Sulfato de dextrano	110	158	358	1,57

Nota: D₉₀, D₁₀ e D₅₀ são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das nanoesferas de alginato totais.

3.2.2. Caracterização morfológica das nanoesferas

A morfologia das nanoesferas de alginato produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna, com e sem a matriz reforçada com polímeros aniônicos, foi caracterizada através de SEM. A Figura III-4 mostra que as nanoesferas formadas apenas por alginato se apresentavam esféricas, apresentando algumas estruturas tubulares disformes à sua superfície. No que respeita à morfologia após a adição de polímeros aniônicos à matriz de alginato, a forma esférica manteve-se para todos os tipos de nanoesferas (Figura III-5). No que concerne às estruturas tubulares, estas sofreram uma modificação significativa, consoante o tipo de polímero utilizado. A presença destas estruturas foi observada na formulação contendo carboximetilcelulose sódica e polifosfato de sódio. Nas nanoesferas de alginato reforçadas com sulfato de celulose, a quantidade de estruturas tubulares foi bastante menor e completamente ausente no caso de nanoesferas de alginato reforçadas com sulfato de dextrano.

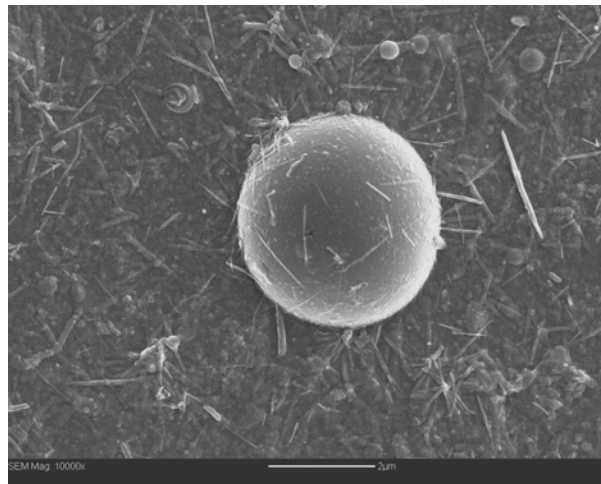


Figura III-4. Fotografia de SEM: morfologia da superfície de uma nanoesfera de alginato contendo insulina e sem polímeros aniônicos (ampliação 10.000 ×).

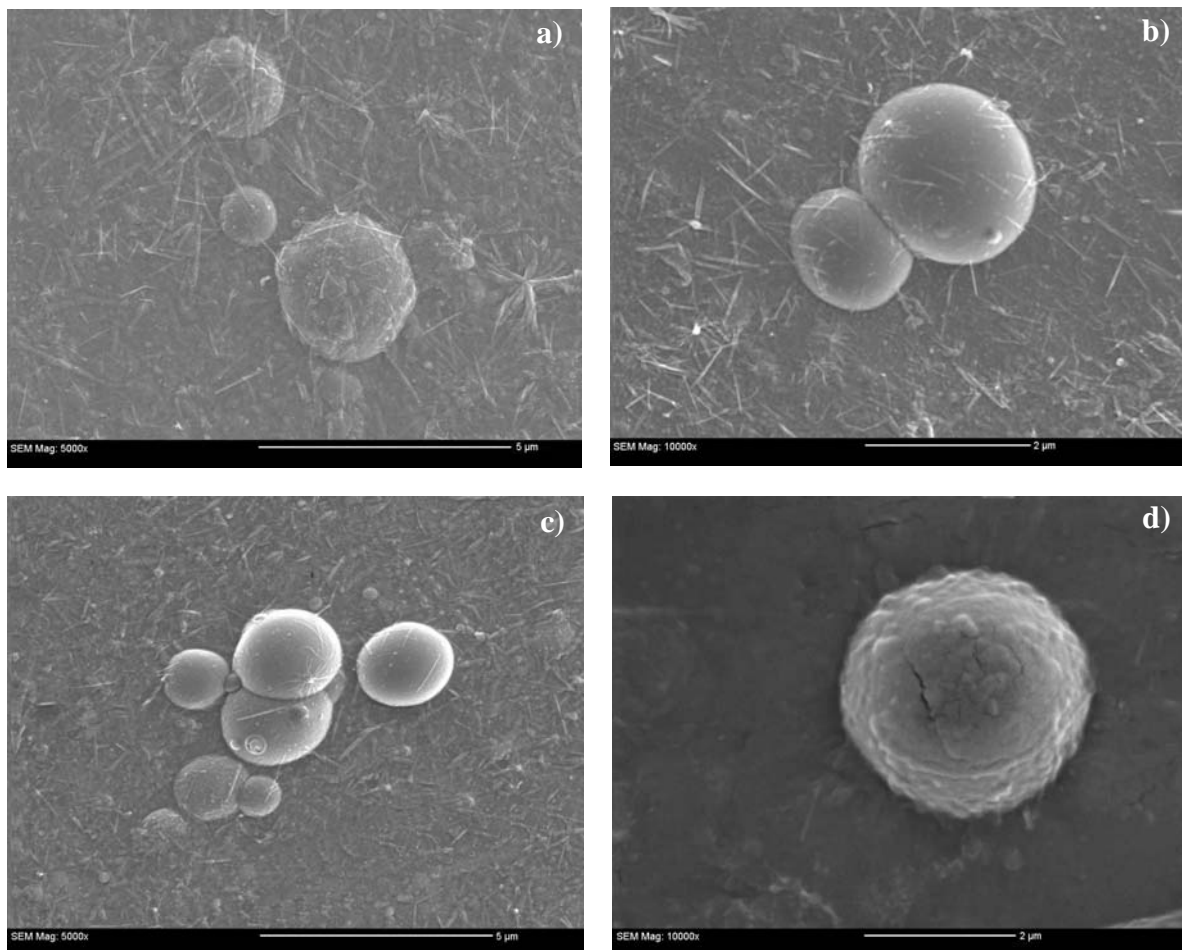


Figura III-5. Fotografia de SEM: morfologia da superfície de nanoesferas de alginato contendo insulina e polímeros aniônicos: a) carboximetilcelulose sódica (ampliação 5000 ×), b) polifosfato de sódio (ampliação 10.000 ×), c) sulfato de celulose (ampliação 5000 ×) e d) sulfato de dextrano (ampliação 10.000 ×).

3.2.3. Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

A incorporação do polímero aniônico na matriz de alginato causou uma ligeira diminuição do teor teórico de insulina nas nanoesferas de alginato. O teor de insulina nas nanoesferas de alginato esteve compreendido entre 1,72 a 2,55% (m/m). A EE também foi influenciada pela adição do polímero aniônico à matriz de alginato (Tabela III-5). A EE diminuiu para 63% e 70%, quando as nanoesferas de alginato foram reforçadas com carboximetilcelulose sódica ($P < 0,05$) e polifosfato de sódio, respectivamente. Pelo contrário, a incorporação de sulfato de celulose e sulfato de dextrano na matriz aumentou significativamente a EE da insulina ($P = 0,0002$), para valores próximos de 90%. No que respeita à percentagem de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido, foram observadas diferenças significativas para todos os polímeros utilizados ($P < 0,0001$), à excepção da carboximetilcelulose sódica.

Tabela III-5. Teor, EE e quantidade de insulina libertada durante a incubação em meio ácido das nanoesferas reforçadas com um polímero aniônico a 0,5% (m/V): carboximetilcelulose sódica, polifosfato de sódio, sulfato de dextrano e sulfato de celulose. Os resultados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P.. * $P < 0,05$ por comparação com as nanoesferas de alginato sem polímero aniônico. ** $P < 0,01$ por comparação com as nanoesferas de alginato sem polímero aniônico.

Polímero de reforço da matriz de alginato	Teor (% m/m)	EE (%)	Insulina libertada a pH 1,2 (%)
-----	2,55 \pm 0,12	74,72 \pm 5,55	47,74 \pm 5,30
Carboximetilcelulose sódica	1,72 \pm 0,02	62,79 \pm 8,14*	47,72 \pm 0,21
Polifosfato de sódio	1,89 \pm 0,56	70,19 \pm 0,86	3,58 \pm 0,38**
Sulfato de celulose	2,39 \pm 0,89	87,22 \pm 2,89*	2,65 \pm 2,11**
Sulfato de dextrano	2,45 \pm 0,01	90,19 \pm 2,71**	2,31 \pm 0,36**

Nota: A quantidade de insulina libertada a pH 1,2 é baseada no valor do teor de insulina presente nas nanoesferas.

Pela granulometria, EE e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido, seleccionou-se o sulfato de dextrano como polímero aniónico para as etapas seguintes.

3.3. Concentração do polímero aniónico

3.3.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

Na fase seguinte, e escolhido o tipo de alginato e o polímero aniónico, foi efectuado um estudo relativo à optimização da concentração do polímero aniónico e à sua influência na granulometria. Observou-se que a concentração do polímero aniónico não influenciou a granulometria das nanoesferas obtidas. Graficamente, as curvas da distribuição granulométrica encontravam-se sobrepostas e com distribuições granulométricas unimodais e, por esse facto, não foram representadas em seguida. Relativamente ao valor do factor SPAN, as concentrações de 0,75% e 1% (m/V) de sulfato de dextrano apresentaram o menor valor, comparativamente às restantes concentrações estudadas (Tabela III-6).

Tabela III-6. Influência da concentração do polímero aniónico, adicionado à matriz de alginato, nas características granulométricas, expressas em número, das nanoesferas contendo insulina.

Sulfato de dextrano (%, m/V)	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
-----	272	515	1168	1,74
0,25	189	358	889	1,96
0,5	110	158	358	1,57
0,75	110	158	327	1,37
1	110	158	327	1,37

Nota: D₉₀, D₁₀ e D₅₀ são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das nanoesferas de alginato totais.

3.3.2. Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

O aumento de concentração de polímero aniônico causou uma ligeira diminuição do teor teórico de insulina nas nanoesferas. O teor de insulina nas nanoesferas diminuiu com o aumento da concentração de sulfato de dextrano. Em termos de EE, os dados experimentais demonstraram diferenças significativas entre as formulações que continham sulfato de dextrano, comparativamente à formulação sem polímero aniônico ($P = 0,0006$). As formulações que continham sulfato de dextrano na sua composição não demonstraram diferenças significativas entre si (Tabela III-7). Da mesma forma, a percentagem de insulina libertada em meio ácido foi muito semelhante nas formulações com sulfato de dextrano, mas todas elas diferentes da formulação sem sulfato de dextrano ($P < 0,0001$).

Tabela III-7. Teor, EE e quantidade de insulina libertada durante a incubação em meio ácido das nanoesferas de alginato reforçadas com sulfato de dextrano (0 a 1%, m/V). Os dados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P.. * $P < 0,01$ por comparação com as nanoesferas sem sulfato de dextrano.

Sulfato de dextrano (%, m/V)	Teor (%, m/m)	EE (%)	Insulina libertada a pH 1,2 (%)
-----	2,55 \pm 0,12	74,72 \pm 5,55	47,74 \pm 5,30
0,25	2,69 \pm 0,20	92,23 \pm 3,85*	10,91 \pm 9,90*
0,5	2,40 \pm 0,01	90,19 \pm 2,71*	2,31 \pm 0,36*
0,75	2,38 \pm 0,01	96,45 \pm 4,14*	1,54 \pm 0,99*
1	2,15 \pm 0,01*	93,59 \pm 4,05*	2,57 \pm 0,38*

Nota: A quantidade de insulina libertada a pH 1,2 é baseada no valor do teor de insulina presente nas nanoesferas.

Pelos resultados obtidos, nomeadamente granulometria, EE e percentagem de insulina libertada a pH 1,2, optou-se pela concentração de sulfato de dextrano a 0,75% (m/V).

3.4. Influência da razão cálcio/alginato (m/m) na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V)

3.4.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

No que respeita à influência da razão cálcio/alginato na granulometria das nanoesferas, após a incorporação de sulfato de dextrano, a análise granulométrica demonstrou que a razão cálcio/alginato não influenciou a granulometria das nanoesferas. Gráficamente, as curvas da distribuição granulométrica de todas as formulações foram sobrepostas e, por esse motivo, optou-se por não se representar gráficamente. A distribuição granulométrica foi unimodal para todas as razões estudadas. O menor valor de factor SPAN foi obtido com a razão cálcio/alginato de 10% (m/m) (Tabela III-8).

Tabela III-8. Influência da razão de cálcio/alginato (m/m) nas características granulométricas, expressas em número, das nanoesferas de alginato contendo insulina.

Cálcio/alginato (%, m/m)	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
2,5	120	189	564	2,35
5	110	158	392	1,78
7	110	158	327	1,37
10	120	189	358	1,26
16,7	110	158	327	1,37

Nota: D₉₀, D₁₀ e D₅₀ são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das nanoesferas de alginato totais.

3.4.2. Aspecto e viscosidade do gel de alginato de cálcio

O aspecto do gel produzido depende da viscosidade das soluções de alginato e esta última depende, primariamente, do PM do polímero (Gombotz e Wee, 1998). O aspecto dos

geles obtidos recorrendo a diferentes razões cálcio/alginato foi variável. Sem sulfato de dextrano (Figura III-6), os geles de alginato de cálcio com as razões cálcio/alginato de 10 e de 16,7% (m/m) apresentaram um aspecto muito líquido, contrariamente às estruturas de gel compactas observadas nas restantes razões cálcio/alginato. Além disso, as razões cálcio/alginato de 2,5 e 5% (m/m) apresentaram uma certa heterogeneidade no aspecto geral, com a presença de pequenos aglomerados. Este facto não foi observado com a razão cálcio/alginato de 7% (m/m).

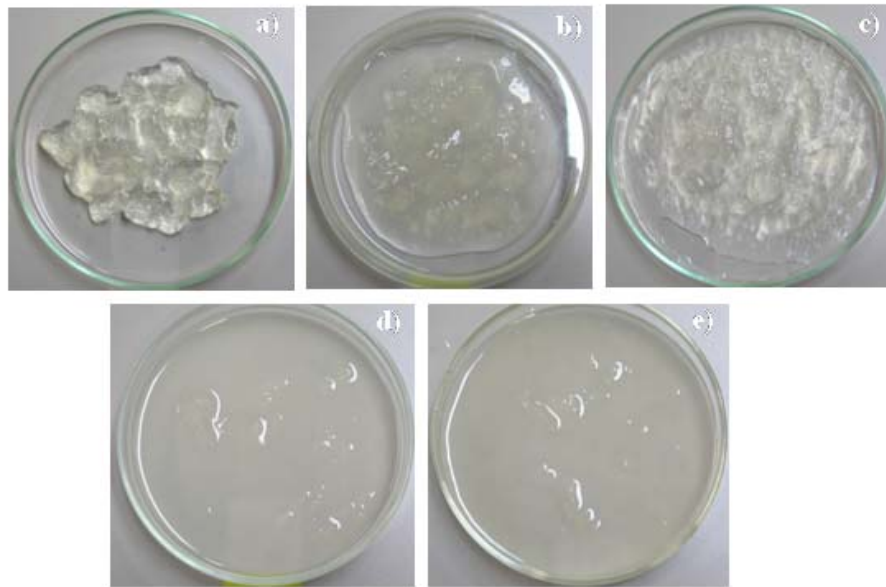


Figura III-6. Aspecto do gel de alginato de cálcio sem polímero aniónico recorrendo a diferentes razões cálcio/alginato (m/m): a) 2,5, b) 5, c) 7, d) 10 e e) 16,7% (m/m).

O alginato em solução aquosa apresentou uma viscosidade próxima de 200 mPa.s (Figura III-7). Quando foi adicionado a suspensão de carbonato de cálcio ao alginato, a viscosidade diminuiu ligeiramente. Após a adição do ácido acético, a viscosidade aumentou notavelmente, especialmente para a razão cálcio/alginato de 2,5% (m/V), com valores próximos de 1500 mPa.s.

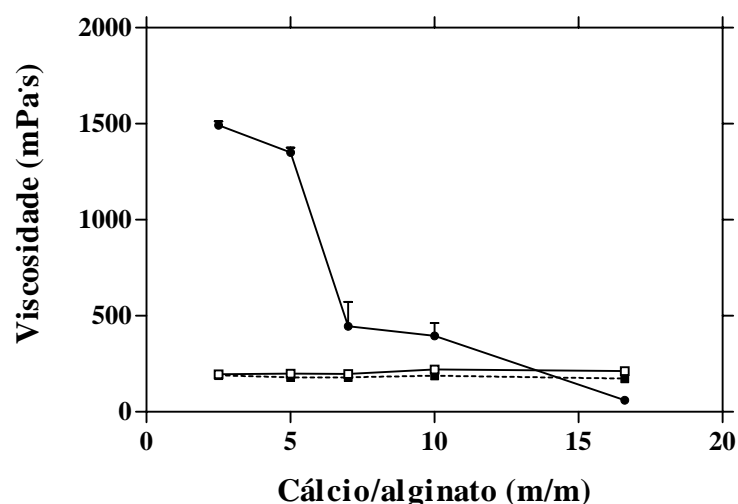


Figura III-7. Variação da viscosidade do alginato durante o processo de dispersão/gelificação, sendo: alginato (—□—), alginato-cálcio (---■---) e o gel alginato-cálcio (—●—) mas sem o polímero aniônico.

Na presença de sulfato de dextrano a 0,75% (m/V), o aspecto do gel foi muito semelhante ao gel sem polímero aniônico, à excepção das razões de cálcio/alginato de 2,5 e 5% (m/m) (Figura III-8). Os valores iniciais de viscosidade, antes e após a adição do sal de cálcio, também foram muito semelhantes entre si e ligeiramente superiores aos valores obtidos sem o polímero aniônico. Após a adição do ácido, a viscosidade do gel aumentou ligeiramente (Figura III-9) para todas as razões cálcio/alginato.

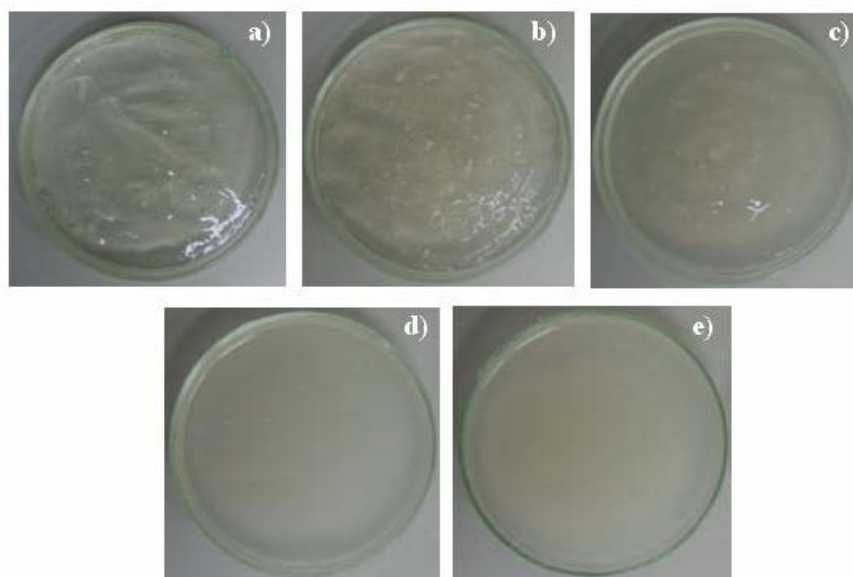


Figura III-8. Aspecto do gel de alginato de cálcio com polímero aniônico recorrendo a diferentes razões cálcio/alginato (m/m): a) 2,5, b) 5, c) 7, d) 10 e e) 16,7% (m/m).

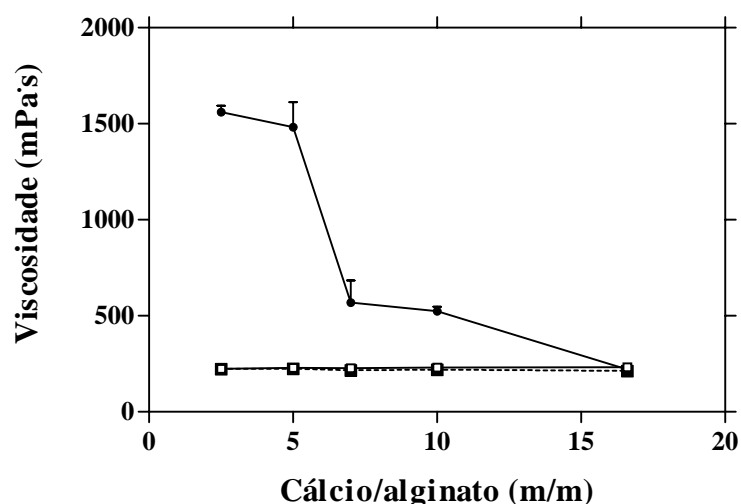


Figura III-9. Variação da viscosidade do alginato durante o processo de dispersão/gelificação sendo: alginato-sulfato de dextrano (—□—), alginato-cálcio-sulfato de dextrano (---■---) e o gel alginato-cálcio-sulfato de dextrano (—●—).

3.4.3. Teor de cálcio

O teor de cálcio presente nas nanoesferas foi quantificado por absorção atômica. Conforme descrito na Tabela III-9, os teores em cálcio situaram-se entre 10,22 e 51,50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de nanoesferas, sendo que o valor de concentração do ião cálcio mais elevado foi obtido com a razão cálcio/alginate de 16,7% (m/m).

Tabela III-9. Teor em cálcio das nanoesferas de alginato reforçadas com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V), aplicando diferentes razões cálcio/alginate (m/m). Os dados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P..

Cálcio/alginate (%, m/m)	Concentração de cálcio observada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Teor de cálcio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ nanoesferas)
2,5	2,04 \pm 0,28	10,22
5	1,13 \pm 0,28	22,60
7	3,69 \pm 0,25	36,90
10	2,33 \pm 0,28	46,60
16,7	5,15 \pm 0,39	51,50

3.4.4. Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

A Tabela III-10 mostra que apenas a razão cálcio/alginate 2,5% (m/m) conduziu a um teor, EE de insulina e a percentagem de insulina libertada em meio ácido diferente em relação à razão cálcio/alginate 16,7% (m/m).

Tabela III-10. Teor, EE e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas de alginate em meio ácido com diferentes razões cálcio/alginate (2,5-16,7%, m/m). Os dados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P.. * $P < 0,05$ por comparação com a razão cálcio/alginate de 16,7% (m/m). ** $P < 0,01$ por comparação com a razão cálcio/alginate de 16,7% (m/m).

Cálcio/alginate (%, m/m)	Teor (%, m/m)	EE (%)	Insulina libertada a pH 1,2 (%)
2,5	1,59 \pm 0,20**	64,52 \pm 10,23*	12,36 \pm 2,417*
5	1,88 \pm 0,01*	75,94 \pm 10,75	5,81 \pm 3,27
7	2,00 \pm 0,01	81,96 \pm 2,73	2,66 \pm 0,15
10	2,10 \pm 0,10	83,6 \pm 2,44	5,57 \pm 4,47
16,7	2,19 \pm 0,04	88,39 \pm 3,61	5,59 \pm 0,95

Nota: A quantidade de insulina libertada a pH 1,2 é baseada no valor do teor de insulina presente nas nanoesferas.

Neste estudo e uma vez que a generalidade dos parâmetros acima analisados foram muito semelhantes para todas as razões de cálcio/alginate, à exceção da razão 2,5% (m/m), optou-se pela razão cálcio/alginate de 7% (m/m) para os estudos subsequentes devido à percentagem de insulina libertada a pH 1,2 mais baixa.

3.5. Influência da razão molar ácido/cálcio na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V) e com a razão cálcio/alginato (m/m) otimizada

3.5.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

A análise granulométrica demonstrou uma ligeira diminuição no tamanho das nanoesferas com o aumento da razão molar ácido/cálcio. No entanto, a curva da distribuição granulométrica de todas as formulações foi muito semelhante e, por esse motivo, optou-se por não se representar graficamente. A distribuição granulométrica foi unimodal para todas as formulações, mas o valor do factor SPAN foi diminuindo com o aumento da razão ácido/cálcio (Tabela III-11).

Tabela III-11. Influência da razão molar ácido/cálcio nas características granulométricas, expressas em número, das nanoesferas de alginato contendo insulina.

Razão molar ácido/cálcio	D₁₀ (nm)	D₅₀ (nm)	D₉₀ (nm)	Factor SPAN
1,5	110	189	564	2,40
2	110	173	429	1,84
3	110	158	327	1,37
3,5	110	158	327	1,37

Nota: D₉₀, D₁₀ e D₅₀ são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das nanoesferas de alginato totais.

3.5.2. Variação de pH ao longo do processo de gelificação

A variação de pH ao longo do processo de produção das nanoesferas foi igualmente objecto de estudo. A Figura III-10 indica que o valor inicial do pH se situou ligeiramente acima de 5. No momento em que foi adicionado a suspensão de carbonato de cálcio à solução de alginato, o pH aumentou para próximo de 8,5. Após a adição do ácido, nas diferentes

razões molares, o pH da emulsão resultante foi diminuindo, até alcançar um valor situado entre 4,5 e 5,5. As razões molares ácido/cálcio a 3 e 3,5 não apresentaram diferenças entre si. No entanto, para as razões molares ácido/cálcio a 1,5 e 2 foram observadas ligeiras diferenças a partir de 15 min de gelificação em relação às restantes.

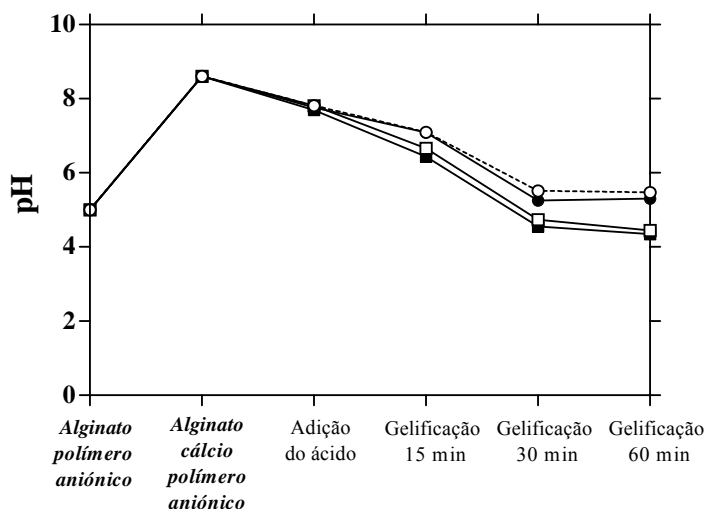


Figura III-10. Variação do pH ao longo do processo de produção das nanoesferas usando diferentes razões molares de ácido/cálcio. No gráfico: razão molar ácido/cálcio a 1,5 (---○---), 2 (—●—), 3 (—□—) e 3,5 (—■—).

3.5.3. Teor, eficiência de encapsulação (EE) e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido

A Tabela III-12 mostra que o aumento da razão molar ácido/cálcio aumentou ligeiramente o teor e a EE da insulina nas nanoesferas de alginato (apesar de não ser estatisticamente significativo). Em termos de quantidade de insulina libertada em meio ácido, a influência da razão molar ácido/cálcio foi também ligeira (sem significado estatístico).

Tabela III-12. Teor, EE e quantidade de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido usando diferentes razões molares ácido/cálcio (1,5-3,5). Os dados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P..

Razão molar ácido/cálcio	Teor (% m/m)	EE (%)	Insulina libertada a pH 1,2 (%)
1,5	2,15 \pm 0,20	86,27 \pm 13,59	3,69 \pm 2,2
2	2,14 \pm 0,10	84,57 \pm 12,51	2,14 \pm 1,09
3	2,26 \pm 0,05	89,45 \pm 9,35	2,93 \pm 1,99
3,5	2,35 \pm 0,10	94,68 \pm 3,11	3,89 \pm 1,01

Nota: A quantidade de insulina libertada a pH 1,2 é baseada no valor do teor de insulina presente nas nanoesferas.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho descreveu diferentes estratégias para reduzir, parcial ou totalmente, a libertação da insulina durante a incubação das nanoesferas em meio ácido e que consistiram, numa etapa inicial, na alteração do tipo de alginato. Foram estudados diferentes tipos de alginato com características físico-químicas diferentes, designadamente o teor em resíduos G e a viscosidade. Escolhido o tipo de alginato, foi realizado o reforço da matriz de alginato com polímeros aniônicos.

4.1. Tipo de alginato

A análise granulométrica demonstrou que todas as formulações testadas com diferentes tipos de alginatos apresentaram uma distribuição granulométrica unimodal. A granulometria variou ligeiramente para os diferentes tipos de alginato, sendo que os alginatos de elevada viscosidade apresentaram granulometria superior aos alginatos de média e baixa viscosidade. Os resultados obtidos estão em conformidade com outros estudos já realizados (Poncelet *et al.*, 1999; Serp *et al.*, 2000; Poncelet, 2001; Kendall *et al.*, 2004). A menor granulometria foi alcançada com os alginatos de baixa viscosidade e de baixo teor em resíduos G. Contudo, o factor SPAN foi ligeiramente superior nos alginatos de baixa viscosidade e de baixo teor em resíduos G. Entre estes dois tipos de alginato estudados, o alginato A0682 apresentou um factor SPAN inferior e, por conseguinte, menor polidispersividade.

Tendo em conta que a concentração do polímero e dos iões cálcio foi constante para todas as formulações estudadas, as diferenças na análise granulométrica podem estar correlacionadas com a viscosidade dos diferentes tipos de alginato.

A viscosidade depende das propriedades de cada tipo de alginato, da temperatura e do PM. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que quanto menor a viscosidade da fase interna, maior seria a facilidade de difusão do ião cálcio no polímero, menor seria a resistência às forças de dispersão durante a preparação da emulsão e, concludentemente,

maior será a probabilidade de obtenção de partículas mais pequenas, em comparação com os alginatos de média e elevada viscosidade. A equação qualitativa Equação II-8 já comprovada para controlar o tamanho das partículas, enunciada no trabalho descrito no capítulo anterior, refere essa mesma observação, ou seja, que quanto menor for a viscosidade da fase interna, menor será o diâmetro das partículas. Para além da análise granulométrica, foi analisado o PM dos alginatos a partir dos quais se obtiveram nanoesferas com a menor granulometria: o Manucol LB e o A0682. Observou-se, mais uma vez, similaridade entre os dois tipos de alginato, o que seria de esperar, uma vez que a viscosidade dos dois tipos de alginatos, era teoricamente semelhante. Quanto à polidispersividade, este factor poderá estar relacionado com a fonte e a pureza do alginato e nem tanto com o PM (Kendall *et al.*, 2004).

No que respeita à EE da insulina, todas as formulações apresentaram valores de EE elevados, provavelmente devido às interações electrostáticas entre o polímero e o fármaco encapsulado. A carga eléctrica positiva da proteína permite uma interacção relativamente facilitada com os grupos carregados negativamente do alginato e, naturalmente, poderá ser essa a justificação para uma elevada EE. Entre todas as formulações, as que foram produzidas com alginatos de elevado teor em resíduos G apresentaram valores de EE ligeiramente superiores, comparativamente com os alginatos de baixo e médio teor em resíduos G, presumivelmente devido à estrutura do gel resultante. Os geles formados por alginatos de elevado teor em resíduos G são considerados rígidos contrariamente aos geles elásticos para os alginatos de baixo teor em resíduos G (Martinsen *et al.*, 1989; Gombotz e Wee, 1998; Quong *et al.*, 1998). A estrutura do gel obtido parece estar relacionada com uma maior ou menor afinidade para os iões cálcio. É descrito que os iões cálcio têm mais afinidade para os resíduos G (Shilpa *et al.*, 2003) e, a ser assim, estabelecem mais facilmente ligações com os alginatos de elevado teor em resíduos G, formando, conseqüentemente, uma rede polimérica mais rígida. A estrutura da rede polimérica ditará a maior ou menor EE. Quanto mais rígida for a rede polimérica e maior o número de ligações entre o alginato e o cálcio, maior será a probabilidade da insulina permanecer associada a esta rede polimérica.

Relativamente à percentagem de insulina libertada em meio ácido, os resultados indicaram que alginatos de baixo teor em resíduos G proporcionaram uma maior retenção da

insulina nas nanoesferas de alginato. Geralmente, a libertação de fármacos a partir de matrizes de alginato é modulada por um processo dissolução-erosão (Almeida e Almeida, 2004). A pH ácido, o alginato é convertido a ácido algínico porque há troca entre os protões do meio e os iões cálcio. Como descrito anteriormente, o ácido algínico é insolúvel em água e precipita. Esta precipitação permitiria, *a priori*, a formação de uma rede polimérica impermeável, retendo no seu interior a insulina e impedindo a penetração das proteases. Mas, como se pôde ver, o alginato, por si só, não conseguiu reter a insulina durante a incubação em meio ácido. Então, a relativa capacidade de retenção da insulina nas diferentes formulações pode estar relacionada com a composição do alginato. Os alginatos com baixo teor em resíduos G são considerados menos porosos (Martinsen *et al.*, 1989; Kendall *et al.*, 2004), comparativamente com alginatos de elevado teor em resíduos G (Darrabie *et al.*, 2006), isto porque, os geles obtidos com alginatos de elevado teor em resíduos G têm uma estrutura do poro mais aberta e, normalmente, exibem velocidades de difusão de proteínas superiores que poderão estar relacionadas com uma menor taxa de intumescimento ou, em última instância, com uma barreira de difusão mais fraca à superfície das esferas (Gombotz e Wee, 1998). Por outro lado, sabe-se que a difusão dos protões é mais rápida do que a difusão dos iões cálcio. Os coeficientes de difusão a 25°C são $7,7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para os protões e $4,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para os iões cálcio (Quong *et al.*, 1998). A difusão dos protões durante a incubação em meio ácido nos alginatos de baixo teor em resíduos G poderá ter sido dificultada por duas situações: pela menor porosidade e granulometria. A porosidade do alginato condicionará tanto a difusão dos protões para o interior das nanoesferas de alginato, como a difusão da insulina para o seu exterior. Logo, quanto menor for a porosidade do gel, mais tempo demorará a perder a sua estrutura e, logicamente, maior será o período de tempo de permanência da insulina associada. Para as etapas subseqüentes, e pelas razões explicitadas anteriormente, o tipo de alginato a utilizar foi o alginato de baixa viscosidade e de baixo teor em resíduos G, o A0682.

Como se expôs, os dados anteriores apontam para o facto de que o alginato, por si só, não consegue reter a insulina durante a incubação em tampão de pH 1,2. Torna-se, por isso, necessário adoptar estratégias adicionais para evitar a libertação da insulina em meio ácido.

4.2. Tipo de polímero aniónico

Foram seleccionados diferentes polímeros aniónicos para reforçar a matriz de alginato: ácidos fracos com grupos carboxílicos (carboximetilcelulose sódica) ou ácidos fortes com grupos fosfato (polifosfato de sódio) ou sulfato (sulfato de dextrano e sulfato de celulose).

A aplicação de polímeros aniónicos na matriz de alginato baseou-se na possível interacção adicional e reversível com a proteína, a insulina, e consequente formação de um complexo polielectrolítico. Aqui, a reversibilidade desta interacção surge como grande vantagem tecnológica, uma vez que se pretende que, no momento da libertação e em condições fisiológicas, a proteína se encontre no seu estado nativo e não complexada com um polímero (Kamiya e Klibanov, 2003). Estes complexos, proteína-polímero aniónico, reversíveis têm sido vulgarmente utilizados na modulação de perfis de libertação de fármacos, a partir de nanoesferas poliméricas (Dumitriu e Chornet, 1998; Kamiya e Klibanov, 2003; Jiang *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2005). Porém, em algumas situações, são utilizados polímeros hidrossolúveis como, por exemplo, o PEG, mas neste caso, contrariamente à anterior, é geralmente de natureza covalente (Kamiya e Klibanov, 2003) e poderá, em última instância, interferir com a acção terapêutica do fármaco.

O reforço da matriz com polímeros aniónicos diminuiu a granulometria das nanoesferas de alginato, à excepção da carboximetilcelulose sódica e do sulfato de celulose, cuja inclusão aumentou ligeiramente a granulometria das nanoesferas resultantes. O aumento da granulometria com a carboximetilcelulose sódica poderá estar relacionado com o aumento da viscosidade da fase aquosa e com o seu elevado PM (90-700 kDa). Na literatura vem descrito que a carboximetilcelulose sódica, mesmo a de baixa viscosidade, pode apresentar valores entre 10 e 110 mPa·s (Silva *et al.*, 2006a). Segundo a Equação II-8, a viscosidade da fase interna de uma emulsão influencia a granulometria das nanoesferas resultantes. Geralmente, quanto maior for a viscosidade da fase interna, maiores serão as partículas poliméricas. O mesmo efeito de aumento no tamanho das microesferas de alginato foi observado por Chan e colaboradores após a incorporação de derivados celulósicos na matriz (Chan *et al.*, 1997). No caso do sulfato de celulose, o aumento da granulometria das

nanoesferas de alginato poderá estar, principalmente, relacionado com o elevado PM do polímero. Apesar de ser um polímero composto por unidades glicosídicas com um grau de substituição de grupos sulfato semelhante ao sulfato de dextrano, o sulfato de celulose apresenta uma cadeia linear de 2000-3000 kDa, enquanto o sulfato de dextrano é um polímero de cadeia ramificada de 5 kDa. Este último, para além da cadeia ramificada, apresenta um peso molecular baixo, o que facilita a sua incorporação na matriz de alginato e, por conseguinte, conduz a uma menor granulometria comparativamente ao sulfato de celulose. Por fim, o polifosfato de sódio não causou alteração da granulometria das nanoesferas de alginato, comparativamente com a formulação sem polímeros aniónicos. Esta observação era previsível, atendendo ao seu baixo PM (aproximadamente 1,3 kDa). Além do PM, as propriedades do poliácido forte e fraco pode interferir com a densidade da matriz polimérica, sendo que os poliácidos fortes deverão originar partículas mais pequenas.

A nível morfológico, as fotografias de SEM mostraram que os polímeros aniónicos não alteraram a forma das nanoesferas mas apenas a sua superfície. Na ausência de polímeros aniónicos, pensa-se que a parte da insulina adicionada no momento de preparação das nanoesferas assumiu uma localização mais superficial nas nanoesferas de alginato, com grande abundância de estruturas tubulares no exterior da partícula. O mesmo ocorreu na presença de carboximetilcelulose sódica e polifosfato de sódio. Estas estruturas tubulares foram atribuídas à insulina em estudos anteriores (Silva *et al.*, 2006a). Na presença de sulfato de celulose e sulfato de dextrano, a localização da proteína parece ter sofrido algumas alterações. A diminuição da quantidade de estruturas tubulares, no caso do sulfato de celulose e a completa ausência, no caso do sulfato de dextrano, sugerem uma localização mais profunda da insulina nestas nanoesferas, o que será favorável para a protecção da insulina à degradação enzimática.

Após incorporação do polímero aniónico, o teor de insulina foi ligeiramente inferior, devido à diminuição do valor seu teórico mas os valores de EE foram consideravelmente superiores, após o reforço da matriz, especialmente para o sulfato de celulose e sulfato de dextrano. Esta observação parece estar em concordância com as fotografias SEM. De facto, os elevados valores de EE da insulina das nanoesferas com sulfato de dextrano e sulfato de

celulose sugerem que a insulina foi encapsulada com sucesso. Assim, se justificam as fotografias de SEM onde evidenciam a ausência de estruturas tubulares no caso sulfato de dextrano ou a sua fraca abundância para o sulfato de celulose de insulina no exterior das nanoesferas de alginato. Atribui-se este aumento de EE a um provável aumento de interações electrostáticas com a insulina. Este aumento da EE na presença de complexos polielectrólitos-proteína foi igualmente observado em microesferas de PLGA (Jiang *et al.*, 2004). No presente trabalho, observou-se, ainda, que os valores de EE da insulina se mantiveram praticamente inalteráveis para o polifosfato de sódio e ligeiramente inferiores para a carboximetilcelulose sódica. Supõe-se, principalmente para a carboximetilcelulose sódica, que a interacção química entre a insulina e estes dois polímeros seja consideravelmente mais fraca do que a observada com os polímeros que têm grupos sulfato.

Por outro lado, o polifosfato de sódio, o sulfato de dextrano e o sulfato de celulose foram eficazes no impedimento da libertação de insulina a partir das nanoesferas de alginato, durante a incubação em meio ácido, contrariamente à carboximetilcelulose sódica. Para além da granulometria, pensa-se que o factor preponderante na interacção com a insulina é a densidade de carga eléctrica e que essa interacção proteína-polímero aniónico adjuvante conduziu à retenção da insulina nas nanoesferas durante a incubação das mesmas em meio ácido. Esta retenção foi apenas alcançada com os poliácidos fortes, designadamente com grupos fosfato e sulfato. No presente trabalho, e contrariamente a outros estudos (Chan *et al.*, 1997), a carboximetilcelulose sódica não foi capaz de reter a libertação do fármaco encapsulado a partir de nanoesferas de alginato. A diferença nos resultados poderá ser atribuída às diferentes metodologias aplicadas e à granulometria das partículas obtidas.

O mecanismo de acção dos polímeros aniónicos na matriz de alginato ainda se encontra por elucidar, mas pensa-se que estes compostos poderão aumentar a densidade da rede polimérica e, conseqüentemente, promover a formação de uma estrutura polimérica mais compacta. Para além disso, postula-se a ocorrência de interações electrostáticas entre as espécies químicas envolvidas: polímero aniónico matriz-fármaco-polímero aniónico adjuvante. Como já foi referido, o alginato apresenta dois pK_a de 3,38 e 3,65, como constantes de dissociação dos monómeros do ácido manurónico e gulurónico, respectivamente (Draget *et*

al., 1994). No caso da carboximetilcelulose sódica, como as suas cargas negativas são devidas a grupos carboxilo, o seu comportamento deverá ser idêntico ao do alginato e, por isso, poder-se-à, então, perceber a ausência do efeito de retenção da insulina. Contrariamente à carboximetilcelulose sódica, os grupos sulfato presentes no sulfato de dextrano e de celulose estão permanentemente carregados. Em ambos os casos, a primeira constante de dissociação é negativa e a segunda é próxima de 2. A presença de cargas negativas permanentes dos grupos sulfato no sulfato de dextrano e de celulose e a carga negativa dos grupos carboxilo para o alginato podem ser responsáveis pela maior interacção com a insulina carregada positivamente ($pI = 5,3-5,4$) a pH 1,2, prevenindo a sua libertação (Silva *et al.*, 2006a). A presença de grupos sulfato nas nanoesferas reforçadas com sulfato de dextrano foi ainda confirmada por análise elementar, recorrendo a SEM, conforme demonstra o Anexo III. No caso do polifosfato de sódio, este composto também demonstrou capacidade em prevenir a libertação de insulina em meio ácido. Contudo, a interacção do polifosfato de sódio com a insulina parece ser mais fraca do que a observada com os grupos sulfatos (Silva *et al.*, 2006a). O ácido fosfórico apresenta três valores de pK_a , a 2,2, 7,2 e 12,3, mas, no caso da molécula de polifosfato de sódio, o número de valores de pK_a é superior, dependendo do número de unidades fosfato que compõem a molécula. É possível que a pH 1,2 ainda existam algumas cargas negativas do fosfato para interagir com a insulina carregada positivamente, embora se espere que esta interacção seja mais fraca do que aquela observada com os grupos sulfato.

De entre os ácidos fortes, e segundo a análise granulométrica e morfológica, EE e percentagem de libertação de insulina em meio ácido, o sulfato de dextrano reúne todos os requisitos para ser considerado o polímero aniónico de eleição no reforço da matriz de alginato. Uma vez que a granulometria demonstrou ser muito semelhante entre os dois polímeros, a escolha do sulfato de dextrano, em detrimento do polifosfato de sódio, baseia-se na obtenção de uma maior EE e na ausência de estruturas tubulares de insulina no exterior das nanoesferas de alginato. Em relação ao sulfato de celulose, a escolha foi feita com base na granulometria, na ausência de estruturas tubulares no exterior das nanoesferas de alginato e na EE da insulina ligeiramente superior. Além disso, o sulfato de dextrano tem sido vulgarmente utilizado na produção de complexos polielectrolíticos com diversas proteínas, nomeadamente

a insulina (Tiyaboonchai *et al.*, 2003; Balabushevich e Larionova, 2004), a lisozima (Kamiya e Klibanov, 2003), a mioglobina e a hemoglobina (He *et al.*, 2005).

4.3. Concentração do polímero aniónico

Foi ainda realizado um estudo de optimização da concentração do sulfato de dextrano. A análise granulométrica demonstrou que um aumento da concentração de sulfato de dextrano causou uma diminuição na granulometria das nanoesferas de alginato. Tal como referido anteriormente, um aumento da densidade de grupos carregados negativamente poderá desencadear interações suficientemente fortes com a insulina, responsáveis por uma estrutura polimérica cada vez mais compacta mas até um certo limite. Pensa-se que para concentrações de sulfato de dextrano acima de 0,75% (m/V), este assume uma grande proporção na formulação e a competição entre as espécies químicas envolvidas para a insulina aumenta. A mesma justificação serve como explicação para o aumento da EE. O maior valor de EE foi observado com a concentração de 0,75% (m/V) de sulfato de dextrano. Relativamente à percentagem de libertação de insulina em meio ácido, mais uma vez os dados experimentais demonstraram que na presença de polímeros aniónicos com elevada densidade de carga negativa, a insulina se mantém associada ao alginato durante o período de incubação em meio ácido. Pelas razões expostas, a concentração de sulfato de dextrano adoptada nos estudos subsequentes foi de 0,75% (m/V).

4.4. Influência da razão cálcio/alginato (m/m) na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V)

No trabalho descrito no Capítulo II foi utilizada uma razão de cálcio/alginato em excesso (16,7%, m/m), no sentido de assegurar a gelificação completa do alginato. Sabe-se, no entanto que, a melhor razão cálcio/alginato na preparação de partículas de alginato por emulsificação/gelificação interna continua a ser assunto de debate. Num estudo anterior (Poncelet, 2001), verificou-se que uma razão molar de 1:4 entre o ião cálcio e o monómero de

alginate foi suficiente para assegurar a formação de microsferas. Esse mesmo estudo demonstrou, ainda, que quantidades superiores resultariam num excesso de cálcio insolúvel à superfície das partículas (Poncelet, 2001).

Relativamente à granulometria, os dados experimentais demonstraram que esta variou ligeiramente e inversamente ao aumento da razão cálcio/alginate. Os resultados foram concordantes com outros estudos (Sriamornsak, 1999; Misirli *et al.*, 2005). A granulometria das razões de cálcio/alginate de 7, 10 e 16,7% (m/m) foi muito semelhante. Contudo, observou-se uma ligeira diferença na polidispersividade, sendo que o menor valor do factor SPAN foi obtido com a razão de cálcio/alginate a 10% (m/m). A explicação para essa variação está relacionada com a etapa de gelificação. Durante a formação de geles de alginate, ocorre uma contração estrutural associada a perdas de água (Martinsen *et al.*, 1989). Esta contração aumenta quando a concentração do ião cálcio disponível para provocar a gelificação do alginate aumenta também (Østberg *et al.*, 1993).

Para complementar o estudo da influência da razão cálcio/alginate na matriz de alginate reforçada com sulfato de dextrano, o teor de cálcio libertado das nanoesferas foi quantificado por absorção atômica. A variação da concentração de cálcio para as diferentes razões cálcio/alginate usadas foi proporcional ao aumento da razão cálcio/alginate. Este resultado confirmou uma maior disponibilidade de iões cálcio para a razão cálcio/alginate de 16,7% (m/m).

Por outro lado, o estudo da viscosidade esclareceu o efeito da razão cálcio/alginate na granulometria. A viscosidade do gel variou com a razão cálcio/alginate, sendo os valores mais elevados observados com as razões cálcio/alginate de 2,5 e 5% (m/m). Como descrito anteriormente, sabe-se que quanto maior for a viscosidade da fase interna, maior será a resistência às forças de dispersão durante a preparação da emulsão e, conseqüentemente, maiores serão as nanoesferas poliméricas. Por outro lado, o estudo da viscosidade demonstrou, ainda, uma ligeira interferência do sulfato de dextrano, após a sua incorporação na solução de alginate, na viscosidade do gel resultante. Com a incorporação de sulfato de dextrano na matriz, a viscosidade de todas as formulações sofreu um ligeiro aumento.

A razão cálcio/alginato (m/m) influenciou ainda a EE da insulina. Observou-se uma relação proporcional entre a EE e a razão cálcio/alginato, tal como aconteceu em estudos anteriores (Lim e Wan, 1997). Para o teor de insulina observou-se a mesma tendência. Neste estudo, a EE da insulina foi ligeiramente superior para uma razão cálcio/alginato de 16,7% (m/m). Relativamente à percentagem de insulina libertada durante a incubação das nanoesferas em meio ácido, os resultados obtidos indicaram que a razão cálcio/alginato influenciou ligeiramente esse parâmetro, sendo que a menor percentagem de libertação foi alcançada com a razão cálcio/alginato de 7% (m/m). Esta última observação poderá estar relacionada com um melhor compromisso de granulometria e EE. Por isso, a razão de cálcio/alginato de 7% (m/m) foi a seleccionada para estudos posteriores.

4.5. Influência da razão molar ácido/cálcio na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V) e com a razão cálcio/alginato (m/m) otimizada

Por fim, a razão molar ácido/cálcio poderia, igualmente, influenciar a quantidade de cálcio disponível para a gelificação do alginato bem como o pH final das nanoesferas. Os resultados demonstraram uma ligeira diminuição da granulometria com o aumento da razão molar ácido/cálcio, provavelmente devido a uma extensa solubilização do sal de cálcio e, por conseguinte, a uma maior quantidade de iões cálcio disponíveis para gelificar com o alginato. A justificação para este facto baseia-se também na contracção estrutural do gel, que deverá aumentar, quando a concentração do ião cálcio disponível para provocar a gelificação do alginato aumenta também (Østberg *et al.*, 1993).

Relativamente ao teor e EE da insulina, os resultados obtidos indicaram um ligeiro aumento com o aumento da razão molar ácido/cálcio. A explicação deste facto está no aumento da disponibilidade do ião cálcio envolvido na gelificação do alginato, tal como foi descrito em trabalhos anteriores (Silva *et al.*, 2006a). Essa maior disponibilidade do ião cálcio poderá conduzir à formação de nanoesferas mais fortes e com uma maior resistência à difusão de solutos (Silva *et al.*, 2006b). Dessa forma, a insulina ficaria mais facilmente retida na rede polimérica de alginato.

Quanto à insulina libertada durante a incubação em meio ácido, este parâmetro foi muito semelhante para todas as razões molares ácido/cálcio, sendo que os valores mais baixos foram alcançados com as razões de 2 e 3. Considerando a reacção entre o ácido acético e o carbonato de cálcio, cada mole de moléculas de carbonato de cálcio reagem com 2 mole de moléculas de ácido acético. Na presença de uma razão molar ácido/cálcio de 1,5, a probabilidade de ocorrência de uma gelificação incompleta do alginato será superior, uma vez que segundo a reacção estequiométrica, a razão molar em causa é inferior àquela que seria necessária. Não obstante a importância da ocorrência de uma gelificação completa do alginato, o pH é de extrema importância e deve ser tal, que possibilite a ocorrência e a preservação de interacções entre o alginato e a insulina durante o processo de produção, recuperação e o acondicionamento. O pH do meio de lavagem foi de 4,5. O estudo do pH ao longo do processo de preparação das nanoesferas demonstrou que apenas as razões molares ácido/cálcio de 3 e 3,5 conseguiram alcançar aquele valor. Pelo melhor compromisso entre granulometria, EE, percentagem de libertação de insulina durante a incubação das nanoesferas em meio ácido e pH final, optou-se pela razão molar de ácido/cálcio de 3 para as fases seguintes da presente dissertação.

5. CONCLUSÕES

O sucesso de uma formulação de libertação controlada depende da resposta às variações sequenciais que ocorrem ao longo do TGI, nomeadamente da passagem de um meio ácido para um meio ligeiramente alcalino. De facto, se a libertação da insulina, total ou em grande parte, ocorrer antes do local de absorção, a insulina ficará automaticamente exposta às condições drásticas do TGI. No presente trabalho estudou-se essa questão e apresentaram-se estratégias para tentar ultrapassar essa dificuldade. A primeira estratégia baseou-se na optimização do tipo de alginato. Foram estudados diferentes alginatos com variações no teor em resíduos G e na viscosidade. Os resultados obtidos demonstraram que todos os tipos de alginato foram incapazes, por si só, de reterem a insulina encapsulada durante a sua passagem em meio ácido. Na avaliação da granulometria obtida, EE e quantidade de insulina libertada em meio ácido, o tipo de alginato seleccionado foi o de baixo teor em resíduos G e de baixa viscosidade, mais especificamente, o alginato A0682.

Numa segunda fase, e seleccionado o tipo de alginato, foram adoptadas estratégias adicionais que consistiram no reforço da matriz polimérica de alginato. O protocolo de preparação das nanoesferas de alginato foi semelhante ao protocolo anterior, à excepção da adição de um outro polímero aniónico à matriz de alginato. Foram avaliados os mesmos parâmetros que anteriormente. Com base no melhor compromisso entre a granulometria, a EE e a praticamente inexistente percentagem de libertação de insulina durante a incubação em meio ácido, foi seleccionado o sulfato de dextrano. A estabilidade das nanoesferas de alginato em meio ácido foi atribuída à formação de um complexo entre a proteína e o polímero aniónico adjuvante, através de interacções electrostáticas. De seguida, foi optimizada a concentração de sulfato de dextrano e a opção da concentração foi realizada segundo os mesmos critérios, tendo sido seleccionada, neste caso particular, uma concentração de 0,75% (m/V).

Numa fase posterior, estudou-se a influência da razão cálcio/alginato na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano. Foram estudadas diferentes razões cálcio/alginato (m/m) e avaliados os parâmetros descritos anteriormente. A razão cálcio/alginato de

7% (m/m) reuniu o melhor compromisso nos vários parâmetros analisados. A influência da razão molar ácido/cálcio também foi alvo de estudo. Os resultados obtidos deste estudo indicaram que uma razão molar ácido/cálcio de 3 deveria ser a razão molar ácido/cálcio a adotar nas próximas etapas. A utilização de um volume adequado de ácido acético deverá permitir uma dissolução completa do carbonato de cálcio, mas sem que o pH atinja valores inferiores a 4,5-5,0, o que poderia ser prejudicial para a interação do alginato com a proteína e, em última instância, para a estabilidade físico-química da proteína encapsulada.

Por fim, a reversibilidade da interação proteína-polímero aniônico adjuvante foi verificada após a libertação imediata, quase instantânea, da insulina após transferência das nanoesferas para o tampão fosfato de pH 6,8. A reversibilidade da interação proteína-polímero aniônico adjuvante, tal como referido na introdução deste capítulo, poderá ser considerada uma vantagem tecnológica.

A melhoria do perfil de libertação da insulina, após a transferência para o pH 6,8, será alvo de estudo no Capítulo V.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, P. F. e ALMEIDA, A. J. (2004) Cross-linked alginate-gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. **J. Control. Rel.** 97, 431-439.
- AL-ZAHRANI, S. M. (1999) Investigation of factors influencing drug release using calcium alginate polymer. **Bioproc. Eng.** 21, 57-60.
- BALABUSHEVICH, N. G. e LARIONOVA, N. I. (2004) Fabrication and characterization of polyelectrolyte microparticles with protein. **Biochem. Biokhim.** 69, 757-762.
- BODMEIER, R. e WANG, J. (1993) Microencapsulation of drugs with aqueous colloidal polymer dispersions. **J. Pharm. Sci.** 82, 191-194.
- CANAPLE, L., REHOR, A. e HUNKELER, D. (2002) Improving cell encapsulation through size control. **J. Biomat. Sci. Polym. Edn.** 13, 783-796.
- CHAN, L. W. e HENG, P. W. (1998) Effects of poly(vinylpyrrolidone) and ethylcellulose on alginate microspheres prepared by emulsification. **J. Microencapsul.** 15, 409-420.
- CHAN, L. W. e HENG, P. W. S. (2002) Effects of aldehydes and methods of cross-linking on properties of calcium alginate microspheres prepared by emulsification. **Biomaterials** 23, 1319-1326.
- CHAN, L. W., HENG, P. W. S. e WAN, L. S. C. (1997) Effect of cellulose derivatives on alginate microspheres prepared by emulsification. **J. Microencapsul.** 14, 545-555.
- COOPER, C. L., DUBIN, P. L., KAYITMAZER, A. B. e TURKSEN, S. (2005) Polyelectrolyte-protein complexes. **Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.** 10, 52-78.
- DARRABIE, M. D., KENDALL, W. F. e OPARA, E. C. (2006) Effect of alginate composition and gelling cation on micro-bead swelling. **J. Microencapsul.** 23, 29-37.
- DAUTZENBERG, H., SCHULDT, U., GRASNICK, G., PETER, K., MÜLLER, P., LOHR, M., PELEGRIN, M., PIECHACZYK, M., ROMBS, K., GUNZBURG, W., SALMONS, B. e SALLER, R. M. (1999) Development of cellulose sulfate-based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications. **Ann. New York Acad. Sci.** 875, 46-63.
- DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G. e SMIDSRØD, O. (1994) Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydr. Polym.** 25, 31-38.

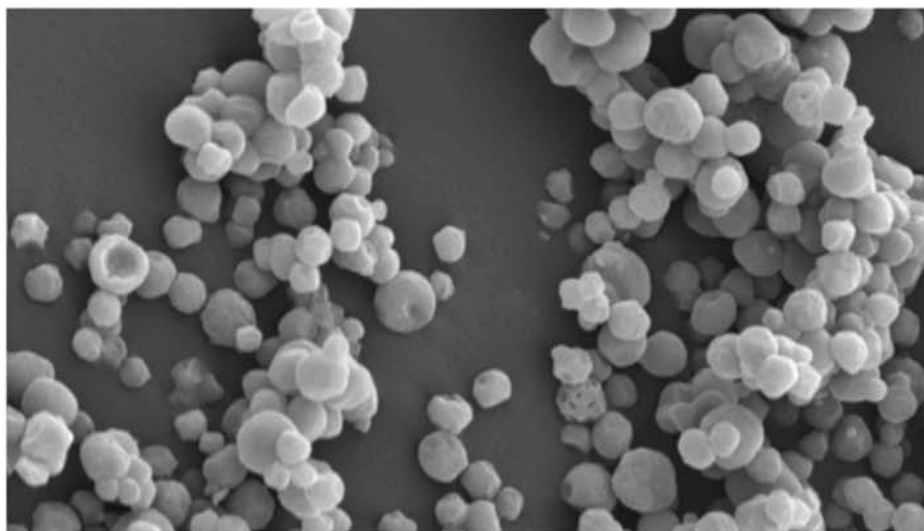
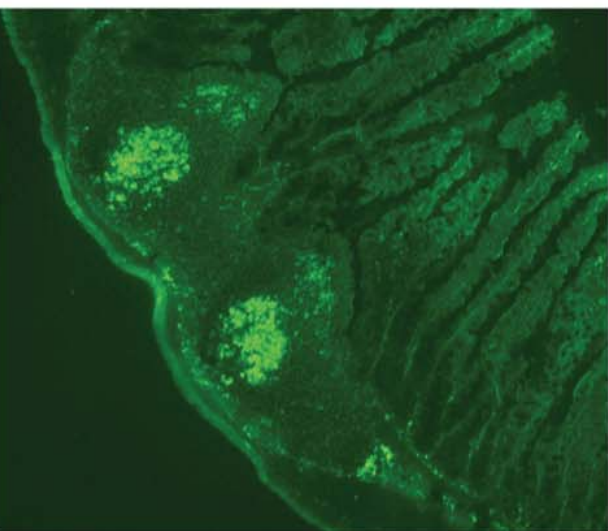
- DUMITRIU, S. e CHORNET, E. (1998) Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 31, 223-246.
- ELCIN, Y. M. (1995) Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres. **Biomaterials** 16, 1157-1161.
- EL-KAMEL, A. H., AL-GOHARY, O. M. N. e HOSNY, E. A. (2003) Alginate-diltiazem hydrochloride beads: optimization of formulation factors, *in vitro* and *in vivo* availability. **J. Microencapsul.** 20, 211-225.
- GEORGE, M. e ABRAHAM, T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. **J. Control. Rel.** 114, 1-14.
- GOMBOTZ, W. R. e WEE, S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 31, 267-285.
- GÜRSOY, A., KALKAN, F. e OKAR, I. (1998) Preparation and tableting of dipyridamole alginate-Eudragit microspheres. **J. Microencapsul.** 15, 621-628.
- GÜRSOY, A., KARAKUS, D. e OKAR, I. (1999) Polymers for sustained release formulations of dipyridamole-alginate microspheres and tabletted microspheres. **J. Microencapsul.** 16, 439-452.
- HE, P., LI, M. e HU, N. (2005) Interaction of heme proteins with poly(propyleneimine) dendrimers in layer-by-layer assembly films under different pH conditions. **Biopolymers** 79, 310-323.
- HENG, P. W. S., CHAN, L. W., LIEW, C. V. e NG, T. Y. (2000) Effect of tableting compaction pressure on alginate microspheres. **J. Microencapsul.** 17, 553-564.
- JIANG, H. L., JIN, J. F., HU, Y. Q. e ZHU, K. J. (2004) Improvement of protein loading and modulation of protein release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres by complexation of proteins with polyanions. **J. Microencapsul.** 21, 615-624.
- JOHNSON, F. A., CRAIG, D. Q. M. e MERCER, A. D. (1997) Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. **J. Pharm. Pharmacol.** 49, 639-643.
- KAMIYA, N. e KLIBANOV, A. M. (2003) Controlling the rate of protein release from polyelectrolyte complexes. **Biotechnol. Bioeng.** 82, 590-594.

- KENDALL, W. F., DARRABIE, M. D., EL-SHEWY, H. M. e OPARA, E. C. (2004) Effect of alginate composition and purity microspheres. **J. Microencapsul.** 21, 821-828.
- KIDANE, A., GUIMOND, P., JU, T.-C. R., SANCHEZ, M., GIBSON, J., NORTH, A., HOGENESCH, H. e BOWERSOCK, T. L. (2002) Effects of cellulose derivatives and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) tri-block copolymers (Pluronic surfactants) on the properties of alginate based microspheres and their interactions with phagocytic cells. **J. Control. Rel.** 85, 181-189.
- LEE, D. W., HWANG, S. J., PARK, J. B. e PARK, H. J. (2003) Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microspheres. **J. Microencapsul.** 20, 179-192.
- LIEW, C. V., CHAN, L. W., CHING, A. L. e HENG, P. W. S. (2006) Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. **Int. J. Pharm.** 309, 25-37.
- LIM, L. Y. e WAN, L. S. (1997) Propranolol hydrochloride binding in calcium alginate beads. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 23, 973-980.
- LIU, P. e KRISHAM, T. R. (1999) Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation. **J. Pharm. Pharmacol.** 51, 141-149.
- LIU, Z., LI, J., NIE, S., LIU, H., DING, P. e PAN, W. (2006) Study of an alginate/HPMC-based *in situ* gelling ophthalmic delivery system for gatifloxacin. **Int. J. Pharm.** 315, 12-17.
- MARTINSEN, A., SKJÅK-BRÆK, G. e SMIDSRØD, O. (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate beads. **Biotechnol. Bioeng.** 33, 79-89.
- MISIRLI, Y., OZTURK, E., KURSAKLIOGLU, H. e DENKBAS, E. B. (2005) Preparation and characterization of mitomycin-C loaded chitosan-coated alginate microspheres. **J. Microencapsul.** 22, 167-178.
- MIYAZAKI, Y., YAKOU, S., NAGAI, T. e TAKAYAMA, K. (2003) Release profiles of theophylline from microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate: effect of polyion complex formation. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 29, 795-804.

- MURATA, Y., MIYAMOTO, E. e KAWASHIMA, S. (1996) Additive effect of chondroitin sulfate and chitosan on drug release from calcium-induced alginate gel beads. **J. Control. Rel.** 38, 101-108.
- MURATA, Y., TSUMOTO, K., KOFUJI, K. e KAWASHIMA, S. (2003) Effects of natural polysaccharide addition on drug release from calcium-induced alginate gel beads. **Chem. Pharm. Bull.** 51, 218-220.
- ONAL, S. e ZIHNIÖGLU, F. (2002) Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: oral therapeutic peptide delivery. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.** 30, 229-237.
- ØSTBERG, T., VESTERHUS, L. e GRAFFNER, C. (1993) Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: II. Effect of process and formulation factors on matrix properties. **Int. J. Pharm.** 97, 183-193.
- PILLAY, V., DANCKWERTS, M. P. e FASSIHI, R. (2002) A cross-linked calcium-alginate-pectinate-cellulose acetophthalate gelisphere system for linear drug release. **Drug Deliv.** 9, 77-86.
- PILLAY, V., DANCKWERTS, M. P., MUHIDINOV, Z. e FASSIHI, R. (2005) Novel modulation of drug delivery using binary zinc-alginate-pectinate polyspheres for zero-order kinetics over several days: experimental design strategy to elucidate the cross-linking mechanism. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 31, 191-207.
- PONCELET, D. (2001) Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. **Ann. New York Acad. Sci.** 944, 74-82.
- PONCELET, D., BABAK, V., DULIEU, C. e PICOT, A. (1999) A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. **Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.** 155, 171-176.
- QUONG, D., NEUFELD, R. J., SKJÅK-BRÆK, G. e PONCELET, D. (1998) External *versus* internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. **Biotechnol. Bioeng.** 57, 438-446.
- ROY, I., SARDAR, M. e GUPTA, M. N. (2005) Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. **Biochem. Eng. J.** 23, 193-198.

- SAJEESH, S. e SHARMA, C. P. (2004) Poly(methacrylic acid)-alginate semi-IPN microparticles for oral delivery of insulin: a preliminary investigation. **J. Biomat. Appl.** 19, 35-45.
- SERP, D., CANTANA, E., HEINZEN, C., VON STOCKER, U. e MARISON, I. W. (2000) Characterization of an encapsulation device for production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. **Biotechnol. Bioeng.** 70, 41-53.
- SEZER, A. D. e AKBUGAEA, J. (1999) Release characteristics of chitosan treated alginate bead I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. **J. Microencapsul.** 16, 195-203.
- SHILPA, A., AGRAWAL, S. S. e RAY, A. R. (2003) Controlled delivery of drugs from alginate matrix. **J. Macromol. Sci.** 43, 187-221.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2006a) Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. **Eur. J. Pharm. Sci.** 29, 148-159.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FIGUEIREDO, I. V., GONCALVES, A. R. e VEIGA, F. (2006b) Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. **Int. J. Pharm.** 311, 1-10.
- SINHA, V. R. e KUMRIA, R. (2001) Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **Int. J. Pharm.** 224, 19-38.
- SMIDSRØD, O. e HAUG, A. (1968) A light scattering study of alginate. **Acta Chem. Scand.** 22, 797-810.
- SRIAMORNSAK, P. (1999) Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads. **Eur. J. Pharm. Sci.** 8, 221-227.
- TAKKA, S. e ACARTURK, F. (1999) Calcium alginate microparticles for oral administration. I: Effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency. **J. Microencapsul.** 16, 275-290.
- TIMMY, S. A., VICTOR, S. P., SHARMA, C. P. e KUMARI, V. (2002) Betacyclodextrin complexed insulin loaded alginate microspheres-oral delivery system. **Trends Biomater. Artif. Org.** 15, 48-53.

- TIYABOONCHAI, W., WOISZWILLO, J., SIMS, R. C. e MIDDAUGH, C. R. (2003) Insulin containing polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 255, 139-151.
- TONNESEN, H. H. e KARLSEN, J. (2002) Alginate in drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 28, 621-630.
- WANG, W. e HE, Z. (2002) Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. **Int. J. Pharm.** 244, 117-126.
- WANG, Z.-Y., ZHANG, Q.-Z., KONNO, M. e SAITO, S. (1994) Sol-gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations: a rheological study. **Biopolymers** 34, 737-746.



AVALIAÇÃO DA BIOACTIVIDADE DA INSULINA LIBERTADA DAS NANOESFERAS

CAPÍTULO IV

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais objectivos do trabalho exposto na presente dissertação baseou-se na encapsulação de insulina em nanoesferas preparadas pelo método de emulsificação/gelificação interna. A preocupação inicial centrou-se na transposição deste método da escala milimétrica/micrométrica para a escala nanométrica. Foram estudados diversos parâmetros de processo e de formulação, na tentativa de obter as nanoesferas com a menor granulometria possível, bem como o melhor processo de recuperação, após a produção das mesmas. De seguida, e de acordo com o que já foi referido no Capítulo III, a intenção foi obter nanoesferas sem libertação precoce da insulina a pH 1,2, uma vez que a formulação se destina a ser administrada oralmente e deverá actuar preferencialmente a nível intestinal. No presente capítulo é abordada outra problemática igualmente relevante: a bioactividade da insulina, após ter sido submetida a um processo de nanoencapsulação e recuperação das nanoesferas.

Para uma proteína ser considerada bioactiva, ela deverá preservar a sua estrutura, durante todo o processo de manipulação e após administração. De acordo com a FDA, considera-se um produto farmacêutico estável quando, ao final de 2 anos, o teor do princípio activo presente na formulação não é inferior a 90% do seu valor inicial declarado no rótulo. No caso das proteínas, o termo estabilidade é um conceito mais específico. De facto, é necessário considerar dois tipos de estabilidade nas proteínas, a estabilidade química e a física. A estabilidade química nas proteínas está relacionada com a manutenção da sequência de aminoácidos (estrutura primária) e a actividade das cadeias laterais (Bilati *et al.*, 2005). Normalmente, a degradação química das proteínas poderá ocorrer através de reacções de desaminação, isomerização, hidrólise, racemização, oxidação, formação de ligações dissulfureto e eliminação β (Bilati *et al.*, 2005). Por outro lado, a estabilidade física das proteínas é geralmente relacionada com a manutenção de, pelo menos, a sua estrutura terciária. Neste caso, a degradação física da proteína pode resultar de fenómenos de desnaturação, de natureza reversível ou irreversível (Bilati *et al.*, 2005) como, por exemplo, as

situações de degradação química, agregação e precipitação. A formação de fibrilhas na insulina é considerada um outro exemplo de uma degradação física (Garriques *et al.*, 2002).

As estruturas de proteínas e formulações que envolvam proteínas podem ser avaliadas por métodos analíticos. Estes métodos podem ser classificados em três grandes classes: métodos macroscópicos, macroscópicos/microscópicos e microscópicos, consoante o tipo de informação que fornecem. Os métodos macroscópicos analisam a estrutura proteica de uma forma mais abrangente e, nestes, podem incluir-se métodos cromatográficos de exclusão molecular, electroforese, estudos de viscosidade, calorimetria de varrimento diferencial (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) e ultracentrifugação analítica. Os métodos macroscópicos/microscópicos fornecem normalmente informações de sistemas mais complexos, reflectindo pequenas diferenças, quer em sistemas heterogéneos quer em sistemas homogéneos. A título de exemplo, podem incluir-se nesta classe, os seguintes métodos: DC, espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) e espectroscopia de *Raman*. Quando se pretende uma informação estrutural proteica mais detalhada, geralmente utilizam-se métodos de difracção raios-x, ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia de força atómica, espectrometria de massa e microscopia electrónica (Arvinte, 2005). Outros métodos poderão ser igualmente utilizados na caracterização da estrutura das proteínas, tais como os métodos de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ou *radioimmunoassay* (RIA).

Estruturalmente, a insulina possui 2 cadeias de aminoácidos, A e B, que contêm 21 e 30 aminoácidos, respectivamente, interligadas por duas pontes de dissulfureto. A conformação estrutural da insulina é essencial para a sua actividade hipoglicemiante (Chien, 1996). Por exemplo, se o resíduo C-terminal B₃₀ for removido da cadeia B, não haverá alterações de conformação, nem de actividade biológica, porém, se o resíduo C-terminal A₂₁ for removido, a insulina muda de configuração e perde a sua actividade biológica (Chien, 1996). Outro exemplo é o octapéptido terminal da cadeia B (B₂₃-B₃₀). Este último é importante, visto que a sua separação conduz a uma perda de 85% da actividade biológica. Os grupos amida, hidroxilo fenólico, imidazol e carboxílicos são igualmente fundamentais para a bioactividade da insulina. De uma forma muito geral, a insulina pode

sofrer alterações na sua estrutura, quer através de reacções de hidrólise que originarão produtos desaminados ou dímeros covalentes (Brange *et al.*, 1992a; Brange *et al.*, 1992b) quer através da formação de ligações intermoleculares covalentes com outras moléculas de insulina que originam produtos de elevado PM ou outros produtos mais complexos (Brange *et al.*, 1992a; Furtado *et al.*, 2006).

De uma maneira geral, e como referido anteriormente, a insulina, tal como outros fármacos peptídicos, é sensível a determinados factores, nomeadamente a temperatura elevada, humidade elevada, solventes orgânicos, agitação mecânica, ultra-sons, interfaces água-solvente, interfaces ar-água, adsorção da proteína ao polímero e tensão superficial (Crotts e Park, 1998; Bilati *et al.*, 2005; Ibrahim *et al.*, 2005). Estes factores podem provocar degradação molecular, desnaturação ou agregação da insulina. Além disso, outros factores poderão influenciar a estabilidade da proteína, nomeadamente a fonte e a pureza da proteína, o tipo de polímero envolvido na encapsulação e a presença ou não de aditivos (Bilati *et al.*, 2005). Mais ainda, a liofilização é normalmente utilizada como método de secagem das nanoesferas com insulina. No entanto, a liofilização pode condicionar a estabilidade da proteína. O processo de liofilização é dividido em três fases: congelamento inicial da água em gelo, secagem primária e a secagem secundária. A etapa da congelação é a fase mais agressiva da liofilização, uma vez que, durante esta etapa, ocorre a formação de uma interface gelo-líquido que pode contribuir para a agregação das proteínas (Yu *et al.*, 2006). Para evitar esta reacção, muitas vezes, são empregues crioprotectores, como descrito no Capítulo I. O congelamento deve ser muito rápido (ex: azoto líquido), de forma a promover uma rápida vitrificação da água sem agregação ou desdobraimento da proteína (Yu *et al.*, 2006). É desejável, ainda, que durante a liofilização se “reponha” o gelo na matriz vítrea, evitando qualquer perturbação estrutural na proteína. Usualmente, recorre-se a misturas de açúcares e derivados de amido (Yu *et al.*, 2006). Por outro lado, durante a liofilização, pode ocorrer a adsorção da proteína à interface ar-água e influenciar a sua estabilidade (Yu *et al.*, 2006). Embora exista alguma destabilização termodinâmica provocada pela baixa temperatura, não significa, necessariamente, que ocorra desdobraimento da proteína. A proteína pode ser liofilizada em segurança, se a velocidade de desdobraimento for suficientemente lenta, de

maneira que a fase de secagem termine sem que se verifique um desdobramento completo (Tang e Pikal, 2004).

Relativamente à caracterização da estabilidade e da estrutura da insulina, a literatura, descreve alguns dos métodos analíticos anteriores. A estabilidade físico-química da insulina foi avaliada através de HPLC-UV (Brange *et al.*, 1992b; Yamamoto *et al.*, 1994; Sadhale e Shah, 1999; Leobandung, 2002; Tiyafoonchai *et al.*, 2003b; Ibrahim *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2006), HPLC-MS (Ibrahim *et al.*, 2005), cromatografia de exclusão molecular (Brange *et al.*, 1992b; Furtado *et al.*, 2006), densidade óptica (García-Fuentes *et al.*, 2003) e electroforese (Brange *et al.*, 1992b; Oliva *et al.*, 1997). A estrutura/conformação da insulina foi analisada por DC (Silva-Cunha *et al.*, 1998; Sadhale e Shah, 1999; Bouchard *et al.*, 2000; Tiyafoonchai *et al.*, 2003b; Aguiar *et al.*, 2004), FTIR (Wei *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1992; Bouchard *et al.*, 2000; Dorkoosh *et al.*, 2002; Garriques *et al.*, 2002; Dzwolak *et al.*, 2003), ELISA (Barichello, 1999; Andersen *et al.*, 2000), RMN (Oliva *et al.*, 1997), microscopia electrónica (Bouchard *et al.*, 2000; Garriques *et al.*, 2002; Pinto-Alphandary, 2003) e os métodos cromatográficos inicialmente descritos (Oliva *et al.*, 1997).

O presente trabalho descreve, inicialmente, o método de preparação das nanoesferas de insulina, de seguida, a caracterização da granulometria, morfologia, EE, perfil de libertação *in vitro* e, finalmente, a bioactividade.

Embora os métodos analíticos descritos anteriormente avaliem a estabilidade físico-química e a estrutura da insulina, estes não garantem efectivamente a sua bioactividade. Neste trabalho, a bioactividade da insulina, após nanoencapsulação e libertação da proteína a partir das nanoesferas, foi avaliada através de dois métodos, *in vitro* e *in vivo*.

Sabe-se que a nível molecular, uma das primeiras acções celulares da insulina é a sua ligação específica ao receptor localizado na superfície da célula-alvo, como descrito no Capítulo I. O receptor da insulina é uma glicoproteína heterotetramérica que consiste em duas subunidades α (PM 135 kDa) e duas subunidades transmembranares β (PM 95 kDa) (Roques *et al.*, 1992). Estas duas últimas subunidades são consideradas subunidades efectoras para a sinalização celular que culmina com o efeito terapêutico da insulina. Na literatura estão descritos poucos métodos *in vitro* para a avaliação da bioactividade da insulina. Estes

métodos baseiam-se na interação da proteína com o seu receptor à superfície da célula. Porém, os anticorpos, necessários para caracterizar esta interação e consequente a bioatividade da insulina, são geralmente inespecíficos. Sabe-se, no entanto, que, e a ser activa a insulina, ocorre a fosforilação do receptor de insulina seguida de uma cascata de reacções de activações de determinadas proteínas. Uma das proteínas activadas é a proteína quinase, vulgarmente conhecida por Akt ou PKB (Alessi e Downes, 1998; Elghazi *et al.*, 2006). O anticorpo para a proteína Akt no estado activo, isto é, no estado fosforilado, é altamente específico e reprodutível com uma banda única nos geles obtidos através da técnica de *western blot* (Patel *et al.*, 2001). O presente trabalho descreve um protocolo inovador que quantifica a bioatividade *in vitro* da insulina, após nanoencapsulação e libertação a partir das nanoesferas. O protocolo baseia-se na estimulação de células à insulina, seguida da destruição celular, do seu isolamento e da quantificação da proteína Akt fosforilada por densitometria. A linha celular escolhida foi mioblastos L6 do rato. Os mioblastos são células muito sensíveis à insulina e, face ao seu estado de indiferenciação, permitem que sejam utilizados durante períodos de tempo prolongados.

A bioatividade da insulina, após o processo de nanoencapsulação e de libertação a partir das nanoesferas, foi igualmente avaliada através de ensaios *in vivo*. Para avaliação da bioatividade *in vivo* da insulina, foi necessário induzir a diabetes em modelos animais.

Na literatura, encontram-se propostos vários mecanismos de indução da diabetes, designadamente a indução da doença através do *stress*, infecções, toxinas ou outras manipulações incluindo a pancreatectomia, lesões do sistema nervoso central, uso de hormonas anti-insulínicas tal como o glucagon, a exposição à hidrocortisona ou hormona adrenocorticotrópica ou indução por vírus (Lerco *et al.*, 2003). Infelizmente, numa grande parte dos métodos anteriores, o agente utilizado não é capaz de mimetizar a fisiopatologia da diabetes no ser humano.

Sendo assim, optou-se por métodos químicos que provocam a supressão endócrina do pâncreas e exibem todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogénico. O aloxano e a estreptozotocina (STZ) são dois agentes químicos com citotoxicidade específica para as células β dos ilhéus de

Langerhans no pâncreas. Estes fármacos causam insuficiência insulínica primária do órgão, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicémicos durante as primeiras horas da administração, seguida da estabilização da doença nas 24 h subsequentes. Estes métodos químicos, apesar de terem um elevado índice de mortalidade em relação a outros métodos, são de fácil execução, permitem a utilização de um grande número de animais e a destruição da parte endócrina do pâncreas com preservação de sua função exócrina. Além disso, estes métodos apresentam a vantagem de estarem padronizados a nível laboratorial (Lerco *et al.*, 2003).

O aloxano (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracilo) e o seu produto de redução, ácido dialúrico, provocam uma série de reacções redução-oxidação, com formação de radicais superóxido (Szkudelski, 2001). Estes radicais desencadeiam uma série de reacções químicas com a formação de espécies reactivas de oxigénio e um aumento massivo dos níveis de cálcio intracelular que levam à destruição das células β (Szkudelski, 2001). Este tipo de agente químico é utilizado quando se pretende induzir a diabetes insulino-dependente, ou seja, diabetes tipo 1. A dose administrada de aloxano deve ser rigorosa devido ao risco de cetose. Em algumas situações, é necessário o reforço da dose para obter um efeito diabetogénico.

No caso da STZ (2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranosose), composto sintetizado *Streptomyces achromogenes*, segue um mecanismo de acção diferente (Al-Achi e Greenwood, 2001). O agente químico utiliza os transportadores de glucose a nível celular (GLUT2) e causa a alquilação do ADN (Wijkstrom *et al.*, 2005). A alteração no ADN induz a activação do poli-ADP-ribosilação que, por sua vez, conduz à deplecção celular NAD^+ e ATP. Após a administração de STZ, o aumento da desfosforilação do ATP estimula a xantina oxidase (as células β possuem uma grande actividade desta enzima) e conduz à formação de radicais superóxido. Por outro lado, a STZ é dador de óxido nítrico que inibe a actividade aconitase e altera o ADN (Szkudelski, 2001). Todos estes factos levam à destruição das células por necrose. A STZ pode ser utilizada na indução dos dois tipos de diabetes insulino-dependente (diabetes tipo 1) e não insulino-dependente (diabetes tipo 2), ambos sem situações de cetose (Szkudelski, 2001).

O modelo animal utilizado para a diabetes foi o rato, pelo facto de apresentar inúmeras vantagens em relação ao cão e a outros animais de maior porte, designadamente a facilidade de manipulação (alimentação, higiene e acomodação), a possibilidade de trabalhar simultaneamente com vários grupos experimentais, sem a ocupação de grandes espaços; a relativa resistência a infecções e, finalmente, por questões económicas. Além desses factores, o modelo experimental da diabetes induzida no rato apresenta semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com a diabetes no ser humano (Lerco *et al.*, 2003).

No presente trabalho, a indução da diabetes foi conseguida por destruição química das células β , recorrendo à STZ, tal como em outros trabalhos descritos (Damgé *et al.*, 1990; Watnasirichaikul *et al.*, 2002; Tiyaboonchai *et al.*, 2003b). Sabe-se também que poderiam ser utilizados ratos diabéticos geneticamente modificados (Furtado *et al.*, 2006), mas, atendendo à dificuldade de aquisição, optou-se pela indução química da diabetes. Encontram-se ainda descritos, na literatura, estudos que utilizam ratos normais (Silva-Cunha *et al.*, 1998; Barichello, 1999; Carino *et al.*, 2000; Kumar e Misra, 2003; Pinto-Alphandary, 2003). Na realidade, em termos práticos, o rato diabético apresenta vantagens relativamente ao rato normal, porque só assim os resultados experimentais obtidos serão, inequivocamente, devido à insulina exógena que foi administrada e não à produção endógena de insulina (Furtado *et al.*, 2006).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O alginato de sódio e o sulfato de dextrano foram os indicados no Capítulo III. O carbonato de cálcio ultrafino, o agente emulsivo (Span[®] 80), a parafina líquida e a insulina foram os indicados no Capítulo II. Nos ensaios de bioatividade *in vitro* da insulina, a albumina bovina sérica (B9001S), que serviu como padrão para as curvas de calibração, foi adquirida à New England BioLabs (Pickering, Ontario, Canadá). Os reagentes utilizados para a preparação do meio de cultura foram adquiridos à Gibco[®]-Invitrogen Corporation (Burlington, Ontario, Canadá). Os anticorpos monoclonais do rato, Akt fosforilada (Ser473), foram adquiridos à New England BioLabs (Pickering, Ontario, Canadá). Os anticorpos policlonais do coelho Akt e Akt fosforilada (Ser473) foram adquiridos aos laboratórios Cell Signaling Technology-New England BioLabs (Pickering, Ontario, Canadá). Os anticorpos actina e PY99 (p-tirosina) foram adquiridos aos laboratórios Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). A STZ foi adquirida à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A água desionizada utilizada na preparação de soluções foi obtida a partir de um sistema Millipore Elix 5 (Bedford, MA, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico, já indicados no Capítulo II.

2.2. Preparação das nanoesferas

As nanoesferas foram preparadas segundo o protocolo descrito no Capítulo III, com o tipo de alginato, polímero aniônico de reforço da matriz, razão cálcio/alginato (m/m) e razão molar ácido/cálcio otimizados para a ausência de libertação da insulina em meio ácido. Resumidamente, uma solução aquosa de alginato de sódio a 2% (m/V) e de sulfato dextrano a 0,75% (m/V) foi preparada por adição do polímero e do polímero-adjuvante em 40 mL de água desionizada a pH 6,4 e sob agitação lenta (100 rpm, 6-8 h), num agitador de movimento

orbital. Após dissolução do alginato de sódio e do sulfato de dextrano, uma solução de insulina a 100 UI/mL (10 mL) foi adicionada, lentamente, à solução anterior. Depois da homogeneização, a solução foi deixada em repouso, pelo menos, 1 h para desgaseificar.

Uma suspensão aquosa de carbonato de cálcio ultrafino a 5% (m/V) foi sujeita a sonicação (20 KHz, output 70, Vibra-Cell[®] VC 130, Sonics, Newton, CT, EUA) durante 30 min e 3,5 mL desta suspensão foram adicionados à solução de alginato de sódio-insulina-sulfato dextrano, de modo a obter uma razão cálcio/alginato de 7% (m/m). Após homogeneização, a mistura foi transferida para um reactor de fundo redondo, contendo 50 mL de parafina líquida (razão A/O de 50/50, V/V) e um agente emulsivo (Span[®] 80) a 1,5% (V/V). A dispersão das duas fases foi conseguida por agitação a uma velocidade de 1600 rpm, utilizando um agitador Ika[®] Eurostar (Staufen, Alemanha) provido de uma hélice marinha de três lâminas de 5,2 cm de diâmetro. O período de emulsificação foi de 15 min e, após este período, adicionaram-se 20 mL de parafina líquida, contendo 300 µL de ácido acético glacial (razão molar ácido/cálcio de 3) para solubilizar o carbonato de cálcio e permitir a gelificação do alginato. As nanoesferas resultantes e dispersas na fase oleosa foram recuperadas, segundo o protocolo seleccionado no Capítulo II, isto é, por adição de 100 mL de uma solução, contendo tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII) e agentes desidratantes (tampão acetato de pH 4,5, acetona, isopropanol e n-hexano, 70:15:10:5 (V/V)), seguida de centrifugação (12.500 × g, 10 min). O ciclo de lavagem foi efectuado mais três vezes, mas com apenas 50 mL de tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII).

As nanoesferas foram liofilizadas a 0°C durante 48 h (Lyph-Lock 6, Labconco, Kansas City, MS, EUA), após congelamento da suspensão de nanoesferas a -50°C num banho de etanol a 96% (V/V) (Benchtop Shell Freezer, Freezone[®] modelo 79490, Labconco).

Além disso, foram preparadas nanoesferas vazias, isto é, sem adição de insulina. Neste último caso, a solução de insulina foi substituída por 10 mL de água desionizada no processo de preparação das nanoesferas.

2.3. Caracterização granulométrica e morfológica das nanoesferas

A distribuição granulométrica e a polidispersividade das nanoesferas foram determinadas de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

A morfologia foi analisada por microscopia electrónica de transmissão (TEM). As amostras foram colocadas em grelhas de carbono, coradas com acetato de uranilo e secas à temperatura ambiente. Depois de secas, as nanoesferas foram observadas no microscópio do modelo Zeiss EM 902A (Oberkochen, Alemanha).

2.4. Determinação da eficiência de encapsulação (EE)

Uma quantidade de nanoesferas liofilizadas (30 mg) foi incubada em 20 mL de tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM e sob agitação magnética (100 rpm, 1 h). De seguida, a suspensão foi centrifugada ($12.500 \times g$, 10 min) e a quantidade de insulina libertada no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce, Pittsburgh, EUA), utilizando um comprimento de onda de 595 nm. A EE (%) da insulina foi calculada com base na Equação IV-1 (Anexo I).

$$EE (\%) = \frac{\text{Insulina libertada } (\mu\text{g}) \text{ das nanoesferas (30 mg)}}{\text{Insulina teórica } (\mu\text{g}) \text{ em 30 mg de nanoesferas}} \times 100 \quad \text{Equação IV-1}$$

2.5. Perfil de libertação *in vitro*

Uma quantidade de nanoesferas (10 mg) foi colocada em 10 mL de tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXVIII) sob agitação magnética (100 rpm, 2 h). A agitação magnética foi realizada numa placa com múltiplos focos (Variomag® Telesystem, H+P Labortechnik AG, Oberschleissheim, Alemanha). Ao fim desse período, procedeu-se a uma centrifugação ($12.500 \times g$, 10 min) e aspiração do sobrenadante. As nanoesferas foram transferidas para

10 mL de tampão fosfato de pH 6,8 (USP XXVIII) e submetidas a agitação magnética (100 rpm, 6 h). Foram recolhidas amostras de 1,5 mL de ambos os meios a tempos pré-determinados. O volume dos meios foi sempre constante, uma vez que as amostras recolhidas foram substituídas pelo mesmo volume em tampão fresco. A quantidade de insulina nessas amostras foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Bradford e a libertação cumulativa de insulina foi calculada de acordo com a Equação II-7 apresentada no Capítulo II (Anexo I). Os ensaios foram realizados em triplicado, e as nanoesferas vazias foram submetidas às mesmas condições e serviram como controlo.

2.6. Bioatividade *in vitro* da insulina

A bioatividade da insulina, após a nanoencapsulação e a libertação das nanoesferas, foi avaliada através da técnica de *western blot*.

2.6.1. Cultura celular

Os mioblastos L6 foram cultivados em placas de 35 mm com o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) enriquecido com soro fetal bovino a 10% (V/V), glutamina a 1% (m/V) e suplementado com antibiótico a 1% (V/V) (10.000 unidades/mL de penicilina G sódica, 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B em meio salino 0,85%) em atmosfera controlada.

2.6.2. Congelamento das células

Os mioblastos L6 foram conservados em azoto líquido com 5% de DMSO. As células foram descongeladas em banho de água a 37°C e transferidas para 10 mL do meio de cultura. As células foram centrifugadas (45 × g, 5 min) e o meio de cultura e o DMSO foram removidos por aspiração. As células sedimentadas foram suspensas, novamente, em meio de

cultura e colocadas em placas de 35 mm. O meio de cultura (2 mL) foi substituído, no dia seguinte, e, depois, de dois em dois dias.

2.6.3. Cell splitting

As células foram cultivadas até apresentarem uma confluência de 1:8. Cada placa foi lavada com 1 mL de PBS esterilizado a pH 7,2 (USP XXVIII) para remover os inibidores de tripsina e incubada com 0,5 mL de tripsina-EDTA a 0,25% (m/V) da Gibco®-Invitrogen Corporation (Burlington, Ontario, Canadá). As células foram ressuspensas no meio de cultura, antes de serem colocadas em placas de 35 mm.

2.6.4. Estimulação das células

Seis horas antes da estimulação celular, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de DMEM, contendo apenas glutamina a 1% (m/V) e antibiótico-antimicótico a 1% (V/V), no sentido de remover o soro fetal bovino. De seguida, as células foram novamente incubadas com 2 mL do meio de cultura anterior. Uma hora antes da estimulação celular, o meio de cultura foi novamente substituído com 1 mL de meio de cultura fresco.

Foi preparada uma solução controlo contendo concentrações específicas de insulina em PBS de pH 7,4 (USP XXVIII). Foram estudadas duas variáveis separadamente: o gradiente de concentração de insulina e o tempo de estimulação, com o objectivo de obter o efeito máximo de fosforilação da proteína Akt. Relativamente ao tempo de estimulação, foram avaliados os seguintes tempos: 0, 1, 2, 5, 10 e 30 min de estimulação. O estudo do gradiente de concentração decorreu em triplicado com concentrações de insulina compreendidas entre 0 e 100 nM e depois 9,5 a 100 nM para 10 min de estimulação.

Foi adicionado 1 mL da solução contendo insulina a 100 nM a cada placa contendo os mioblastos. Em intervalos de tempos específicos (0, 1, 2, 5, 10 e 30 min de estimulação), cada placa foi rapidamente colocada em gelo. A solução para a estimulação celular foi aspirada, a placa foi lavada com 1 mL de PBS arrefecido e depois foram adicionados 250 µL de tampão

para provocar a lise celular. Este último tampão continha Nonidet P-40 a 1% (m/V), deoxicolato de sódio a 1% (m/V), dodecilsulfato de sódio a 0,1% (m/V), cloreto de sódio a 0,15 M, EDTA a 2 mM, fluoreto de sódio a 50 mM e fosfato de sódio a 0,01 M de pH 7,2. O meio foi ainda enriquecido com vanadato (diluição 1:1000 da solução stock), leupeptina (diluição 1:1000 da solução stock) e aprotinina (diluição 1:1000 da solução stock). O fluoreto de fenilmetilsulfonilo foi preparado a 17 mg/mL em isopropanol e adicionado ao tampão anterior (diluição 1:100 da solução stock). Todas as soluções stock referidas anteriormente foram preparadas através de diluições com água desmineralizada a pH 7,3 e conservadas a 4°C.

O lisado celular foi recolhido para microtubos, agitado no vórtex durante 10 s, seguido de repouso em gelo durante 20 min e centrifugação a 4°C ($20.000 \times g$, 15 min). O sobrenadante foi então dividido para dois ensaios diferentes: 200 µL do sobrenadante foram utilizados na técnica de *western blot* e 15 µL foram utilizados para quantificação proteica pelo método de Bradford. As amostras para a técnica de *western blot* foram diluídas com 40 µL (seis vezes) com tampão Laemmli, aquecidas durante 3 min e de novo colocadas em gelo. Ambas as amostras, para *western blot* e Bradford, foram congeladas a -70°C.

O estudo do gradiente de concentração foi igualmente avaliado com idêntico protocolo, em triplicado, mas para concentrações de insulina compreendidas entre 0 a 100 nM e 9,5 a 100 nM, com um tempo de estimulação celular constante (10 min).

2.6.5. Doseamento da proteína pelo método de Bradford

As amostras foram descongeladas e diluídas com água desmineralizada (1:5). De seguida, foram quantificadas espectrofotometricamente pelo método de Bradford (Bio-rad Protein Assay, Bio-rad Laboratories Mississauga, Canadá) em placas de 96 células. As absorvâncias foram lidas num espectrofotómetro de multiplacas ELx800UV (BioTek Instruments Inc., Vermont, EUA) e com o comprimento de onda de 595 nm. As curvas de calibração, utilizando como padrão albumina bovina sérica, e a quantificação da insulina foram as indicadas pelo fornecedor do kit. O ensaio foi realizado em triplicado. Após a

quantificação, o conteúdo proteico foi normalizado para 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, utilizando diluições específicas com tampão Laemmli.

2.6.6. Western blot

As proteínas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida com a composição descrita no Anexo IV, utilizando um sistema *Mini-Protean* (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canadá). Em seguida, as proteínas separadas foram transferidas do gel para membranas, recorrendo ao sistema de transferência de células *Bio-Rad Transblot SD Semi-Dry* com filtro de papel extra grosso (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canadá) e membranas de transferência *Millipore Immobilon* (Millipore, Mississauga, Ontario, Canadá), aplicando uma corrente de 110 mA durante 45 min.

As membranas foram lavadas com tampão Tris salino com Tween[®] 20 (cloreto de sódio a 150 mM, Tris a 10 mM e Tween[®] 20 a 0,1% (V/V)) para eliminar a acrilamida residual e, de seguida, foram colocadas sob agitação lenta no tampão bloqueador (Blotto TBST ou Blotto TBST com albumina a 5% (m/V)), durante 1 h, à temperatura ambiente (ver Anexo IV). Posteriormente, as membranas foram incubadas com uma solução de anticorpo primário a 4°C sob agitação lenta durante 12 h. Foram aplicados diferentes anticorpos, designadamente α -Akt, α -Akt fosforilada (Ser473), α -actina e α -pY99. Os anticorpos controlo utilizados foram a actina e o pY99. As fontes de anticorpos, os tampões bloqueadores e as diluições utilizadas encontram-se descritos na Tabela AIV-2 do Anexo IV. Após a incubação com o anticorpo primário, cada membrana foi lavada três vezes com tampão Tris salino com Tween[®] 20 e incubada com soluções de peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase*) conjugada com o anticorpo secundário, durante 1 h, à temperatura ambiente e sob agitação lenta. Após 1 h, cada membrana foi de novo lavada, de acordo o protocolo anterior, e imersa 30 s numa solução contendo substrato quimioluminescente. A membrana foi analisada e a imagem foi processada (Kodak M35A X-OMAT, Kodak Diagnostic Imaging Inc., Rochester, New York, EUA), sendo esta analisada por densitometria. A razão de intensidades da proteína Akt fosforilada e a proteína Akt não

fosforilada foi determinada por regressão linear. A percentagem de bioatividade da insulina foi determinada de acordo com a equação obtida por regressão linear, tendo em conta o factor de diluição e os valores de bioatividade da insulina teóricos.

2.6.7. Libertação da insulina a partir das nanoesferas

As nanoesferas foram suspensas em tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII) de forma a obter uma concentração final de 1 mg/mL. De seguida, 1 mL desta suspensão foi centrifugado ($12.500 \times g$, 10 min). O tampão acetato foi removido por aspiração. As nanoesferas foram ressuspensas em 400 μ L de PBS de pH 7,4 (USP XXVIII), durante 1 h, à temperatura ambiente e sob agitação. Após este período, as nanoesferas foram de novo centrifugadas ($12.500 \times g$, 10 min). Retiraram-se 400 μ L do sobrenadante e adicionou-se a 1,6 mL da solução para estimulação celular. A insulina não encapsulada foi sujeita às mesmas condições e foi considerada como solução controlo.

2.7. Bioatividade *in vivo* da insulina

2.7.1. Indução da Diabetes Mellitus

A bioatividade da insulina foi avaliada *in vivo* recorrendo a ratos *Wistar*, machos e com pesos compreendidos entre 200-300 g. Os animais foram devidamente acomodados num biotério com controlo de temperatura, humidade e qualidade do ar, com um ciclo diário de luz de 12 h e agrupados em grupos de dois animais por caixa (Figura IV-1). As caixas de policarbonato apresentavam grelhas metálicas e tampas de policarbonato com possibilidade de aplicação de filtros de ar. Os animais foram alimentados com uma ração própria e com acesso livre a água.



Figura IV-1. Biotério e as condições de acomodação dos animais em experimentação.

O projecto de experimentação animal foi aprovado pela Direcção Geral de Veterinária, de acordo com o Decreto-Lei n.º 129/92, de 6 de Julho, que transpõe para o direito interno a Directiva n.º 86/609/CEE, de 24 de Novembro, e ao abrigo da Portaria n.º 1005/92, de 23 de Outubro.

Antes da indução da diabetes do tipo 1, os ratos foram colocados em jejum durante 16-19 h com acesso livre a água. Uma solução de STZ a 20 mg/mL foi preparada extemporaneamente em tampão citrato de pH 4,5 (adição de 25,5 mL de citrato de sódio a 0,1 M e 24,5 mL de ácido cítrico a 0,1 M para um balão de 100 mL que foi aferido com água destilada) e administrada, no máximo, durante 1 h após a sua preparação. Antes da administração da STZ, foram determinados em todos os animais, os níveis da glicémia basal. A glicémia foi medida, utilizando um glicómetro Medisense[®] Precision Xtra (Abbott, Illinois, EUA).

A diabetes foi induzida, quimicamente, através de uma injeção intraperitoneal (i.p.) e com dose única de STZ (50 mg/kg). Durante as primeiras 24 h, foi fornecido soro glicosilado a 5% (m/V) aos ratos para prevenir a hipoglicémia reaccional causada pela destruição das

células β do pâncreas. Após 8-10 dias do tratamento com STZ, os ratos com poliúria, perda de peso corporal e níveis de glicémia superiores a 250 mg/dL, foram incluídos no estudo e randomizados em 7 grupos (por grupo $n = 6$), tal como mostra a Tabela IV-1.

Tabela IV-1. Randomização dos animais em estudo e os diferentes tratamentos.

Grupo	Tratamento
Teste	
I	Insulina encapsulada e libertada das nanoesferas a 1 UI/kg
II	Insulina encapsulada e libertada das nanoesferas a 4 UI/kg
Controlos	
I	Efeito jejum
II	Meio de dispersão (PBS)
III	Insulina não encapsulada a 1 UI/kg
IV	Insulina não encapsulada a 4 UI/kg
V	Nanoesferas vazias

2.7.2. Libertação da insulina a partir das nanoesferas

Uma quantidade de nanoesferas liofilizadas (41,5 mg) foi incubada em 20 mL de PBS de pH 7,4 (USP XXVIII) com o objectivo de libertar a insulina a partir das nanoesferas (100 rpm, 2 h). Após centrifugação ($12.500 \times g$, 10 min), o sobrenadante foi filtrado através de um filtro com um poro de 0,45 μm e, a quantificação da insulina no filtrado foi realizada segundo o método de Bradford (Anexo I). As nanoesferas vazias e o meio de dispersão (PBS) foram submetidos às mesmas condições e considerados como grupos controlo negativo. O efeito jejum foi analogamente analisado e considerado como controlo negativo. Como grupos controlo positivo, a insulina não encapsulada foi dissolvida em PBS nas mesmas condições e a concentração de insulina foi ajustada de forma a obter o mesmo valor que a insulina encapsulada e libertada das nanoesferas.

Para minimizar as flutuações diurnas dos níveis de glicemia dos ratos, todas as experiências se iniciaram à mesma hora e sempre no início da manhã (8:00 às 9:00). A administração aos ratos diabéticos foi realizada após um jejum de, pelo menos, 16 h com livre acesso a água e depois de confirmado o estado hiperglicêmico. A via de administração para todas as formulações e respectivos grupos foi a s.c., tal como mostra a Figura IV-2. O volume injectado foi de 1 mL/kg e idêntico para todos grupos. Nos grupos de estudo e grupos controlo positivo foram administradas, pela mesma via de administração, duas doses de insulina, 1 UI/kg e 4 UI/kg.



Figura IV-2. Fotografias relativas à administração das formulações a ratos diabéticos pela via s.c. e determinação da glicemia através da colheita sanguínea na extremidade da cauda do rato, utilizando um glicómetro Medisense® Precision Xtra.

A colheita sanguínea foi realizada por picada com uma agulha na extremidade da cauda em intervalos de tempo pré-determinados e a curva da glicemia em função do tempo foi traçada e analisada.

2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com o descrito no Capítulo III.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização granulométrica e morfológica das nanoesferas

As nanoesferas produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna foram caracterizadas em termos de distribuição granulométrica e morfologia, através de difracção laser e microscopia electrónica de transmissão, respectivamente. A distribuição granulométrica das nanoesferas, e tal como mostra a Figura IV-3, foi unimodal. Aproximadamente 90% das nanoesferas apresentaram um diâmetro médio inferior a 1 μm (D_{90}) e cerca de 50% menos de 564 nm (D_{50}).

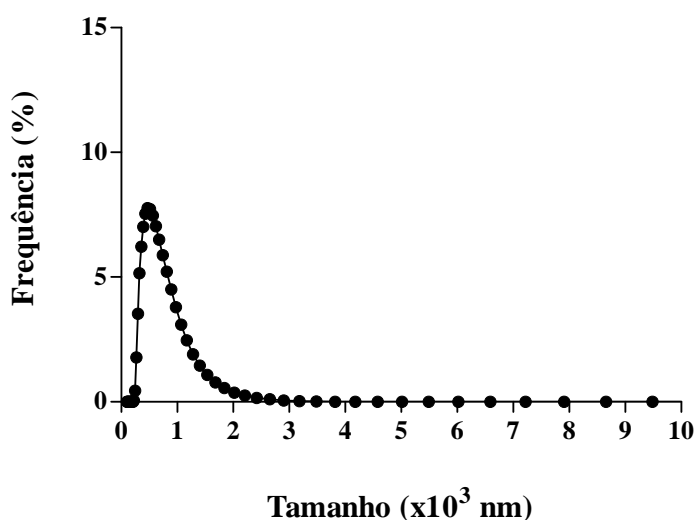


Figura IV-3. Distribuição granulométrica, em número, das nanoesferas obtidas através do método de emulsificação/gelificação interna.

Relativamente à morfologia, a análise por TEM demonstrou que as nanoesferas apresentaram uma forma relativamente esférica (Figura IV-4). Esta análise confirmou a granulometria observada pela técnica anterior. Contudo, observou-se a presença de alguns aglomerados.

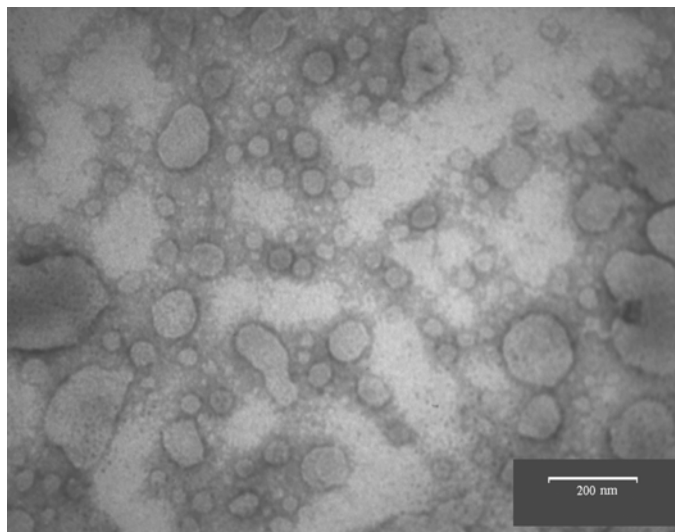


Figura IV-4. Fotografia obtida através de TEM das nanoesferas produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna.

3.2. Eficiência de encapsulação (EE)

A EE da insulina nas nanoesferas de alginato produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna foi de $82,5 \pm 3,3$ %.

3.3. Perfil de libertação *in vitro*

A Figura IV-5 representa o perfil de libertação da insulina em condições experimentais muito similares às condições fisiológicas, à excepção do conteúdo enzimático. Observou-se que em meio ácido, tampão HCl/KCl de pH 1,2, a insulina foi completamente retida nas nanoesferas. No entanto, quando as nanoesferas foram transferidas para o tampão fosfato de pH 6,8, ocorreu uma dissolução rápida e completa das nanoesferas com uma libertação instantânea da insulina (cerca de 89%). A libertação total de insulina ocorreu ao final de 30 min no tampão fosfato de pH 6,8.

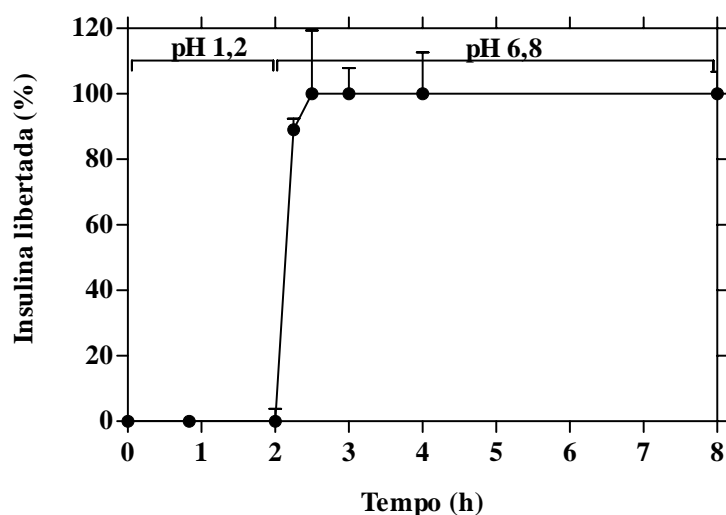


Figura IV-5. Perfil de libertação *in vitro* da insulina a partir das nanoesferas produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna. Cada ponto corresponde à média de 3 determinações \pm D.P..

3.4. Bioatividade *in vitro* da insulina

Foi desenvolvido um protocolo *in vitro* para quantificar o estado de fosforilação da proteína Akt após a ligação da insulina ao seu receptor celular. Foram estudadas duas variáveis: tempo de estimulação e concentração de insulina de forma a obter a fosforilação máxima da proteína Akt.

3.4.1. Tempo necessário para obter a fosforilação máxima da proteína Akt

Os mioblastos L6 foram estimulados com 100 nM de insulina não encapsulada durante os seguintes períodos de tempo: 0, 1, 2, 5, 10 e 30 min. Os lisados celulares foram recolhidos e analisados por *western blot*. Como esperado, ao minuto zero, não foi detectada qualquer fosforilação da proteína Akt. Ao minuto 1 e 2, foi observada uma ligeira estimulação celular. Apesar de existir alguma variabilidade entre os ensaios, verificou-se, em todos eles, que o efeito máximo decorreu aos 10 min (Figura IV-6). A análise dos resultados por densitometria encontra-se descrita na Tabela IV-2.

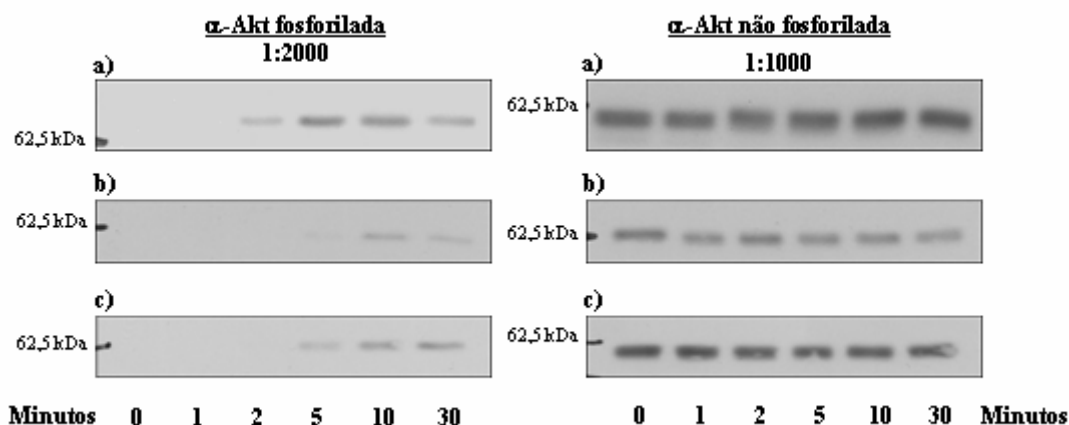


Figura IV-6. Estudo do factor tempo na fosforilação da proteína Akt na ausência de insulina (tempo de estimulação zero) e na presença da insulina ao final de 1, 2, 5, 10 e 30 min de estimulação. A imagem da esquerda corresponde Akt fosforilada e a imagem da direita à proteína Akt não fosforilada. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Tabela IV-2. Densitometria das diferentes razões Akt fosforilada/Akt não fosforilada obtidas no estudo do factor tempo para fosforilação da proteína Akt. Os ensaios foram realizados em triplicado e os valores normalizados para 1,0 ao minuto 10.

Ensaio	Tempo de estimulação celular (min)					
	0	1	2	5	10	30
1	0,000	0,000	0,325	1,020	1,000	0,651
2	0,001	0,060	0,050	0,274	1,000	0,712
3	0,005	0,013	0,119	0,716	1,000	1,358

3.4.2. Gradiente de concentração de insulina para obter a fosforilação máxima da proteína Akt

O gradiente de concentração de insulina para obter o estado de fosforilação máxima da Akt foi também alvo de estudo. Os lisados celulares foram recolhidos e analisados por *western blot* (Figura IV-7). A análise dos resultados por densitometria encontra-se descrita na Tabela IV-3.

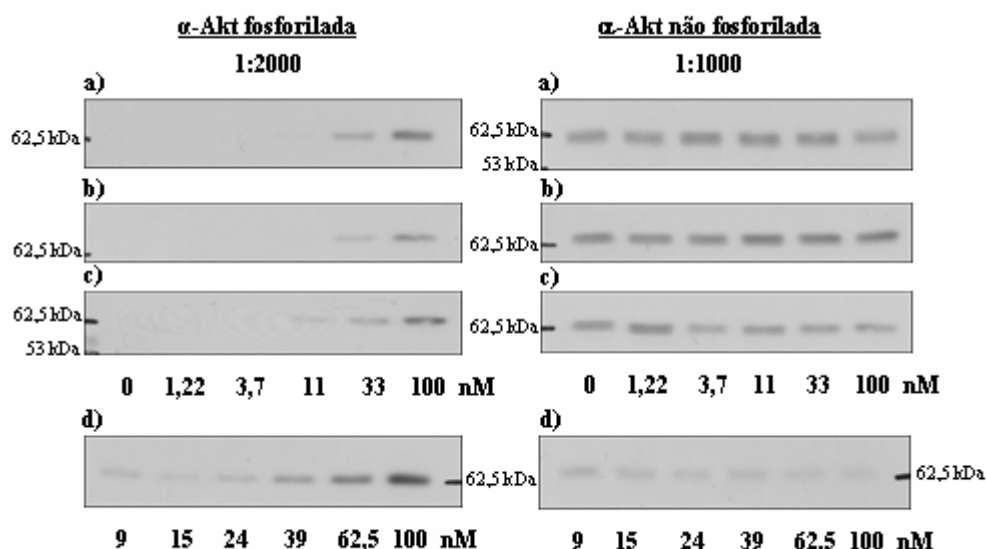


Figura IV-7. Estudo do gradiente de concentração de insulina na fosforilação da proteína Akt com 10 min de estimulação celular. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Tabela IV-3. Densitometria das diferentes razões Akt fosforilada/Akt não fosforilada obtidas no estudo do gradiente de concentração para fosforilação da proteína Akt (tempo de estimulação de 10 min). Os ensaios foram realizados em triplicado e os valores normalizados para 1,0 quando a concentração de insulina foi de 100 nM. Foi ainda realizado um quarto ensaio (ensaio 4).

Concentração de insulina (nM)	0,4	1,23	3,7	11	33	100
Ensaio 1	0,02	0,05	0,08	0,07	0,35	1,00
Ensaio 2	0,10	0,08	0,08	0,09	0,33	1,00
Ensaio 3	0,06	0,03	0,02	0,14	0,34	1,00
Concentração de insulina (nM)	9,5	15	24	39	62,5	100
Ensaio 4	0,12	0,10	0,17	0,26	0,50	1,00

3.4.3. Bioatividade in vitro da insulina libertada a partir das nanoesferas

A insulina libertada das nanoesferas foi sujeita às mesmas condições experimentais da insulina não encapsulada. Os mioblastos foram estimulados com insulina libertada a partir das nanoesferas. Os lisados celulares foram igualmente recolhidos e analisados por *western blot*. A razão relativa das intensidades entre a proteína Akt fosforilada e Akt não fosforilada foi de

0,299. Aplicando a Equação IV-2 (consultar Anexo IV), a bioactividade de insulina foi de 55%, conforme descreve a Tabela IV-4.

$$\frac{Akt_{fosforilada}}{Akt_{n\tilde{a}o\ fosforilada}} = 0,0346 e^{0,0346 \times Concentra\tilde{c}ao} \quad \text{Equa\tilde{c}ao IV-2}$$

Tabela IV-4. Bioactividade *in vitro* da insulina encapsulada e libertada a partir das nanoesferas (%).

Intensidade relativa observada para 0,1 mg de nanoesferas	0,299
Actividade experimental (nmol/mg nanoesferas)	1,25
Actividade teórica (nmol/mg nanoesferas)	2,28
Bioactividade (%)	55

Nota: Para os cálculos intermédios, assumiu-se que o PM da insulina seria de 5,8 kDa.

3.5. Bioactividade *in vivo* da insulina libertada a partir das nanoesferas

A bioactividade foi avaliada *in vivo* após injeccão s.c. da insulina libertada das nanoesferas. Antes da administraçãõ das formulações, os valores de glicémia basal dos ratos diabéticos foram superiores a 350 mg/dL, tendo sido observado o valor médio de 379,71 ± 10,55 mg/dL. Após a administraçãõ, observou-se uma reduçãõ semelhante na glicémia em todos os grupos com insulina, designadamente no grupo com insulina não encapsulada a 1 UI/kg e a 4 UI/kg e insulina encapsulada e libertada das nanoesferas a 1 UI/kg e a 4 UI/kg. A Figura IV-8 mostra que todos os grupos de animais com formulações contendo insulina tiveram o mesmo comportamento em termos de actividade máxima e duraçãõ de acçãõ. A acçãõ da insulina foi rápida (0,5-1 h). Os valores máximos foram atingidos entre 2^a e a 4^h do ensaio. Após 4 h, a reduçãõ de glicémia dos ratos diabéticos foi de 76% e 89% para a insulina encapsulada e libertada das nanoesferas 1 UI/kg e insulina encapsulada e libertada das nanoesferas 4 UI/kg, respectivamente. O efeito manteve-se

durante 8 h. Os restantes grupos controlo, PBS e nanoesferas vazias, demonstraram valores de glicémia elevados durante o ensaio. Não houve diferenças entre os grupos controlo negativo.

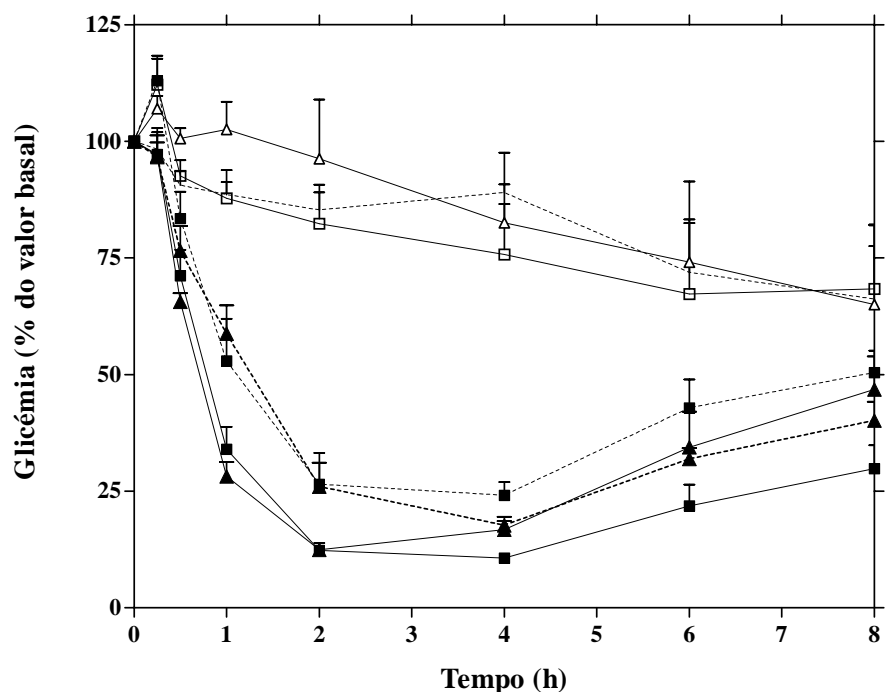


Figura IV-8. Níveis de glicémia após administração s.c. a ratos diabéticos: grupo jejum (---), PBS (-Δ-), nanoesferas vazias (-□-), insulina não encapsulada 1 UI/kg (--▲--), insulina encapsulada e libertada das nanoesferas 1 UI/kg (-■-), insulina não encapsulada 4 UI/kg (-▲-) e, finalmente, insulina encapsulada e libertada das nanoesferas 4 UI/kg (-■-). Cada ponto corresponde à média de 3 determinações ± D.P.M. (por grupo n = 6).

4. DISCUSSÃO

4.1. Caracterização granulométrica e morfológica das nanoesferas

O método de emulsificação/gelificação interna permitiu encapsular a insulina em nanoesfera de alginato com uma distribuição granulométrica unimodal, onde cerca 90% das partículas produzidas apresentaram um tamanho inferior a 1 μm . Tal como foi referido nos Capítulos II e III, a granulometria das nanoesferas obtidas é de extrema importância para a absorção oral de insulina. Alguns estudos descritos na literatura referem 5 μm (Damgé *et al.*, 1996), como valor crítico para ocorrer absorção intestinal, incluindo as placas de Peyer, enquanto outros estudos referem 10 μm (Eldridge *et al.*, 1990; Desai *et al.*, 1997). Qualquer que seja esse limite, as nanoesferas produzidas pelo método de emulsificação/gelificação interna apresentaram uma granulometria inferior ao valor crítico e, desta forma, poderão ser absorvidas por via oral.

Outro factor igualmente importante para a absorção das partículas através da barreira intestinal diz respeito à forma das mesmas. Sabe-se que as partículas esféricas apresentam uma maior área de superfície, comparativamente com partículas disformes (Powers *et al.*, 2006). De facto, quanto maior for a área de material exposta a um determinado ambiente ou, alternativamente, a área interfacial desse mesmo material, maior será a sua área de superfície (Powers *et al.*, 2006). Se as partículas forem esféricas, possuem uma área de superfície mais elevada e, por conseguinte, apresentam uma maior área exposta para a interacção com o epitélio intestinal. As fotografias obtidas através de TEM demonstraram que a maioria das nanoesferas eram esféricas. Contudo, observou-se a presença de alguns aglomerados.

4.2. Eficiência de encapsulação (EE)

O método de emulsificação/gelificação interna permitiu encapsular eficazmente a insulina nas nanoesferas (EE superiores a 80%). Os factores de processo e de formulação que influenciam este parâmetro encontram-se descritos nos trabalhos dos Capítulos II e III. Além

desses factores, a EE é igualmente influenciada pelo valor do pH do meio de lavagem. A pH 4,5, o alginato possui carga negativa e a insulina possui carga positiva. Por isso, a diferença de cargas permite a interacção entre as duas espécies por interacções electrostáticas e, consequentemente, permite obter valores de EE elevados.

4.3. Perfil de libertação *in vitro*

O perfil de libertação *in vitro* demonstrou que o mecanismo de libertação da insulina, a partir de nanoesferas de alginato, foi dependente do pH e, a explicação é a mesma que foi sugerida no capítulo anterior. A libertação instantânea da insulina a pH 6,8 acontece porque, a este pH, o gel ácido se encontra estruturalmente destabilizado. A rede polimérica de alginato expande-se e promove a libertação de insulina para o meio. Esta expansão do gel é ainda reforçada pela presença de iões fosfato e contra-iões como o ião sódio (Ramdas *et al.*, 1999). Por outro lado, quer o alginato quer a insulina apresentam carga negativa a pH 6,8 e a repulsão electrostática pode ser também responsável pela libertação da insulina a partir das nanoesferas. Tal como descrito no capítulo anterior, esta reversibilidade da reacção (alginato-insulina) será, no entanto, importante para a administração oral da insulina, uma vez que só a insulina poderá actuar no receptor celular depois de absorvida.

4.4. Bioactividade *in vitro* da insulina

Uma das preocupações na área da nanoencapsulação centra-se na garantia da estabilidade físico-química do fármaco encapsulado após o processo de manipulação do fármaco, da produção das nanoesferas e da libertação do fármaco a partir das mesmas. Contudo, na presença de fármacos peptídicos, essa preocupação é superior, uma vez que a preservação da estabilidade físico-química não garante, por si só, a sua bioactividade.

A bioactividade da insulina foi avaliada através de um protocolo *in vitro* que permitiu quantificar o estado de fosforilação da proteína Akt, após ligação da insulina ao receptor celular. O anticorpo para a Akt fosforilada revelou uma elevada especificidade com o

aparecimento de uma única banda e de forte intensidade. Durante o desenvolvimento do protocolo, foi necessário otimizar duas variáveis: o tempo e o gradiente concentração de insulina necessários para a fosforilação máxima da proteína Akt.

Os resultados da técnica de *western blot* com insulina não encapsulada demonstraram o aparecimento de bandas entre os 5 e os 30 min de estimulação, para concentrações de insulina de 100 nM. O efeito máximo foi observado após 10 min de estimulação. Relativamente ao gradiente de concentração, as concentrações de insulina abaixo de 10 nM apresentaram bandas com intensidades muito fracas ao fim de 10 min de estimulação celular. Concentrações de insulina mais elevadas demonstraram bandas mais intensas. As curvas de calibração Akt fosforilada/Akt não fosforilada *versus* concentração de insulina foram lineares. Os resultados demonstraram que a fosforilação da proteína Akt foi dependente do tempo e da concentração de insulina.

A bioactividade da insulina encapsulada e libertada a partir das nanoesferas foi testada através do protocolo *in vitro* otimizado. Os resultados obtidos sugerem que uma quantidade significativa, não a totalidade, de insulina mantém a sua bioactividade após o processo de nanoencapsulação e libertação. O valor de bioactividade obtido foi mais baixo do que seria de esperar. Este valor pode estar relacionado com a ausência de condições esterilidade durante a preparação das nanoesferas ou com o tempo que mediou entre a produção das nanoesferas e a realização do ensaio de libertação da insulina a partir das mesmas. De facto, supõe-se que a presença de microrganismos na amostra de insulina pode ocasionar a formação de bioproductos e, por conseguinte, condicionar a reacção dos mioblastos L6 com a solução para a estimulação celular. Por outro lado, o ensaio *in vitro* decorreu 1 ano após a preparação das nanoesferas e, será também o tempo, o factor condicionante do resultado obtido.

4.5. Bioactividade *in vivo* da insulina

A bioactividade da insulina foi igualmente avaliada através de um protocolo *in vivo*. Os resultados obtidos indicaram uma evidente preservação da bioactividade da insulina após as etapas de preparação, recuperação e liofilização das nanoesferas. Os resultados obtidos

nesta fase reforçam a hipótese lançada de que o valor de bioatividade obtido *in vitro* foi relativamente mais baixo do que seria de esperar. Este estudo revelou que a correlação entre os ensaios *in vitro* e os ensaios *in vivo* não foi satisfatória.

Neste ensaio, a insulina encapsulada e libertada das nanoesferas conduziu a uma redução semelhante da glicémia à insulina não encapsulada (controlo positivo). Por outro lado, o efeito revelou ser dependente da dose de insulina administrada, sendo superior para dose de 4 UI/kg. Estes resultados permitem afirmar que este método de preparação das nanoesferas manteve a bioatividade da insulina.

Geralmente, é descrito na literatura que os métodos de preparação de partículas baseados em emulsões podem desencadear fenómenos de desnaturação da proteína, devido à agitação mecânica utilizada na emulsificação e à presença de uma interface óleo-água (Putney, 1998). Por outro lado, certas condições ácidas associadas à agitação mecânica poderão igualmente facilitar a dissociação e a destabilização da proteína (Ma *et al.*, 2002). Apesar de ter sido utilizado, no presente trabalho, ácido acético em baixa concentração para solubilizar o carbonato de cálcio, a verdade é que, nem este factor, nem a agitação mecânica e nem a interface óleo-água alteraram a estrutura da proteína, tal como descreveu o trabalho do Capítulo II, e a sua bioatividade. Podem ter contribuído para a estabilização da proteína durante a preparação das nanoesferas alguns factores como, por exemplo, a presença dos agentes emulsivos, a temperatura utilizada durante a preparação das nanoesferas e a liofilização.

Durante o processo de emulsão A/O, a área interfacial total vai aumentando, à medida que o tamanho da gotícula da fase interna vai diminuindo. Normalmente, para evitar a coalescência/ruptura das gotículas e para estabilizar a emulsão, recorre-se a agentes emulsivos. Estes agentes promovem a protecção da proteína à interface óleo-água, devido a duas razões: a primeira, centra-se no efeito estérico ou efeito obstrutivo do agente emulsivo que bloqueia os locais hidrofóbicos à superfície da proteína mais sensíveis à agregação (Bam *et al.*, 1998) e, a outra razão, relaciona-se com o efeito competitivo do agente emulsivo para a interface óleo-água (Cornec *et al.*, 1996) que impede a exposição da proteína, subsequente adsorção e respectivo dano estrutural da proteína (Jørgensen *et al.*, 2004).

Por outro lado, o método de emulsificação/gelificação interna não requer aquecimento, humidade elevada ou sistema de ultra-sons. Trata-se de um método de preparação de nanoesferas que utiliza condições não agressivas. Os passos mais críticos para a estabilidade da proteína encontram-se relacionados com os solventes orgânicos utilizados no processo de recuperação e com o processo de liofilização. Mas, mesmo os solventes orgânicos, não alteraram a estrutura da insulina pela análise DC e, não houve a formação de produtos de degradação, quer de baixo quer elevado PM pela análise de HPLC, conforme o descrito no trabalho do Capítulo II.

Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a insulina após liofilização mantém a sua bioactividade. Na liofilização das amostras, o processo de congelação utilizado foi muito rápido. Durante esta liofilização não foi adicionado agente crioprotector. No entanto, o dextrano aqui utilizado pode ter actuado como agente estabilizante e crioprotector da insulina e das nanoesferas, tal como descrito em estudos anteriores (Tiyaboonchai *et al.*, 2003a; Abdelwahed *et al.*, 2006). De facto, o trabalho desenvolvido por Abdelwahed e colaboradores (Abdelwahed *et al.*, 2006) descreveu um mecanismo de protecção através de ligações de hidrogénio entre o crioprotector e os grupos polares do material de encapsulação. Estes crioprotectores como, por exemplo, o dextrano, funcionariam como “substitutos da água”, evitando a agregação da proteína ou a sua exposição à interface gelo-líquido. Além disso, este estudo refere, ainda, que os outros polissacáridos podem, igualmente, actuar como crioprotectores e, se assim fosse, o alginato funcionaria, ele próprio, como agente estabilizante da insulina.

5. CONCLUSÕES

O método de emulsificação/gelificação interna permitiu obter nanoesferas com uma distribuição granulométrica unimodal, com aproximadamente 90% das nanoesferas de diâmetro inferior a 1 μm e com forma esférica. Além disso, este método permitiu encapsular eficazmente a insulina em nanoesferas de alginato. Aproximadamente 80% da insulina adicionada inicialmente à solução de alginato permaneceu associada ao alginato depois do processo de nanoencapsulação. O perfil de libertação *in vitro* demonstrou que o mecanismo de libertação da insulina, a partir de nanoesferas de alginato, foi dependente do pH. Em meio ácido, a libertação da insulina foi praticamente nula devido à presença de sulfato de dextrano na matriz de alginato. Pelo contrário, a pH 6,8, o alginato, sob a forma de ácido algínico, encontra-se estruturalmente destabilizado e expande-se, promovendo a libertação rápida e completa de insulina para o meio. Por outro lado, a pH 6,8, quer o alginato quer a insulina apresentam carga negativa e a repulsão electrostática pode ser também responsável pela libertação da insulina a partir das nanoesferas. Contudo, interessa-nos que o perfil de libertação da insulina a pH 6,8 seja controlado e não ocorra uma libertação instantânea de insulina. Este parâmetro será alvo de estudo no próximo capítulo.

A bioactividade da insulina depois de encapsulada e libertada das nanoesferas foi avaliada por duas técnicas diferentes. Foi desenvolvido um protocolo *in vitro* que permitiu quantificar a bioactividade da insulina. A insulina manteve uma quantidade significativa de bioactividade, um ano após ter sido encapsulada, e em condições de preparação não estéreis. Este método poderá ser futuramente utilizado como um método preliminar de avaliação da bioactividade para estudos de pré-formulação. No que respeita aos resultados *in vivo*, estes foram mais optimistas. O efeito terapêutico da insulina encapsulada e libertada das nanoesferas foi semelhante ao da insulina não encapsulada.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., STAINMESSE, S. e FESSI, H. (2006) Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 58, 1688-1713.
- AGUIAR, M. M. G., RODRIGUES, J. M. e SILVA-CUNHA, A. (2004) Encapsulation of insulin-cyclodextrin complex in PLGA microspheres: a new approach for prolonged pulmonary insulin delivery. **J. Microencapsul.** 21, 553-564.
- AL-ACHI, A. e GREENWOOD, R. (2001) A brief report on some physiological parameters of streptozotocin-diabetic rat. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 27, 465-468.
- ALESSI, D. R. e DOWNES, C. P. (1998) The role of PI 3-kinase in insulin action. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Cell Biol. Lipids** 1436, 151-164.
- ANDERSEN, L., JØRGENSEN, P. N., JENSEN, L. B. e WALSH, D. (2000) A new insulin immunoassay specific for the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, suitable for bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. **Clin. Biochem.** 33, 627-633.
- ARVINTE, T. (2005) Concluding remarks: analytical methods for protein formulations **Biotechnol.: Pharm. Asp.** AAPS, p. 1-8.
- BAM, N. B., CLELAND, J. L., YANG, J., MANNING, M. C., CARPENTER, J. F., KELLEY, R. F. e RANDOLPH, T. W. (1998) Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. **J. Pharm. Sci.** 87, 1554-1559.
- BARICHELLO, J. M. (1999) Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. **Int. J. Pharm.** 184, 189-198.
- BILATI, U., ALLÉMANN, E. e DOELKER, E. (2005) Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 59, 375-388.

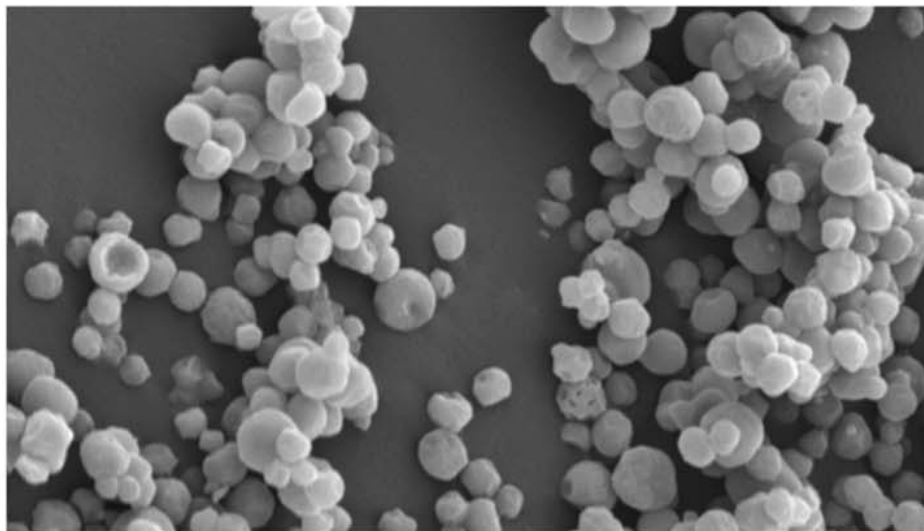
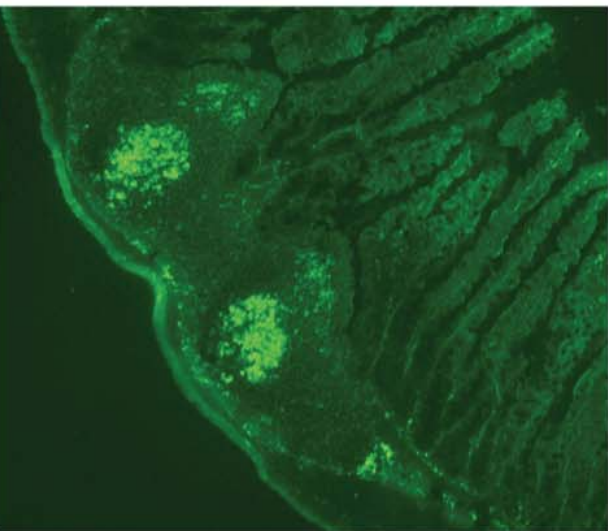
- BOUCHARD, M., ZURDO, J., NETTLETON, E. J., DOBSON, C. M. e ROBINSON, C. V. (2000) Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. **Prot. Sci.** 9, 1960-1967.
- BRANGE, J., HAVELUND, S. e HOUGAARD, P. (1992a) Chemical stability of insulin. 2. Formation of higher molecular weight transformation products during storage of pharmaceutical preparations. **Pharm. Res.** 9, 727-734.
- BRANGE, J., LANGKJAER, L., HAVELUND, S. e VOLUND, A. (1992b) Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations. **Pharm. Res.** 9, 715-726.
- CARINO, G. P., JACOB, J. S. e MATHIOWITZ, E. (2000) Nanosphere based oral insulin delivery. **J. Control. Rel.** 65, 261-269.
- CHIEN, Y. W. (1996) Human insulin: basic sciences to therapeutic uses. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 22, 753-789.
- CORNEC, M., MACKIE, A. R., WILDE, P. J. e CLARK, D. C. (1996) Competitive adsorption of β -lactoglobulin and β -casein with Span 80 at the oil-water interface and the effect on emulsion behaviour. **Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Asp.** 114, 237-244.
- CROTTS, G. e PARK, T. G. (1998) Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. **J. Microencapsul.** 15, 699-713.
- DAMGÉ, C., APRAHAMIAN, M., MARCHAIS, H., BENOIT, J. P. e PINGET, M. (1996) Intestinal absorption of PLGA microspheres in the rat. **J. Anat.** 189, 491-501.
- DAMGÉ, C., MICHEL, C., APRAHAMIAN, M., COUVREUR, P. e DEVISSAGUET, J.-P. (1990) Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. **J. Control. Rel.** 13, 233-239.
- DESAI, M. P., LABHASETWAR, V., WALTER, E., LÉVY, R. J. e AMIDON, G. L. (1997) The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. **Pharm. Res.** 14, 1568-1573.

- DORKOOSH, F. A., VERHOEF, J. C., AMBAGTS, M. H. C., RAFIEE-TEHRANI, M., BORCHARD, G. e JUNGINGER, H. E. (2002) Peroral delivery systems based on superporous hydrogel polymers: release characteristics for peptide drugs buserelin, octreotide and insulin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 15, 433-439.
- DZWOLAK, W., RAVINDRA, R., LENDERMANN, J. e WINTER, R. (2003) Aggregation of bovine insulin probed by DSC/PPC calorimetry and FTIR spectroscopy. **Biochemistry** 42, 11347-11355.
- ELDRIDGE, J. H., HAMMOND, C. J., MEULBROEK, J. A., STAAS, J. K., GILLEY, R. M. e TICE, T. R. (1990) Controlled vaccine release in gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. **J. Control. Rel.** 11, 205-214.
- ELGHAZI, L., BALCAZAR, N. e BERNAL-MIZRACHI, E. (2006) Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic [beta]-cell mass and function. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 38, 157-163.
- FURTADO, S., ABRAMSON, D., SIMHKAY, L., WOBBEKIND, D. e MATHIOWITZ, E. (2006) Subcutaneous delivery of insulin loaded poly(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres to type 1 diabetic rats. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 63, 229-236.
- GARCÍA-FUENTES, M., TORRES, D. e ALONSO, M. J. (2003) Design and lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. **Coll. Surf. B Biointerf.** 27, 159-168.
- GARRIQUES, L. N., FROKJAER, S., CARPENTER, J. F. e BRANGE, J. (2002) The effect of mutations on the structure of insulin fibrils studied by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy. **J. Pharm. Sci.** 91, 2473-2480.
- IBRAHIM, M. A., ISMAIL, A., FETOUH, M. I. e GOPFERICH, A. (2005) Stability of insulin during the erosion of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. **J. Control. Rel.** 106, 241-252.

- JØRGENSEN, L., KIM, D. H., VERMEHREN, C., BJERREGAARD, S. e FROKJAER, S. (2004) Micropipette manipulation: a technique to evaluate the stability of water-in-oil emulsions containing proteins. **J. Pharm. Sci.** 93, 2994-3003.
- KUMAR, T. M. e MISRA, A. (2003) Influence of absorption promoters on pulmonary insulin bioactivity. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** 4, E15.
- LEOBANDUNG. (2002) Preparation of stable insulin-loaded nanospheres of poly(ethylene glycol) macromers and N-isopropyl acrylamide. **J. Control. Rel.** 80, 357-363.
- LERCO, M. M., SPADELLA, C. T., MACHADO, J. L. M., SCHELLINI, S. A. e PAVODINI, C. R. (2003) Caracterização de um modelo experimental de Diabetes *Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrg. Bras.** 18, 136-142.
- MA, Z., YEOH, H. H. e LIM, L.-Y. (2002) Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles. **J. Pharm. Sci.** 91, 1396-1404.
- OLIVA, A., FARINA, J. e LLABRES, M. (1997) Analysis of peptides and proteins: evaluation of purity, stability, and structural characterization of insulin. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 23, 915-927.
- PATEL, N., CRADDOCK, B. L., STANIFORTH, J. N., TOBYN, M. e JWELHAM, M. (2001) Spray-dried insulin particles retain biological activity in rapid *in-vitro* assay. **J. Pharm. Pharmacol.** 53, 1415-1418.
- PINTO-ALPHANDARY, H. (2003) Visualization of insulin-loaded nanocapsules: *in vitro* and *in vivo* studies after oral administration to rats. **Pharm. Res.** 20, 1071-1084.
- POWERS, K. W., BROWN, S. C., KRISHNA, V. B., WASDO, S. C., MOUDGIL, B. M. e ROBERTS, A. S. M. (2006) Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicol. Sci.** 90, 296-303.
- PUTNEY, S. D. (1998) Encapsulation of proteins for improved delivery. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 2, 548-552.

- RAMDAS, M., DILEEP, K. J., ANITHA, Y., PAUL, W. e SHARMA, C. P. (1999) Alginate encapsulated bioadhesive chitosan microspheres for intestinal drug delivery. **J. Biomater. Appl.** 13, 290-296.
- ROQUES, M., DAMGÉ, C., MICHEL, C., STAEDEL, C., CRÉMEL, G. e HUBERT, P. (1992) Encapsulation of insulin for oral administration preserves interaction of the hormone with its receptor *in vitro*. **Diabetes** 41, 451-456.
- SADHALE, Y. e SHAH, J. C. (1999) Stabilization of insulin against agitation-induced aggregation by the GMO cubic phase gel. **Int. J. Pharm.** 191, 51-64.
- SILVA-CUNHA, A., CHERON, M., GROSSIORD, J. L., PUISIEUX, F. e SEILLER, M. (1998) W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: biological activity after oral administration to normal and diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 169, 33-44.
- SZKUDELSKI, T. (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.** 50, 536-546.
- TANG, X. C. e PIKAL, M. J. (2004) Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharm. Res.** 21, 191-200.
- TIYABOONCHAI, W., WOISZWILLO, J. e MIDDAUGH, C. R. (2003a) Formulation and characterization of DNA-polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Sci.** 19, 191-202.
- TIYABOONCHAI, W., WOISZWILLO, J., SIMS, R. C. e MIDDAUGH, C. R. (2003b) Insulin containing polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 255, 139-151.
- WATNASIRICHAIKUL, S., RADES, T. e TUCKER, I. G. (2002) *In vitro* release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion. **J. Pharm. Pharmacol.** 54, 473-480.

- WEI, J., LIN, Y.-Z., ZHOU, J.-M. e TSOU, C.-L. (1991) FTIR studies of secondary structures of bovine insulin and its derivatives. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Prot. Struct. Mol. Enzymol.** 1080, 29-33.
- WEI, J., XIE, L., LIN, Y.-Z. e TSOU, C.-L. (1992) The pairing of the separated A and B chains of insulin and its derivatives, FTIR studies. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Prot. Struct. Mol. Enzymol.** 1120, 69-74.
- WIJKSTROM, M., KIRCHHOF, N., GRAHAM, M., INGULLI, E., COLVIN, R. B., CHRISTIANS, U., HERING, B. J. e SCHUURMAN, H.-J. (2005) Cyclosporine toxicity in immunosuppressed streptozotocin-diabetic nonhuman primates. **Toxicology** 207, 117-127.
- YAMAMOTO, A., TANIGUCHI, T., RIKYUU, K., TSUJI, T., FUJITA, T., MURAKAMI, M. e MURANISHI, S. (1994) Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. **Pharm. Res.** 11, 1496-1500.
- YU, Z., JOHNSTON, K. P. e WILLIAMS III, R. O. (2006) Spray freezing into liquid *versus* spray-freeze drying: influence of atomization on protein aggregation and biological activity. **Eur. J. Pharm. Sci.** 27, 9-18.



CONTROLO DO PERFIL DE
LIBERTAÇÃO DA INSULINA
ENCAPSULADA
A PH INTESTINAL

CAPÍTULO V

1. INTRODUÇÃO

Uma preocupação observada nos trabalhos descritos nos capítulos anteriores relacionou-se com a libertação instantânea e prematura da insulina das nanoesferas de alginato, logo após a sua transferência do meio ácido para o meio neutro.

É desejável que após a administração oral de um sistema polimérico, este seja capaz de evitar a libertação precoce do fármaco e libertá-lo, apenas e exclusivamente, de forma controlada no seu local de absorção (Anal e Stevens, 2005). Como se viu, a primeira etapa foi alcançada no trabalho descrito no Capítulo III, onde o reforço da matriz de alginato com sulfato de dextrano conseguiu reduzir a libertação da insulina em meio ácido. Porém, após a transferência das nanoesferas para o tampão fosfato de pH 6,8, a libertação da insulina ocorreu rapidamente. Sugeriu-se que seriam a porosidade das partículas de alginato de cálcio e o mecanismo de dissolução da matriz, os factores responsáveis por essa libertação precoce de insulina.

O local de absorção da insulina, neste caso particular, deverá situar-se ao nível intestinal e a libertação do fármaco deverá ocorrer de forma controlada. Para além disso, será conveniente que estes sistemas poliméricos apresentem outras características físico-químicas que favoreçam a absorção intestinal da insulina, nomeadamente a presença de carga eléctrica à superfície da partícula de forma a interagir electrostaticamente com a mucosa intestinal e, por conseguinte, aumentar o tempo de residência e a probabilidade de absorção do fármaco; uma elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade de forma a evitar fenómenos toxicológicos de natureza aguda ou crónica e, ainda, a capacidade de conferir ao polímero da matriz uma baixa porosidade, de modo a evitar a difusão rápida do fármaco encapsulado para o exterior antes do seu local de absorção.

A libertação de fármacos a partir de matrizes de alginato, e em particular as proteínas, pode ocorrer segundo dois mecanismos: através da difusão da proteína pelos poros da matriz ou através da degradação do próprio polímero (Gombotz e Wee, 1998). A difusão de moléculas pequenas, como a glucose e o etanol, geralmente não é afectada pela matriz de alginato (Gombotz e Wee, 1998). Pelo contrário, a difusão de moléculas de dimensão

superior, como as proteínas, depende do seu PM, da concentração de alginato, do teor em resíduos G e da carga eléctrica da proteína (Gombotz e Wee, 1998).

A porosidade do alginato influencia a velocidade de difusão dos fármacos. Geralmente, os geles de alginato apresentam uma porosidade consideravelmente elevada para a finalidade terapêutica aqui proposta. A porosidade do alginato pode ser, no entanto, reduzida recorrendo a vários processos: alteração da elasticidade do gel por *cross-linking* da matriz com outros compostos; aplicação de determinados polímeros de revestimento; aplicação de diferentes métodos de secagem; manipulação do pH ou alteração da força de intumescimento (Ottoy e Smidsrød, 1997; Gombotz e Wee, 1998). Este último processo pode ser alcançado através de três formas: alterando a concentração externa de sal, alterando a valência dos contra-íões ou modificando a densidade de carga do polímero por protonação ou por ligação a um policatião (Ottoy e Smidsrød, 1997).

A estratégia de redução da porosidade do alginato adoptada no presente trabalho foi a do revestimento com polímeros. O alginato forma com relativa facilidade complexos polielectrolíticos com policatiões devido à sua natureza aniónica. Na literatura, vêm descritos diversos oligo- e policatiões que podem ser usados no revestimento: álcool polivinílico com derivados de quitosano (Kokufuta *et al.*, 1988), dietilaminoetil-dextrano (Huguet *et al.*, 1996), quitosano (Lee *et al.*, 1997; Ottoy e Smidsrød, 1997; Gåserød *et al.*, 1998b; Quong e Neufeld, 1998; Kim *et al.*, 1999; Misirli *et al.*, 2005; Wittaya-arekul *et al.*, 2006), quitosano com PEG (Chandy *et al.*, 2002), oligoquitosano (Bartkowiak e Hunkeler, 1999a; Bartkowiak e Hunkeler, 1999b; Bartkowiak, 2002), poli-L-arginina (Wang *et al.*, 2003), poli-L-histidina (Wang *et al.*, 2005), poli(metileno-co-guanidina) (Müller *et al.*, 1999; Hearn e Neufeld, 2000; DeGroot e Neufeld, 2001; Orive *et al.*, 2003; Bucko *et al.*, 2005; Rosinski *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005), poli(hexametileno-co-guanidina) (Quong e Neufeld, 1999), polivinilamina e polialilamina (Wang, 2000), polietilenoimina (Iskakov *et al.*, 2002; Halder *et al.*, 2005), PLL (Thu, 1996; Ottoy e Smidsrød, 1997; Lemoine *et al.*, 1998; Cui *et al.*, 2000), polialquilamina com sulfato de poliestireno (Zhu *et al.*, 2005), poli-L-ornitina (Darrabie *et al.*, 2005; Rosinski *et al.*, 2005; Thanos *et al.*, 2006), derivados de dextrano ou mesmo proteínas (George e Abraham, 2006).

Entre os polímeros utilizados na área da micro e nanoencapsulação, a PLL e o quitosano são poliacetatos muito utilizados no revestimento de partículas de alginato.

A PLL é um polímero catiónico e biodegradável (De e Robinson, 2003), flexível, com elevado número de cargas por cadeia e ao longo da cadeia polimérica (Ottoy e Smidsrød, 1997) (Figura V-1).

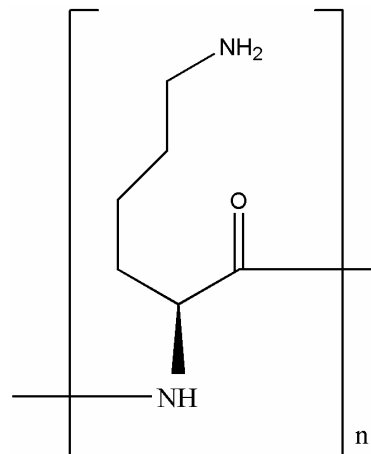


Figura V-1. Estrutura molecular da PLL e os grupos amina, que depois de protonados, poderão interagir com o alginato.

O pK_a da PLL é aproximadamente 10,5 (Horisberger e Clerc, 1988). A ligação desta ao alginato é relativamente rápida, o que sugere que a PLL se liga preferencialmente à superfície das partículas de alginato (Ottoy e Smidsrød, 1997) e, geralmente, a rapidez da reacção aumenta com o teor de resíduos M do alginato (Thu, 1996). A PLL foi aplicada, pela primeira vez, no início dos anos 80, por Lim e Sun (Lim e Sun, 1980), na preparação de microcápsulas de alginato, contendo ilhéus pancreáticos encapsulados. As microcápsulas de alginato foram reticuladas com PLL e, em seguida, o interior foi liquefeito por adição de uma solução de citrato. As células pancreáticas encapsuladas sobreviveram durante 4 meses *in vitro* e, após a implantação celular em ratos diabéticos, estes mantiveram os níveis de glicémia normais durante um período de 2-3 semanas. Após este estudo, surgiu um outro trabalho com a mesma aplicação da PLL, mas em que o período de manutenção dos níveis de glicémia foi diferente. A glicémia normalizou após 4 dias e manteve-se por um período de 90 dias (Ma *et al.*, 1994). Após estes dois estudos, a PLL começou a ser frequentemente

utilizada na encapsulação de oligonucleótidos *antisense* (Ferreiro *et al.*, 2002), ADN (Quong e Neufeld, 1998), enzimas (Lee *et al.*, 1993; DeGroot e Neufeld, 2001), vitaminas (Rosinski *et al.*, 2005), antibióticos (Ueng *et al.*, 2004) e antigénios (Lemoine *et al.*, 1998). Actualmente, a aplicação da PLL tem vindo a diminuir, devido a alguns casos de imunogenicidade (De e Robinson, 2003).

Foram surgindo alternativas à PLL como, por exemplo, o quitosano. O quitosano é um derivado da quitina extraída dos crustáceos, obtido por N-desacetilação alcalina parcial da quitina (Kumar, 2000). O termo quitosano é utilizado para descrever uma série de polímeros com diferentes graus de desacetilação (70-95%), definidos em termos de percentagem de grupos amina primários no esqueleto do polímero e com PM médio entre 10 a 1000 kDa (George e Abraham, 2006). O quitosano é facilmente metabolizado por enzimas presentes no TGI como, por exemplo, a lisozima (Quong *et al.*, 1999; George e Abraham, 2006). Quimicamente, trata--se de um polissacárido linear, composto por resíduos de D-glucosamina e N-acetilglucosamina ligados por ligações β -(1,4) (Kumar, 2000), como mostra a Figura V-2. As propriedades físico-químicas do quitosano, a biodegradabilidade e a biocompatibilidade são dependentes das proporções relativas dos resíduos de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina (George e Abraham, 2006).

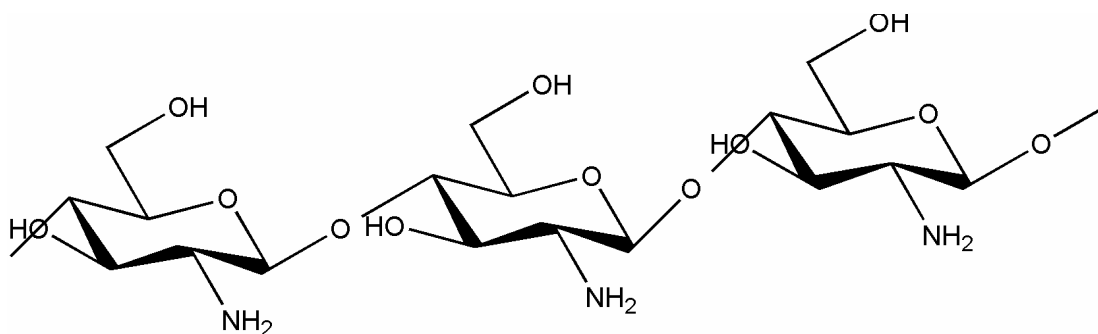


Figura V-2. Estrutura molecular do quitosano e os grupos amina. Em meio ácido, estes últimos são protonados, o quitosano adquire carga positiva e poderá interagir com o alginato.

O pK_a do quitosano está compreendido entre 6,2 e 7,0 (Mansouri *et al.*, 2004), pelo que, em meio ácido, os grupos amina são protonados e o quitosano adquire carga positiva (Mansouri *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2004). Para valores de pH superiores ao seu pK_a , o quitosano adquire carga negativa e torna-se insolúvel. O quitosano forma sais solúveis em

água na presença de ácidos inorgânicos e orgânicos (Dyer *et al.*, 2002). Cada unidade de D-glucosamina possui uma amina primária, o que confere à molécula uma elevada densidade de carga, permitindo a ocorrência de reacções químicas, a formação de sais com ácidos e uma forte interacção com superfícies negativas (George e Abraham, 2006).

O quitosano apresenta propriedades físico-químicas particulares que o tornam um polímero especial. É um polímero mucoadesivo (Lehr *et al.*, 1992; Gåserød *et al.*, 1998a). Este facto foi confirmado em estudos anteriores, nos quais a aplicação de quitosano aumentou o tempo de residência de lipossomas contendo insulina no TGI (Bernkop-Schnürch, 2000) e interagiu fortemente com a mucina (Wittaya-areekul *et al.*, 2006). A mucoadesividade do quitosano geralmente aumenta com o PM, com o grau de desacetilação e com a acidez do meio (George e Abraham, 2006). Para além das suas propriedades mucoadesivas, o quitosano tem sido aplicado como promotor de absorção de fármacos (Artursson, 1994; Illum *et al.*, 1994; Bernkop-Schnürch, 2000; Pan *et al.*, 2002), uma vez que apresenta a capacidade de promover, transitoriamente, a abertura das junções paracelulares (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1999; Dyer *et al.*, 2002). Esta estratégia tem sido frequentemente utilizada na absorção de substâncias hidrofílicas (George e Abraham, 2006). O quitosano tem sido aplicado na encapsulação de enzimas (Zhang *et al.*, 2000; DeGroot e Neufeld, 2001; Taqieddin e Amiji, 2004), anticorpos (Albarghouthi *et al.*, 2000), toxinas (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1999), proteínas (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1999; Onal e Zihnioglu, 2002; Chen *et al.*, 2007; Portero *et al.*, 2007), plasmídeos (Pan *et al.*, 2002), fármacos convencionais (Lucinda-Silva e Evangelista, 2003; Anal e Stevens, 2005; Misirli *et al.*, 2005) e oligonucleótidos (Quong e Neufeld, 1998; Pan *et al.*, 2002). A grande desvantagem do quitosano reside na sua fraca solubilidade a pH próximo do pH fisiológico (Taqieddin e Amiji, 2004).

O quitosano é ainda usado na clínica como antiácido (Kumar, 2000), antiulceroso (Kumar, 2000), anticoagulante (Zhang *et al.*, 2000) e hipocolesterolémico (Kumar, 2000; Zhang *et al.*, 2000; George e Abraham, 2006) e, em outras indústrias, nomeadamente a fotográfica, a cosmética, a alimentar, a têxtil e a indústria do papel (Kumar, 2000).

A associação do alginato com o quitosano tem atraído uma grande atenção por parte dos investigadores, pelo facto de poderem formar complexos polielectrolíticos com potencial

utilidade na administração oral de proteínas. De facto, a facilidade de solubilização do quitosano a pH ácido é inibida pela presença do alginato, uma vez que o alginato é insolúvel a pH ácidos e a dissolução do alginato a pH mais elevado é controlada pelo quitosano, que é estável a pH mais elevados (George e Abraham, 2006). A formação de complexos polielectrolíticos com polímeros aniónicos, como o alginato, ocorre por interacção dos grupos amina do quitosano, carregados positivamente, com os grupos carboxílicos do alginato, carregados negativamente, através de ligações electrostáticas (Takahashi *et al.*, 1990). Outras forças intermoleculares, como as forças *Coulomb* e as interacções hidrofóbicas, são igualmente importantes na formação dos complexos polielectrolíticos (Lee *et al.*, 1997). A formação do complexo, alginato-quitosano, depende de diferentes parâmetros, nomeadamente da razão de massa entre os dois polímeros, força iónica, temperatura e grau de desacetilação (Takahashi *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1997). Existem vários estudos que descrevem a influência das condições do revestimento das partículas de alginato com quitosano (Polk *et al.*, 1994; Vandenberg *et al.*, 2001; Shu e Zhu, 2002; George e Abraham, 2006).

Foi, ainda, estudado um polímero de revestimento alternativo ao quitosano e à PLL: a poli(hexametileno-co-guanidina) (PHMCG). Trata-se de um polímero constituído por unidades de biguanida, geralmente 8 a 15 unidades (Kawabata e Taylor, 2007), com uma parte lipofílica (cadeia alquílica) (Figura V-3). A sua elevada basicidade permite que a maioria dos seus grupos funcionais esteja na forma catiónica a pH neutro, ou mesmo, a pH fisiológico (Abad-Villar *et al.*, 2006).

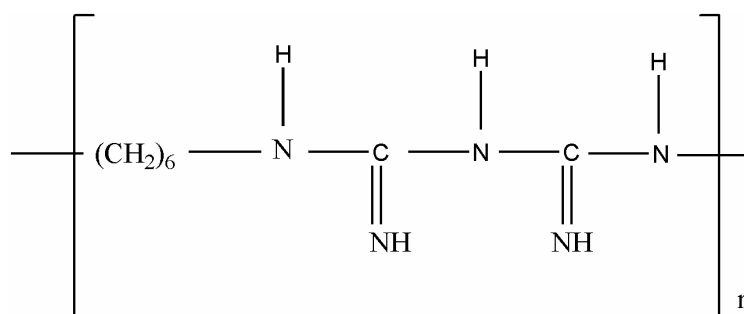


Figura V-3. Estrutura molecular da PHMCG e os grupos amina, que depois de protonados poderão interagir com o alginato.

O pK_a da PHMCG situa-se entre 12 e 13 (Nigam, 2001). A PHMCG é utilizada como agente antimicrobiano que se liga e destrói as membranas bacterianas (Abad-Villar *et al.*, 2006). É frequentemente utilizada na cosmética, em detergentes para lentes de contacto e desinfectantes de águas (Hattori *et al.*, 2003). Por outro lado, a PHMCG tem sido aplicada como polímero de revestimento de macropartículas de alginato, pectina e carboximetilcelulose (Quong e Neufeld, 1999) e em microcápsulas de alginato e sulfato de celulose que continham células e enzimas (Hearn e Neufeld, 2000).

O revestimento pode ser realizado em uma ou duas etapas. O processo de revestimento adoptado no presente trabalho foi o revestimento em duas etapas. Este último baseia-se no revestimento das partículas de alginato de cálcio após a sua produção e recuperação (McKnight *et al.*, 1988). Pelo contrário, o revestimento em uma única etapa é realizado de forma contínua onde ambos os polímeros, o da matriz e o do revestimento, estão em contacto entre si antes da etapa de recuperação das partículas (Rha e Rodriguez-Sanchez, 1988). Encontram-se descritos alguns estudos que comparam os dois processos de revestimentos (Gåserød *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2005).

A selecção do polímero de revestimento foi baseada nas características granulométricas, potencial zeta, EE e na análise do perfil de libertação *in vitro* em meios de incubação sem enzimas. A comparação dos perfis de libertação das várias formulações foi efectuada por aplicação das equações dos factores de diferenciação e semelhança (f_1 e f_2) (Moore e Flanner, 1996). A análise dos perfis de libertação foi realizada através da aplicação de modelos cinéticos que descrevem, matematicamente, a libertação do fármaco.

Finalmente, foram também realizados estudos adicionais relativos à interacção electrostática entre o alginato e o polímero catiónico seleccionado, recorrendo à calorimetria de varrimento diferencial (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) e à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, *Fourier-Transform Infrared*). Os espectros de FTIR foram realizados recorrendo ao método de reflexão total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflection*) (Müller *et al.*, 1999).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O alginato de sódio e o sulfato de dextrano foram os indicados no Capítulo III. O carbonato de cálcio ultrafino, o agente emulsivo (Span[®] 80), a parafina líquida e a insulina foram os indicados no Capítulo II. O quitosano (PM = 50 kDa, grau de desacetilação compreendido entre 75 e 85%) foi adquirido à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A PLL, sob a forma de hidrobrometo (PM = 5 kDa) e a PHMCG (PM = 1,2 kDa) foram adquiridas à Sigma (St. Louis, MO, EUA) e à AVECIA Limited (Manchester, Reino Unido), respectivamente. A água desionizada utilizada na preparação de soluções foi obtida a partir de um sistema Millipore Elix 5 (Bedford, MA, EUA). O acetonitrilo, o TFA e a água utilizados no sistema de HPLC foram de qualidade adequada. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico, já indicados no Capítulo II.

2.2. Preparação das nanoesferas

As nanoesferas foram preparadas segundo o protocolo descrito no Capítulo IV. No entanto, foram produzidos mais lotes de nanoesferas mas desta vez foram revestidas, imediatamente, após a sua recuperação por um processo de duas etapas com três soluções diferentes (100 mL): PLL a 0,05% (m/V) a pH 6 (Quong e Neufeld, 1999), quitosano a 0,03% (m/V) a pH 4,5 e PHMCG a 0,5% (m/V) a pH 6 (Quong e Neufeld, 1999). As três soluções de polímeros foram enriquecidas com cloreto de cálcio a 1,5% (m/V) (Chandy *et al.*, 1999; Vandenberg *et al.*, 2001). Segundo estudos anteriores, o enriquecimento em cálcio do meio em que ocorre o revestimento permite reduzir a difusão da proteína para o exterior das partículas de alginato (Vandenberg *et al.*, 2001) e aumentar a probabilidade de ligação do polímero catiónico ao alginato (Mi *et al.*, 2002). A solução de quitosano foi preparada por dissolução do polímero em ácido acético glacial a 1% (V/V) e o pH foi ajustado a 4,5. Depois

a solução de quitosano foi filtrada através de papel de filtro *Whatman* n.º 4 para eliminar resíduos insolúveis. O pH da solução de quitosano utilizada foi escolhido com base em estudos já realizados (Silva *et al.*, 2005; Silva, 2007). A concentração do quitosano foi baseada em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Quanto ao PM deste polímero, e de acordo com estudos anteriores (Yan *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Douglas e Tabrizian, 2005; Misirli *et al.*, 2005), foi seleccionado um quitosano com baixo PM.

As nanoesferas de alginato de cálcio foram revestidas durante 30 min (Liu *et al.*, 2004) sob agitação magnética (100 rpm) e posteriormente armazenadas a 4°C durante 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado sob vácuo. As nanoesferas revestidas foram liofilizadas, segundo o protocolo descrito nos capítulos anteriores. Nesta etapa, foram igualmente preparadas nanoesferas vazias, isto é, sem adição de insulina. Neste último caso, a solução de insulina foi substituída por 10 mL de água desionizada no processo de preparação das nanoesferas, conforme o indicado no Capítulo IV.

As nanoesferas resultantes nesta fase foram designadas de nanoesferas, com insulina ou vazias, revestidas.

2.3. Caracterização granulométrica das nanoesferas

A distribuição granulométrica e a polidispersividade das nanoesferas foram determinadas de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

2.4. Potencial zeta das nanoesferas

O potencial zeta das nanoesferas revestidas e não revestidas foi determinado em triplicado pela técnica de Anemometria *Laser Doppler*, recorrendo a um Zetasizer 5000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Esta técnica determina a mobilidade electroforética de partículas, definida como a velocidade de uma dada partícula por unidade de campo eléctrico, e é calculada aplicando-se um campo eléctrico sobre a dispersão de iões

no diluente, com força iónica baixa ou alta. O resultado desta técnica é expresso em potencial zeta.

2.5. Determinação da eficiência de encapsulação (EE)

A EE da insulina foi determinada de acordo com as condições descritas no Capítulo IV, à excepção do método de quantificação da insulina. Neste caso, recorreu-se ao método de quantificação da insulina por HPLC (ver Anexo II).

2.6. Perfil de libertação *in vitro*

O perfil de libertação da insulina *in vitro* foi determinado segundo as condições descritas no Capítulo IV, à excepção do volume de amostra recolhido que foi de 2 mL e do método de doseamento da insulina que foi por HPLC.

2.7. Análise da insulina por HPLC

A insulina foi quantificada por um método de HPLC que se encontra descrito no Anexo II. A preparação das amostras foi baseada em trabalhos anteriores (Silva, 2007). As amostras recolhidas do meio ácido a pH 1,2 foram centrifugadas ($12.100 \times g$, 10 min) e o sobrenadante foi utilizado directamente para análise da insulina. O volume de amostra recolhido foi de 2 mL. No caso das amostras recolhidas em tampão fosfato de pH 6,8, adicionaram-se 42 μL de NaOH a 0,2 M para se aumentar ligeiramente o pH e, posteriormente, 2 mL de etanol para precipitar o alginato. Após agitação orbital (100 rpm, 10 min), as amostras foram centrifugadas ($12.100 \times g$, 10 min) e o sobrenadante foi analisado para quantificar a insulina.

2.8. Análise dos perfis de libertação

A análise dos perfis de libertação pode ser realizada através de métodos independentes ou dependentes de modelos matemáticos (Costa, 2002).

No presente trabalho, o método independente de modelos matemáticos utilizado baseia-se no cálculo do factor de diferença (f_1) e o factor de semelhança (f_2). Os factores f_1 e f_2 são representados pelas seguintes expressões:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \times 100 \quad \text{Equação V-1}$$

$$f_2 = 50 \times \log \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \right] \times 100 \quad \text{Equação V-2}$$

sendo n o número de recolhas, R_t e T_t representam a percentagem do produto de referência e teste, respectivamente, libertada no tempo t .

Este método é o mais adequado para a comparação de perfis de libertação, quando estão disponíveis mais de três ou quatro tempos de libertação (no mínimo três, em que não mais de um ponto ultrapasse 85% do teor inicial). Para que os perfis de libertação sejam considerados equivalentes, os valores de f_1 devem aproximar-se o mais possível de 0 e os valores de f_2 de 100. Porém, de um modo geral, para valores de f_1 inferiores a 15 (0-15) e valores de f_2 superiores a 50 (50-100), correspondentes a uma diferença média de valores de não mais que 10% para cada um dos pontos de libertação considerados, as duas curvas serão consideradas equivalentes e, portanto, os comportamentos cinéticos de ambos os produtos, teste e referência, poderão ser considerados equivalentes (Moore e Flanner, 1996; Ribeiro, 2005). O factor f_2 é considerado um parâmetro mais sensível do que o factor f_1 (Yuksel *et al.*,

2000) e foi proposto pela FDA e pela EMEA (*European Medicine Agency*) para ser utilizado como medida de comparação entre perfis de libertação. Mas, ambas as equações são muito bem aceites para a comparação de perfis de libertação, são recomendadas pela FDA e EMEA e, têm sido aplicadas em vários documentos (Costa e Sousa Lobo, 2001; Ribeiro, 2005).

A avaliação do perfil de libertação foi também efectuada por aplicação de vários modelos matemáticos aos resultados obtidos, e que estão resumidos na Tabela V-1.

Tabela V-1. Modelos matemáticos utilizados para descrever os perfis de libertação, em que Q_0 e Q_t correspondem à quantidade de fármaco inicial e libertado no tempo t , respectivamente; Q_t/Q_∞ representam a fracção de fármaco libertada no tempo t ; K_0 , K_1 , K_H , K_K e K são constantes de libertação de ordem zero, ordem um, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Baker-Lonsdale, respectivamente; a é um parâmetro de escala relacionado com o tempo decorrido de ensaio; b é um parâmetro de forma e n é o expoente de libertação do fármaco.

Modelo matemático	Equação
Ordem zero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Ordem um	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$
Weibull	$\log[-\ln(1 - Q_t/Q_\infty)] = b \times \log t - \log a$
Higuchi (square root)	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = K_k t^n$
Baker-Lonsdale	$\left(\frac{3}{2}\right) \left[1 - \left(1 - Q_t/Q_\infty\right)^{2/3} \right] - Q_t/Q_\infty = Kt$

2.9. Análise do complexo polielectrolítico por calorimetria de varrimento diferencial (DSC)

Para a análise de DSC utilizou-se um calorímetro Shimadzu DSC-50 (Kyoto, Japão), associado a um analisador térmico com ligação a um sistema informático TA-50I. As amostras analisadas foram os polímeros isolados, as misturas físicas dos polímeros, os complexos polielectrolíticos, as nanoesferas não revestidas e as nanoesferas revestidas.

Para a análise dos polímeros isolados, utilizaram-se uma solução aquosa de alginato de sódio a 2% (m/V) e uma solução do polímero de revestimento à concentração e pH pré-estabelecidos. Depois do ajuste do pH, estas soluções foram liofilizadas segundo o protocolo descrito nos capítulos anteriores. As misturas físicas prepararam-se num almofariz por mistura, numa proporção de 1:1 (m/m), dos liofilizados do alginato de sódio a 2% (m/V) e do polímero de revestimento à concentração e pH pré-estabelecidos. Para se obterem os complexos polielectrolíticos, procedeu-se à adição de 10 mL da solução do polímero de revestimento, à concentração e pH pré-estabelecidos, a um volume idêntico da solução de alginato a 2% (m/V) e deixou-se sob agitação magnética (100 rpm) durante 30 min. O complexo foi também liofilizado e segundo o protocolo descrito nos capítulos anteriores. As nanoesferas, revestidas e não revestidas, foram igualmente analisadas após liofilização.

Para todas as situações, as amostras foram rigorosamente pesadas (2 mg) em cápsulas de alumínio, que foram posteriormente seladas com auxílio de uma prensa. Como amostra de referência, foi utilizada uma cápsula de alumínio vazia. A temperatura variou entre 22 e 350°C a uma velocidade de 10°C/min. O ensaio decorreu sob uma corrente contínua de azoto a um fluxo de 20 mL/min. A verificação do aparelho foi efectuada utilizando índio (99,98% Aldrich, Milwaukee, WIS, EUA), como padrão.

2.10. Análise do complexo polielectrolítico por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos com um espectrofotómetro JASCO® FT/IR-420 (Tokyo, Japão), associado a um sistema de

reflexão total atenuada (Miracle, PIKE[®] Technologies, Madison, WI, EUA). As amostras foram sujeitas a 16 varrimentos de número de onda entre 600 e 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} . As amostras analisadas foram as mesmas que as descritas para a análise por DSC.

2.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com o descrito no Capítulo III.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

As nanoesferas, produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna e revestidas com diferentes polímeros catiónicos, foram caracterizadas em termos de distribuição granulométrica através de difracção laser. Para todas as situações estudadas, a distribuição granulométrica das nanoesferas e, tal como mostra a Figura V-4, foi unimodal. Em termos gráficos, e contrariamente ao que aconteceu com a PLL, o revestimento com quitosano e PHMCG produziu um desvio na curva de distribuição granulométrica em ambos os polímeros e a um aumento da polidispersividade, no caso da PHMCG (Tabela V-2).

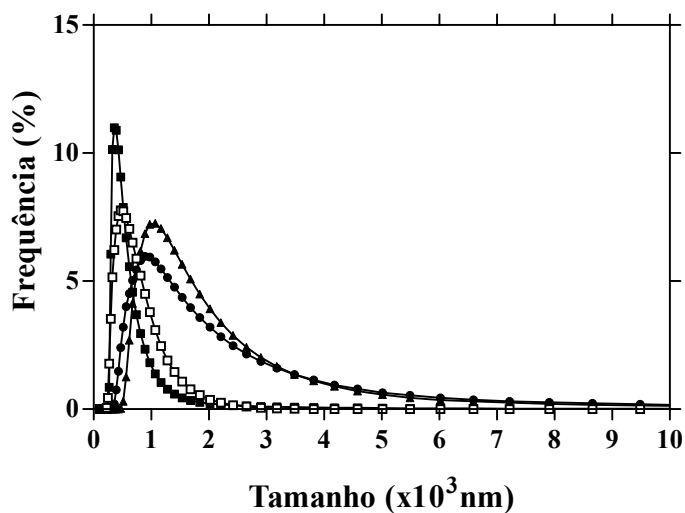


Figura V-4. Distribuição granulométrica, em número, das nanoesferas obtidas através do método de emulsificação/gelificação interna revestidas com PLL (—■—), quitosano (—●—) e PHMCG (—▲—) e nanoesferas não revestidas (—□—).

Tabela V-2. Influência do tipo de polímero de revestimento nas características granulométricas, expressas em número, das nanoesferas de alginato contendo insulina.

Polímero de revestimento	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
----	358	618	1168	1,31
PLL	358	470	889	1,13
Quitosano	618	1168	2181	1,34
PHMCG	812	1402	3181	1,69

Nota: D₉₀, D₁₀ e D₅₀ são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das nanoesferas de alginato totais.

3.2. Potencial zeta das nanoesferas

Na Tabela V-3 encontram-se os resultados obtidos da análise do potencial zeta. Observou-se uma variação da carga eléctrica à superfície das nanoesferas, quando estas foram revestidas com polímeros catiónicos. A maior variação do potencial zeta ocorreu com o quitosano. Neste caso, ocorreu uma inversão do valor de negativo (nanoesferas não revestidas) para um valor positivo. O potencial zeta positivo obtido pode ser considerado uma vantagem tecnológica para a interacção do quitosano com a mucina intestinal, uma vez que esta última apresenta uma carga eléctrica global negativa.

Tabela V-3. Variação do potencial zeta das nanoesferas de alginato após revestimento com diferentes polímeros catiónicos.

Polímero de revestimento	Potencial zeta (mV) ^a
----	-16,30 ± 1,81
PLL	-1,33 ± 2,08
Quitosano	+14,55 ± 0,77
PHMCG	-6,00 ± 2,65

^aValor médio ± D.P.

3.3. Eficiência de encapsulação (EE)

Os resultados obtidos mostram que a EE de insulina diminuiu após o revestimento com todos os polímeros de revestimento. Este efeito foi mais evidente para a PHMCG, conforme descreve a Tabela V-4.

Tabela V-4. EE da insulina encapsulada em nanoesferas de alginato não revestidas e revestidas com PLL, quitosano e PHMCG. Os dados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P.. * $P < 0,05$ por comparação com as nanoesferas não revestidas.

Polímero de revestimento	EE (%) ^a
----	89,45 \pm 9,35
PLL	62,09 \pm 13,94
Quitosano	82,10 \pm 5,91
PHMCG	42,77 \pm 11,19*

^aValor médio \pm D.P.

3.4. Perfil de libertação *in vitro*

O perfil de libertação da insulina encontra-se representado na Figura V-5. No tampão HCl/KCl de pH 1,2, verificou-se uma ausência evidente de libertação da insulina durante a sua passagem pelo meio ácido, à excepção do revestimento com PHMCG. De facto, o revestimento com PHMCG provocou a libertação instantânea da totalidade de insulina encapsulada durante a incubação em meio ácido. No caso das nanoesferas não revestidas e revestidas com PLL, observou-se uma dissolução rápida das nanoesferas com uma libertação de insulina quase instantânea (cerca de 90%), após transferência das nanoesferas para o tampão fosfato de pH 6,8. Porém, a libertação de insulina a partir das nanoesferas revestidas com quitosano ocorreu de forma diferente, tendo sido controlado o perfil de libertação ao longo do período de incubação no tampão fosfato de pH 6,8.

Este ensaio foi propositadamente prolongado até às 24 h, mas a percentagem de insulina, em todas as situações, foi semelhante à percentagem de insulina libertada às 8 h e, por essa razão, não foi representada graficamente.

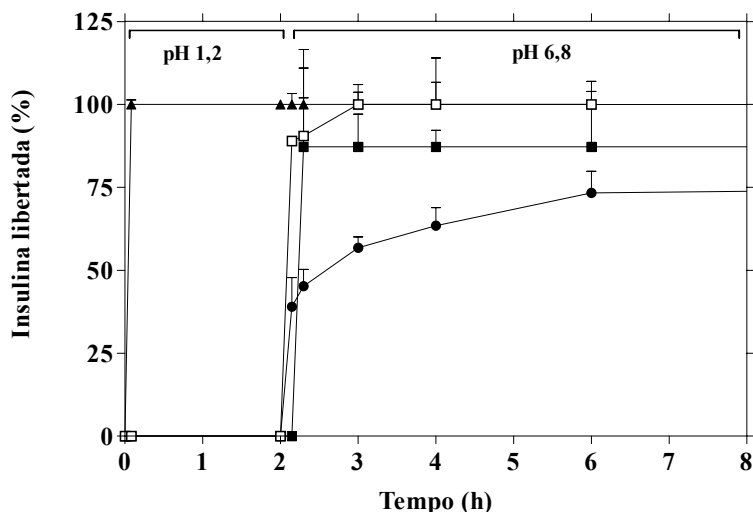


Figura V-5. Perfil de libertação *in vitro* da insulina a partir das nanoesferas obtidas através do método de emulsificação/gelificação interna e revestidas com PLL (—■—), quitosano (—●—) e PHMCG (—▲—) e nanoesferas não revestidas (—□—). Cada ponto corresponde à média de 3 determinações \pm D.P..

3.5. Análise dos perfis de libertação

Para confirmar a influência do revestimento e o tipo de polímero de revestimento no perfil de libertação da insulina, foram determinados os factores de diferença (f_1) e de semelhança (f_2). O cálculo destes parâmetros, apresentados na Tabela V-5, confirmou a influência do processo de revestimento no perfil de libertação de insulina porque f_1 foi sempre superior a 15 e f_2 inferior a 50. As nanoesferas não revestidas foram utilizadas como referência para cada polímero de revestimento.

Tabela V-5. Comparação dos perfis de libertação da insulina a partir de nanoesferas não revestidas com as nanoesferas revestidas com PLL, quitosano e PHMCG, por aplicação dos factores de diferença (f_1) e semelhança (f_2).

	Não revestidas/revestidas PLL	Não revestidas/revestidas quitosano	Não revestidas/revestidas PHMCG
f_1	21,72	37,65	Não aplicável
f_2	26,52	25,25	Não aplicável

A cinética de libertação da insulina a partir das formulações representadas na Figura V-5 foi estudada por aplicação de vários modelos matemáticos, conforme apresentado na Tabela V-1. Os modelos só foram aplicados após a transferência das nanoesferas para o tampão fosfato de pH 6,8. Matematicamente, não foi possível aplicar os respectivos modelos às nanoesferas não revestidas e nanoesferas revestidas com PHMCG e PLL, uma vez que a libertação da insulina foi instantânea e resultou em ajustes inaceitáveis para todos os modelos estudados. No caso das nanoesferas revestidas com quitosano, a análise dos resultados indicou que o modelo que mais se ajustou ao perfil de libertação da insulina nos tempos de dissolução compreendidos entre 2 a 8 h foi o modelo de Weibull com um coeficiente correlação de 0,9054 (com $b < 1$), seguido do modelo Baker-Lonsdale com um coeficiente correlação de 0,8935. A aplicação dos restantes modelos matemáticos conduziu a valores de coeficiente de correlação inferiores a 0,87. Os coeficientes de correlação obtidos são muito inferiores ao que geralmente é observado ($r^2 > 0,985$).

De acordo com os resultados obtidos até ao momento, especificamente o potencial zeta positivo que pode ser considerada uma vantagem tecnológica para a interacção electrostática com a mucina intestinal, a EE elevada e o perfil de libertação controlado, optou-se por se revestir as nanoesferas com quitosano em todos os ensaios subsequentes. Os ensaios subsequentes consistiram na análise da formação do complexo polielectrolítico entre o alginato e o quitosano. Nesta fase e completando a metodologia da Secção 2.9., foram preparadas soluções de alginato de sódio a 2% (m/V) e de quitosano a 0,03% (m/V), por dissolução do alginato em água ou do quitosano numa solução aquosa de ácido acético a 1% (V/V). O pH das soluções foi ajustado a 4,5. A concentração de quitosano utilizada para a

análise dos complexo polielectrolítico foi também de 0,03% (m/V) bem como o pH de 4,5. As restantes amostras foram preparadas segundo as indicações descritas na Secção 2.9..

3.6. Análise do complexo polielectrolítico por calorimetria de varrimento diferencial (DSC)

A análise por DSC da solução de alginato de sódio a 2% (m/V) liofilizada revelou o aparecimento de um pico endotérmico a 56,78°C, com uma variação de entalpia de -568,97 J/g (Tabela V-6), e um pico exotérmico a 248,92°C (Figura V-6, a), com uma variação de entalpia de 317,76 J/g. Na curva de DSC do alginato é ainda possível observar a existência de um outro pico exotérmico a 318,36°C, com uma variação de entalpia de 100,77 J/g.

Por sua vez, o quitosano apresenta dois picos: um pico endotérmico a 76,40°C, com uma entalpia menos negativa comparativamente com o alginato, e um pico exotérmico a 308,41°C (Figura V-6, b).

As curvas de DSC das misturas físicas do alginato e quitosano (1:1, m/m) revelaram os picos característicos de ambos os polímeros isolados (Figura V-6, c).

Porém, a curva de DSC do complexo entre o alginato e o quitosano demonstrou uma alteração no comportamento térmico da amostra, relativamente à sua mistura física (Figura V-6, d). Neste caso, observou-se a presença de um duplo pico endotérmico na curva de DSC entre 60 e 80°C e um pico exotérmico altamente energético a 333,48°C, com uma variação de entalpia de 204,80 J/g (Tabela V-6).

No caso das nanoesferas não revestidas, o comportamento térmico sofreu alterações, nomeadamente um desvio do pico endotérmico característico do alginato de 56,78 para 64,40°C e uma atenuação do pico exotérmico do alginato (Figura V-6, e).

Finalmente, nas nanoesferas revestidas com quitosano, observaram-se picos endotérmicos a 53,83°C e outro a 149,44°C seguidos de uma subida ligeira da linha de base com um novo pico endotérmico a 229,37°C, mas sem que se registasse um pico exotérmico no

intervalo de temperaturas analisadas (Figura V-6, f). As variações de entalpia estavam compreendidas entre -30,49 e -258,55 J/g, conforme descreve a Tabela V-6.

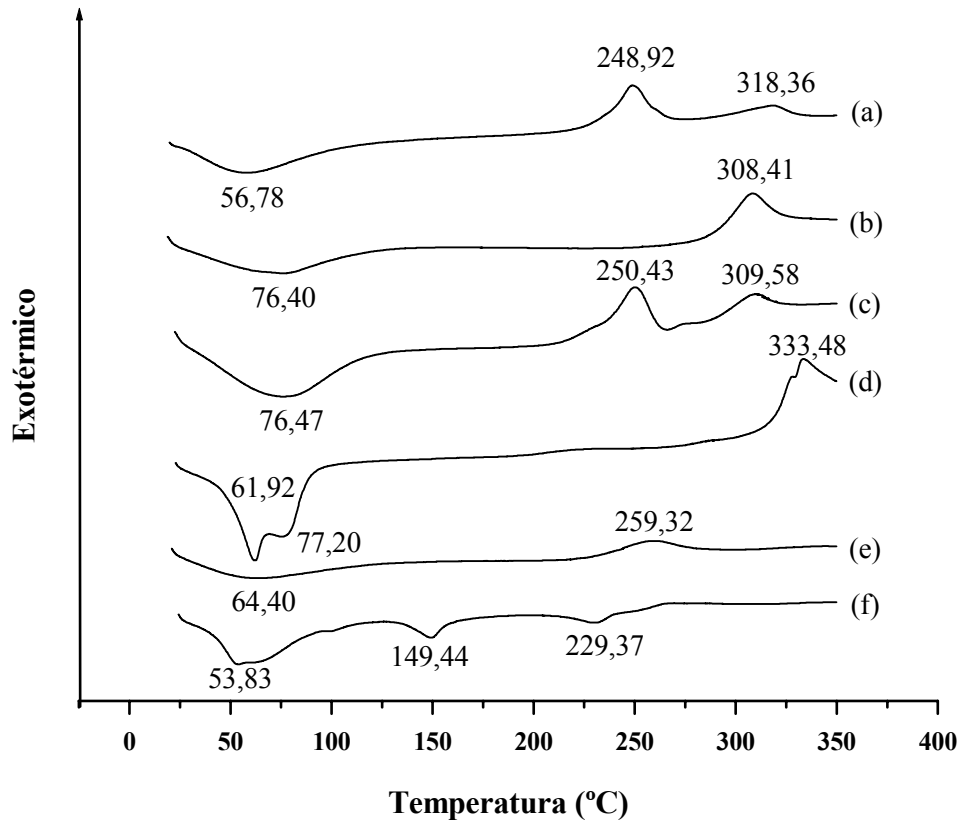


Figura V-6. Curvas de DSC: a) alginato de sódio, b) quitosano, c) mistura física de alginato de sódio e quitosano 1:1 (m/m), d) complexo de alginato e quitosano e) nanoesferas não revestidas e f) nanoesferas revestidas.

Tabela V-6. Temperaturas e variações de entalpia para as amostras analisadas por DSC.

Amostra	Temperatura (°C)			ΔH (J/g)
	Início	Pico	Fim	
Alginato	24,26	56,78	102,20	-568,97
	233,84	248,92	261,21	317,76
	291,72	318,36	330,89	100,77
Quitosano	24,80	76,40	117,30	-316,19
	289,98	308,41	325,27	142,28
Mistura física 1:1 (m/m)	32,88	76,47	116,41	-387,15
	231,85	250,23	263,35	159,15
	290,18	309,58	324,52	59,51
Complexo alginato e quitosano	50,70	61,92	67,26	-129,01
	72,79	77,20	85,40	-60,82
	323,21	333,48	348,39	204,8
Nanoesferas não revestidas	28,35	64,40	115,67	-386,11
	233,03	259,32	283,74	190,90
Nanoesferas revestidas	40,35	53,83	90,95	-258,55
	134,68	149,44	158,70	-56,44
	213,07	229,37	240,29	-30,49

3.7. Análise do complexo polielectrolítico por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Todos os espectros FTIR obtidos apresentaram uma banda larga entre 3700 e 2800 cm^{-1} , mais ou menos intensa, associada à presença de grupos hidroxilo ligados por pontes de hidrogénio e outras ligações C-H e N-H.

A região compreendida entre 1800 e 600 cm^{-1} foi sujeita a um análise mais detalhada, uma vez que, neste intervalo, é possível retirar mais informações sobre as interações entre os polímeros em causa. Os espectros encontram-se representados na Figura V-7.

O espectro do alginato mostrou três picos: 1597,7, 1408,7 e 1029,8 cm^{-1} correspondentes a vibrações assimétricas e simétricas de elongação C=O de carboxilato e à elongação C-O, respectivamente (Figura V-7, a).

A análise de FTIR do quitosano revelou a presença de quatro picos: 1643,1, 1534,1 1456,9 e 1016,1 cm^{-1} , possivelmente relacionados com a elongação C=O da amida (banda amida I), flexão N-H do ião amónio ($-\text{NH}_3^+$), elongação simétrica C=O ou C-N e, elongação C-O, respectivamente (Figura V-7, b). É possível que a flexão N-H de amida (II), normalmente visível a 1500-1600 cm^{-1} , esteja sobreposta com a flexão N-H de ião amónio. Na região *fingerprint*, entre 1400 e 1000 cm^{-1} , o quitosano apresentou picos característicos da sua estrutura celulósica, geralmente atribuídos a elongações C-O, C-C e C-N. A presença de grupos amida resulta do facto do quitosano ser obtido por N-desacetilação parcial da quitina (Mitrevej *et al.*, 2001) e, como se referiu na Secção 2.1., o grau de desacetilação do quitosano utilizado no presente trabalho estava compreendido entre 75 e 85%.

Quando as soluções destes dois polímeros foram misturadas entre si, o espectro obtido sofreu alterações, comparativamente com o espectro dos polímeros isolados, conforme mostra a Figura V-7 c. Neste caso, observou-se uma banda larga entre 1642 e 1573 cm^{-1} , com aparecimento de um *shoulder* no pico característico do alginato e dois picos de grande intensidade a 1541,8 cm^{-1} e a 1408,7 cm^{-1} .

Os espectros de FTIR das misturas físicas entre o alginato e o quitosano (1:1, m/m) revelaram os picos característicos de ambos os polímeros (Figura V-7, d).

No que respeita às nanoesferas, o espectro das nanoesferas não revestidas apresentou os mesmos picos do alginato, mas com desvios ligeiros (1548,8, 1406,7 e 1025,5 cm^{-1}). Por fim, o espectro obtido das nanoesferas revestidas com quitosano revelou a existência de um pico a 1336,5 cm^{-1} e outro a 1257,7 cm^{-1} . Além disso, observou-se um desvio da banda entre 3700 e 2800 cm^{-1} e do pico a 3229,1 cm^{-1} .

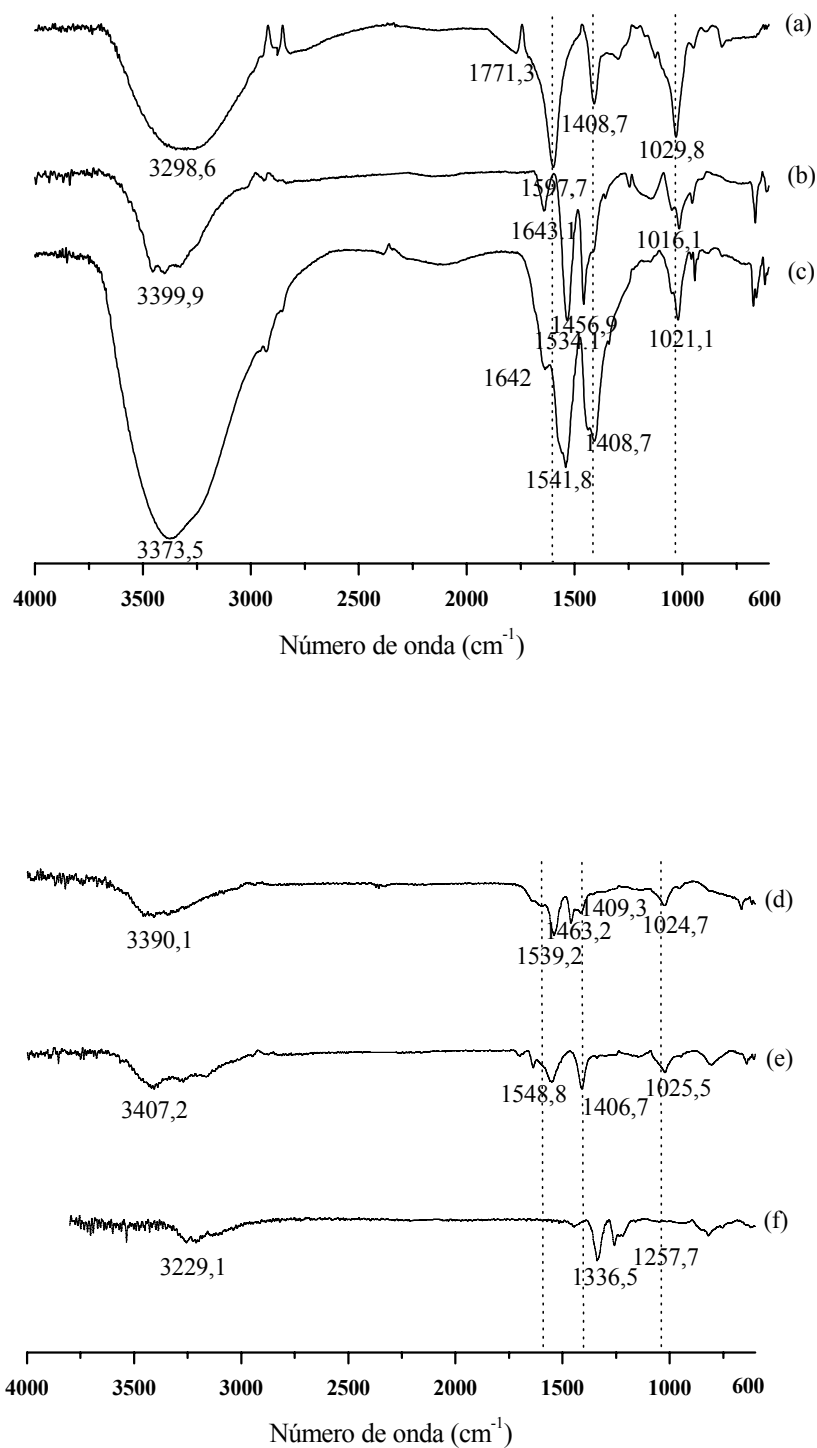


Figura V-7. Espectros de FTIR: a) alginato de sódio, b) quitosano, c) complexo alginato e quitosano, d) mistura física 1:1 (m/m) de alginato de sódio e quitosano, e) nanoesferas de alginato não revestidas e f) nanoesferas de alginato revestidas com quitosano.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram estudados três polímeros de revestimento, nomeadamente a PLL, o quitosano e a PHMCG, para as nanoesferas de alginato no sentido de obter um perfil de libertação controlado da insulina a partir das mesmas. Os parâmetros de processo e de formulação para o revestimento basearam-se em trabalhos anteriores (Quong e Neufeld, 1998; Quong e Neufeld, 1999; Silva *et al.*, 2006).

4.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

Na avaliação da influência do revestimento na granulometria das nanoesferas observou-se um ligeiro desvio na curva granulométrica, particularmente para as nanoesferas revestidas com quitosano e PHMCG.

O aumento na granulometria após revestimento poderá ser devido a dois importantes factores, designadamente a espessura da membrana de revestimento resultante após o revestimento ou a ocorrência de aglomerados.

Relativamente à espessura da membrana de revestimento, estudos anteriores demonstraram que a espessura da membrana de revestimento pode ser um dos factores responsáveis pelo aumento da granulometria (Ma *et al.*, 1994; Hearn e Neufeld, 2000; Liu *et al.*, 2004). Nestes últimos estudos, os valores máximos de espessura da membrana de revestimento obtidos foram inferiores a 15 μm (Ma *et al.*, 1994; Hearn e Neufeld, 2000), 5 μm (Liu *et al.*, 2004) e 60 μm (Hearn e Neufeld, 2000) quando aplicados revestimentos de PLL, quitosano e PHMCG, respectivamente. Também aqui se observou que o revestimento com PHMCG conduziu a uma granulometria superior comparativamente aos restantes polímeros. Porém, perante estes dados, e estabelecendo um ponto de comparação com os resultados obtidos no presente trabalho, o aumento na granulometria das nanoesferas observado após revestimento parece não ser devido unicamente à formação de uma membrana, uma vez que não se observou no presente trabalho esta relação entre a PLL e o quitosano. As diferenças observadas podem também estar relacionadas com as diferentes metodologias, PM e

concentrações dos polímeros envolvidos. Todos os polímeros utilizados no presente trabalho apresentam pesos moleculares inferiores aos referenciados nos estudos citados anteriormente (Ma *et al.*, 1994; Hearn e Neufeld, 2000; Liu *et al.*, 2004). A utilização de polímeros com baixo PM pode ser vantajosa, isto porque, os polímeros de menor PM conseguem difundir-se mais facilmente nas matrizes (Yan *et al.*, 2001) e formar membranas mais densas (Liu *et al.*, 2004), enquanto os polímeros de elevado PM apenas se ligam à superfície (Quong e Neufeld, 1998). Por essa razão, os polímeros de baixo PM deverão originar granulometrias mais baixas que os polímeros de elevado PM (Misirli *et al.*, 2005).

De facto, o PM da PLL foi inferior ao PM do quitosano e por apresentar um PM baixo, a PLL poderá ter difundido mais facilmente pela matriz de alginato e originar nanoesferas com uma granulometria próxima das nanoesferas não revestidas. Num estudo desenvolvido por De e colaboradores (De e Robinson, 2003), observou-se essa mesma relação para a granulometria das nanoesferas de alginato revestidas com PLL e a granulometria das nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e essa diferença foi atribuída ao menor PM da PLL. Além disso, o quitosano apresenta uma estrutura mais ramificada que poderá ter dificultado a difusão na matriz de alginato, originando granulometrias consideravelmente superiores às nanoesferas não revestidas e revestidas com PLL. Por outro lado, convém também salientar que o fenómeno de ocorrência de aglomerados pode ser, igualmente, uma outra explicação possível para a granulometria obtida. A ocorrência de aglomerados, após o revestimento com quitosano, encontra-se também documentada (Anal e Stevens, 2005) e foi atribuída, entre outros factores, às propriedades adesivas do quitosano relacionadas com as interacções electrostáticas (Lim *et al.*, 1997; González-Rodríguez *et al.*, 2002).

Contudo, o PM da PLL é muito próximo da PHMCG e os valores da granulometria das nanoesferas, aplicando os dois polímeros, foram diferentes. Neste caso, a explicação parece estar mais relacionada com a concentração utilizada e com a ocorrência de aglomerados. No presente trabalho, a concentração usada para cada um dos polímeros de revestimento foi diferente, tendo sido verificada a seguinte ordem de concentrações: quitosano < PLL <<< PHMCG. Seria, então, de esperar uma granulometria superior para as nanoesferas com PHMCG em relação aos restantes polímeros. Este facto verificou-se. Além

disso, a ocorrência de agregação entre partículas de apenas alginato de reduzidas dimensões durante o seu revestimento é frequente (Hurteaux *et al.*, 2005). No presente trabalho, observou-se uma maior tendência de aglomeração das nanoesferas revestidas com PHMCG, comparativamente com o quitosano e com a PLL. Por outro lado, a menor granulometria das nanoesferas revestidas com a PLL em relação à PHMCG pode também estar relacionada com a extensão e rapidez de interação com o alginato. Trabalhos anteriores referem que a PLL se liga fácil e rapidamente (De e Robinson, 2003) a alginatos de elevado teor em resíduos M, comparativamente aos alginatos de elevado teor em resíduos G (Gåserød *et al.*, 1998b). Como foi descrito no trabalho do Capítulo III, o alginato utilizado apresenta um elevado conteúdo em resíduos M e, talvez essa característica possa ser, para além do baixo PM da PLL, responsável por uma difusão facilitada.

No caso do quitosano e da PHMCG, as diferenças obtidas parecem não estar relacionadas com a facilidade de difusão. Se assim fosse, a PHMCG, como apresenta um PM mais baixo que o quitosano deveria, *a priori*, apresentar uma granulometria inferior ao quitosano, o que não se veio a verificar. A explicação para a maior granulometria da PHMCG deverá estar relacionada com a concentração utilizada e a ocorrência de aglomerados após o revestimento.

4.2. Potencial zeta das nanoesferas

O potencial zeta, que caracteriza a carga eléctrica global da superfície de uma partícula, é um parâmetro importante que poderá prever a possibilidade de ocorrência de interação entre a mucosa intestinal e as nanoesferas em causa.

O potencial zeta depende do pH do meio (Arnedo *et al.*, 2002). À excepção do esófago, todo o TGI é revestido por uma camada contínua insolúvel de muco, que apresenta carga eléctrica global negativa. Por seu lado, o alginato é um polímero aniónico, isto é, apresenta carga eléctrica global negativa, devido aos baixos pK_a que apresenta (Draget *et al.*, 1994). Tendo em conta a carga eléctrica da mucosa intestinal, seria de esperar que as nanoesferas de alginato teriam algumas dificuldades de interação com a mesma. Foi por essa

razão, entre outras, que foram adicionados polímeros catiónicos às nanoesferas de alginato. Entre os polímeros catiónicos seleccionados, apenas o quitosano foi capaz de inverter a carga eléctrica negativa das nanoesferas de alginato para uma carga positiva. Trabalhos anteriores referem igualmente essa inversão de carga eléctrica após revestimento com quitosano. Por exemplo, em nanopartículas de álcool polivinílico, cujo potencial zeta inicial foi de -8 mV, após revestimento com quitosano, este aumentou para +10 mV (Kumar *et al.*, 2004). No presente trabalho, a explicação para o resultado obtido poderá estar relacionada com o seu maior PM, comparativamente com os restantes polímeros, e com a natureza catiónica e particular do polímero (Gåserød *et al.*, 1998a). O facto de o quitosano apresentar um PM superior aos restantes polímeros poderá fazer com que a interacção com o alginato ocorra mais à superfície e, por isso, apresentar uma localização mais superficial e menos interna na matriz polimérica. Essa localização do quitosano pode ser responsável pela maior densidade de cargas positivas à superfície das nanoesferas e, conseqüentemente, mais vantajosa do ponto de vista da mucoadesividade (Douglas e Tabrizian, 2005; Wittaya-areekul *et al.*, 2006). Na literatura, têm surgido várias teorias que tentam explicar o mecanismo de mucoadesão entre os materiais adesivos e a mucina, designadamente a teoria por adsorção electrostática, teoria da molhabilidade, teoria da difusão, entre outras. Para o quitosano, a teoria mais provável seria baseada na adsorção electrostática (Wittaya-areekul *et al.*, 2006), isto porque, trata-se de um polímero flexível com uma elevada densidade de carga.

4.3. Eficiência de encapsulação (EE)

A EE de insulina em nanoesferas de alginato, tal como foi referido nos capítulos anteriores, está condicionada pela interacção electrostática entre o fármaco peptídico e o polímero. No presente trabalho, observou-se que a adição de um polímero de revestimento diminuiu, em larga medida, a EE de insulina. Esta diminuição da EE pode estar relacionada com a competição entre as espécies químicas envolvidas, isto é, o ião gelificante, o fármaco e o polímero de revestimento que competem pelo polímero da matriz. Esta competição química foi relatada em trabalhos anteriores, especificamente entre os iões cálcio e, por exemplo,

moléculas de quitosano em micropartículas de alginato (Wittaya-areekul *et al.*, 2006) ou entre a albumina bovina sérica e o quitosano para os grupos carboxílicos das cadeias do alginato (Coppi *et al.*, 2001). Além disso, o facto de se submeterem as nanoesferas a um processo de agitação extra a 100 rpm durante 30 min, este pode ser responsável por alguma difusão da insulina para o exterior e/ou superfície das nanoesferas. Essa difusão poderá estar correlacionada com a porosidade das nanoesferas. No entanto, não é possível descrever a porosidade das nanoesferas, uma vez que este parâmetro não foi quantificado no presente trabalho e os valores do poro do alginato que se encontram descritos na literatura variam com a metodologia aplicada e com o tipo de alginato envolvido. Mas, entre os polímeros estudados, o quitosano conduziu a valores de EE ligeiramente superiores, relativamente aos restantes polímeros, provavelmente devido à presença de uma membrana de quitosano mais superficial devido ao seu PM elevado. Esta membrana mais superficial pode ter dificultado a difusão da insulina durante o processo de revestimento. Por outro lado, a PHMCG originou valores de EE mais baixos. Num estudo desenvolvido por Quong e colaboradores (Quong e Neufeld, 1999), foram encapsuladas, em macroesferas de alginato, moléculas de ADN com um PM compreendido entre 394 a 15173 kDa, e revestidas com PHMCG. Os valores de EE determinados foram elevados. Todavia, a EE neste estudo foi apenas calculada com as moléculas de ADN de elevado PM, porque os fragmentos de ADN com peso inferior foram todos perdidos durante o processo de encapsulação (Quong e Neufeld, 1999). No presente trabalho, o fármaco utilizado apresenta um PM muito inferior a esse limite ($6 \text{ kDa} < 394 \text{ kDa}$) e, talvez por esse facto, a EE em nanoesferas de alginato revestidas com PHMCG não foi satisfatória para o objectivo inicial.

4.4. Perfil de libertação *in vitro*

Como constatado, o alginato, por si só, não é um polímero ideal para a libertação controlada de insulina, uma vez que esta foi imediatamente libertada após transferência das mesmas do meio ácido para o neutro. Supõe-se que a pH 1,2 o alginato se encontra sob a forma de ácido algínico que é insolúvel e poroso (Draget *et al.*, 1994; George e Abraham,

2006). Quando as nanoesferas não revestidas são submetidas a um valor de pH superior, o ácido algínico é convertido num gel solúvel (George e Abraham, 2006). Após a passagem gástrica, o alginato, como apresenta menor conteúdo em iões cálcio (Hari *et al.*, 1996b) e tendo em conta que a troca iónica continua a realizar-se com iões sódio e fosfato presentes no meio neutro, este intumescer e sofre a dissolução completa (Lee *et al.*, 2003). A referida troca iónica produz a formação de espaços intersticiais que promovem a difusão da insulina através da matriz de alginato. Por outro lado, a repulsão electrostática entre os aniões carboxilato a pH neutro também poderá acelerar o intumescimento e a erosão dos geles de alginato (Lee *et al.*, 2003).

Porém, o perfil de libertação da insulina a partir das nanoesferas de alginato foi alterado após revestimento com os polímeros catiónicos. Para avaliar a influência do revestimento e o tipo de polímero catiónico, foram calculados os factores de diferença (f_1) e de semelhança (f_2). A formulação de referência foi a das nanoesferas não revestidas e as formulações teste foram a das nanoesferas revestidas com PLL e quitosano. Esta metodologia não foi aplicável no caso do revestimento com PHMCG, uma vez que a insulina foi totalmente libertada nos primeiros minutos e, por isso, este tipo método de comparação não pode ser utilizado. O cálculo destes parâmetros confirmou a influência do processo de revestimento com quitosano e PLL no perfil de libertação de insulina, uma vez que f_1 foi sempre superior a 15 e f_2 inferior a 50.

Tal como descrito no Capítulo III, a retenção da insulina nas nanoesferas em meio ácido foi atribuída ao reforço da matriz polimérica com um adjuvante aniónico, o sulfato de dextrano. Este facto foi ainda mais reforçado quando foram realizados outros estudos, nos quais foi aplicado o quitosano como polímero de revestimento mas sem o polímero aniónico na matriz de alginato. Verificou-se que estas nanoesferas revestidas com quitosano, mas sem o polímero aniónico, foram incapazes de reter a insulina em meio ácido. Os resultados obtidos foram concordantes com alguns trabalhos (Murata *et al.*, 1999; Paul e Sharma, 2001; Li *et al.*, 2002; Onal e Zihnioglu, 2002; Silva, 2007), mas contrariaram outros (Hari *et al.*, 1996a; Ramadas *et al.*, 2000; González-Rodríguez *et al.*, 2002; Lucinda-Silva e Evangelista, 2003).

As diferenças obtidas podem estar relacionadas com as diferentes metodologias utilizadas, sistemas poliméricos e fármacos envolvidos.

Curiosamente, essa incapacidade de retenção da insulina em meio ácido foi igualmente verificada no presente estudo com o polímero de revestimento PHMCG mas, desta vez, com a matriz reforçada. A explicação poderia estar relacionada com uma competição entre a PHMCG e insulina para o sulfato de dextrano e/ou para o alginato, mas não existem dados bibliográficos disponíveis que a suportem.

Pelo contrário, o efeito de retenção da insulina em meio ácido devido à presença do sulfato de dextrano na matriz de alginato manteve-se, quer para o quitosano quer para a PLL. A pH 1,2, o alginato encontra-se sob a forma de ácido algínico (González-Rodríguez *et al.*, 2002), enquanto a PLL e o quitosano encontram-se completamente protonados a este pH. Este facto parece não ter interferido com o efeito de reforço da matriz por parte do sulfato de dextrano.

Por outro lado, o tempo de dissolução das nanoesferas de alginato no meio neutro foi modificado, após o revestimento com PLL mas ainda mais com o quitosano. Após a transferência para o meio neutro, esperava-se uma maior retenção da proteína com a PLL, comparativamente ao quitosano, devido à sua menor granulometria, ao seu elevado pK_a e a capacidade de redução da permeabilidade do alginato, tal como foi observado em outros estudos (Ottoy e Smidsrød, 1997). Mas, os resultados obtidos contrariaram esse pressuposto e suportam agora a explicação que a retenção da proteína poderá ser devida a outras propriedades do quitosano, nomeadamente o seu maior PM, densidade de carga à superfície da nanoesferas e a própria conformação das cadeias.

A PLL tem uma conformação mais compacta, enquanto o quitosano apresenta uma conformação mais distendida. Por outro lado, o facto do quitosano apresentar um PM superior poderá ter originado uma membrana de revestimento mais superficial e, conseqüentemente, um maior impedimento estérico para a difusão do fármaco a partir da matriz. A membrana de quitosano em macroesferas de alginato tem sido descrita como uma estrutura forte e resistente, mesmo na presença de agentes quelantes de cálcio ou agentes anti-gelificantes (Albarghouthi *et al.*, 2000; Onal e Zihnioglu, 2002). Esta teoria foi confirmada no presente

estudo, uma vez que, mesmo 24 h após de ensaio de libertação, uma quantidade considerável de insulina, cerca de 20%, se encontrava associada às nanoesferas. Isto pode ser uma vantagem tecnológica no sentido de possibilitar um aumento da residência das nanoesferas ao nível do intestino e, por conseguinte, conduzir a um aumento da absorção intestinal da insulina. Os resultados aqui obtidos com o quitosano são concordantes com estudos anteriores (Hari *et al.*, 1996b; Sezer e Akbuga, 1999; DeGroot e Neufeld, 2001; González-Rodríguez *et al.*, 2002; Wang e He, 2002).

Além disso, a interacção do alginato-quitosano está descrita como sendo mais forte que a interacção alginato-PLL (Gåserød *et al.*, 1999). Um outro estudo anterior corrobora os resultados obtidos no presente trabalho (Liu *et al.*, 1997). Neste estudo desenvolvido por Liu e colaboradores (Liu *et al.*, 1997), foram produzidas microesferas de alginato não revestidas, revestidas com PLL e revestidas com quitosano. A percentagem de libertação do fármaco encapsulado, neste caso a albumina, foi de cerca de 100%, 75% e 45% 6 h após incubação em PBS, respectivamente. A libertação instantânea de albumina foi atribuída à baixa estabilidade da interacção alginato-cálcio, devido à presença de iões fosfato, quando o pH foi superior a 5. A diminuição da percentagem de albumina libertada com o revestimento de PLL e quitosano foi atribuída ao efeito estabilizante dos policatiões.

Por fim, a diferença entre o quitosano e a PLL poderá ser atribuída à semelhança da estrutura sacarídica do quitosano com o alginato, comparativamente à diferença estrutural entre a estrutura da PLL e a estrutura do alginato. A semelhança estrutural entre o quitosano e o alginato pode ter conduzido a reacções intercadeias mais fortes e, conseqüentemente, ao prolongamento da libertação do fármaco encapsulado. Este resultado foi igualmente observado em outros trabalhos já realizados (Daly e Knorr, 1988).

A análise matemática dos perfis de libertação foi apenas aplicada às nanoesferas revestidas com o quitosano, uma vez que, quer nas nanoesferas não revestidas quer nas nanoesferas revestidas com PLL, a libertação de insulina foi imediata após transferência das nanoesferas para o meio neutro. Assim, verificou-se que o perfil de libertação se encontrava próximo dos modelos de Weibull e de Baker-Lonsdale. Relativamente ao modelo de Weibull, este apresenta algumas deficiências por ser considerado um modelo empírico (Costa, 2002).

No que respeita ao modelo de Baker-Lonsdale, é geralmente utilizado para a linearização de ensaios de libertação de várias formulações de microesferas ou microcápsulas (Costa, 2002). Neste modelo, os perfis de libertação de fármacos são geralmente associados a processos de difusão através de uma matriz esférica.

A difícil adaptação dos modelos matemáticos poderá ter origem na dimensão das partículas envolvidas. Os modelos matemáticos descritos são geralmente aplicados para formas farmacêuticas tradicionais e, mais recentemente, para microesferas e microcápsulas. A sua aplicação em nanoesferas não se encontra descrita na literatura, pelo menos que se tenha conhecimento, e pode constituir, de facto, uma dificuldade acrescida na análise dos perfis de libertação. Contudo, apesar das dificuldades, optou-se por proceder a essa avaliação com o intuito de reforçar, ainda mais, a escolha do polímero de revestimento.

Por todas as razões descritas, designadamente o potencial zeta positivo, a EE de insulina superior aos restantes polímeros de revestimento e um perfil de libertação controlado, optou-se, como polímero de revestimento, pelo quitosano.

Depois de seleccionado o polímero de revestimento, foi ainda realizado um estudo complementar: alteração do tipo de revestimento, isto é, mudança do revestimento em duas etapas para um revestimento em uma etapa. Os resultados obtidos não foram animadores. Para além da insulina, observou-se uma grande quantidade de óleo de parafina encapsulado. Esse facto pode estar relacionado com a velocidade de agitação utilizada (1600 rpm). Nesta fase, pensou-se em alterar a velocidade de agitação, no sentido de diminuir a incorporação de óleo, mas, como descrito no trabalho do Capítulo II, este parâmetro é um dos que mais influencia a granulometria das partículas obtidas por métodos baseados em emulsificações. Assim, essa alternativa foi colocada de parte e o tipo de revestimento em uma etapa foi completamente abandonado.

4.5. Análise do complexo polielectrolítico por calorimetria de varrimento diferencial (DSC)

As análises de DSC permitiram avaliar, numa etapa inicial, a influência da reticulação com iões cálcio na matriz de alginato e, numa segunda fase, estudar a formação de um complexo polielectrolítico entre o alginato e o quitosano.

Inicialmente, e no caso das nanoesferas não revestidas, observou-se que a reticulação do alginato com iões cálcio alterou o comportamento térmico do polímero em relação ao comportamento térmico observado com o polímero isolado. A entalpia envolvida na reacção de reticulação revelou a existência de uma quantidade de energia envolvida ao nível dos picos endotérmicos muito diferente da entalpia do polímero isolado. Os picos endotérmicos são geralmente associados a fenómenos de desidratação dos grupos hidrofílicos dos polímeros (Sarmiento *et al.*, 2006). Os desvios dos picos endotérmicos, após reticulação do alginato, podem ser atribuídos a uma maior resistência do alginato à perda de água na presença de cálcio. Essa resistência poderá estar associada à maior organização estrutural do alginato de cálcio na forma de nanoesferas proporcionada pela formação de ligações intercadeias, de acordo com o modelo caixa-de-ovos, comparativamente com o polímero não reticulado (Martinsen *et al.*, 1989). Por outro lado, o pico exotérmico sofreu, também, um desvio para temperaturas mais elevadas e a explicação para este facto baseia-se, igualmente, no aumento da resistência devido à organização estrutural do alginato de cálcio. Geralmente, os picos exotérmicos de um polímero de natureza polissacarídica encontram-se associados a fenómenos de degradação devido à desidratação e a reacções de despolimerização (reacções de descarboxilação parcial dos grupos carboxílicos e reacções de oxidação dos complexos polielectrolíticos) (Soares *et al.*, 2004; Zohuriaan e Shokrolahi, 2004; Mimmo *et al.*, 2005).

A formação de um complexo polielectrolítico entre o alginato e o quitosano, após o revestimento das nanoesferas, foi confirmada através da preparação do complexo de alginato e quitosano, e cujo comportamento foi comparado com o das nanoesferas revestidas. Por análise da curva de DSC do complexo de alginato e quitosano, observou-se um duplo pico endotérmico a 61,92°C e 77,20°C de média e baixa intensidade, respectivamente. Este pico foi igualmente observado nas nanoesferas revestidas, mas em menor intensidade. O duplo pico

endotérmico pode ser atribuído à interacção do alginato e do quitosano através da formação de interacções electrostáticas entre o grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$) do alginato e o grupo amónio ($-\text{NH}_3^+$) do quitosano (Tapia *et al.*, 2002). A curva de DSC das nanoesferas revestidas revelou, ainda, a existência de múltiplos picos endotérmicos, contrariamente ao que foi observado na curva de DSC do complexo de alginato e quitosano formado pela mistura das soluções dos dois polímeros. A existência de múltiplos picos endotérmicos foi concordante com o trabalho desenvolvido por Wong e colaboradores, quando estes desenvolveram um sistema polimérico, muito semelhante ao do presente trabalho, que envolvia alginato e quitosano com o fármaco sulfatiazol (Wong *et al.*, 2002). A existência dos múltiplos picos endotérmicos atribuiu-se a uma resistência adicional associada ao alginato de cálcio e à interacção do alginato com o quitosano (Fernández-Hervás *et al.*, 1998). Como se viu, o alginato, quando reagiu com o quitosano, encontrava-se sob a forma de alginato de cálcio. A presença de cálcio pode ter condicionado interacções electrostáticas entre os grupos amina do quitosano e os grupos carboxílicos do alginato. O pico exotérmico observado no complexo polielectrolítico dos polímeros isolados apresentou uma temperatura mais elevada de decomposição, comparativamente à temperatura observada nos polímeros isolados. Este facto leva-nos a concluir que existem interacções mais fortes entre os dois polímeros envolvidos. No caso das nanoesferas revestidas, o pico de decomposição não se observou no intervalo de temperaturas estudadas. A explicação para este facto pode estar relacionada com o limite superior de temperatura seleccionado não ter sido suficiente para abranger a fase de decomposição do complexo polielectrolítico. Esta resistência térmica poderá ser atribuída à elevada estabilidade do complexo polielectrolítico (Smitha *et al.*, 2005).

Por fim, a análise por DSC da mistura dos dois polímeros revelou a inexistência de interacções entre as duas espécies, já que estavam apenas presentes os picos característicos de cada um dos polímeros envolvidos. Desta forma, pode-se concluir que, para que ocorra a formação de um complexo polielectrolítico entre o alginato e quitosano, é essencial o contacto em solução entre as espécies químicas envolvidas. Além disso, o comportamento térmico do complexo formado irá depender da presença de outras espécies químicas, como é o caso do cálcio.

4.6. Análise do complexo polielectrolítico por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR permitiu constatar diferenças espectrais entre o alginato isolado e o alginato reticulado com o ião cálcio sob a forma de nanoesferas. As nanoesferas de alginato de cálcio não revestidas demonstraram os picos correspondentes às ligações -COO^- , -CH e C-O-C (Wang e He, 2002) da mesma forma que o alginato isolado, mas em menor intensidade. De facto, a reticulação com o ião cálcio provocou desvios dos picos característicos do alginato para valores de número de onda ligeiramente inferiores e de menor intensidade. Este resultado foi concordante com resultados obtidos em trabalhos anteriores (Wong *et al.*, 2002).

No que respeita a análise por FTIR do complexo polielectrolítico, o espectro demonstrou que os picos correspondentes aos grupos funcionais de cada um dos polímeros sofreram alterações, especialmente com o aparecimento de uma banda mais larga, *shoulder*, a 1642 cm^{-1} . Esta banda foi observada em outros estudos já realizados (Yan *et al.*, 2000; Simsek-Ege *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001), tendo sido atribuída a forças *Coulomb* entre os grupos amina do quitosano e os grupos carboxílicos do alginato (Takahashi *et al.*, 1990; Wang e He, 2002). A Figura V-8 representa um esquema ilustrativo das interações electrostáticas entre os dois polímeros.

No caso das nanoesferas revestidas, a intensidade dos picos foi consideravelmente menor, o que sugere a complexação entre o quitosano e o alginato, tal como se verificou em outros trabalhos (Mitrevej *et al.*, 2001). Essa menor intensidade dos picos pode estar ainda relacionada com o factor diluição, comparativamente aos polímeros isolados (Wang e He, 2002). Além disso, a diferença entre o complexo formado entre os polímeros e o complexo formado nas nanoesferas está, também ela, relacionada com a presença de cálcio nas nanoesferas. Assim, a interacção entre o alginato e o quitosano poderá originar uma orientação diferente dos grupos funcionais na presença ou ausência de cálcio, o que conduz à visualização de um novo pico nas nanoesferas revestidas. O aparecimento de um pico a $1257,7\text{ cm}^{-1}$ foi concordante com o trabalho desenvolvido por Smitha e colaboradores (Smitha *et al.*, 2005). O aparecimento deste pico pode ser considerado uma confirmação de que

ocorreu com o revestimento de quitosano nas nanoesferas de alginato de cálcio. Por outro lado, a hipótese de competição química entre o quitosano e o ião cálcio para o alginato, que se lançou como explicação para a diminuição da EE de insulina após o revestimento, foi ainda reforçada com a análise obtida por FTIR. Por fim, o aparecimento de um novo pico a $3229,1\text{ cm}^{-1}$ poderá ser atribuído a ligações intermoleculares por pontes de hidrogénio O-H entre o alginato e o quitosano (Zhang *et al.*, 2004), o que reforça, ainda mais, a teoria de interacção electrostática entre o alginato e o quitosano.

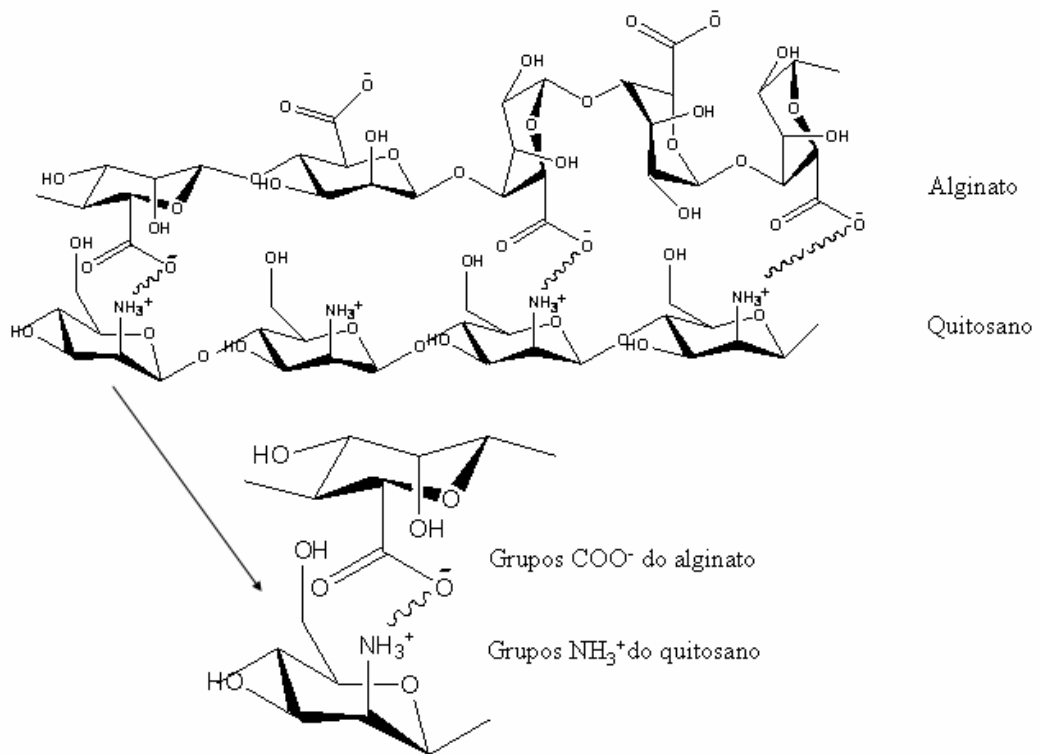


Figura V-8. Representação esquemática das interacções electrostáticas entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amina do quitosano (adaptado de Mi *et al.*, 2002).

5. CONCLUSÕES

No sentido de obter um perfil de libertação controlado de insulina a partir das nanoesferas de alginato foram utilizados três polímeros de revestimento, designadamente a PLL, o quitosano e a PHMCG. A selecção do polímero de revestimento foi baseada na granulometria, potencial zeta, EE mas, principalmente, nos perfis de libertação de insulina obtidos.

O presente trabalho mostrou que a menor granulometria das nanoesferas de alginato foi obtida com a PLL seguida do quitosano e, por fim, a PHMCG. A menor granulometria obtida com a PLL parece estar relacionada com a maior ou menor facilidade de difusão do polímero na matriz de alginato.

Já na avaliação do potencial zeta, apenas o revestimento com quitosano foi capaz de inverter a carga eléctrica negativa das nanoesferas de alginato para uma carga positiva, provavelmente devido ao seu PM que lhe confere uma localização mais superficial. Este facto poderá ser vantajoso em termos de interacção das nanoesferas com a mucina intestinal.

Quanto à EE, observou-se que a adição de um polímero de revestimento diminuiu em larga medida a EE de insulina. Este facto parece estar relacionado com a competição entre as espécies químicas envolvidas e com o próprio processo de revestimento. Entre os polímeros estudados, o quitosano foi aquele que conduziu a valores de EE ligeiramente superiores, em comparação com os restantes polímeros, provavelmente devido à presença de uma membrana de quitosano mais superficial.

O perfil de libertação das nanoesferas de alginato foi alterado após a utilização de polímeros catiónicos, sobretudo no caso da PHMCG, onde se observou a incapacidade de retenção da insulina em meio ácido, mesmo com a matriz reforçada com sulfato de dextrano. Pelo contrário, o efeito do reforço da matriz de alginato com o sulfato de dextrano manteve-se, quer para o quitosano quer para a PLL, uma vez que insulina não foi libertada a pH 1,2. No que respeita à libertação da insulina a partir das nanoesferas em tampão fosfato de pH 6,8, observou-se que o revestimento com quitosano retardou a dissolução das nanoesferas neste meio. Tal facto não se verificou para as nanoesferas revestidas com PLL.

Por fim, as análises de DSC e FTIR permitiram confirmar a influência da reticulação com os iões cálcio na matriz de alginato e, numa segunda fase, comprovou-se a formação de um complexo polielectrolítico entre o alginato e o quitosano.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABAD-VILLAR, E. M., ETTER, S. F., THIEL, M. A. e HAUSER, P. C. (2006) Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylene biguanide in eye drops by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Anal. Chim. Acta** 561, 133-137.
- ALBARGHOUTH, M., FARA, D. A., SALEEM, M., EL-THAHER, T., MATALKA, K. e BADWAN, A. (2000) Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. **Int. J. Pharm.** 206, 23-34.
- ANAL, A. K. e STEVENS, W. F. (2005) Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **Int. J. Pharm.** 290, 45-54.
- ARNEDO, A., ESPUELAS, S. e IRACHE, J. M. (2002) Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. **Int. J. Pharm.** 244, 59-72.
- ARTURSSON, P. (1994) Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). **Pharm. Res.** 11, 1358-1361.
- BARTKOWIAK, A. (2002) Effect of the ionic strength on properties of binary alginate/oligochitosan microcapsules. **Coll. Surf. A: Physic. Eng. Asp.** 204, 117-124.
- BARTKOWIAK, A. e HUNKELER, D. (1999a) Alginate-oligochitosan microcapsules: a mechanistic study relating membrane and capsule properties to reaction conditions. **Chem. Mater.** 11, 2486-2492.
- BARTKOWIAK, A. e HUNKELER, D. (1999b) New microcapsules based on oligoelectrolyte complexation. **Ann. New York Acad. Sci.** 875, 36-45.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A. (2000) Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems. **Int. J. Pharm.** 194, 1-13.
- BUCKO, M., VIKARTOVSKA, A., LACIK, I., KOLLARIKOVA, G., GEMEINER, P., PATOPRSTY, V. e BRYGIN, M. (2005) Immobilization of a whole-cell epoxide-hydrolyzing biocatalyst in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-co-guanidine) capsules using a controlled encapsulation process. **Enz. Microb. Technol.** 36, 118-126.

- CHANDY, T., MOORADIAN, D. L. e RAO, G. H. (1999) Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation. **Artif. Org.** 23, 894-903.
- CHANDY, T., RAO, G. H., WILSON, R. F. e DAS, G. S. (2002) Delivery of LMW heparin via surface coated chitosan/peg-alginate microspheres prevents thrombosis. **Drug Deliv.** 9, 87-96.
- CHEN, F., ZHANG, Z.-R. e HUANG, Y. (2007) Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. **Int. J. Pharm.** 336, 166-173.
- COPPI, G., IANNUCELLI, V., LEO, E., BERNABEI, M. T. e CAMERONI, R. (2001) Chitosan-alginate microparticles as a protein carrier. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 27, 393-400.
- COSTA, P. (2002) Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **RBCF** 38, 141-153.
- COSTA, P. e SOUSA LOBO, J. M. (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.** 13, 123-133.
- CUI, J.-H., GOH, J.-S., KIM, P.-H., CHOI, S.-H. e LEE, B.-J. (2000) Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. **Int. J. Pharm.** 210, 51-59.
- DALY, M. M. e KNORR, D. (1988) Chitosan-alginate complex coacervation capsules: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability. **Biotechnol. Prog.** 4, 76-81.
- DARRABIE, M. D., KENDALL, J., WILLIAM F. e OPARA, E. C. (2005) Characteristics of poly-L-ornithine-coated alginate microcapsules. **Biomaterials** 26, 6846-6852.
- DE, S. e ROBINSON, D. (2003) Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine-alginate nanospheres. **J. Control. Rel.** 89, 101-112.
- DEGROOT, A. R. e NEUFELD, R. J. (2001) Encapsulation of urease in alginate beads and protection from alfa-chymotrypsin with chitosan membranes. **Enz. Microb. Technol.** 29, 321-327.

- DOUGLAS, K. L. e TABRIZIAN, M. (2005) Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. **J. Biomater. Sci. Polym. Edn.** 16, 43-56.
- DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G. e SMIDSRØD, O. (1994) Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydr. Polym.** 25, 31-38.
- DYER, A. M., HINCHCLIFFE, M., WATTS, P., CASTILLE, J., JABBAL-GILL, I., NANKERVIS, R., SMITH, A. e ILLUM, L. (2002) Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. **Pharm. Res.** 19, 998-1008.
- FERNÁNDEZ-HERVÁS, M. J., HOLGADO, M. A., FINI, A. e FELL, J. T. (1998) *In vitro* evaluation of alginate beads of a diclofenac salt. **Int. J. Pharm.** 163, 23-34.
- FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R., CALVO, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. **Pharm. Res.** 16, 1576-1581.
- FERREIRO, M. G., TILLMAN, L., HARDEE, G. e BODMEIER, R. (2002) Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers. **Int. J. Pharm.** 239, 47-59.
- GÅSERØD, O., JOLLIFFE, I. G., HAMPSON, F. C., DETTMAR, P. W. e SKJÅK-BRÆK, G. (1998a) The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate beads by coating with chitosan. **Int. J. Pharm.** 175, 237-246.
- GÅSERØD, O., SANNES, A. e SKJÅK-BRÆK, G. (1999) Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. **Biomaterials** 20, 773-783.
- GÅSERØD, O., SMIDSRØD, O. e SKJÅK-BRÆK, G. (1998b) Microcapsules of alginate-chitosan. I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. **Biomaterials** 19, 1815-1825.
- GEORGE, M. e ABRAHAM, T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. **J. Control. Rel.** 114, 1-14.
- GOMBOTZ, W. R. e WEE, S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 31, 267-285.

- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. L., HOLGADO, M. A., SANCHEZ-LAFUENTE, C., RABASCO, A. M. e FINI, A. (2002) Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. **Int. J. Pharm.** 232, 225-234.
- HALDER, A., MUKHERJEE, S. e SA, B. (2005) Development and evaluation of polyethyleneimine-treated calcium alginate beads for sustained release of diltiazem. **J. Microencapsul.** 22, 67-80.
- HARI, P. R., CHANDY, T. e SHARMA, C. P. (1996a) Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin. **J. Microencapsul.** 13, 319-329.
- HARI, P. R., CHANDY, T. e SHARMA, C. P. (1996b) Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin. **J. Appl. Polym. Sci.** 59, 1795-1801.
- HATTORI, T., NAKATA, Y. e KATO, R. (2003) Determination of biguanide groups in polyhexamethylene biguanide hydrochloride by titrimetric methods. **Anal. Sci.** 19, 1525-1528.
- HEARN, E. e NEUFELD, R. J. (2000) Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease. **Proc. Biochem.** 35, 1253-1260.
- HORISBERGER, M. e CLERC, M.-F. (1988) Chitosan-colloidal gold complexes as polycationic probes for the detection of anionic sites by transmission and scanning electron microscopy. **Histochem. Cell Biol.** 90, 165-175.
- HUGUET, M. L., NEUFELD, R. J. e DELLACHERIE, E. (1996) Calcium-alginate beads coated with polycationic polymers: comparison of chitosan and DEAE-dextran. **Proc. Biochem.** 31, 347-353.
- HURTEAUX, R., EDWARDS-LÉVY, F., LAURENT-MAQUIN, D. e LÉVY, M.-C. (2005) Coating alginate microspheres with a serum albumin-alginate membrane: application to the encapsulation of a peptide. **Eur. J. Pharm. Sci.** 24, 187-197.
- ILLUM, L., FARRAJ, N. F. e DAVIS, S. S. (1994) Chitosan as novel nasal delivery system for peptide drugs. **Pharm. Res.** 11, 1186-1189.
- ISKAKOV, R. M., KIKUCHI, A. e OKANO, T. (2002) Time-programmed pulsatile release of dextran from calcium-alginate gel beads coated with carboxy-n-propylacrylamide copolymers. **J. Control. Rel.** 80, 57-68.

- KAWABATA, A. e TAYLOR, J. A. (2007) The effect of reactive dyes upon the uptake and antibacterial efficacy of poly(hexamethylene biguanide) on cotton. Part 3: Reduction in the antibacterial efficacy of poly(hexamethylene biguanide) on cotton, dyed with bis(monochlorotriazinyl) reactive dyes. **Carbohydr. Polym.** 67, 375-389.
- KIM, H. J., LEE, H. C., OH, J. S., SHIN, B. A., OH, C. S., PARK, R. D., YANG, K. S. e CHO, C. S. (1999) Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.** 10, 543-556.
- KOKUFUTA, E., SHIMIZU, N., TANAKA, H. e NAKAMURA, I. (1988) Use of polyelectrolyte complex-stabilized calcium alginate gel for entrapment of β -amylase. **Biotechnol. Bioeng.** 32, 756-759.
- KUMAR, M. N. R., BAKOWSKY, U. e LEHR, C. M. (2004) Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. **Biomaterials** 25, 1771-1777.
- KUMAR, M. N. V. R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.** 46, 1-27.
- LEE, D. W., HWANG, S. J., PARK, J. B. e PARK, H. J. (2003) Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microspheres. **J. Microencapsul.** 20, 179-192.
- LEE, K. H., LEE, P. M. e SLAW, Y. S. (1993) Immobilization of aminoacylase by encapsulation in poly-L-lysine-stabilized calcium alginate beads. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 57, 27-32.
- LEE, K. Y., PARK, W. H. e HA, W. S. (1997) Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. **J. Appl. Polym. Sci.** 63, 425-432.
- LEHR, C.-M., BOUWSTRA, J. A., SCHACHT, E. H. e JUNGINGER, H. E. (1992) *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **Int. J. Pharm.** 78, 43-48.
- LEMOINE, D., WAUTERS, F., BOUCHEND'HOMME, S. e PRÉAT, V. (1998) Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen. **Int. J. Pharm.** 176, 9-19.

- LI, S., WANG, X. T., ZHANG, X. B., YANG, R. J., ZHANG, H. Z., ZHU, L. Z. e HOU, X. P. (2002) Studies on alginate-chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits. **J. Control. Rel.** 84, 87-98.
- LIM, F. e SUN, A. M. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. **Science** 210, 908-910.
- LIM, L. Y., WAN, L. S. e THAI, P. Y. (1997) Chitosan microspheres prepared by emulsification and ionotropic gelation. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 23, 981-985.
- LIU, L.-S., LIU, S.-Q., NG, S. Y., FROIX, M., OHNO, T. e HELLER, J. (1997) Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres. **J. Control. Rel.** 43, 65-74.
- LIU, X., XUE, W., LIU, Q., YU, W., FU, Y., XIONG, X., MA, X. e YUAN, Q. (2004) Swelling behaviour of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. **Carbohydr. Polym.** 56, 459-464.
- LUCINDA-SILVA, R. M. e EVANGELISTA, R. C. (2003) Microspheres of alginate-chitosan containing isoniazid. **J. Microencapsul.** 20, 145-152.
- MA, X., VACEK, I. e SUN, A. M. (1994) Generation of alginate poly-L-lysine (APA) biomicrocapsules: the relationship between the membrane strength and the reaction conditions. **Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech.** 22, 43-69.
- MANSOURI, S., LAVIGNE, P., CORSI, K., BENDERDOUR, M., BEAUMONT, E. e FERNANDES, J. C. (2004) Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 57, 1-8.
- MARTINSEN, A., SKJÅK-BRÆK, G. e SMIDSRØD, O. (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate beads. **Biotechnol. Bioeng.** 33, 79-89.
- MCKNIGHT, C. A., KU, A. e GOOSEN, M. F. (1988) Synthesis of chitosan-alginate microcapsule membranes. **J. Bioact. Compat. Polym.** 3, 334-355.
- MI, F. L., SUNG, H. W. e SHYU, S. S. (2002) Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. **Carbohydr. Polym.** 48, 61-72.

- MIMMO, T., MARZADORI, C., MONTECCHIO, D. e GESSA, C. (2005) Characterisation of Ca- and Al-pectate gels by thermal analysis and FT-IR spectroscopy. **Carbohydr. Res.** 340, 2510-2519.
- MISIRLI, Y., OZTURK, E., KURSAKLIOGLU, H. e DENKBAS, E. B. (2005) Preparation and characterization of mitomycin-C loaded chitosan-coated alginate microspheres. **J. Microencapsul.** 22, 167-178.
- MITREVEJ, A., SINCHAIPANID, N., RUNGVEJHAVUTTIVITTAYA, Y. e KOSITCHAIYONG, V. (2001) Multiunit controlled-release diclofenac sodium capsules using complex of chitosan with sodium alginate or pectin. **Pharm. Develop. Technol.** 6, 385-392.
- MOORE, J. W. e FLANNER, H. H. (1996) Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharm. Technol.** 20, 64-74.
- MÜLLER, M., BRIŠŠOVÁ, M., RIESER, T., POWERS, A. C. e LUNKWITZ, K. (1999) Deposition and properties of polyelectrolyte multilayers studied by ATR-FTIR spectroscopy. **Mat. Sci. Eng.: C** 8-9, 163-169.
- MURATA, Y., TONIWA, S., MIYAMOTO, E. e KAWASHIMA, S. (1999) Preparation of alginate gel beads containing chitosan nicotinic acid salt and the functions. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 48, 49-52.
- NIGAM, A. (2001) Method and composition for textile printing, Patente EUA 6291023.
- ONAL, S. e ZIHNIÖGLU, F. (2002) Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: oral therapeutic peptide delivery. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.** 30, 229-237.
- ORIVE, G., HERNÁNDEZ, R. M., GASCÓN, A. R., IGARTUA, M. e PEDRAZ, J. L. (2003) Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation. **Int. J. Pharm.** 259, 57-68.
- OTTOY, M. H. e SMIDSRÖD, O. (1997) Swelling of poly-L-lysine and chitosan-coated superswelling sodium-alginate gel beads. **Polym. Gels Networks** 5, 307-314.
- PAN, Y., LI, Y.-J., ZHAO, H.-Y., ZHENG, J.-M., XU, H., WEI, G., HAO, J.-S. e CUI, F.-D. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin *in vivo*. **Int. J. Pharm.** 249, 139-147.

- PAUL, W. e SHARMA, C. P. (2001) Porous hydroxyapatite nanoparticles for intestinal delivery of insulin. **Trends Biomat. Artif. Org.** 14, 37-38.
- POLK, A., AMSDEN, B., YAO, K. D., PENG, T. e GOOSEN, M. F. A. (1994) Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. **J. Pharm. Sci.** 83, 178-185.
- PORTERO, A., TEJEIRO-OSORIO, D., ALONSO, M. J. e REMUÑÁN-LÓPEZ, C. (2007) Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin. **Carbohydr. Polym.** 68, 617-625.
- QUONG, D. e NEUFELD, R. J. (1998) DNA protection from extracapsular nuclease, within chitosan-or poly-L-lysine-coated alginate beads. **Biotechnol. Bioeng.** 60, 124-134.
- QUONG, D. e NEUFELD, R. J. (1999) DNA encapsulation within co-guanidine membrane coated alginate beads and protection from extracapsular nuclease. **J. Microencapsul.** 16, 573-585.
- QUONG, D., YEO, J. N. e NEUFELD, R. J. (1999) Stability of chitosan and poly-L-lysine membranes coatings DNA-alginate beads when exposed to hydrolytic enzymes. **J. Microencapsul.** 16, 73-82.
- RAMADAS, M., PAUL, W., DILEEP, K. J., ANITHA, Y. e SHARMA, C. P. (2000) Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats. **J. Microencapsul.** 17, 405-411.
- RHA, C. e RODRIGUEZ-SANCHEZ, D. (1988) Encapsulated active material system, Patente EUA 4749620.
- RIBEIRO, A. J., SILVA, C., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2005) Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. **Eur. J. Pharm. Sci.** 25, 31-40.
- RIBEIRO, L. S. S. (2005) Sistemas multicomponentes com ciclodextrinas como estratégia para otimizar a biodisponibilidade oral de fármacos: aplicação em medicamentos de libertação controlada. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- ROSINSKI, S., LEWINSKA, D., WÓJCIK, M., ORIVE, G., PEDRAZ, J. L. e WERYNSKI, A. (2005) Mass transfer characteristics of poly-lysine, poly-ornithine and

poly-methylene-co-guanidine membrane coated alginate microcapsules. **J. Memb. Sci.** 254, 249-257.

SARMENTO, B., FERREIRA, D., VEIGA, F. e RIBEIRO, A. (2006) Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydr. Polym.** 6, 1-7.

SEZER, A. D. e AKBUGA, J. (1999) Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads. **J. Microencapsul.** 16, 687-696.

SHU, X. Z. e ZHU, K. J. (2002) The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated with chitosan: the preparation method effect. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 53, 193-201.

SILVA, C. (2007) Aumento da biodisponibilidade oral de fármacos peptídicos recorrendo à encapsulação com alginato e quitosano. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra, Coimbra.

SILVA, C., RIBEIRO, A. J., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2005) Characterization of chitosan membranes coating alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. Trends & challenges in pharmaceutics: 2nd Congress of the pharmaceutical sciences, 6th Portuguese-spanish congress on the controlled release. Coimbra.

SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FIGUEIREDO, M., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2006) Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **AAPS J.** 7, E903-E913.

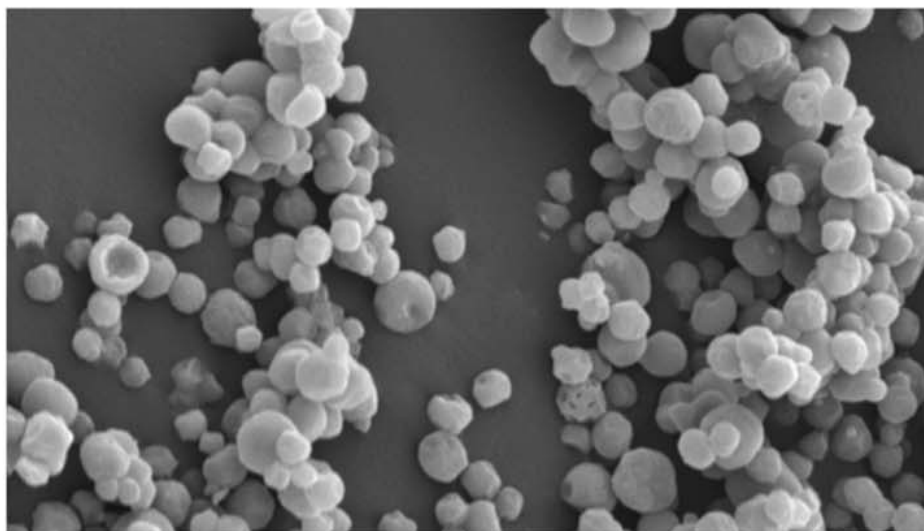
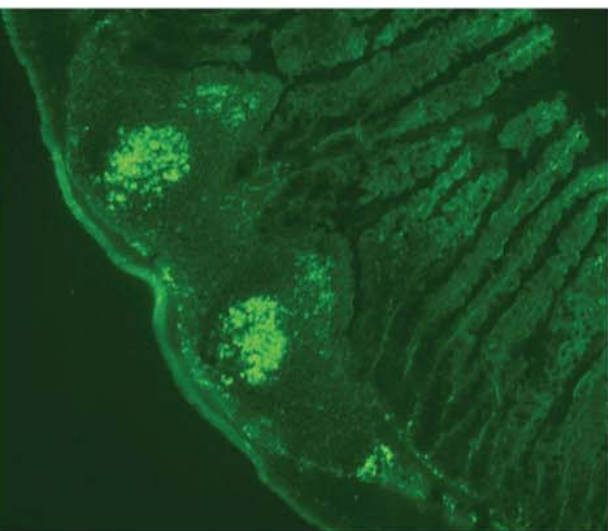
SIMSEK-EGE, F. A., BOND, G. M. e STRINGER, J. (2003) Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. **J. Appl. Polym. Sci.** 88, 346-351.

SINHA, V. R., SINGLA, A. K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., BANSAL, K. e DHAWAN, S. (2004) Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **Int. J. Pharm.** 274, 1-33.

SMITHA, B., SRIDHAR, S. e KHAN, A. A. (2005) Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. **Eur. Polym. J.** 41, 1859-1866.

- SOARES, J. P., SANTOS, J. E., CHIERICE, G. O. e CAVALHEIRO, E. T. G. (2004) Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Ecletica Química** 29, 53-56.
- TAKAHASHI, T., TAKAYAMA, K., MACHIDA, Y. e NAGAI, T. (1990) Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate. **Int. J. Pharm.** 61, 35-41.
- TAPIA, C., COSTA, E., MORIS, M., SAPAG-HAGAR, J., VALENZUELA, F. e BASUALTO, C. (2002) Study of the influence of the pH media dissolution, degree of polymerization, and degree of swelling of the polymers on the mechanism of release of diltiazem from matrices based on mixtures of chitosan/alginate. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 28, 217-224.
- TAQIEDDIN, E. e AMIJI, M. (2004) Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. **Biomaterials** 25, 1937-1945.
- THANOS, C. G., BINTZ, B. E., BELL, W. J., QIAN, H., SCHNEIDER, P. A., MACARTHUR, D. H. e EMERICH, D. F. (2006) Intraperitoneal stability of alginate-polyornithine microcapsules in rats: an FTIR and SEM analysis. **Biomaterials** 27, 3570-3579.
- THU, B. (1996) Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. **Biomaterials** 17, 1031-1040.
- UENG, S. W. N., YUAN, L.-J., LEE, N., LIN, S.-S., CHAN, E.-C. e WENG, J.-H. (2004) *In vivo* study of biodegradable alginate antibiotic beads in rabbits. **J. Ortop. Res.** 22, 592-599.
- VANDENBERG, G. W., DROLET, C., SCOTT, S. L. e NOUÈ, J. D. L. (2001) Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. **J. Control. Rel.** 77, 297-307.
- WANG, K. e HE, Z. (2002) Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. **Int. J. Pharm.** 244, 117-126.
- WANG, L., KHOR, E. e LIM, L. Y. (2001) Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. **J. Pharm. Sci.** 90, 1134-1142.
- WANG, S. B., LIU, Y. G., WENG, L. J. e MA, X. J. (2003) Effect of the molecular weights of poly-L-arginine on membrane strength and permeability of poly-L-arginine group microcapsules. **Macromol. Biosci.** 3, 347-350.

- WANG, S. B., XU, F. H., HE, H. S. e WENG, L. J. (2005) Novel alginate-poly(L-histidine) microcapsules as drug carriers: *in vitro* protein release and short term stability. **Macromol. Biosci.** 5, 408-414.
- WANG, Y. J. (2000) Development of new polycations for cell encapsulation with alginate. **Mater. Sci. Eng.** 13, 59-63.
- WITTAYA-AREEKUL, S., KRUEENATE, J. e PRAHSARN, C. (2006) Preparation and *in vitro* evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. **Int. J. Pharm.** 312, 113-118.
- WONG, T. W., CHAN, L. W., KHO, S. B. e SIA HENG, P. W. (2002) Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. **J. Control. Rel.** 84, 99-114.
- YAN, X., KHOR, E. e LIM, L. Y. (2000) PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. **Chem. Pharm. Bull.** 48, 941-946.
- YAN, X. L., KHOR, E. e LIM, L. Y. (2001) Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. **J. Biomed. Mat. Res.** 58, 358-365.
- ZHANG, L., GUO, J., PENG, X. e JIN, Y. (2004) Preparation and release behavior of carboxymethylated chitosan/alginate microspheres encapsulating bovine serum albumin. **J. Appl. Polym. Sci.** 92, 878-882.
- ZHANG, L., GUO, J., ZHOU, J., YANG, G. e DU, Y. (2000) Blend membranes from carboxymethylated chitosan/alginate in aqueous solution. **J. Appl. Polym. Sci.** 77, 610-616.
- ZHANG, L.-Y., YAO, S.-J. e GUAN, Y.-X. (2005) Effects of poly(methylene-co-guanidine) on microbial growth in an alginate/cellulose sulphate-CaCl₂/poly(methylene-co-guanidine) capsule system. **Proc. Biochem.** 40, 189-193.
- ZHU, H., SRIVASTAVA, R. e MCSHANE, M. J. (2005) Spontaneous loading of positively charged macromolecules into alginate-templated polyelectrolyte multilayer microcapsules. **Biomacromolecules** 6, 2221-2228.
- ZOHURIAAN, M. J. e SHOKROLAHI, F. (2004) Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing** 23, 575-579.



EFEITO TERAPÊUTICO ORAL DA
INSULINA APÓS PREVENÇÃO DO
ATAQUE PROTEOLÍTICO
A NÍVEL GÁSTRICO

CAPÍTULO VI

1. INTRODUÇÃO

No trabalho experimental descrito anteriormente observou-se que foi possível produzir nanoesferas através do método de emulsificação/gelificação interna; observou-se que foi possível recuperar, eficazmente, as nanoesferas, recorrendo a um processo de recuperação que associa etapas de desidratação e centrifugação; e finalmente, observou-se que foi possível preservar a bioactividade da insulina após os processos de encapsulação e recuperação das nanoesferas. A partir desta fase, a formulação foi desenvolvida de modo a alcançar dois objectivos: impedir a libertação da insulina a nível gástrico e obter um perfil de libertação controlado a nível intestinal. Como descrito anteriormente, a retenção da insulina a nível gástrico foi conseguida após o reforço da matriz de alginato com o sulfato de dextrano. O perfil de libertação *in vitro* da insulina foi controlado com o revestimento de quitosano. Contudo, e até ao presente momento, o comportamento da formulação na presença de enzimas proteolíticas é desconhecido. No presente trabalho irá ser abordada a problemática da barreira enzimática a nível gástrico, designadamente a acção proteolítica da pepsina sobre a insulina encapsulada, e as tentativas, do ponto de vista tecnológico, que foram executadas no sentido de transpor essa mesma barreira.

A proteólise dos péptidos inicia-se no estômago através de uma família de proteases aspárticas designadas pepsinas. A enzima pepsina (EC 3.4.23.1) é sintetizada pelas glândulas gástricas no estômago como um zimogénio inactivo (pepsinogénio), que em contacto com o pH ácido do estômago (na diluição gástrica à volta de 0,1%) (Prista *et al.*, 1995), sofre hidrólise, originando a enzima activa (pepsina) e um polipéptido inactivo (Peppas e Kavimandan, 2006). A separação do polipéptido torna o centro activo da enzima acessível aos seus substratos. A activação do pepsinogénio também pode ocorrer por autocatálise. A pepsina é solúvel em água desionizada e apresenta um PM próximo dos 35 kDa (Sigma-Aldrich, 2007) e um raio hidrodinâmico de 2,74 nm (Williams e Rajagopalan, 1966). O pI da pepsina é próximo de 1,0 (Advanced Enzyme Technologies, 2006). Esta enzima é mais activa a pH 2 até 3 (pH óptimo 2,2) e torna-se inactiva a pH superior a 5 (Peppas e Kavimandan, 2006).

A pepsina é normalmente responsável pela degradação da proteína em cerca de 10 a 20%. Geralmente, esta enzima hidrolisa apenas ligações peptídicas e não as ligações amidas ou ésteres, como acontece com outras endopeptidases (Sigma-Aldrich, 2007). As cadeias laterais dos ácidos carboxílicos de dois resíduos de ácido aspártico são responsáveis pela actividade catalítica e encontram-se representados pelas duas esferas na Figura VI-1. A pepsina cliva, preferencialmente, resíduos hidrofóbicos e de preferência aromáticos (Fruton *et al.*, 1961), mas também o grupo carboxílico da fenilalanina e da tirosina (Advanced Enzyme Technologies, 2006), e em menor extensão, do ácido glutâmico (Sigma-Aldrich, 2007). A enzima não exerce actividade proteolítica em outros aminoácidos como, por exemplo, a valina, a alanina ou a glicina (Sigma-Aldrich, 2007; Worthington-biochem, 2007).

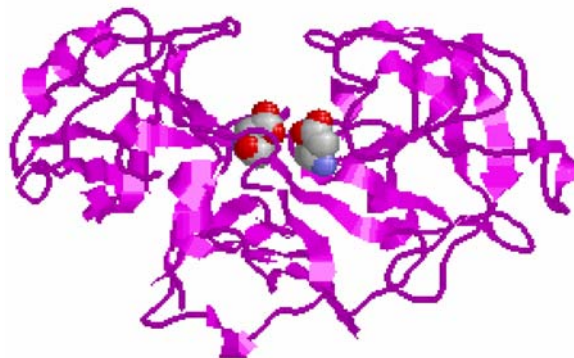


Figura VI-1. Representação esquemática e tridimensional da pepsina. As duas esferas representam as cadeias laterais dos ácidos carboxílicos de dois resíduos de ácido aspártico.

Ao longo dos tempos, têm sido utilizadas diversas estratégias para prevenir o ataque proteolítico quando se administra oralmente a insulina, como foi descrito no Capítulo I. Apesar de algumas delas terem produzido um aumento da biodisponibilidade oral de péptidos, parte das estratégias descritas apresenta alguns inconvenientes do ponto de vista tecnológico e fisiológico. Por isso, as partículas poliméricas aparecem, mais uma vez, como uma alternativa válida, comparativamente com algumas das estratégias referidas no mesmo capítulo. Na área das partículas poliméricas encontram-se as nanopartículas. As nanopartículas têm sido descritas como veículo protector da insulina a nível do TGI, nomeadamente as nanopartículas de quitosano (Pan *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2006), de quitosano e PLGA (Pan *et al.*, 2003), de quitosano e Eudragit[®] (Li *et al.*, 2007), de quitosano

e ácido poli-glutâmico (Lin *et al.*, 2007), de PACA (Couvreur *et al.*, 1980; Damgé *et al.*, 1988; Damgé *et al.*, 1990; Michel *et al.*, 1991; Damgé *et al.*, 1997; Aboubakar, 1999; Aboubakar *et al.*, 2000; Radwan, 2001; Courmarie *et al.*, 2002; Radwan e Aboul-Enein, 2002; Mesiha *et al.*, 2005), de PLGA e PLA (Cui *et al.*, 2006a), de PCL (Dangé *et al.*, 2007), de PLGA (Cui *et al.*, 2006b), de PLGA e ácido fumárico (Carino *et al.*, 2000), de PLGA disperso em microemulsões (Watnasirichaikul *et al.*, 2002) e, até mesmo, nanopartículas de ouro (Joshi *et al.*, 2006).

Para além da acção proteolítica da pepsina, a influência do pH a nível gástrico deve ser sempre considerada, uma vez que se trata de uma barreira complexa na administração oral de insulina porque, por um lado, a activação do pepsinogénio a pepsina depende do pH ácido e também porque, a estabilidade físico-química da insulina pode ser condicionada a este pH (Brange *et al.*, 1992).

No presente trabalho, foram adoptadas técnicas de revestimento adicionais com polímeros e/ou proteínas à formulação desenvolvida no Capítulo V. A necessidade de adoptar estas estratégias surgiu após a realização de ensaios enzimáticos preliminares, onde foi observado que as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano, apesar de conferirem um perfil de libertação de insulina controlado, não conseguiram prevenir o ataque enzimático por parte da pepsina. A explicação desta sensibilidade à enzima parece estar relacionada com a porosidade da matriz polimérica. Supõe-se que essa porosidade permite a difusão da pepsina para o interior da nanoesfera, promovendo a degradação da insulina encapsulada. Entre muitos, os polímeros e as proteínas seleccionados para prevenir o ataque enzimático no presente trabalho foram a pectina, a caseína e a albumina.

A pectina é um polissacárido polimolecular, heterogéneo, não tóxico e extraído das paredes celulares das plantas de grande porte (Thakur *et al.*, 1997; Liu e Krisham, 1999; Sinha e Kumria, 2001). A estrutura dominante da pectina é uma cadeia linear de ácido galacturónico com ligações glicosídicas α -(1-4), como mostra a Figura VI-2, com diversos graus de esterificação dos resíduos de ácido carboxílico (Thakur *et al.*, 1997). O PM da pectina pode variar de 50 a 180 kDa (Sinha e Kumria, 2001) e a sua composição oscila com a fonte da qual foi extraída, bem como com as condições utilizadas durante a extracção e

purificação (Towle e Christensen, 1973; Sriamornsak, 2007). A pectina possui um pK_a de 3,5. É solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos. As propriedades funcionais da pectina são determinadas pela percentagem de grupos carboxilo que podem estar esterificados ou amidados. A percentagem de grupos ácidos na forma de ésteres metílicos presentes na cadeia designa-se por grau de esterificação e, consoante este parâmetro, as pectinas são classificadas em pectinas HM (elevado teor de grupos metoxilo) e pectinas LM (baixo teor de grupos metoxilo). Considera-se, segundo a *Food Chemicals Codex*, que na presença de mais de 50% de grupos metoxilo, a pectina deve ser designada por pectina HM. Quando se utiliza amónia no processo de desesterificação, obtém-se a pectina amidada.

Tal como acontece com o alginato, a pectina do tipo LM sofre gelificação na presença de iões cálcio (Liu e Krisham, 1999; Braccini e Perez, 2001). O tipo de estrutura formada é, vulgarmente, designado por modelo caixa-de-ovos, à semelhança do que acontece com o alginato, mas a associação intercadeias na pectina é ligeiramente diferente do modelo descrito para o alginato (Braccini e Perez, 2001).

As pectinas são, geralmente, utilizadas na indústria alimentar, mas também na indústria tabaqueira e na indústria dos plásticos. Na clínica, a pectina tem sido muito utilizada devido às suas propriedades terapêuticas, nomeadamente como agente anticoagulante, hipoglicémico, hipocolesterolémico, anti-inflamatório, inibidor do crescimento de células tumorais, entre outras. Na indústria farmacêutica, tem sido utilizada na administração de fármacos convencionais como, por exemplo, o atenolol, o piroxicam, a cloroquina, a indometacina e o paracetamol (Joseph e Venkataram, 1995; Aydin e Akbuga, 1996; Fernández-Hervás e Fell, 1998; Liu e Krisham, 1999; Itoh *et al.*, 2006) ou, por exemplo, na administração de fármacos peptídicos como, por exemplo, a albumina e a insulina (Chang e Lin, 2000; Kim e Young Hwan Park, 2003; Cheng e Lim, 2004; Urbano, 2004). O interesse da pectina para o presente trabalho relaciona-se com as descritas características de resistência e insolubilidade às condições drásticas, ao longo do TGI, até à chegada ao cólon (Sriamornsak, 1998; Sriamornsak e Nunthanid, 1998; Musabayane *et al.*, 2000; Hiorth *et al.*, 2006) e do tempo de residência de fármacos mais prolongado comparativamente com as partes antecedentes do TGI (Sriamornsak, 1999). Já no cólon, a pectina sofre degradação e

origina oligogalacturonatos solúveis (Ashford *et al.*, 1994). O fluido colónico não é ácido e contém níveis baixos de enzimas proteolíticas responsáveis pela destruição dos fármacos peptídicos, contrariamente ao que acontece no estômago (Sriamornsak, 1999). Contudo, o cólon contém um elevado número de enzimas que degradam um grande número de polissacáridos, sendo a pectina um desses polissacáridos.

Por isso, tendo em conta a resistência à acção proteolítica e ao conteúdo ácido do estômago, a pectina poderá tornar-se uma estratégia eficaz na transposição da primeira barreira fisiológica na administração oral de insulina. No presente trabalho, optou-se pelo tipo de pectina amidada com grau de esterificação baixo devido à maior resistência do gel resultante, à melhor textura e à menor tendência para a sinerese. Geralmente, a resistência do gel aumenta com a diminuição do grau de esterificação e a capacidade de formar geles aumenta com a amidação. Esta selecção foi baseada em trabalhos anteriores (Urbano, 2004; Hiorth *et al.*, 2006).

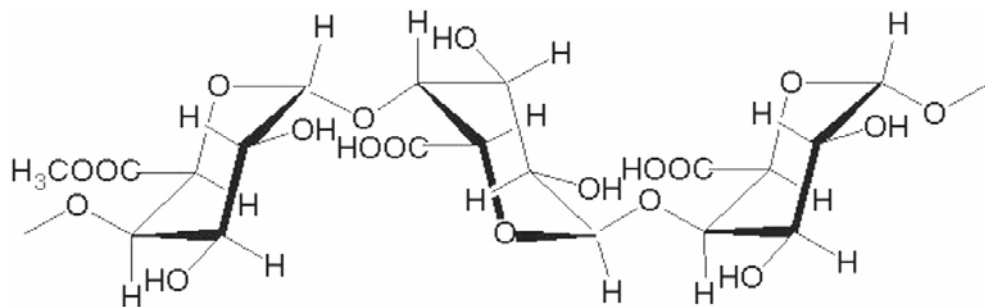


Figura VI-2. Representação esquemática da estrutura da pectina.

Uma outra estratégia baseou-se no segundo revestimento das nanoesferas de alginato revestidas com quitosano mas, desta vez, com a caseína. A opção da caseína foi baseada num trabalho desenvolvido por Morçol e colaboradores (Morçol *et al.*, 2004). A caseína, uma fosfoproteína extraída do leite, é constituída por várias subunidades α -, β -, γ - e κ - (Narambuena *et al.*, 2005). As subunidades diferenciam-se no seu PM, no pI e no grau de fosforilação. Quimicamente, a caseína é composta por um número elevado de aminoácidos, particularmente de prolina, que não interagem entre si. A caseína não apresenta pontes dissulfureto. Como resultado, a caseína possui estruturas secundária e terciária ligeiras e, por causa deste facto, não é facilmente desnaturada. A caseína é relativamente hidrofóbica e

apresenta uma fraca solubilidade em água e em soluções neutras de sais. É estável ao calor e forma micelas através da ligação de iões cálcio e interações hidrofóbicas, como mostra a Figura VI-3.

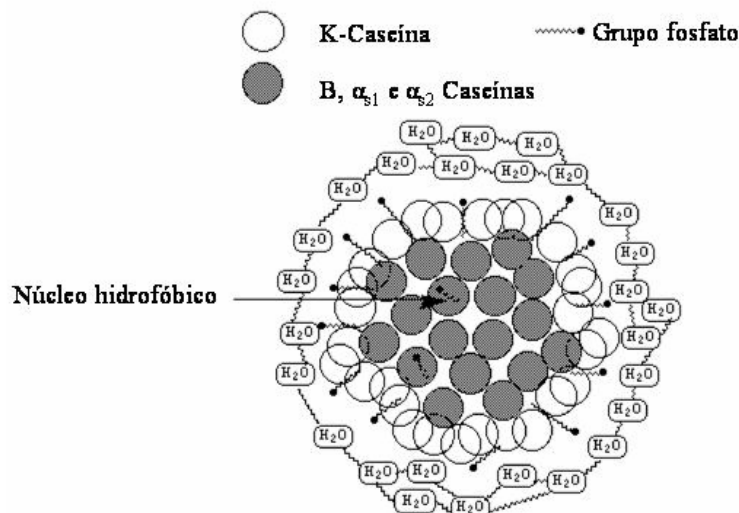


Figura VI-3. Representação esquemática das micelas da caseína.

Estas micelas são estruturas estáveis, esféricas (0,04 a 0,3 µm de diâmetro) mas relativamente porosas. O pI da caseína é 4,6 (Pan *et al.*, 2006). Quando o pH do meio é ácido, a caseína sofre agregação e forma micelas (Ye *et al.*, 2006). A agregação da caseína foi descrita como sendo o factor responsável pelo efeito protector da formulação contendo insulina durante a sua passagem gástrica e, conseqüente, absorção a nível intestinal (Morçol *et al.*, 2004). Por esta razão, entre outras (Pan *et al.*, 2006), a caseína foi seleccionada como segundo material de revestimento.

As aplicações da caseína são variadas, nomeadamente na área da imunológica, bioquímica, na indústria de adesivos e plásticos, na indústria farmacêutica como polímero para a encapsulação (Bajpai, 1999; Santinho *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2006), inibidor enzimático (Ohtani *et al.*, 2003; Venkatesan *et al.*, 2005), agente de revestimento (Zhu e Li, 2003) e, na indústria alimentar como aditivo (Morçol *et al.*, 2004; Nambuena *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2006). Em termos terapêuticos, a caseína apresenta propriedades anti-hipertensivas e citostáticas (Zimecki e Kruzel, 2007).

Por fim, para o presente trabalho foi ainda adoptada a albumina como segundo material de revestimento. A albumina é uma das proteínas mais estudadas (Chuang *et al.*, 2002). A albumina é biodegradável, não tóxica, não antigénica e facilmente acessível na sua forma pura (Chuang *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005). É considerada a proteína plasmática mais abundante, compreendendo cerca de 50-60% da massa total das proteínas plasmáticas (Patil, 2003). A albumina é degradada em quase todos os tecidos do organismo (Sharma *et al.*, 2006). É uma proteína plasmática constituída por uma única cadeia peptídica composta por 580 a 585 aminoácidos, consoante a espécie, e tem um PM que pode variar entre 66 e 69 kDa. Possui um baixo conteúdo de triptofano e metionina e um elevado conteúdo de cisteína, ácido aspártico e glutâmico, lisina e arginina (Urbano, 2004). Dados da cristalografia de raios-x referem que a estrutura da albumina é predominantemente α -helicoidal e os restantes polipéptidos estão distribuídos por regiões extendidas ou flexíveis, como mostra a Figura VI-4. A conformação da albumina depende do pH do meio (Urbano, 2004). O pI da albumina pode variar entre 4,8 a 5,28.

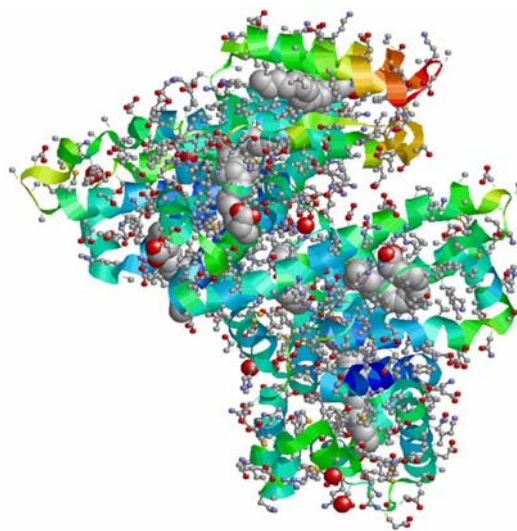


Figura VI-4. Estrutura α -helicoidal da molécula de albumina sérica.

A albumina é responsável pelo transporte de ácidos gordos livres, iões cálcio e cobre, bilirrubina e outros fármacos (Alface, 1997). As aplicações terapêuticas da albumina são variadas, e vão desde a sua utilização em transfusões sanguíneas, na vectorização de fármacos, na conjugação directa com fármacos, na terapia génica, na libertação controlada de fármacos até às técnicas de diagnóstico (Chuang *et al.*, 2002; Patil, 2003). Na indústria

farmacêutica, a albumina é utilizada como agente estabilizante em produtos farmacêuticos e biológicos como, por exemplo, em vacinas e células (Chuang *et al.*, 2002; Patil, 2003; Schneider *et al.*, 2003). Na área da micro e nanoencapsulação, a albumina tem vindo a ser empregue em três campos distintos: como fármaco modelo a encapsular (Polk *et al.*, 1994; Akiyoshi *et al.*, 1996; Crofts e Park, 1997; Lemoine *et al.*, 1998; Bousquet *et al.*, 1999; Chandy *et al.*, 1999; Edwards-Lévy e Lévy, 1999; Coppi *et al.*, 2001; Vandenberg *et al.*, 2001; Baran *et al.*, 2002; Anal *et al.*, 2003; Kang e Singh, 2003; Lameiro *et al.*, 2006), como polímero principal para encapsular outro fármaco (Sugibayashi *et al.*, 1977; Sugibayashi *et al.*, 1979a; Sugibayashi *et al.*, 1979b; Morimoto *et al.*, 1981; Longo *et al.*, 1982; Gupta *et al.*, 1986; Oppenheim, 1986; Gupta e Hung, 1989; Arshady, 1990; Arnedo *et al.*, 2002; Langer *et al.*, 2003) ou, então, como polímero de revestimento de partículas poliméricas (Landry *et al.*, 1996a; Landry *et al.*, 1997; Hurteaux *et al.*, 2005).

No presente trabalho, a adopção da albumina como material de revestimento surgiu após um trabalho desenvolvido por Hurteaux e colaboradores (Hurteaux *et al.*, 2005), onde demonstraram que a albumina, como polímero de revestimento, aumentou a estabilidade das macroesferas de alginato à acção do ião citrato e à liofilização. Para além deste estudo, um outro serviu como base para o presente trabalho, mas com um objectivo ligeiramente diferente. Neste outro estudo, a albumina produziu um aumento do tempo de vida plasmática da insulina, após conjugação com a mesma (Schechter *et al.*, 2005).

Sintetizando, o principal objectivo deste trabalho consistiu em seleccionar o polímero e/ou proteína de revestimento que fosse capaz de prevenir o ataque enzimático da pepsina à insulina encapsulada. A selecção do polímero/proteína de revestimento foi baseada nas características granulométricas, EE de insulina, percentagem de insulina resistente após incubação com a pepsina e, finalmente, no seu efeito terapêutico após administração oral a ratos diabéticos.

Mais tarde, e já seleccionado o/a polímero/proteína de revestimento, procedeu-se à optimização do seu efeito na glicémia. Neste caso, a estratégia inicial consistiu na administração da formulação em causa no seu estado hidratado em vez de liofilizada e, sendo

esta estratégia bem sucedida, procedeu-se à adição de polietilenoglicol (PEG) à solução de quitosano (Prego *et al.*, 2006).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O alginato de sódio e o sulfato de dextrano foram os indicados no Capítulo III. O carbonato de cálcio ultrafino, o agente emulsivo (Span[®] 80), a parafina líquida e a insulina foram os indicados no Capítulo II. O quitosano foi o indicado no Capítulo V. A caseína (origem bovina e sob a forma de sal sódico, PM = 19-25 kDa e pI 4,6) e albumina (origem bovina, PM = 66 kDa e pI 5,2) foram adquiridas à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A pectina (origem citrina, PM = 150 kDa) foi adquirida à CP Kelco (Lille Skensved, Dinamarca). A pectina utilizada apresentava, segundo indicações do fabricante, um baixo grau de esterificação (27-33%) e um grau de amidação compreendido entre 16 e 22%. Por isso, foi designada de pectina LM e amidada. A pepsina (EC 3.4.23.1) da mucosa gástrica porcina, com uma actividade de 800-2500 U/mg de proteína, foi adquirida à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O fármaco utilizado na indução da diabetes foi a STZ. Este fármaco foi adquirido à Sigma-Aldrich Chimie (L'Isle d'Abeau Chesnes, França). O polietilenoglicol (PEG, PM = 4 kDa) foi adquirido à Fluka, Chemie GmbH (Buchs, Suíça). A água desionizada utilizada na preparação de soluções foi obtida a partir de um sistema Millipore Elix 5 (Bedford, MA, EUA). O acetonitrilo, o TFA e a água utilizados no sistema de HPLC foram de qualidade adequada. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico, já indicados no Capítulo II.

2.2. Preparação das nanoesferas

As nanoesferas foram preparadas, segundo o protocolo descrito no Capítulo IV. Depois de recuperadas, as nanoesferas foram revestidas por um processo de duas etapas com uma solução (100 mL) de quitosano (0,03% m/V, a pH 4,5), enriquecida com cloreto de cálcio a 1,5% (m/V), durante 30 min e sob agitação magnética (100 rpm). Após o

revestimento, as nanoesferas foram armazenadas a 4°C durante 24 h. Decorrido o período de repouso, o sobrenadante foi aspirado sob vácuo. As nanoesferas foram liofilizadas a 0°C durante 48 h (Lyph-Lock 6, Labconco, Kansas City, MS, EUA), após congelamento da suspensão de nanoesferas a -50°C num banho de etanol a 96% (V/V) (Benchtop Shell Freezer, Freezone[®] modelo 79490, Labconco). Foram preparadas nanoesferas vazias, isto é, sem adição de insulina. Neste último caso, a solução de insulina foi substituída por 10 mL de água desionizada no processo de preparação das nanoesferas, descrito no trabalho do Capítulo IV.

Alternativamente, foram preparados mais lotes de nanoesferas, onde foi aplicado às nanoesferas de alginato revestidas com quitosano no estado hidratado (sem submeter à liofilização) um segundo revestimento com três soluções diferentes (volume utilizado 100 mL): pectina (0,03% m/V, a pH 4,5), caseína (20 mg/mL, em tampão fosfato a 10 mM e a pH 8) e albumina (1% m/V, a pH 5,1). O tempo de revestimento foi de 30 min e o revestimento decorreu sob agitação magnética (100 rpm). A relação de massa entre o quitosano e a pectina (1:1) foi baseada em trabalhos anteriores (Mitrevej *et al.*, 2001). A concentração de caseína foi baseada no trabalho desenvolvido por Morçol e colaboradores (Morçol *et al.*, 2004). A concentração de albumina foi baseada no trabalho realizado no Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Decorrido o período de revestimento, o sobrenadante foi aspirado sob vácuo e as nanoesferas foram armazenadas e liofilizadas segundo o protocolo anterior. Nesta etapa, foram igualmente preparadas nanoesferas vazias.

Numa segunda parte deste trabalho e depois de seleccionado o segundo material de revestimento, o protocolo de preparação das nanoesferas foi ligeiramente alterado mas de forma sequencial. Numa primeira fase, não se realizou o passo da liofilização, mantendo os restantes passos descritos no protocolo anterior. Numa segunda fase, procedeu-se à adição de PEG (0,15%, m/V) à solução de revestimento de quitosano e de cloreto de cálcio, seguindo os restantes passos descritos anteriormente, à excepção do passo da liofilização.

2.3. Caracterização granulométrica das nanoesferas

A distribuição granulométrica e a polidispersividade das nanoesferas foram determinadas de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

2.4. Potencial zeta das nanoesferas

O potencial zeta das nanoesferas foi determinado em triplicado, recorrendo a um Malvern Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), segundo a técnica descrita no Capítulo V.

2.5. Determinação da eficiência de encapsulação (EE)

A EE da insulina foi de acordo com as condições descritas no Capítulo IV, à excepção do método de quantificação da insulina. Neste caso, quantificou-se a insulina por HPLC (ver Anexo II).

2.6. Estabilidade enzimática na presença da pepsina

O valor da actividade enzimática da pepsina foi baseado no trabalho desenvolvido por Silva (Silva, 2007), onde descreveu que a pepsina utilizada no presente trabalho apresenta uma actividade enzimática de $727,9 \pm 13,5$ U/mg de sólido, correspondente a uma variação de, aproximadamente, 10% em relação ao valor especificado pelo fornecedor (662 U/mg de sólido).

Para determinar a estabilidade enzimática da insulina encapsulada em nanoesferas, foi determinado, inicialmente, o teor de insulina encapsulada nas nanoesferas. O protocolo foi semelhante ao indicado no Capítulo IV mas o método de doseamento da insulina foi por HPLC. De seguida, uma quantidade de nanoesferas (15 mg) foi incubada em 10 mL de fluido

gástrico artificial (USP XXVIII) com pepsina sob agitação magnética (100 rpm, 2 h), promovida por intermédio de uma placa com múltiplos focos, em banho de água termostaticado a 37°C. A concentração de pepsina no fluido gástrico artificial foi de 3,2 g/L. Neste caso, e segundo os dados anteriores, a actividade da pepsina no fluido gástrico artificial foi de 2329 U/mL (Silva, 2007). Decorrido o período de incubação com a pepsina, a suspensão das nanoesferas foi centrifugada ($12.500 \times g$, 10 min) e o sobrenadante foi eliminado por aspiração. De seguida, as nanoesferas sedimentadas foram incubadas em 10 mL de tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio 55 mM e sob agitação magnética (100 rpm, 1 h). A quantidade de insulina libertada nesta fase, considerada como resistente à acção da pepsina, foi determinada por HPLC. A estabilidade enzimática foi calculada através da razão entre a quantidade de insulina libertada das nanoesferas após incubação enzimática com a pepsina e o teor inicial de insulina nas nanoesferas (Equação VI-1). Como controlo negativo, uma solução de insulina (insulina não encapsulada) foi sujeita às mesmas condições experimentais. A concentração da solução de insulina não encapsulada foi semelhante à analisada nas nanoesferas. Paralelamente, uma solução de insulina não encapsulada e não sujeita a incubação enzimática foi analisada por HPLC. Esta solução foi designada por solução referência. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

$$\text{Insulina resistente à pepsina (\%)} = \frac{\text{Teor de insulina após incubação com pepsina}}{\text{Teor inicial de insulina}} \times 100 \quad \text{Equação VI-1}$$

2.7. Análise da insulina por HPLC

O doseamento da insulina foi realizado de acordo com as condições descritas no Capítulo V e no Anexo II.

2.8. Efeito terapêutico após administração oral das formulações a ratos diabéticos

2.8.1. Indução da Diabetes Mellitus

O efeito terapêutico das nanoesferas foi avaliado *in vivo* recorrendo a ratos *Wistar*, machos, com pesos compreendidos entre 200-300 g e com, aproximadamente, 2 meses de idade. Os animais foram devidamente acomodados num biotério com controlo de temperatura ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), humidade relativa ($\pm 55\%$) e um ciclo diário de luz de 12 h (Figura VI-5). Os animais foram alimentados com uma ração própria (UAR, Villemoisson-sur-Orge, França) e com acesso livre a água.



Figura VI-5. Biotério e as condições de acomodação dos animais em experimentação.

Antes da indução da diabetes do tipo 1, os ratos foram colocados em jejum durante 12 h com acesso livre a água. Antes da administração da STZ, foi determinada em todos os animais os níveis da glicémia basal. A glicémia foi determinada, utilizando um glicómetro Accu-Chek Go[®] (Roche, Strasbourg, França). No dia da indução da diabetes, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (80:20, V/V) a uma dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal administrada pela via i.p.. A diabetes foi induzida quimicamente, através de uma injeção intravenosa (i.v.), na veia peniana, com uma dose única de STZ (65 mg/kg) dissolvida em 400 μL de tampão citrato de pH 4,5 (adição de 25,5 mL de citrato de sódio a 0,1 M e 24,5 mL de ácido cítrico a 0,1 M para um balão de 100 mL que foi aferido com água destilada). A alteração do procedimento da indução da diabetes em relação ao descrito no Capítulo IV foi efectuada apenas pela necessidade do

presente protocolo estar em concordância com o protocolo já pré-estabelecido da Faculdade de Medicina da Universidade de Louis Pasteur, em França. Os ensaios *in vivo* decorreram de acordo com as Directivas da Comunidade Europeia, de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC).

Após 8-10 dias do tratamento com a STZ, os ratos com poliúria, perda de peso corporal e níveis de glicémia superiores a 300 mg/dL foram incluídos no estudo e randomizados em 11 grupos, tal como descreve a Tabela VI-1.

Tabela VI-1. Randomização dos animais em estudo e os diferentes tratamentos.

Formulação	Via de administração	Tratamento
Teste		
I	Oral	Nanoesferas de alginato contendo insulina e revestidas com quitosano
II	Oral	Nanoesferas de alginato contendo insulina e revestidas com quitosano e pectina
III	Oral	Nanoesferas de alginato contendo insulina e revestidas com quitosano e caseína
IV	Oral	Nanoesferas de alginato contendo insulina e revestidas com quitosano e albumina
Controlos		
I	Oral	Meio de dispersão (água)
II	S.C.	Insulina não encapsulada a 4 UI/kg
III	Oral	Insulina não encapsulada a 50 UI/kg
IV	Oral	Nanoesferas de alginato vazias revestidas com quitosano
V	Oral	Nanoesferas de alginato vazias revestidas com quitosano e pectina
VI	Oral	Nanoesferas de alginato vazias revestidas com quitosano e caseína
VII	Oral	Nanoesferas de alginato vazias revestidas com quitosano e albumina

2.8.2. Administração oral das nanoesferas

A administração oral das formulações (Tabela VI-1) aos ratos diabéticos foi efectuada no 11º dia após a indução da diabetes. Para minimizar as flutuações diurnas dos níveis de glicémia dos ratos, todas as experiências se iniciaram à mesma hora e sempre no início da manhã (entre as 8:00 e as 9:00). As nanoesferas foram suspensas em água, de modo a obter uma concentração de insulina de 50 UI/6 mL. No caso das nanoesferas vazias, utilizou-se uma concentração em nanoesferas equivalente às correspondentes nanoesferas contendo insulina. As nanoesferas, contendo insulina e vazias, foram administradas oralmente a ratos diabéticos utilizando uma sonda endogástrica metálica e rígida, como mostra a Figura VI-6.



Figura VI-6. Fotografias representativas das caixas com os animais em estudo, a sonda endogástrica utilizada e a administração oral das formulações descritas na Tabela VI-1.

Como controlos negativos foram administrados, pela mesma via de administração, uma solução de insulina obtida por diluição de Actrapid® em água (insulina não encapsulada) à mesma concentração anterior (50 UI/6 mL) e o meio de dispersão (água). Como controlo positivo, foi administrada pela via s.c. uma solução de insulina (insulina não encapsulada) preparada a 4 UI/mL obtida por diluição de Actrapid® em água destilada (volume final 10 mL). A dose administrada foi de 4 UI/kg por peso corporal e o volume total administrado foi de 1 mL/kg. Para cada animal, foi calculado o volume necessário de forma a completar

1 mL. A diferença de volume foi realizada, recorrendo a uma solução aquosa de NaCl a 0,9% (m/V).

Em todas as situações, as administrações foram realizadas após um período de jejum de 12 h e depois de confirmado o estado hiperglicémico dos ratos diabéticos. Foram recolhidas amostras sanguíneas da ponta da cauda dos ratos para determinação da glicémia em intervalos de tempos pré-definidos (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 h após a administração das formulações).

2.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com as condições descritas no Capítulo III.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

As nanoesferas produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna e revestidas por quitosano, foram sujeitas a um revestimento adicional com três polímeros e/ou proteínas de revestimento diferentes e caracterizadas em termos de distribuição granulométrica através de difração laser. Em todas as situações, a distribuição granulométrica das nanoesferas foi unimodal, como mostra a Figura VI-7. Em termos gráficos, o revestimento com pectina e com caseína conduziu a um desvio na curva de distribuição granulométrica e a uma alteração da polidispersividade (Tabela VI-2). O revestimento com albumina produziu uma diminuição da granulometria das nanoesferas, observando-se um desvio da curva de distribuição granulométrica para a esquerda. Contudo, o factor SPAN aumentou, comparativamente às nanoesferas revestidas apenas com quitosano.

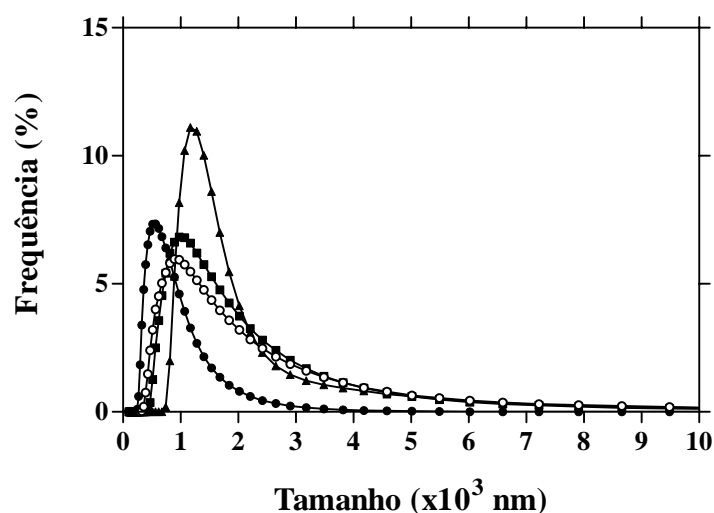


Figura VI-7. Distribuição granulométrica, em número, das nanoesferas obtidas através do método de emulsificação/gelificação interna revestidas apenas com quitosano (—○—) ou revestidas com quitosano e com: pectina (—▲—), caseína (—■—) e albumina (—●—).

Tabela VI-2. Influência do tipo de segundo polímero e/ou proteína de revestimento nas características granulométricas, expressas em número, das nanoesferas de alginato contendo insulina e revestidas com quitosano.

Nanoesferas	D₁₀ (nm)	D₅₀ (nm)	D₉₀ (nm)	Factor SPAN
Revestidas com quitosano	618	1168	2181	1,34
Revestidas com quitosano + pectina	1067	1402	2905	1,31
Revestidas com quitosano + caseína	741	1280	2905	1,69
Revestidas com quitosano + albumina	272	677	1402	1,67

Nota: D₉₀, D₁₀ e D₅₀ são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das nanoesferas de alginato totais.

3.2. Potencial zeta das nanoesferas

A análise do potencial zeta encontra-se descrita na Tabela VI-3. O potencial zeta variou com o segundo revestimento. Neste caso, ocorreu uma inversão do potencial zeta positivo para negativo, tendo sido observada a maior variação do potencial zeta com a caseína.

Tabela VI-3. Variação do potencial zeta das nanoesferas revestidas com quitosano após o segundo revestimento com pectina, caseína e albumina.

Nanoesferas	Potencial zeta (mV)^a
Revestidas com quitosano	+14,55 ± 0,77
Revestidas com quitosano + pectina	-19,90 ± 1,60
Revestidas com quitosano + caseína	-27,45 ± 0,55
Revestidas com quitosano + albumina	-12,00 ± 4,53

^aValor médio ± D.P.

3.3. Eficiência de encapsulação (EE)

A EE de insulina diminuiu significativamente, após o segundo revestimento, em comparação com o valor observado com as nanoesferas revestidas apenas com o quitosano. O efeito mais pronunciado ocorreu com a pectina ($P < 0,0001$), conforme descreve a Tabela VI-4.

Tabela VI-4. EE da insulina em nanoesferas revestidas com quitosano e após o segundo revestimento com pectina, caseína e albumina. Os dados correspondem à média de 3 determinações \pm D.P.. * $P < 0,01$ por comparação com as nanoesferas revestidas apenas com quitosano.

Nanoesferas	EE (%) ^a
Revestidas com quitosano	82,10 \pm 5,91
Revestidas com quitosano + pectina	21,60 \pm 1,34*
Revestidas com quitosano + caseína	41,28 \pm 0,31*
Revestidas com quitosano + albumina	62,75 \pm 1,59*

^aValor médio \pm D.P.

3.4. Estabilidade enzimática na presença da pepsina

A análise por HPLC de uma solução de referência de insulina (Figura VII-8, a), revelou um pico cromatográfico com um tempo de retenção para a insulina próximo de 5 min. Porém, na presença da pepsina, os resultados demonstraram que a solução de insulina não encapsulada foi completamente degradada após incubação enzimática, já que não foi detectada qualquer proteína ao final de 2 h de incubação com a pepsina (Figura VI-8, b). O ensaio de estabilidade enzimática na presença da pepsina foi ainda realizado para as diferentes formulações em estudo. No caso das nanoesferas revestidas com quitosano (Figura VI-8, c) ou revestidas com quitosano e caseína (Figura VI-8, d), ambas as nanoesferas não demonstraram qualquer efeito protector à insulina encapsulada durante a incubação com a pepsina, uma vez que não foi observado qualquer pico cromatográfico correspondente à insulina. Pelo contrário, o revestimento com a albumina ou com a pectina conferiu alguma protecção à insulina

durante a incubação com a pepsina. Neste caso, a percentagem de insulina resistente à pepsina obtida foi de $66,89 \pm 1,20\%$ e de $14,33 \pm 2,15\%$ para as nanoesferas revestidas com quitosano e albumina e com quitosano e pectina, respectivamente. O tempo de retenção para a insulina, em ambas as situações, manteve-se e esteve em concordância com o valor obtido da solução de referência sem incubação prévia com a pepsina. Os cromatogramas obtidos neste ensaio encontram-se representados na Figura VI-8.

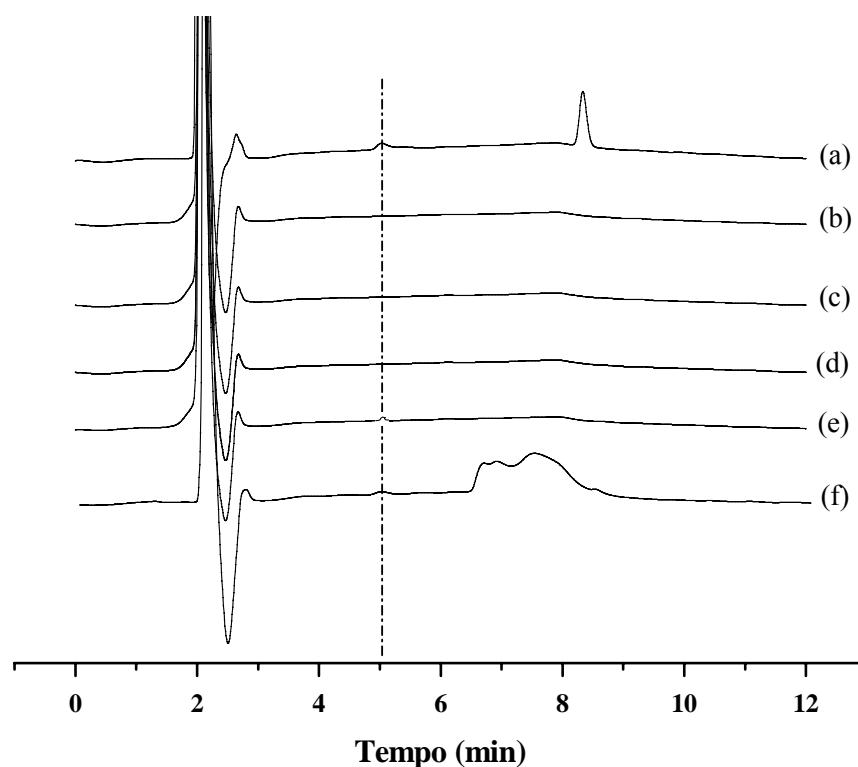


Figura VI-8. Cromatogramas de HPLC: a) solução referência (insulina não encapsulada) dissolvida em tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM mas sem prévia incubação enzimática, b) solução de referência após incubação enzimática, c) insulina libertada a partir das nanoesferas revestidas com quitosano após incubação enzimática, d) insulina libertada a partir das nanoesferas revestidas com quitosano e caseína após incubação enzimática, e) insulina libertada a partir das nanoesferas revestidas com quitosano e pectina após incubação enzimática e, finalmente, f) insulina libertada a partir das nanoesferas revestidas com quitosano e albumina após incubação enzimática. O tempo de retenção para a insulina foi de, aproximadamente, 5 min. A solução de referência apresentou um pico adicional próximo dos 8 min. Este pico corresponde ao conservante: meta-cresol. Porém, este composto é eliminado durante as lavagens das nanoesferas e, por essa razão, não aparece no cromatograma correspondente. O cromatograma f) apresenta ainda uma banda larga correspondente à albumina e esta encontra-se compreendida entre os 6 e 9 min. Esta banda foi igualmente observada com a solução contendo insulina libertada a partir das nanoesferas revestidas com quitosano e albumina mas sem prévia incubação enzimática.

3.5. Efeito terapêutico após administração oral das formulações a ratos diabéticos

Antes da indução da diabetes, os animais pesavam $284,73 \pm 1,29$ g. Após a administração de STZ, o peso reduziu para $276,44 \pm 2,75$ g. Relativamente às glicémias, a variação observada foi mais significativa, sendo o valor inicial de $82,5 \pm 4,15$ mg/dL e, após a indução da diabetes, este aumentou para $484,35 \pm 10,96$ mg/dL.

No caso do controlo positivo, a glicémia começou a diminuir 30 min após a administração s.c. (Figura VI-9), tendo sido observado o seu efeito máximo entre 2^a a 4^a h ($37,57 \pm 3,03$ mg/dL à 4^a h, correspondendo a 10,5% do valor inicial). Pelo contrário, a administração oral da solução de insulina não encapsulada não causou qualquer diminuição na glicémia durante o período de avaliação de 12 h, comparativamente com a mesma solução administrada pela via s.c. ($P < 0,0001$). Os resultados indicaram também que as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano, com e sem insulina, após administração oral não reduziram a glicémia. Além disso, em todas as situações onde foi utilizada a via oral, observou-se um aumento significativo dos níveis de glicémia nos primeiros minutos.

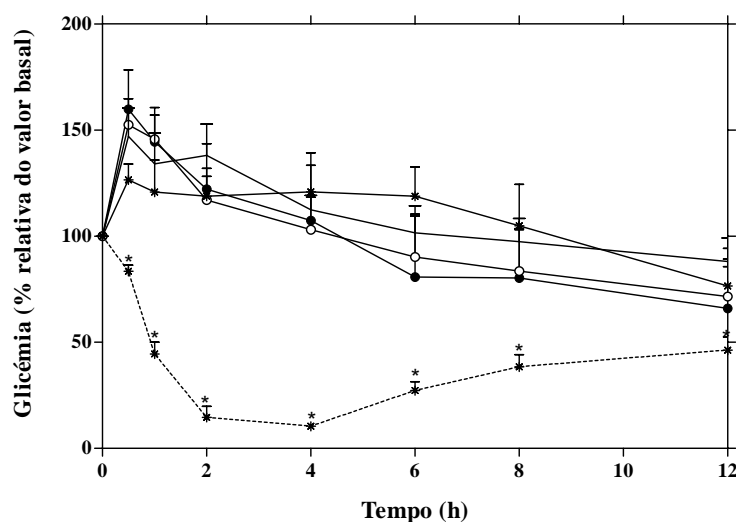


Figura VI-9. Níveis de glicémia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração s.c. (4 UI/kg, --*--*) ou oral (50 UI/kg, —*—) de uma solução de insulina não encapsulada e níveis de glicémia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração oral de: meio de dispersão (água, —○—), nanoesferas vazias revestidas com quitosano (—○—) e nanoesferas revestidas com quitosano contendo insulina a 50 UI/kg (—●—). A dose foi única em todas as situações. Cada valor representa a média \pm D.P.M.. *Diferenças significativas em relação ao grupo de ratos diabéticos administrados com água, sendo $P < 0,01$.

O mesmo aconteceu com as nanoesferas revestidas com quitosano e pectina. Estas nanoesferas contendo insulina não reduziram a glicémia dos ratos diabéticos, à excepção de uma redução ligeira da glicémia observada à 12^a h (Figura VI-10).

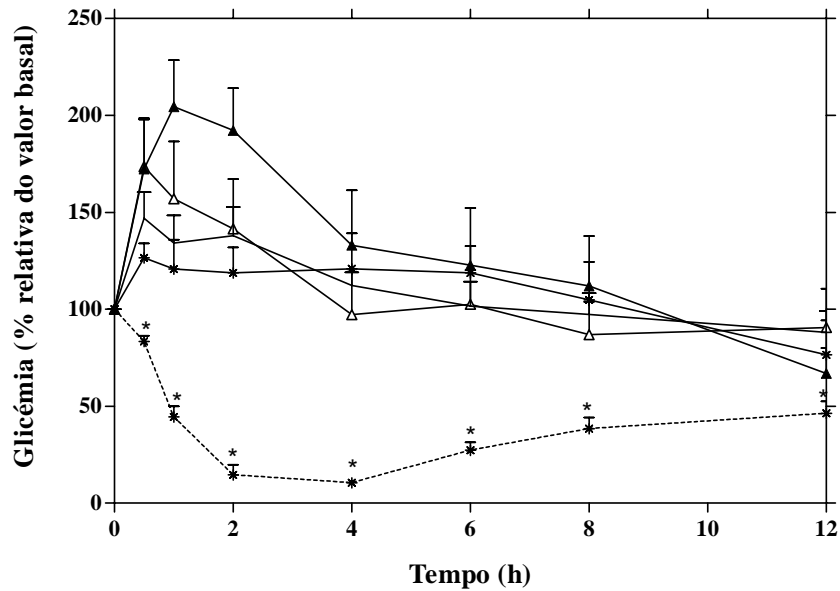


Figura VI-10. Níveis de glicémia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração s.c. (4 UI/kg, -*-) ou oral (50 UI/kg, —*) de uma solução de insulina não encapsulada e níveis de glicémia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração oral de: meio de dispersão (água, —), nanoesferas vazias revestidas com quitosano e pectina (-Δ-) e nanoesferas revestidas com quitosano e pectina contendo insulina a 50 UI/kg (-▲-). A dose foi única em todas as situações. Cada valor representa a média \pm D.P.M.. *Diferenças significativas em relação ao grupo de ratos diabéticos administrados com água, sendo $P < 0,01$.

No caso das nanoesferas revestidas com quitosano e caseína, não se observou qualquer diminuição da glicémia dos ratos diabéticos durante todo o ensaio, tal como aconteceu com as nanoesferas revestidas apenas com quitosano (Figura VI-11).

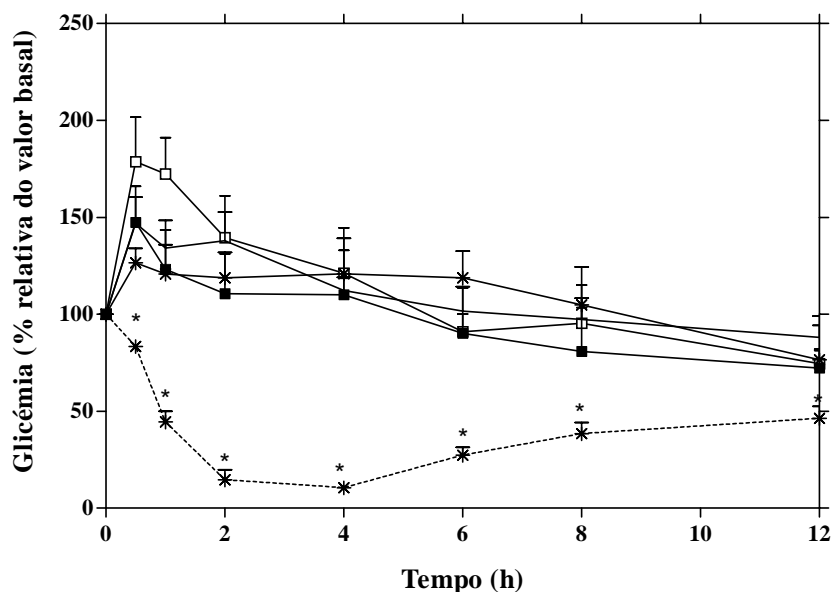


Figura VI-11. Níveis de glicémia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração s.c. (4 UI/kg, --*--) ou oral (50 UI/kg, —*—) de uma solução de insulina não encapsulada e níveis de glicémia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração oral de: meio de dispersão (água, —), nanoesferas vazias revestidas com quitosano e caseína (—□—) e nanoesferas revestidas com quitosano e caseína contendo insulina a 50 UI/kg (—■—). A dose foi única em todas as situações. Cada valor representa a média \pm D.P.M.. *Diferenças significativas em relação ao grupo de ratos diabéticos administrados com água, sendo $P < 0,01$.

Finalmente, as nanoesferas revestidas com quitosano e albumina conduziram a uma redução da glicémia entre a 2^a e 4^ah e mais tarde, entre a 8^a e a 12^a h (Figura VI-12).

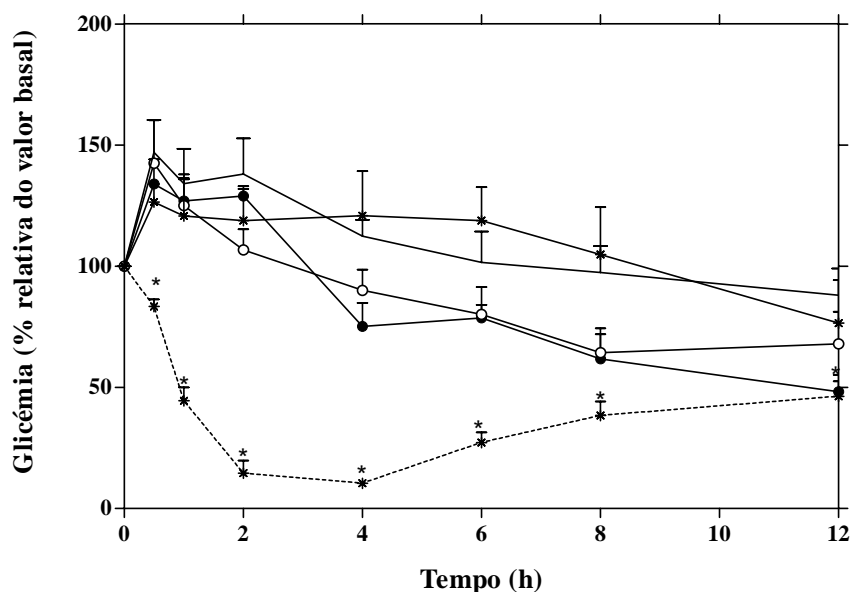


Figura VI-12. Níveis de glicémia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração s.c. (4 UI/kg, -*-) ou oral (50 UI/kg, —*—) de uma solução de insulina não encapsulada e níveis de glicémia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração oral de: meio de dispersão (água, —), nanoesferas vazias revestidas com quitosano e albumina (—○—) e nanoesferas revestidas com quitosano e albumina contendo insulina a 50 UI/kg (—●—). A dose foi única em todas as situações. Cada valor representa a média \pm D.P.M.. *Diferenças significativas em relação ao grupo de ratos diabéticos administrados com água, sendo $P < 0,01$.

Analisando os resultados obtidos, nomeadamente a granulometria, a EE, a percentagem de insulina resistente à pepsina e o seu efeito terapêutico, considerou-se que, entre os três polímeros e/ou proteínas estudados, o revestimento com albumina foi o que apresentou os melhores resultados nos parâmetros anteriores.

Como referido na introdução do presente capítulo, foram adoptadas, numa segunda parte, duas estratégias no sentido de melhorar o efeito terapêutico das nanoesferas após administração oral. Numa primeira fase, procedeu-se à administração oral das nanoesferas revestidas com quitosano e albumina mas no estado hidratado.

Neste último caso, observou-se uma redução da glicémia mais significativa (para 28% *versus* 48% do valor da glicémia basal 12 h após a administração oral), comparativamente com a mesma formulação liofilizada, tal como mostra a Figura VI-13. Pela

primeira vez, o resultado foi estatisticamente significativo em relação ao grupo de animais tratados com o meio de dispersão.

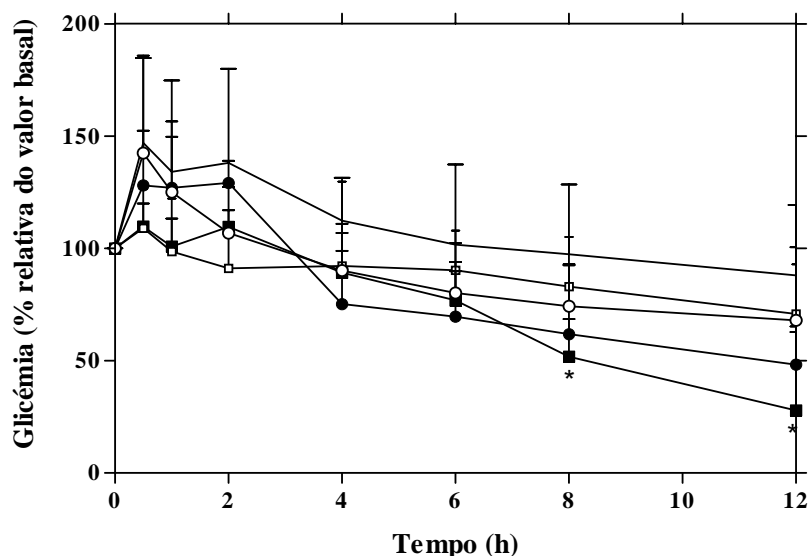


Figura VI-13. Níveis de glicemia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração oral de: meio de dispersão (água, —), nanoesferas vazias revestidas com quitosano e albumina liofilizadas (—○—) e hidratadas (—□—) e, finalmente, nanoesferas contendo insulina revestidas com quitosano e albumina liofilizadas (—●—) e hidratadas (—■—). A dose foi única em todas as situações. Cada valor representa a média \pm D.P.M.. *Diferenças significativas em relação ao grupo de ratos diabéticos administrados com água, sendo $P < 0,05$.

Os restantes parâmetros analisados da formulação hidratada foram semelhantes aos obtidos com a liofilizada, à exceção da granulometria, tendo sido observado um ligeiro aumento do D_{10} para um valor de 392 nm e uma diminuição do factor SPAN para 1,49.

Numa segunda fase, procedeu-se à adição de um adjuvante que, de alguma forma, aumentasse a estabilidade da formulação nos fluidos gastrintestinais, mantendo o estado de hidratação da formulação. O PEG foi o agente escolhido e essa selecção foi baseada em trabalhos anteriores (Prego *et al.*, 2006). A relação PEG/quitosano (m/m) foi baseada no trabalho desenvolvido pelo grupo anterior.

Em termos de resultados *in vivo*, esta formulação obteve um efeito na glicemia semelhante à formulação sem PEG, à exceção das primeiras duas horas após administração oral, onde revelou um efeito ligeiramente superior à formulação hidratada sem PEG, como mostra a Figura VI-14.

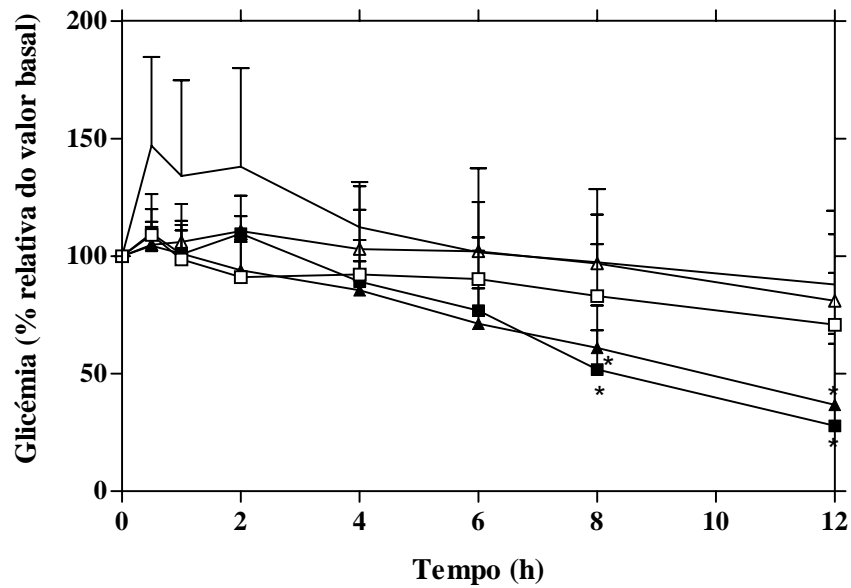


Figura VI-14. Níveis de glicemia dos ratos diabéticos (por grupo $n = 6$) após a administração oral de: meio de dispersão (água, —), nanoesferas vazias revestidas com quitosano e albumina hidratadas sem PEG (—□—) e com PEG (—△—) e, finalmente, nanoesferas contendo insulina, no estado hidratado, e revestidas com quitosano e albumina sem PEG (—■—) e com PEG (—▲—). A dose foi única em todas as situações. Cada valor representa a média \pm D.P.M.. *Diferenças significativas em relação ao grupo de ratos diabéticos administrados com água, sendo $P < 0,05$.

Esta nova formulação apresentou características ligeiramente diferentes da anterior (hidratada e sem PEG). Porém, a caracterização desta formulação será detalhadamente desenvolvida no capítulo seguinte.

4. DISCUSSÃO

Tal como constatado, a actividade proteolítica é um dos maiores obstáculos na administração oral de fármacos peptídicos. Entre as enzimas que degradam os fármacos peptídicos, encontra-se a pepsina. O presente trabalho descreveu algumas estratégias tecnológicas possíveis e que foram adoptadas no sentido de prevenir o ataque proteolítico da pepsina à insulina encapsulada. Essas estratégias consistiram na aplicação de um segundo revestimento à formulação descrita no Capítulo V. Entre muitos polímeros e/ou proteínas susceptíveis de serem utilizados, foram seleccionados, por razões de acessibilidade e resultados enzimáticos preliminares, apenas três: a pectina, a caseína e a albumina. Esta selecção foi baseada nas propriedades físico-químicas de cada um dos compostos, especificamente na resistência às condições acídicas e enzimáticas descrita pela pectina (Wakerly *et al.*, 1996; Fernández-Hervás e Fell, 1998; Sriamornsak, 1998; Liu e Krisham, 1999; Sriamornsak, 2007), na inibição enzimática (Ohtani *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2004; Venkatesan *et al.*, 2005) ou na acção estabilizante por parte da caseína (Morçol *et al.*, 2004) e, finalmente, na acção estabilizante por parte da albumina (Shechter *et al.*, 2005). A estabilidade enzimática da insulina encapsulada nas nanoesferas foi avaliada através da quantificação da insulina não degradada que permaneceu associada às nanoesferas após incubação no fluido gástrico artificial e na presença da enzima.

4.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

Os dados da granulometria das nanoesferas indicaram que o segundo revestimento das nanoesferas de alginato com polímeros e/ou proteínas alterou ligeiramente a granulometria das nanoesferas. Especificamente, foi observado um ligeiro desvio na curva granulométrica com a caseína e a pectina, tendo sido este mais significativo com a pectina. A explicação para este facto poderá basear-se no seu elevado PM (150 > 66 > 25 kDa, para a pectina, albumina e caseína, respectivamente) e na sua estrutura linear polimérica. De facto, a maioria dos açúcares da pectina está interligada por ligações diaxiais, resultando numa estrutura rígida

(Lévy e Edwards-Lévy, 1996). Além disso, é descrito que a mobilidade dos polissacáridos é inferior à das proteínas devido ao raio de giração (Nurdin *et al.*, 2000). No caso das proteínas globulares, este situa-se entre 4,2 a 4,6 nm enquanto o raio de giração dos polissacáridos situa-se entre 6,5 e 8,3 nm (Nurdin *et al.*, 2000). Este aumento da granulometria das nanoesferas observado após o revestimento com a pectina encontra-se em conformidade com trabalhos anteriores (Sriamornsak *et al.*, 2006). Neste estudo desenvolvido por Sriamornsak e colaboradores, o revestimento com a pectina aumentou a granulometria dos *pellets*. Este aumento na granulometria foi proporcional ao aumento de concentração da pectina.

A diferença observada na granulometria das nanoesferas revestidas com as proteínas pode estar relacionada com a própria configuração da proteína de revestimento, uma vez que a estrutura das proteínas envolvidas é diferente, sendo não helicoidal (mais distendida) e helicoidal para a caseína e a albumina, respectivamente (Herskovits e Mescanti, 1995; Horne, 2002). Assim, a estrutura mais distendida da caseína resultaria numa granulometria das nanoesferas superior enquanto a estrutura helicoidal da albumina (Akiyoshi *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 2001) resultaria num maior empacotamento na membrana de revestimento e na matriz polimérica. Existe um estudo (Haque e Kinsella, 1989) que merece particular atenção e corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, particularmente com os resultados da granulometria das nanoesferas após o revestimento com a caseína. Nesse estudo, foram estudadas as propriedades emulsivas de cada uma das proteínas seleccionadas, a caseína e a albumina, e a sua influência em vários parâmetros, tendo sido um deles a granulometria das gotículas da emulsão. Observou-se que as gotículas com a albumina foram consideravelmente mais pequenas, comparativamente com as gotículas da emulsão com a caseína. No caso da caseína, encontram-se ainda descritos outros trabalhos que suportam os dados obtidos no presente trabalho e onde foi observado que é realmente frequente a formação de aglomerados com a caseína e com outros polímeros como, por exemplo, com o quitosano (Ausar *et al.*, 2001b) ou com a goma arábica (Ye *et al.*, 2006). De facto, a caseína assume uma configuração mais desorganizada e distendida em solução (Damodaran, 2003) e geralmente associa-se em micelas. A dimensão deste tipo de estrutura pode situar-se entre 100 (Pan *et al.*, 2006) e 200 nm (Narambuena *et al.*, 2005). No caso da albumina, a dimensão molecular da

proteína é inferior a 200 Å (Gåserød *et al.*, 1999; Kiselev *et al.*, 2001) e comparativamente inferior às micelas da caseína, o que poderá, também, ter sido um factor determinante para a menor granulometria das nanoesferas.

4.2. Potencial zeta das nanoesferas

No trabalho descrito no capítulo anterior observou-se uma inversão do potencial zeta negativo para um potencial zeta positivo após o revestimento das nanoesferas com quitosano. Contudo, no presente trabalho observou-se que, após o segundo revestimento, o potencial zeta das nanoesferas voltou a sofrer uma inversão para valores negativos. Esta inversão de cargas eléctricas reforça a hipótese de ocorrência do segundo revestimento com os diferentes polímeros e/ou proteínas de revestimento.

A amplitude da variação do potencial zeta, após o segundo revestimento, dependeu do pH da solução de revestimento e das características físico-químicas de cada tipo de material aplicado. A maior variação foi observada com a caseína. De facto, o pH da solução de revestimento de caseína foi muito superior ao seu pI (próximo de 4,6 (Pan *et al.*, 2006)). A pH 8, a caseína, como apresenta uma elevada densidade de cargas negativas (Ausar *et al.*, 2001a), o valor do potencial zeta das nanoesferas é muito negativo. Este valor de potencial zeta foi concordante ao observado em estudos anteriores (Ye *et al.*, 2006). No que respeita à pectina e pela mesma justificação, a pH 4,5 a pectina, como apresenta um pK_a inferior a este valor de pH, encontra-se carregada negativamente e, por essa razão, conferiu um valor de potencial zeta negativo às nanoesferas de alginato revestidas com quitosano. Por último, o pH da solução de revestimento de albumina foi mais próximo do seu pI. Por isso, a densidade de cargas negativas seria, com certeza, ligeiramente inferior em relação aos materiais de revestimento anteriores e, por consequência, o potencial zeta foi menos negativo.

4.3. Eficiência de encapsulação (EE)

Nesta fase, observou-se um decréscimo na EE de insulina após o segundo revestimento. A explicação para este facto pode surgir a vários níveis. Por um lado, o facto do período de revestimento das nanoesferas ter sido prolongado (mais 30 min) e sob agitação magnética (100 rpm) pode ter conduzido a uma maior difusão do fármaco encapsulado para a superfície das mesmas ou para o meio circundante e, por conseguinte, ter reduzido a EE de insulina. Por outro lado, tal como descrito no capítulo anterior, o facto de adicionar espécies químicas que interajam com o primeiro polímero de revestimento que se encontra complexado com o polímero da matriz pode, de alguma forma, destabilizar a estrutura da nanoesferas por um mecanismo de competição entre as espécies envolvidas e, consequentemente, ser responsável pela difusão da insulina encapsulada para a superfície e/ou exterior das nanoesferas. Além disso, a explicação para o decréscimo da EE de insulina poderá incidir nas características físico-químicas dos próprios polímeros e/ou proteínas de revestimento como, por exemplo, no tipo de pectina utilizado. No presente trabalho foi utilizada uma pectina LM. Contudo, a pectina pode ser sujeita a uma série de reacções químicas que transformam as cadeias da pectina em cadeias mais pequenas. Contudo, as cadeias mais pequenas da pectina podem resultar numa rede mais instável (Hiorth *et al.*, 2006) e, por consequência, ter sido essa a razão responsável pela maior difusão do fármaco durante o revestimento e, consequente, diminuição da EE. No caso da caseína, a diminuição da EE pode ser também devido à forte interacção que existe entre a caseína e o quitosano (Ausar *et al.*, 2001a; Ausar *et al.*, 2001b). De facto, este tipo de interacção tem-se revelado útil na precipitação da caseína e das gorduras no leite na indústria alimentar, uma vez que o quitosano permite a destabilização das micelas de caseína devido à sua natureza fortemente catiónica. Esta destabilização da caseína pode ser igualmente responsável pelo decréscimo da EE de insulina. Finalmente, a albumina conduziu a valores inferiores, mas relativamente mais próximos das nanoesferas de alginato apenas com quitosano, em comparação com os restantes polímeros e/ou proteínas de revestimento. Essa diminuição parece estar, também, relacionada com as explicações acima citadas, nomeadamente com o tempo de revestimento prolongado e

a competição entre as espécies químicas envolvidas mas, em comparação com a pectina e a caseína, a diminuição da EE com o revestimento das nanoesferas com albumina poderá estar relacionada com a menor granulometria das mesmas.

Além disso, foram realizados outros estudos com estas nanoesferas, mais especificamente, o estudo do perfil de libertação *in vitro* da insulina após o segundo revestimento. Em todos os casos, observaram-se alterações no perfil de libertação *in vitro* da insulina em relação às nanoesferas revestidas apenas com quitosano, independentemente do tipo de polímero e/ou proteína do segundo revestimento aplicado. A menor alteração do perfil de libertação da insulina foi observada com o revestimento com a albumina, provavelmente devido à mesma explicação descrita para a maior EE. Neste caso, observou-se apenas que a percentagem de insulina libertada a pH 1,2 aumentou de zero para as nanoesferas revestidas apenas com quitosano para um valor inferior a 25% para as nanoesferas revestidas com quitosano e albumina. Pelo contrário, a pH 6,8 não foram observadas diferenças no perfil de libertação da insulina após o segundo revestimento com a albumina.

4.4. Estabilidade enzimática na presença de pepsina

A insulina não encapsulada demonstrou uma elevada sensibilidade à acção da pepsina, uma vez que não foi detectado qualquer pico cromatográfico correspondente ao fármaco. Isto significa dizer que, por si só, a insulina foi incapaz de resistir à acção proteolítica da pepsina, sendo por isso crucial a adopção de um veículo protector para esse efeito. Os resultados obtidos no presente trabalho foram concordantes com resultados obtidos em trabalhos anteriores (Kim e Peppas, 2003).

O veículo que, supostamente, iria actuar como protector seria o alginato, isto porque, em estudos similares (Strugala *et al.*, 2005) foi observado que soluções de alginato apresentaram propriedades inibidoras da actividade pepsínica. No presente trabalho, tal facto não foi observado. É possível que essa propriedade inibidora da actividade pepsínica esteja associada não só estado físico do alginato (em solução e não às nanoesferas de alginato), mas também ao tipo de alginato utilizado. Por outro lado, os resultados obtidos indicaram que

mesmo após o revestimento das nanoesferas de alginato com quitosano, estas foram incapazes de impedir o ataque proteolítico. Todavia, estes resultados não foram concordantes com alguns estudos já realizados (Anal *et al.*, 2003; Strugala *et al.*, 2005). Esta falta de protecção pode ser explicada a dois níveis: por um lado, o facto do quitosano apresentar carga eléctrica positiva poderia promover a adsorção da proteína, pepsina, uma vez que o seu pI é próximo de 1 e, por outro lado, esta falta de protecção pode estar relacionada com a porosidade da matriz polimérica e da membrana de revestimento. Sabe-se que a matriz de alginato (Quong e Neufeld, 1998) e a membrana de quitosano são porosas (Onal e Zihnioglu, 2002). No entanto, seria de esperar uma redução da porosidade do alginato após o revestimento com quitosano. O quitosano apresenta uma estrutura rígida através de ligações de hidrogénio inter e intramolecular mas, em solução, o quitosano adopta uma conformação distendida com as cadeias poliméricas mais flexíveis devido à repulsão electrostática entre as cadeias poliméricas (Gan *et al.*, 2005). Além disso, um estudo desenvolvido por Gåserød e colaboradores avaliou o tamanho do poro de macroesferas de alginato revestidas com quitosano em multicamadas (Gåserød *et al.*, 1999) e o valor obtido foi de 9 nm. Este valor do tamanho do poro não é fixo, mas, assumindo que a pepsina tem um raio hidrodinâmico de 2,74 nm, facilmente se explicaria a incapacidade de impedimento da difusão da pepsina para o interior das nanoesferas de alginato revestidas com quitosano. Por outro lado, o peso molecular de corte ou *MWCO*, do inglês *molecular weight cut-off*, de macroesferas de alginato e quitosano foi igualmente avaliado em outros estudos, tendo sido encontrado o valor de 200 kDa (McKight *et al.*, 1988). Sendo o PM da pepsina 35 kDa seria, então, de esperar que esta se difundisse nas nanoesferas. Por último, e para além das características do alginato e do quitosano, a própria tecnologia envolvida no presente trabalho pode ter tido alguma influência na porosidade da matriz de alginato, uma vez que o método de emulsificação/gelificação interna está geralmente associado a partículas com uma estrutura mais porosa (Vandenberg e Nouè, 2001).

Porém, a mesma incapacidade de impedimento da difusão da pepsina para o interior das nanoesferas foi observada após o revestimento das nanoesferas de alginato com quitosano e caseína. Surgem duas explicações para esta observação: a primeira, relaciona-se com a

digestão rápida da caseína pela pepsina seguida da difusão da pepsina para o interior da nanoesfera, e a segunda, relaciona-se com a não alteração da permeabilidade das nanoesferas após o revestimento com caseína. Relativamente à primeira explicação, existem dados bibliográficos (Advanced Enzyme Technologies, 2006) que indicam que a própria pepsina possui uma forte actividade caseinolítica e, por isso mesmo, se explica a ausência de efeito protector da caseína no presente trabalho. Este resultado contraria alguns trabalhos anteriores (Latha *et al.*, 2000; Ohtani *et al.*, 2003; Venkatesan *et al.*, 2005), onde foi descrito que a caseína apresenta as propriedades inibidoras das enzimas proteolíticas. Mais especificamente, num desses estudos, que envolveu a produção de microesferas de caseína contendo progesterona, foi demonstrado que estes veículos poliméricos foram capazes de reter/proteger o fármaco encapsulado após 4 dias de incubação na presença de proteases (Latha *et al.*, 2000). Um outro estudo com outro tipo de formulação, desta vez envolvendo a formação de micelas de fosfato de cálcio, PEG e caseína e insulina, também demonstrou um efeito na redução da glicémia após administração oral a ratos diabéticos (Morçol *et al.*, 2004). Neste último estudo, o valor de glicémia, em jejum, diminuiu para 80% na primeira hora após administração oral. O mecanismo proposto no estudo desenvolvido por Morçol e colaboradores para a resistência proteolítica da insulina baseou-se na agregação da caseína a pH ácido e, conseqüente protecção da insulina encapsulada relativamente às enzimas gástricas (Morçol *et al.*, 2004). As diferenças dos trabalhos anteriores e os resultados obtidos no presente trabalho poderão ser atribuídas às diferentes metodologias e aos materiais envolvidos. Para além disso, no presente trabalho, a caseína encontrava-se supostamente complexada com o quitosano, como aconteceu em outros trabalhos (Ausar *et al.*, 2001a; Ausar *et al.*, 2001b) e, talvez seria essa a explicação para a ausência do seu efeito protector em relação à pepsina. De facto, essa interacção electrostática poderia ter conduzido à precipitação da caseína e alteração das propriedades inibidoras da caseína para as enzimas gástricas, mas poderia ter também conduzido, inclusivamente, a um aumento de permeabilidade da matriz de alginato e, por essa razão, a percentagem de insulina resistente à pepsina ter sido nula.

No caso da pectina, a protecção da insulina à acção pepsínica foi relativamente baixa, provavelmente devido à competição entre as espécies químicas envolvidas. Tal como

constatado, a EE de insulina para as nanoesferas revestidas com quitosano e pectina também foi baixa. De facto, seria de esperar uma maior resistência à enzima após o revestimento com a pectina, até porque, certos trabalhos precedentes, que envolveram macroesferas constituídas por pectina e quitosano, consideraram os dois polímeros como excelentes veículos protectores para fármacos peptídicos (Fernández-Hervás e Fell, 1998; Macleod *et al.*, 1999). A falta de protecção a nível gástrico observada no presente trabalho poderá estar relacionada com as diferentes metodologias e os materiais utilizados mas também relacionada com a complexidade do sistema polimérico em causa.

Pelo contrário, a albumina permitiu uma protecção considerável da insulina encapsulada à acção proteolítica da pepsina. O mecanismo de resistência enzimática ainda não se encontra esclarecido, mas pensa-se que, de alguma forma, a albumina poderia ter actuado como “alvo enzimático” para a pepsina. Pela hipótese sugerida, a pepsina “ocupar-se-ia”, temporariamente, com a albumina, durante o tempo de incubação gástrica, deixando livres a insulina e o núcleo polimérico. Este mecanismo de substituição química, entre a insulina e albumina, foi baseado em trabalhos anteriores (Landry *et al.*, 1996b). Neste estudo desenvolvido por Landry e colaboradores, nanopartículas de PLA foram revestidas com albumina. A albumina foi degradada ao final de 12 min e 60 min nos fluidos gástricos artificiais e fluidos intestinais artificiais, respectivamente. Contudo, o núcleo polimérico de PLA manteve-se intacto e estável durante a incubação nos fluidos gástricos. Para além deste estudo, foi igualmente descrito na literatura que a albumina possui um efeito estabilizante importante para a viabilidade de células microencapsuladas (Schneider *et al.*, 2003). No estudo desenvolvido por Schneider e colaboradores (Schneider *et al.*, 2003), foi observado um aumento da secreção da insulina em células pancreáticas encapsuladas durante um período de incubação de 3 semanas. O mecanismo de acção estabilizadora da albumina relacionou-se com a supressão do intumescimento das microcápsulas de alginato. Além disso, a albumina é uma proteína que apresenta um tempo de semi-vida plasmática elevado e é muito estável *in vivo* (Schechter *et al.*, 2005). Essa estabilidade pode ser mais uma justificação para as diferenças observadas na glicémia dos ratos diabéticos com as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e caseína. Para além disso, a granulometria das nanoesferas de

alginato revestidas com quitosano e albumina foi menor à granulometria das nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e caseína. A diferença com a pectina parece estar relacionada com a granulometria produzida, entre outros factores. Num estudo que envolveu a preparação de macroesferas de alginato foram aplicados diferentes polímeros de revestimento, entre eles, a pectina e a albumina (Lévy e Edwards-Lévy, 1996). Foi demonstrado que a membrana de albumina era de consistência sólida, contrariamente à consistência mais frágil obtida com a membrana de pectina. Além disso, as macroesferas revestidas com albumina revelaram maior resistência às proteases, especialmente com a pepsina. O mecanismo sugerido envolveu a ligação das proteínas a polissacáridos e o aumento da resistência ao ataque proteolítico (Lévy e Edwards-Lévy, 1996).

4.5. Efeito terapêutico após administração oral das formulações a ratos diabéticos

No sentido de verificar a protecção enzimática *in vivo* por parte das nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e com os três diferentes materiais de revestimento, procedeu-se à administração oral de cada uma das formulações a ratos diabéticos.

Observou-se que em todas as situações onde foi realizada a administração oral com a sonda endogástrica foi observado um aumento da glicémia nos primeiros minutos após a administração. Este aumento está associado ao tipo de administração e não ao tipo de tratamento, uma vez que a administração oral com a sonda endogástrica causa algum *stress* ao animal em estudo.

Os resultados *in vivo* confirmaram os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*. A ineficácia na redução da glicémia dos ratos diabéticos da insulina encapsulada em nanoesferas de alginato revestidas com quitosano ou em nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e caseína pode ter estado associada à incapacidade das nanoesferas em proteger a insulina do ataque proteolítico por parte da pepsina. No caso da caseína, existe uma particularidade interessante associada a esta proteína. É descrito que a caseína, quando absorvida a nível intestinal, pode estimular a secreção das enzimas digestivas pancreáticas (Lefebvre *et al.*,

2006). A ser assim, mesmo que a insulina, eventualmente, tivesse transposto a barreira gástrica, chegada ao intestino seria mais facilmente degradada pelas enzimas intestinais.

Relativamente ao efeito na glicémia das nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e pectina, este foi muito ligeiro e apenas observável 12 h após administração oral. A acção hipoglicémica tardia das nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e pectina foi concordante com as propriedades físico-químicas da pectina, isto porque, na literatura, é descrito que a pectina é insolúvel no estômago e no intestino delgado, sendo apenas degradada pelas bactérias colónicas (Sriamornsak, 1998; Sriamornsak e Nunthanid, 1998; Musabayane *et al.*, 2000; Hiorth *et al.*, 2006). O efeito tardio na glicémia dos ratos diabéticos pode, realmente, coincidir com a chegada da formulação ao colón.

Por último, as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e albumina demonstraram uma redução da glicémia entre a 2^a e 4^a h. Os resultados dos ensaios *in vivo* confirmaram os resultados dos ensaios *in vitro* da estabilidade enzimática. A albumina conseguiu proteger a insulina encapsulada da acção proteolítica da pepsina e, por este facto, foi seleccionada para estudos subsequentes.

Existe, contudo, um dado que seria importante esclarecer: de uma forma geral, as nanoesferas vazias demonstraram um ligeiro efeito hipoglicémico, em todas as situações. Este facto poderá estar relacionado com as propriedades hipocolesterolémicas e hipoglicémicas de muitos polissacáridos solúveis (Burting, 2003) como, por exemplo, do quitosano (Hasegawa *et al.*, 2001) e da pectina (Sriamornsak, 2007) mas, também de proteínas, como, por exemplo, da caseína (Lefebvre *et al.*, 2006).

A etapa seguinte do presente trabalho consistiu na administração oral a ratos diabéticos da mesma formulação, isto é, nanoesferas revestidas com quitosano e albumina, mas no estado hidratado. Observou-se um efeito na redução da glicémia ligeiramente superior (cerca de 20%), provavelmente devido ao estado físico da formulação. Geralmente, as formulações hidratadas apresentam uma maior facilidade de dissolução nos fluidos fisiológicos (Prista *et al.*, 1995). Consequentemente, o tempo de dissolução da formulação hidratada será relativamente menor em comparação à mesma formulação liofilizada. Por sua vez, é descrito que a eficácia dos princípios activos será tanto maior, quanto mais rapidamente

eles atingirem o local de actuação e mais tempo aí se mantiverem numa concentração determinada e constante (Prista *et al.*, 1995). Por isso, se explica o maior efeito terapêutico observado no presente trabalho com a formulação hidratada.

Numa segunda fase, foi adoptada uma estratégia adicional, no sentido de aumentar a estabilidade da insulina durante a incubação gástrica. O agente estabilizante seleccionado foi o PEG por três diferentes razões. Por um lado, a modificação do quitosano com o PEG demonstrou em trabalhos anteriores um aumento na biocompatibilidade do quitosano (Prego *et al.*, 2006). Em segundo lugar, o revestimento com PEG em nanopartículas conduziu a um aumento da estabilidade nos fluidos biológicos e, como consequência, facilitou o transporte de macromoléculas bioactivas através dos epitélios intestinal e nasal (Morçol *et al.*, 2004; Prego *et al.*, 2006). Finalmente, o PEG demonstrou, em trabalhos anteriores, propriedades mucoadesivas e promotoras de absorção, promovendo a interacção das nanopartículas com a mucosa intestinal (Tobío *et al.*, 2000; Serra *et al.*, 2006).

De facto, na formulação com PEG, observou-se um efeito precoce na redução da glicémia após administração oral a ratos diabéticos. O mecanismo proposto para o presente trabalho baseia-se na formação de uma rede polimérica mais estável na presença das proteases. Este mecanismo foi baseado em resultados obtidos em trabalhos anteriores (Iwanaga *et al.*, 1997; Tobío *et al.*, 2000; Calceti *et al.*, 2004; Vila *et al.*, 2004b; Yoncheva *et al.*, 2005). Porém, o uso de revestimentos com polímeros hidrofílicos, como o PEG, levanta algumas questões, uma vez que a sua aplicação contraria algumas teorias descritas na literatura. Na teoria clássica é descrito que a natureza hidrofóbica das partículas é considerado um factor crucial para a administração mucosal (Vila *et al.*, 2004a). No entanto, o revestimento das nanopartículas com o PEG, um polímero de natureza hidrofílica, tem vindo a ocupar um lugar de grande destaque na administração mucosal (Brigger *et al.*, 2001; Morçol *et al.*, 2004; Vila *et al.*, 2004a) e, a contrariar as teorias clássicas, tendo-se revelado cada vez mais importante na área da micro e nanoencapsulação.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi abordada a problemática da barreira enzimática a nível gástrico, particularmente a acção proteolítica da pepsina sobre a insulina encapsulada. Foram estudados diferentes polímeros e/ou proteínas, como segundo material de revestimento, com o objectivo de transpor essa mesma barreira.

A granulometria das nanoesferas sofreu alterações após o segundo revestimento, principalmente, com a pectina e caseína. Pelo contrário, a aplicação de um revestimento com albumina conduziu a uma diminuição do tamanho das nanoesferas, possivelmente devido a um maior empacotamento da proteína na membrana de revestimento e na matriz polimérica.

Em termos da EE de insulina, este valor foi reduzido após o segundo revestimento, provavelmente devido a uma maior difusão da insulina para a superfície das nanoesferas e/ou meio circundante, provocada por um prolongamento do tempo de agitação magnética durante o revestimento e, também, por uma possível competição entre as diferentes espécies químicas envolvidas.

O presente trabalho demonstrou, ainda, que as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano, embora tenham sido capazes de controlar a libertação da insulina, como descrito no trabalho do Capítulo V, não foram capazes de inibir a degradação proteolítica da insulina nas nanoesferas. A ineficácia de protecção enzimática das nanoesferas, preparadas pelo método de emulsificação/gelificação interna e revestidas com quitosano, pode estar associada à própria metodologia utilizada e às características intrínsecas de cada um dos polímeros. Esta sensibilidade enzimática da insulina à pepsina também ocorreu após o revestimento com a caseína. Pelo contrário, a resistência proteolítica da insulina encapsulada aumentou após a aplicação da pectina mas, principalmente, com a da albumina. Os valores de insulina resistente à pepsina foram de $14,30 \pm 2,15$ % e $66,89 \pm 1,20$ % para a pectina e albumina, respectivamente.

Os resultados da estabilidade enzimática *in vitro* foram confirmados nos ensaios *in vivo*. As nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e caseína foram administradas pela via oral a ratos diabéticos e

revelaram-se ineficazes na redução da glicémia. Pelo contrário, as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e pectina conduziram a uma redução da glicémia 12 h após a administração oral. Este resultado está, de algum modo, em conformidade com as características físico-químicas da pectina descritas na literatura. Já as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e albumina, estas conduziram a uma redução da glicémia mas, neste caso, relativamente superior ao observado com a pectina. O mecanismo proposto baseia-se numa substituição do “alvo enzimático” da pepsina. Julga-se que, durante o tempo de incubação no fluido gástrico artificial, a pepsina degrada maioritariamente a albumina, deixando livre insulina encapsulada e o núcleo polimérico. Este efeito foi ainda mais significativo, após administração oral da mesma formulação, mas no estado hidratado e na presença de PEG.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABOUBAKAR, M. (1999) Physico-chemical characterization of insulin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization. **Int. J. Pharm.** 183, 63-66.
- ABOUBAKAR, M., COUVREUR, P., PINTO-ALPHANDARY, H., GOURITIN, B., LACOUR, B., FARINOTTI, R., PUISIEUX, F. e VAUTHIER, C. (2000) Insulin-loaded nanocapsules for oral administration: *in vitro* and *in vivo* investigation. **Drug Dev. Res.** 49, 109-117.
- ADVANCED ENZYME TECHNOLOGIES (2006) www.enzymeindia.com/enzymes/pepsin.asp, consultado em 10/12/2006.
- AKIYOSHI, K., NISHIKAWA, T., MITSUI, Y., MIYATA, T., KODAMA, M. e SUNAMOTO, J. (1996) Self-assembly of polymer amphiphiles: thermodynamics of complexation between bovine serum albumin and self-aggregate of cholesterol-bearing pullulan. **Coll. Surf. A: Physic. Eng. Asp.** 112, 91-95.
- ALFACE, J. I. S. (1997) Proteínas do plasma. In: Halpern, M. J. (ed.) **Bioquímica**. Lidel-Edições Técnicas, Limitada, Lisboa, p. 127-131.
- ANAL, A. K., BHOPATKAR, D., TOKURA, S., TAMURA, H. e STEVENS, W. F. (2003) Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 29, 713-724.
- ARNEDO, A., ESPUELAS, S. e IRACHE, J. M. (2002) Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. **Int. J. Pharm.** 244, 59-72.
- ARSHADY, R. (1990) Albumin microspheres and microcapsules: methodology of manufacturing techniques. **J. Control. Rel.** 14, 111-131.
- ASHFORD, M., FELL, J., ATTWOOD, D., SHARMA, H. e WOODHEAD, P. (1994) Studies on pectin formulations for colonic drug delivery. **J. Control. Rel.** 30, 225-232.
- AUSAR, S. F., BIANCO, I. D., BADINI, R. G., CASTAGNA, L. F., MODESTI, N. M., LANDA, C. A. e BELTRAMO, D. M. (2001a) Characterization of casein micelle precipitation by chitosans. **J. Dairy Sci.** 84, 361-369.

- AUSAR, S. F., LANDA, C. A., BIANCO, I. D., CASTAGNA, L. F. e BELTRAMO, D. M. (2001b) Hydrolysis of a chitosan-induced milk aggregate by pepsin, trypsin and pancreatic lipase. **Biosci. Biotech. Biochem.** 65, 2412-2418.
- AYDIN, Z. e AKBUGA, J. (1996) Preparation and evaluation of pectin beads. **Int. J. Pharm.** 137, 133-136.
- BAJPAI, S. K. (1999) Casein cross-linked polyacrylamide hydrogels: study of swelling and drug release behaviour. **Iran. Polym. J.** 8, 231-239.
- BARAN, E. T., OZER, N. e HASIRCI, V. (2002) Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an *in vitro* study. **J. Microencapsul.** 19, 363-376.
- BOUSQUET, Y., SWART, P. J., SCHMITT-COLIN, N., VELGE-ROUSSEL, F., KUIPERS, M. E., MEIJER, D. K. F., BRU, N., HOEBEKE, J. e BRETON, P. (1999) Molecular mechanism of adsorption of a model protein (human serum albumin) on poly(methylidene malonate 2.1.2) nanoparticles. **Pharm. Res.** 16, 141-147.
- BRACCINI, I. e PEREZ, S. (2001) Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules** 2, 1089-1096.
- BRANGE, J., LANGKJAER, L., HAVELUND, S. e VOLUND, A. (1992) Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations. **Pharm. Res.** 9, 715-726.
- BRIGGER, I., CHAMINADE, P., MARSAUD, V., APPEL, M., BESNARD, M., GURNY, R., RENOIR, M. e COUVREUR, P. (2001) Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. **Int. J. Pharm.** 214, 37-42.
- BURTING, P. (2003) Nutritional value of seaweeds. **EJEAFChe** 2, 498-503.
- CALCETI, P., SALMASO, S., WALKER, G. e BERNKOP-SCHNÜRCH, A. (2004) Development and *in vivo* evaluation of an oral insulin-PEG delivery system. **Eur. J. Pharm. Sci.** 22, 315-323.
- CARINO, G. P., JACOB, J. S. e MATHIOWITZ, E. (2000) Nanosphere based oral insulin delivery. **J. Control. Rel.** 65, 261-269.

- CHANDY, T., MOORADIAN, D. L. e RAO, G. H. (1999) Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation. **Artif. Org.** 23, 894-903.
- CHANG, K. L. B. e LIN, J. (2000) Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. **Carbohydr. Polym.** 43, 163-169.
- CHENG, K. e LIM, L.-Y. (2004) Insulin-loaded calcium pectinate nanoparticles: effects of pectin molecular weight and formulation pH. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 30, 359-367.
- CHUANG, V. T. G., KRAGH-HANSEN, U. e OTAGIRI, M. (2002) Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. **Pharm. Res.** 19, 569-578.
- COPPI, G., IANNUCELLI, V., LEO, E., BERNABEI, M. T. e CAMERONI, R. (2001) Chitosan-alginate microparticles as a protein carrier. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 27, 393-400.
- COURNARIE, F., AUCHERE, D., CHEVENNE, D., LACOUR, B., SEILLER, M. e VAUTHIER, C. (2002) Absorption and efficiency of insulin after oral administration of insulin-loaded nanocapsules in diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 242, 325-328.
- COUVREUR, P., LENAERTS, V., KANTE, B., ROLAND, M. e SPEISER, P. P. (1980) Oral and parenteral administration of insulin associated to hydrolysable nanoparticles. **Acta Pharm. Technol.** 26, 220-222.
- CROTTS, G. e PARK, T. G. (1997) Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. **J. Control. Rel.** 44, 123-134.
- CUI, F., SHI, K., ZHANG, L., TAO, A. e KAWASHIMA, Y. (2006a) Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation. **J. Control. Rel.** 114, 242-250.
- CUI, F., ZHANG, L., ZHENG, J. e KAWASHIMA, Y. (2004) A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. **J. Drug Del. Sci. Tech.** 14, 435-439.
- CUI, F.-D., TAO, A.-J., CUN, D.-M., ZHANG, L.-Q. e SHI, K. (2006b) Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. **J. Pharm. Sci.** 96, 421-427.
- DAMGÉ, C., MAINCENT, P. e UBRICH, N. (2007) Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **J. Control. Rel.** 117, 163-170.

- DAMGÉ, C., MICHEL, C., APRAHAMIAN, M. e COUVREUR, P. (1988) New approach for oral administration of insulin with poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules as drug carrier. **Diabetes** 37, 246-251.
- DAMGÉ, C., MICHEL, C., APRAHAMIAN, M., COUVREUR, P. e DEVISSAGUET, J.-P. (1990) Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. **J. Control. Rel.** 13, 233-239.
- DAMGÉ, C., VRANCKX, H., BALSCHMIDT, P. e COUVREUR, P. (1997) Poly(alkylcyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. **J. Pharm. Sci.** 86, 1403-1409.
- DAMODARAN, S. (2003) *In situ* measurement of conformational changes in proteins at liquid interfaces by circular dichroism spectroscopy. **Anal. Bioanal. Chem.** 376, 182-188.
- EDWARDS-LÉVY, F. e LÉVY, M. C. (1999) Serum albumin-alginate coated beads: mechanical properties and stability. **Biomaterials** 20, 2069-2084.
- FERNÁNDEZ-HERVÁS, M. J. e FELL, J. T. (1998) Pectin/chitosan mixtures as coatings for colon-specific drug delivery: an *in vitro* evaluation. **Int. J. Pharm.** 169, 115-119.
- FERRER, M. L., DUCHOWICZ, R., CARRASCO, B., TORRE, J. G. e ACUNA, A. U. (2001) The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. **Biophys. J.** 80, 2422-2430.
- FRUTON, J. S., FUJII, S. e KNAPPENBERGER, M. H. (1961) The mechanism of pepsin action. **Biochem.** 47, 759-761.
- GAN, Q., WANG, T., COCHRANE, C. e MCCARRON, P. (2005) Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Coll. Surf. B: Biointerf.** 44, 65-73.
- GÅSERØD, O., SANNES, A. e SKJÅK-BRÆK, G. (1999) Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. **Biomaterials** 20, 773-783.
- GEORGE, M. e ABRAHAM, T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. **J. Control. Rel.** 114, 1-14.
- GUPTA, B. K. e HUNG, C. T. (1989) Albumin microspheres. II. Applications in drug delivery. **J. Microencapsul.** 6, 463-472.
- GUPTA, B. K., HUNG, C. T. e PERRIER, D. G. (1986) Albumin microspheres. II. Effect of stabilization temperature on the release of adriamycin. **Int. J. Pharm.** 33, 137-146.

- HAN, Y., LI, S., WANG, X., CAO, X., JIA, L. e LI, J. (2005) Preparation and characterization of calcium phosphate-albumin colloidal particles by high ultrasonic irradiation. **Coll. Polym. Sci.** 284, 203-207.
- HAQUE, Z. e KINSELLA, J. E. (1989) Relative emulsifying activity of bovine serum albumin and casein as assessed by three different methods. **J. Food Sci.** 54, 1341-1344.
- HASEGAWA, M., K.YAGI, IWAKAWA, S. e HIRAI, M. (2001) Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumour cells. **Jpn. J. Cancer Res.** 92, 459-466.
- HERSKOVITS, T. T. e MESCANTI, L. (1995) Conformation of peptides and polypeptides. **J. Biol. Chem.** 240, 639-644.
- HIORTH, M., VERSLAND, T., HEIKKILA, J., THO, I. e SANDE, S. A. (2006) Immersion coating of pellets with calcium pectinate and chitosan. **Int. J. Pharm.** 308, 25-32.
- HORNE, D. S. (2002) Casein structure, self-assembly and gelation. **Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.** 7, 456-461.
- HURTEAUX, R., EDWARDS-LÉVY, F., LAURENT-MAQUIN, D. e LÉVY, M.-C. (2005) Coating alginate microspheres with a serum albumin-alginate membrane: application to the encapsulation of a peptide. **Eur. J. Pharm. Sci.** 24, 187-197.
- ITOH, K., KUBO, W., FUJIWARA, M., HIRAYAMA, T., MIYAZAKI, S., DAIRAKU, M., TOGASHI, M., MIKAMI, R. e ATTWOOD, D. (2006) The influence of variation of gastric pH on the gelation and release characteristics of in situ gelling pectin formulations. **Int. J. Pharm.** 312, 37-42.
- IWANAGA, K., ONO, S., NARIOKA, K., MORIMOTO, K., KAKEMI, M., YAMASHITA, S., NANGO, M. e OKU, N. (1997) Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: improvement of stability of insulin in GI tract. **Int. J. Pharm.** 157, 73-80.
- JOSEPH, I. e VENKATARAM, S. (1995) Indomethacin sustained release from alginate-gelatin or pectin-gelatin coacervates. **Int. J. Pharm.** 126, 161-168.
- JOSHI, H. M., BHUMKAR, D. R., JOSHI, K., POKHARKAR, V. e SASTRY, M. (2006) Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. **Langmuir** 22, 300-305.

- KANG, F. e SINGH, J. (2003) Conformational stability of a model protein (bovine serum albumin) during primary emulsification process of PLGA microspheres synthesis. **Int. J. Pharm.** 260, 149-156.
- KIM, B. e PEPPAS, N. A. (2003) *In vitro* release behavior and stability of insulin in complexation hydrogels as oral drug delivery carriers. **Int. J. Pharm.** 266, 29-37.
- KIM, T. H., PARK, Y. H., KIM, J. K. e CHO, S. C. (2003) Release of albumin from chitosan-coated pectin beads *in vitro*. **Int. J. Pharm.** 250, 371-383.
- KISELEV, M. A., GRYZUNOV, I. A., DOBRETSOV, G. E. e KOMAROVA, M. N. (2001) Size of a human serum albumin molecule in solution. **Biofizika** 46, 423-427.
- LAMEIRO, M. H., LOPES, A., MARTINS, L. O., ALVES, P. M. e MELO, E. (2006) Incorporation of a model protein into chitosan-bile salt microparticles. **Int. J. Pharm.** 312, 119-130.
- LANDRY, F. B., BAZILE, D. V., SPENLEHAUER, G., VEILLARD, M. e KREUTER, A. J. (1996a) Degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin model digestive fluids (USP XXII). **Biomaterials** 17, 715-723.
- LANDRY, F. B., BAZILE, D. V., SPENLEHAUER, G., VEILLARD, M. e KREUTER, J. (1996b) Influence of coating agents on the degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles in model digestive fluids (USP XXII). **S.T.P. Pharma Sci.** 6, 195-202.
- LANDRY, F. B., BAZILE, D. V., SPENLEHAUER, G., VEILLARD, M. e KREUTER, J. (1997) Release of fluorescent marker Prodan from poly(D, L- lactic acid)nanoparticles coated with albumin or polyvinyl alcohol in model digestive fluids (USP XXII). **J. Control. Rel.** 44, 227-236.
- LANGER, K., BALTHASAR, S., VOGEL, V., DINAUER, N., VON BRIESEN, H. e SCHUBERT, D. (2003) Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 257, 169-180.
- LATHA, M. S., LAL, A. V., KUMARY, T. V., SREEKUMAR, R. e JAYAKRISHNAN, A. (2000) Progesterone release from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres: *in vitro* studies and *in vivo* response in rabbits. **Contraception** 61, 329-334.
- LEFEBVRE, D. E., POWELL, K. L., STROM, A. e SCOTT, F. W. (2006) Dietary proteins as environmental modifiers of type 1 diabetes *mellitus*. **Ann. Rev. Nutr.** 26, 175-202.

- LEMOINE, D., WAUTERS, F., BOUCHEND'HOMME, S. e PRÉAT, V. (1998) Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen. **Int. J. Pharm.** 176, 9-19.
- LÉVY, M. C. e EDWARDS-LÉVY, F. (1996) Coating alginate beads with cross-linked biopolymers: a novel method based on a transacylation reaction. **J. Microencapsul.** 13, 169-183.
- LI, M.-G., LU, W.-L., WANG, J.-C., ZHANG, X., WANG, X.-Q., ZHENG, A.-P. e ZHANG, Q. (2007) Distribution, transition, adhesion and release of insulin loaded nanoparticles in the gut of rats. **Int. J. Pharm.** 329, 182-191.
- LIN, Y.-H., MI, F.-L., CHEN, C.-T., CHANG, W.-C., PENG, S.-F., LIANG, H.-F. e SUNG, H.-W. (2007) Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. **Biomacromolecules** 8, 146-152.
- LIU, P. e KRISHAM, T. R. (1999) Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation. **J. Pharm. Pharmacol.** 51, 141-149.
- LONGO, W. E., IWATA, H., LINDHEIMER, T. A. e GOLDBERG, E. P. (1982) Preparation of hydrophilic albumin microspheres using polymeric dispersing agents. **J. Pharm. Sci** 71, 1323-1328.
- MA, Z., LIM, T. M. e LIM, L.-Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 293, 271-280.
- MACLEOD, G. S., COLLETT, J. H. e FELL, J. T. (1999) The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. **J. Control. Rel.** 58, 303-310.
- MCKINGHT, C. A., KU, A., GOOSEN, M. F. A., SUN, D. e PENNEY, C. (1988) Synthesis of chitosan-alginate microcapsule membranes. **J. Bioact. Compat. Polym.** 3, 334-355.
- MESIHA, M. S., SIDHOM, M. B. e FASIPE, B. (2005) Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 288, 289-293.
- MICHEL, C., ROQUES, M., COUVREUR, P., VRANCHX, H. e BALDSCHMIDT, P. (1991) Isobutylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier for oral administration of insulin. **Proc. of the Int. symp. contr. rel. bioact. mat.** 18, 97-98.

- MITREVEJ, A., SINCHAIPANID, N., RUNGVEJHAVUTTIVITTAYA, Y. e KOSITCHAIYONG, V. (2001) Multiunit controlled-release diclofenac sodium capsules using complex of chitosan with sodium alginate or pectin. **Pharm. Develop. Technol.** 6, 385-392.
- MORÇOL, T., NAGAPPAN, P., NERENBAUM, L., MITCHELL, A. e BELL, S. J. D. (2004) Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin. **Int. J. Pharm.** 277, 91-97.
- MORIMOTO, Y., SUGIBAYASHI, K. e KATO, Y. (1981) Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. V. Antitumor effect of microsphere-entrapped adriamycin of liver metastasis of AH 7974 cells in rats. **Chem. Pharm. Bull.** 29, 1433-1439.
- MUSABAYANE, C. T., MUNJERI, O., BWITITI, P. e OSIM, E. E. (2000) Orally administered, insulin-loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats. **J. Endocrinol.** 164, 1-6.
- NARAMBUENA, C., AUSAR, F., BIANCO, I. D., BELTRAMO, D. M. e LEIVA, E. P. M. (2005) Aggregation of casein micelles by interactions with chitosans: a study by Monte Carlo simulations. **J. Agric. Food Chem.** 53, 459-463.
- NURDIN, N., CANAPLE, L., BARTKOWIAK, A., DESVERGNE, B. e HUNKELER, D. (2000) Capsule permeability via polymer and protein ingress/egress. **J. Appl. Polym. Sci.** 75, 1165-1175.
- OHTANI, S., SHIRASU, K., OGAWARA, K., HIGAKI, K. e KIMURA, T. (2003) Evaluation of inhibitory activity of casein on proteases in rat intestine. **Pharm. Res.** 20, 611-617.
- ONAL, S. e ZIHNIÖGLU, F. (2002) Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: oral therapeutic peptide delivery. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.** 30, 229-237.
- OPPENHEIM, R. C. (1986) Nanoparticulate drug delivery systems based on gelatine and albumin. In: Guiot, P. e Couvreur, P. (eds) **In: Polymeric nanoparticles and microspheres**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1-25.
- PAN, X., MU, M., HU, B., YAO, P. e JIANG, M. (2006) Micellization of casein-graft-dextran copolymer prepared through maillard reaction. **Biopolymers** 81, 29-38.

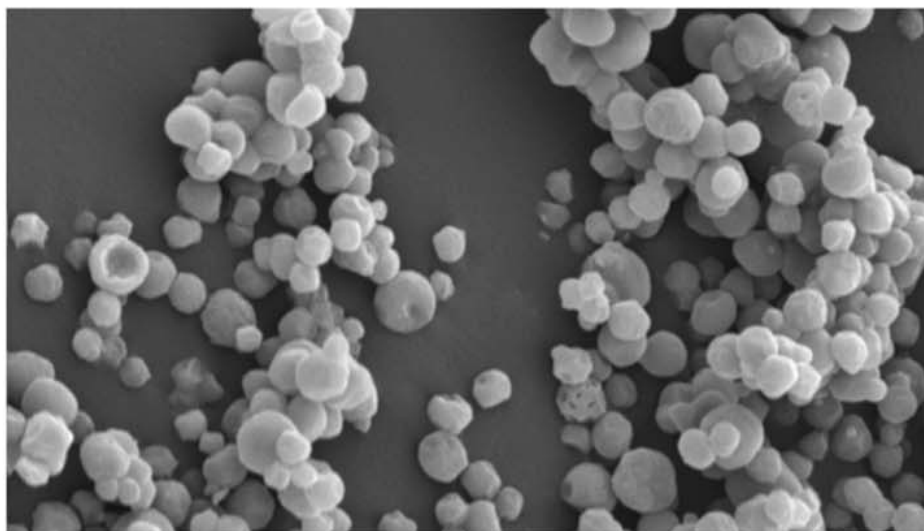
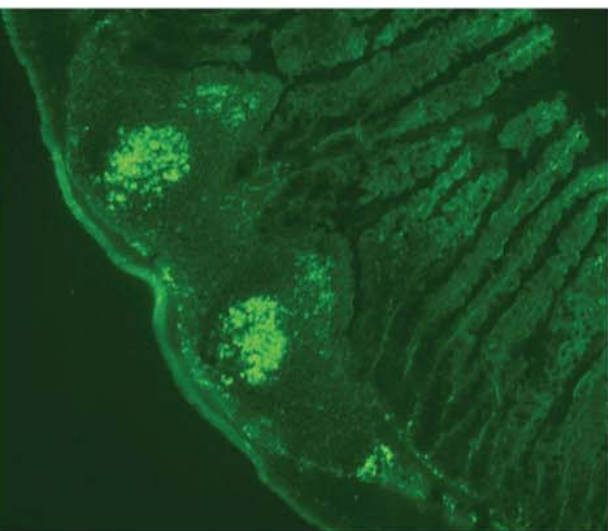
- PAN, Y., LI, Y., ZHAO, H., ZHENG, J., XU, H., WEI, G., HAO, J. e CUI, F. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin *in vivo*. **Int. J. Pharm.** 249, 139-147.
- PAN, Y., LI, Y. J., GAO, P., DING, P. T., XU, H. e ZHENG, J. M. (2003) [Enhancement of gastrointestinal absorption of chitosan-coated insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles]. **Yao Xue Xue Bao** 38, 467-470.
- PATIL, G. V. (2003) Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. **Drug Dev. Res.** 58, 219-247.
- PEPPAS, N. A. e KAVIMANDAN, N. J. (2006) Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. **Eur. J. Pharm. Sci.** 29, 183-197.
- POLK, A., AMSDEN, B., YAO, K. D., PENG, T. e GOOSEN, M. F. A. (1994) Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. **J. Pharm. Sci.** 83, 178-185.
- PREGO, C., TORRES, D., FERNANDEZ-MEGIA, E., NOVOA-CARBALLAL, R., QUIÑOÁ, E. e ALONSO, M. J. (2006) Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan pegylation degree. **J. Control. Rel.** 111, 299-308.
- PRISTA, L. N., ALVES, A. C. e MORGADO, R. (1995) Administração de medicamentos. In: Prista, L. N., Alves, A. C. e Morgado, R. (eds) **Tecnologia Farmacêutica**. 5ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 41-191.
- QI, R., PING, Q.-N., XU, R.-Y. e SHI, Y.-P. (2004) Effect of casein and protamine on the enzymatic degradation and the orally hypoglycemic action of insulin. **Acta Pharm. Sin.** 39, 844-848.
- QIAN, F., CUI, F., DING, J., TANG, C. e YIN, C. (2006) Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization. **Biomacromolecules** 7, 2722-2727.
- QUONG, D. e NEUFELD, R. J. (1998) DNA protection from extracapsular nuclease, within chitosan-or poly-L-lysine-coated alginate beads. **Biotechnol. Bioeng.** 60, 124-134.

- RADWAN, M. A. (2001) Enhancement of absorption of insulin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 27, 981-989.
- RADWAN, M. A. e ABOUL-ENEIN. (2002) The effect of the oral absorption enhancers on the *in vivo* performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats. **J. Microencapsul.** 19, 225-235.
- SANTINHO, A. J. P., PEREIRA, N. L., FREITAS, O. D. e COLLETT, J. H. (1999) Influence of formulation on the physicochemical properties of casein microparticles. **Int. J. Pharm.** 186, 191-198.
- SCHECHTER, Y., MIRONCHIK, M., RUBINRAUT, S., SAUL, A., TSUBERY, H. e FRIDKIN, M. (2005) Albumin-insulin conjugate releasing insulin slowly under physiological conditions: a new concept for long-acting insulin. **Bioconjug. Chem.** 16, 913-920.
- SCHNEIDER, S., FEILEN, P., CRAMER, H., HILLGARTNER, M., BRUNNENMEIER, F., ZIMMERMANN, H., WEBER, M. M. e ZIMMERMANN, U. (2003) Beneficial effects of human serum albumin on stability and functionality of alginate microcapsules fabricated in different ways. **J. Microencapsul.** 20, 627-636.
- SERRA, L., DOMENECH, J. e PEPPAS, N. A. (2006) Design of poly(ethylene glycol)-tethered copolymers as novel mucoadhesive drug delivery systems. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 63, 11-18.
- SHARMA, R. I., PEREIRA, M., SCHWARZBAUER, J. E. e MOGHE, P. V. (2006) Albumin-derived nanocarriers: substrates for enhanced cell adhesive ligand display and cell motility. **Biomaterials** 27, 3589-3598.
- SHECHTER, Y., MIRONCHIK, M., RUBINRAUT, S., SAUL, A., TSUBERY, H. e FRIDKIN, M. (2005) Albumin-insulin conjugate releasing insulin slowly under physiological conditions: a new concept for long-acting insulin. **Bioconjug. Chem.** 16, 913-920.
- SIGMA-ALDRICH (2007) www.sigmaaldrich.com, consultado em 22/05/2007.
- SILVA, C. (2007) Aumento da biodisponibilidade oral de fármacos peptídicos recorrendo à encapsulação com alginato e quitosano. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra, Coimbra.

- SINHA, V. R. e KUMRIA, R. (2001) Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **Int. J. Pharm.** 224, 19-38.
- SRIAMORNSAK, P. (1998) Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. **Int. J. Pharm.** 169, 213-220.
- SRIAMORNSAK, P. (1999) Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads. **Eur. J. Pharm. Sci.** 8, 221-227.
- SRIAMORNSAK, P. (2007) <http://www.journal.su.ac.th/index.php/suij/article/viewFile/48/48>, consultado em 28/06/2007.
- SRIAMORNSAK, P., BURTON, M. A. e KENNEDY, R. A. (2006) Development of polysaccharide gel coated pellets for oral administration. 1. Physico-mechanical properties. **Int. J. Pharm.** 326, 80-88.
- SRIAMORNSAK, P. e NUNTHANID, J. (1998) Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and *in vitro* release studies. **Int. J. Pharm.** 160, 207-212.
- STRUGALA, V., KENNINGTON, E. J., CAMPBELL, R. J., SKJÅK-BRÆK, G. e DETTMAR, P. W. (2005) Inhibition of pepsin activity by alginates *in vitro* and the effect of epimerization. **Int. J. Pharm.** 304, 40-50.
- SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y., NADAI, T. e KATO, Y. (1977) Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. I. Tissue distribution of microspheres-entrapped 5-fluorouracil in mice. **Chem. Pharm. Bull.** 12, 3433-3434.
- SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y., NADAI, T. e KATO, Y. (1979a) Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. III. Effect of microspheres-entrapped 5-fluorouracil on Ehrlich ascites carcinoma in mice. **J. Pharm. Dyn.** 2, 350-355.
- SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y., NADAI, T., KATO, Y., HASEGAWA, A. e ARITA, T. (1979b) Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. II. Preparation and tissue distribution in mice microspheres-entrapped 5-fluorouracil. **Chem. Pharm. Bull** 27, 204-209.
- THAKUR, B. R., SINGH, R. K. e HANDA, A. K. (1997) Chemistry and uses of pectin - a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 37, 47-73.

- TOBÍO, M., SÁNCHEZ, A., VILA, A., SORIANO, I., EVORA, C., VILA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. (2000) The role of PEG on the stability in digestive fluids and *in vivo* fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. **Coll. Surf. B Biointerf.** 18, 315-323.
- TOWLE, G. A. e CHRISTENSEN, O. (1973) **Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives.** Academic Press Inc., New York.
- URBANO, A. P. A. (2004) Microencapsulação de fármacos peptídicos em pectina pelo método emulsificação/gelificação interna: a albumina como fármaco modelo. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- VANDEBERG, G. W., DROLET, C., SCOTT, S. L. e DE LA NOUÈ, J. (2001) Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. **J. Control. Rel.** 77, 297-307.
- VANDEBERG, G. W. e NOUÈ, J. D. L. (2001) Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation. **J. Microencapsul.** 18, 433-441.
- VENKATESAN, N., YOSHIMITSU, J., ITO, Y., SHIBATA, N. e TAKADA, K. (2005) Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. **Biomaterials** 26, 7154-7163.
- VILA, A., GILL, H., MCCALLION, O. e ALONSO, M. J. (2004a) Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. **J. Control. Rel.** 98, 231-244.
- VILA, A., SÁNCHEZ, A., JANES, K. A., BEHRENS, I., KISSEL, T., VILA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. (2004b) Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 57, 123-131.
- WAKERLY, Z., FELL, J. T., ATTWOOD, D. e PARKINS, D. (1996) Pectin/ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery. **Pharm. Res.** 13, 1210-1212.
- WATNASIRICHAIKUL, S., RADES, T. e TUCKER, I. G. (2002) *In vitro* release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion. **J. Pharm. Pharmacol.** 54, 473-480.

- WILLIAMS, R. C. e RAJAGOPALAN, T. G. (1966) Ultracentrifugal characterization of pepsin and pepsinogen. **J. Biol. Chem.** 241, 4951-4954.
- WORTHINGTON-BIOCHEM (2007) <http://www.worthington-biochem.com/PM/cat.html>, consultado em 28/06/2007.
- YE, A., FLANAGAN, J. e SINGH, H. (2006) Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. **Biopolymers** 82, 121-133.
- YONCHEVA, K., LIZARRAGA, E. e IRACHE, J. M. (2005) Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. **Eur. J. Pharm. Sci.** 24, 411-419.
- ZHU, J. e LI, P. (2003) Synthesis and characterization of poly(methylmethacrylate)/casein nanoparticles with a well-defined core-shell structure. **J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.** 41, 3346-3353.
- ZIMECKI, M. e KRUZEL, M. L. (2007) Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. **J. Exp. Ther. Oncol.** 6, 89-106.



CARACTERIZAÇÃO
DO SISTEMA NANOMÉTRICO,
EFEITO TERAPÊUTICO ORAL
E ESTUDO DA ABSORÇÃO INTESTINAL

CAPÍTULO VII

1. INTRODUÇÃO

O objectivo do trabalho descrito no presente capítulo incidiu na caracterização da formulação desenvolvida no capítulo anterior e na sua avaliação com recurso a metodologias específicas com o intuito de prever o mecanismo de absorção intestinal das nanoesferas. As nanoesferas consistem numa matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano e revestidas com quitosano, PEG e albumina. O desenvolvimento desta formulação foi realizado de modo sequencial. No trabalho do presente capítulo, à formulação apresentada inicialmente no capítulo anterior foi-lhe adicionado um novo polímero: o PEG.

O PEG é considerado um polímero flexível, biodegradável, não tóxico e hidrofílico (Zhu *et al.*, 2007) (Figura VII-1). É solúvel em água e em alguns solventes orgânicos como, por exemplo, o metanol, o benzeno e o diclorometano (Hinds e Kim, 2002), sendo, no entanto, insolúvel em outros solventes orgânicos, tais como, o éter dietílico. O PM do PEG pode variar entre 1 kDa e 20 kDa (Chandy *et al.*, 1999).

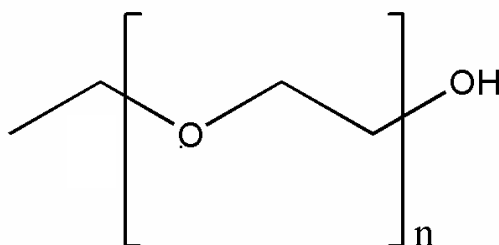


Figura VII-1. Estrutura química do PEG.

O PEG é aplicado na indústria alimentar e na indústria dos polímeros como agente plasticizante mas também é muito utilizado nas áreas da medicina e da farmacêutica na produção de formas tópicas, supositórios, cremes e *sprays* para administração nasal, sendo igualmente utilizado em técnicas de diagnóstico (exemplo: colonoscopias). Na tecnologia farmacêutica, pode ser aplicado como agente de revestimento (Chen *et al.*, 1998; Chandy *et al.*, 1999; Tobío *et al.*, 2000; Al-Azzam *et al.*, 2002; Prego *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007), agente bioadesivo (Win e Feng, 2005), agente emulsivo (Castellanos *et al.*, 2003), agente

promotor de absorção de proteínas através do epitélio nasal e intestinal (Tobío *et al.*, 1998; Vila, 2002), agente de redução da adsorção de proteínas a outras macromoléculas e da adesão celular (Chandy *et al.*, 1999), mas também pode ser aplicado como agente químico que se liga às proteínas e altera as suas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas, nomeadamente o tempo de semi-vida plasmática de fármacos e a sua biodistribuição (Caliceti e Veronese, 1999; Hinds e Kim, 2002; Na *et al.*, 2003; Caliceti *et al.*, 2004; Hinds *et al.*, 2005; Bhadra *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007). Comercialmente, encontram-se disponíveis produtos farmacêuticos que incluem PEG na sua composição, nomeadamente o PEG-interferão alfa (indicado para o tratamento da hepatite C) e o PEG-filgastrim (Neulasta[®], indicado para o tratamento da neutropenia).

No trabalho descrito no presente capítulo pretendeu-se caracterizar a formulação no que respeita a sua granulometria, a morfologia, o potencial zeta, a EE de insulina, o perfil de libertação *in vitro* e a percentagem de insulina não degradada após incubação com a pepsina à semelhança do que foi realizado no capítulo anterior. Além disso, no trabalho do presente capítulo pretendeu-se avaliar o efeito terapêutico das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina com insulina após administração oral a ratos diabéticos. Para isso, foram realizados ensaios adicionais, entre os quais a prova de tolerância à glucose oral (PTGO), a determinação da insulinémia e da biodisponibilidade.

A biodisponibilidade pode ser definida pela velocidade e pela extensão com que uma substância activa é absorvida, a partir de uma forma farmacêutica, tornando-se disponível no seu local de acção. A avaliação da biodisponibilidade pode ser efectuada numa matriz biológica acessível, como seja o sangue ou o plasma. O processo usualmente aplicado para calcular a quantidade absorvida é através da determinação da área total sob a curva das concentrações (designada por AUC, do inglês, *area under curve*) *versus* tempo após administração de uma dose única (Monteiro e Garrett, 1994). A importância dos estudos de biodisponibilidade é enorme no desenvolvimento galénico e biofarmacêutico de uma forma farmacêutica. Os estudos de biodisponibilidade permitem conhecer a velocidade e a extensão com que um fármaco é absorvido; permitem identificar as formulações mais adequadas ao perfil de libertação desejado e permitem avaliar a bioequivalência entre duas formulações

equivalentes sob o ponto de vista químico ou farmacêutico (Ribeiro, 2005). A biodisponibilidade oral dos produtos farmacêuticos é geralmente documentada pela construção de perfis de exposição sistêmica das substâncias activas. Da análise dos perfis de exposição sistêmica é possível avaliar a velocidade e a extensão da libertação do fármaco, a partir da sua forma farmacêutica, assim como avaliar eventuais acções sistémicas e pré-sistémicas, após a libertação das respectivas formas farmacêuticas, tais como a degradação local ou a precipitação nos fluidos gastrintestinais (Ribeiro, 2005). No caso particular desta dissertação, a determinação da biodisponibilidade oral da insulina a partir das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina permite avaliar a eficácia deste sistema como estratégia para a administração oral da insulina, ou seja, é decisiva para determinar uma possível aplicação na terapêutica da Diabetes *Mellitus*.

Por outro lado, um dos assuntos de grande debate entre a comunidade científica continua a ser o mecanismo de absorção de péptidos e proteínas, tal como foi descrito no Capítulo I. Deste modo, o trabalho do presente capítulo descreveu duas diferentes metodologias microscópicas para a visualização da absorção e uma metodologia de quantificação dessa mesma absorção intestinal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O alginato de sódio foi o indicado no Capítulo III. O carbonato de cálcio ultrafino, o agente emulsivo (Span[®] 80), a parafina líquida e a insulina foram os indicados no Capítulo II. Porém, face à deslocação do trabalho prático para Strasbourg, houve a necessidade de encomendar novos reagentes, mantendo, sempre que foi possível, as mesmas especificações. O quitosano (PM = 50 kDa, grau de desacetilação de 75-85%), a albumina (PM = 66 kDa, pI 5,2) e a pepsina (EC 3.4.23.1) da mucosa gástrica porcina com uma actividade de 370 U/mg de sólido, o isotiocianato de fluoresceína (FITC, PM = 389,84 Da) foram adquiridos à Sigma-Aldrich Chimie (L'Isle d'Abeau Chesnes, França). O sulfato de dextrano (PM = 5 kDa) e o PEG (PM = 4 kDa) foram adquiridos à Fluka, Chemie GmbH (Buchs, Suíça). A STZ foi a indicada no Capítulo VI. A água desionizada utilizada na preparação de soluções foi obtida a partir de um sistema Millipore Elix 5 (Bedford, MA, EUA). O acetonitrilo, o TFA e a água utilizados no sistema de HPLC foram de qualidade adequada. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico, já indicados no Capítulo II.

2.2. Preparação das nanoesferas

As nanoesferas foram preparadas segundo o protocolo descrito no Capítulo IV. Depois de recuperadas, as nanoesferas foram revestidas por um processo de duas etapas com uma solução (100 mL) de quitosano (0,03% m/V, a pH 4,5) e PEG (0,15%, m/V), enriquecida com cloreto de cálcio a 1,5% (m/V), durante 30 min e sob agitação magnética (100 rpm). Após revestimento, as nanoesferas foram armazenadas a 4°C durante 24 h. Passado esse período de repouso, o sobrenadante foi aspirado sob vácuo e, em seguida, as nanoesferas de alginato foram revestidas com uma solução (100 mL) de albumina (1% m/V, a pH 5,1), durante 30 min e sob agitação magnética (100 rpm). O sobrenadante foi, novamente, aspirado sob vácuo e as nanoesferas foram armazenadas a 4°C. Foram preparadas nanoesferas vazias, isto

é, sem adição de insulina. Neste caso, a solução de insulina foi substituída por 10 mL de água desionizada no processo de preparação das nanoesferas.

2.3. Caracterização granulométrica das nanoesferas

A distribuição granulométrica e a polidispersividade das nanoesferas foram determinadas de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

2.4. Caracterização morfológica das nanoesferas

A morfologia das nanoesferas foi determinada por SEM e de acordo com as condições descritas no Capítulo II.

2.5. Potencial zeta das nanoesferas

O potencial zeta das nanoesferas foi determinado em triplicado, recorrendo a um Malvern Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Worcestshire, Reino Unido) e segundo a técnica descrita no Capítulo V.

2.6. Determinação da eficiência de encapsulação (EE)

Uma quantidade de nanoesferas (1 mL) foi colocada em 5 mL de tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM sob agitação magnética (100 rpm, 1 h), numa placa de agitação magnética com múltiplos focos (Variomag[®] Telesystem, H+P Labortechnik AG, Oberschleissheim, Alemanha). Ao fim desse período, procedeu-se a uma centrifugação ($12.500 \times g$, 10 min) e a quantidade de insulina libertada no sobrenadante foi determinada pelo método de HPLC (Anexo II). A EE (%) da insulina foi calculada com base na Equação VII-1.

$$EE (\%) = \frac{\text{Insulina encapsulada } (\mu\text{g}) \text{ em } 1 \text{ mL de nanoesferas}}{\text{Insulina teórica } (\mu\text{g}) \text{ em } 1 \text{ mL de nanoesferas}} \times 100$$

Equação VII-1

2.7. Perfil de libertação *in vitro*

Uma quantidade de nanoesferas (5 mL) foi colocada em 5 mL de tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXVIII) sob agitação magnética a 100 rpm, durante 2 h, numa placa de agitação magnética com múltiplos focos (Variomag[®] Telesystem, H+P Labortechnik AG, Oberschleissheim, Alemanha). Ao fim desse período, procedeu-se a uma centrifugação (12.500 × g, 10 min) e aspiração do sobrenadante. As nanoesferas foram transferidas para 10 mL de tampão fosfato de pH 6,8 (USP XXVIII) e submetidas a agitação magnética (100 rpm, 6 h). Foram recolhidas amostras de ambos os meios a tempos pré-determinados. O volume dos meios foi sempre constante, uma vez que as amostras recolhidas foram substituídas pelo mesmo volume em tampão fresco. A quantidade de insulina nessas amostras foi determinada pelo método de HPLC (Anexo II) e a libertação cumulativa de insulina foi calculada de acordo com a Equação II-7 apresentada no Capítulo II. Os ensaios foram realizados em triplicado. A análise dos perfis de libertação foi realizada através da aplicação dos métodos dependentes de modelos matemáticos descritos no Capítulo V.

2.8. Estabilidade enzimática na presença de pepsina

Para determinar a estabilidade enzimática da insulina encapsulada em nanoesferas, a quantidade de insulina encapsulada nas nanoesferas foi determinada, inicialmente, segundo o protocolo descrito anteriormente. De seguida, uma quantidade de nanoesferas (1 mL) foi incubada em 5 mL de fluido gástrico artificial (USP XXVIII) com pepsina sob agitação magnética (100 rpm, 2 h), promovida por intermédio de uma placa com múltiplos focos, num banho de água termostaticado a 37°C. Finalizado este período de incubação com a pepsina, a suspensão das nanoesferas foi centrifugada (12.500 × g, 10 min) e o sobrenadante foi eliminado por aspiração. De seguida, tornaram-se a suspender as nanoesferas sedimentadas

em 5 mL de tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM e mantiveram-se sob agitação magnética (100 rpm, 1 h). A quantidade de insulina libertada nesta fase, considerada como resistente à acção da pepsina, foi determinada por HPLC e a estabilidade enzimática foi calculada segundo a Equação VI-1. Como controlo negativo, uma solução de insulina não encapsulada foi sujeita às mesmas condições experimentais. A concentração da solução de insulina foi semelhante à analisada nas nanoesferas. Paralelamente, uma solução de insulina não sujeita a incubação enzimática foi analisada por HPLC. Esta solução foi designada por solução referência. Após este ensaio, procedeu-se à determinação do potencial zeta das nanoesferas. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.9. Efeito terapêutico da formulação otimizada após administração a ratos diabéticos

2.9.1. Indução da Diabetes Mellitus

As características dos animais em experimentação, nomeadamente a idade, o peso, o sexo, condições de acomodação (ciclo diário de luz, temperatura, humidade e qualidade do ar), comida e água foram os indicados no Capítulo VI. O protocolo da indução da diabetes do tipo 1 foi o descrito no capítulo anterior.

2.9.2. Administração s.c. da formulação otimizada

Para confirmar a bioactividade da insulina encapsulada optou-se por administrar pela via s.c. as nanoesferas contendo insulina, e não a insulina libertada das nanoesferas, como tinha sido realizado anteriormente no trabalho descrito no Capítulo IV. Esta alteração foi efectuada apenas pela necessidade do presente protocolo estar em concordância com o protocolo já pré-estabelecido da Faculdade de Medicina da Universidade Louis Pasteur, Strasbourg, em França.

Foram randomizados três grupos de ratos diabéticos aos quais foram administradas diferentes formulações: um grupo de animais com insulina não encapsulada a 4 UI/kg (controle positivo) dissolvida em NaCl a 0,9% (m/V), um grupo com solução aquosa de NaCl a 0,9% (m/V) (controle negativo) e, finalmente, outro grupo de animais com nanoesferas, contendo insulina a 4 UI/kg em NaCl a 0,9% (m/V). A administração aos ratos diabéticos foi realizada após um jejum de 12 h, com livre acesso a água e depois de confirmado o estado hiperglicêmico. Para minimizar as flutuações diurnas dos níveis de glicemia dos ratos, todas as experiências se iniciaram à mesma hora e sempre no início da manhã (entre as 8:00 e as 9:00). O volume injectado, 1 mL/kg, foi idêntico para todos os grupos. A colheita sanguínea foi realizada por picada com uma agulha na extremidade da cauda em intervalos de tempo pré-determinados, até às 8 h após administração s.c.. O aparelho de medição da glicemia foi o descrito no capítulo anterior. Decorrido o ensaio, os animais foram alimentados e a glicemia voltou aos níveis hiperglicêmicos que tinham sido verificados antes do dia de jejum.

2.9.3. Administração oral da formulação otimizada

2.9.3.1 Efeito terapêutico oral

O efeito terapêutico foi avaliado após administração oral das nanoesferas contendo insulina. Estas últimas foram suspensas em água, de modo a obter uma concentração de insulina de 50 UI/6 mL e administradas oralmente a ratos diabéticos. No caso das nanoesferas vazias, utilizou-se uma concentração em nanoesferas equivalente às correspondentes nanoesferas com insulina e a mesma via de administração. Como controle negativo foi administrada, pela mesma via de administração, uma solução de insulina obtida por diluição de Actrapid[®] em água, de modo a obter a mesma concentração referida para a formulação otimizada (50 UI/6 mL). A administração foi realizada após um período de jejum de 12 h, com livre acesso a água e depois de confirmado o estado hiperglicêmico dos ratos diabéticos. As formulações foram administradas oralmente a 6 mL/kg, correspondendo a 50 UI/kg, com a sonda endogástrica utilizada no trabalho descrito no capítulo anterior. Para todas as situações,

foram recolhidas amostras sanguíneas da ponta da cauda dos ratos para determinação da glicemia em intervalos de tempos pré-definidos (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 h, após administração oral das formulações).

2.9.3.2 Efeito dose-resposta

O efeito dose-resposta foi avaliado após administração oral das nanoesferas contendo insulina a três diferentes doses: 25, 50 e 100 UI/kg para três diferentes grupos de animais. As nanoesferas com insulina foram suspensas em água e preparadas a diferentes níveis de concentração de modo a obter as dosagens referidas (25, 50 e 100 UI/6 mL). No caso das nanoesferas vazias, utilizou-se apenas uma das concentrações em nanoesferas equivalente à correspondente concentração das nanoesferas contendo insulina (50 UI/6 mL). A administração foi realizada após um período de jejum de 12 h, com livre acesso a água e depois de confirmado o estado hiperglicêmico dos ratos diabéticos. As formulações foram administradas oralmente a 6 mL/kg, utilizando a sonda endogástrica. Para todas as situações foram recolhidas amostras sanguíneas da ponta da cauda dos ratos para determinação da glicemia em intervalos de tempos pré-definidos (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 h, após administração oral das formulações).

2.9.3.3 Prova de tolerância à glucose oral (PTGO)

A PTGO foi realizada após administração de uma solução de glucose concentrada, segundo um protocolo descrito na literatura (Dangé *et al.*, 2007). Os ratos diabéticos foram randomizados em dois grupos, especificamente, um grupo com nanoesferas com insulina (50 UI/kg) e outro grupo com nanoesferas vazias (concentração equivalente à concentração das nanoesferas com insulina). As formulações foram preparadas utilizando a água como meio de dispersão.

Para a PTGO, foi preparada uma solução aquosa de glucose concentrada a 1 g/mL e os animais foram submetidos a um período de jejum de 5 h mas com livre acesso a água. Decorrido

o período de jejum e depois de confirmado o estado hiperglicémico dos animais, as formulações (6 mL/kg) em estudo foram administradas oralmente, utilizando a sonda endogástrica.

Dez horas depois e avaliados os níveis glicêmicos dos respectivos animais, a solução aquosa de glucose concentrada foi administrada oralmente com a sonda endogástrica na dose 2 g/kg de peso corporal. O volume administrado foi de 1 mL, sendo que a diferença volumétrica para perfazer esse mesmo volume foi compensada com água. O tempo decorrido entre a administração das nanoesferas e a administração da solução aquosa de glucose concentrada foi seleccionado após análise dos resultados obtidos na Secção 2.9.3.1 do presente capítulo. Após administração da solução aquosa de glucose concentrada, foram recolhidas amostras sanguíneas da ponta da cauda dos ratos, para determinação da glicémia aos 20, 40, 60, 90, 120 e 180 min. Nesta situação, consideraram-se como valores basais, os níveis de glicémia dos animais antes da administração da solução aquosa de glucose concentrada.

2.9.3.4 Determinação da insulinémia e biodisponibilidade

A insulina plasmática foi quantificada após administração oral das nanoesferas. As nanoesferas com insulina foram suspensas em água, de modo a obter uma concentração de insulina de 50 UI/6 mL.

No dia do ensaio, os animais foram anestesiados por via i.p. com uma mistura de quetamina e xilazina (80:20, V/V) a uma dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal. Imediatamente antes da administração das nanoesferas, foi recolhida uma amostra sanguínea através de uma punção cardíaca. A administração foi realizada após um período de jejum de 12 h, com livre acesso a água e depois de confirmado o estado hiperglicémico dos ratos diabéticos. As nanoesferas contendo insulina foram administradas a 6 mL/kg, correspondendo a 50 UI/kg, utilizando a sonda endogástrica. Os tempos de recolha de amostras sanguíneas foram 0, 4, 8 e 12 h, após a administração oral das formulações. O sangue foi recolhido por punção cardíaca, colocado em tubos com anticoagulante (EDTA), imediatamente centrifugado (3500 × g, 15 min) e armazenado a -20°C até proceder à quantificação da insulina plasmática. A insulina foi quantificada no Hospital da Universidade de Louis Pasteur em Strasbourg,

recorrendo ao método de RIA (*radioimmunoassay*) e utilizando um kit específico para esse efeito (Insulin-CT kit da CIS Bio International, Gif-sur-Yvette Cedex, França).

Para a determinação da biodisponibilidade da formulação otimizada foi realizada, em paralelo, a administração s.c. de insulina não encapsulada a 10 UI/kg. A insulinemia foi quantificada em ambas as situações. Foram calculadas as AUC da concentração sanguínea da insulina, segundo o método dos trapézios. O valor da biodisponibilidade, fracção de absorção $F_{relativa}$, foi calculado pela Equação VII-3 (Monteiro e Garrett, 1994).

$$F_{relativa} (\%) = \frac{AUC_{oral\ 0-8\ h} \times Dose_{s.c.}}{AUC_{s.c.\ 0-8\ h} \times Dose_{oral}} \times 100 \quad \text{Equação VII-2}$$

2.10. Estudo da absorção intestinal da formulação otimizada após administração *in situ* a ratos diabéticos

2.10.1. Visualização da captação intestinal da formulação otimizada

Para a realização dos ensaios de captação intestinal, foi necessário adicionar à insulina um marcador fluorescente. O marcador fluorescente seleccionado foi o isotiocianato de fluoresceína (FITC). O protocolo de marcação da insulina foi baseado em trabalhos anteriores (Bromer e Sheehan, 1967; Hentz e Richardson, 1997; Li *et al.*, 2007). A insulina foi marcada com FITC na Faculdade de Farmácia da Universidade de Nancy e gentilmente fornecida para a realização dos ensaios a seguir descritos. O protocolo de preparação das nanoesferas com insulina-FITC foi semelhante ao descrito na Secção 2.2. do presente capítulo.

No dia do ensaio e depois de um período de jejum de 12 h, mas com livre acesso a água, os animais diabéticos foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) por via i.p..

Após laparotomia, foi destacado um segmento intestinal com um comprimento de 30 cm, situado imediatamente antes da válvula ileocecal, e colocadas duas ligaduras em cada uma das suas extremidades. As nanoesferas contendo insulina-FITC foram injectadas no lúmen do segmento intestinal isolado (50 UI/kg). O volume injectado foi de 2 mL. Os animais

diabéticos (6 por grupo) foram sacrificados em intervalos de tempo determinados (5 min, 30 min, 1, 2, 4 e 8 h). Como controlo, foi também injectada solução de insulina-FITC não encapsulada. As biópsias do tecido intestinal folicular (placas de Peyer) e não folicular do segmento intestinal foram recolhidas nos intervalos de tempo descritos e sujeitas a um processo de congelação e fixação. Inicialmente, os tecidos intestinais foram embebidos num meio com crióstato (Tissue Tek, Miles Diagnostics, Elkhart, Indiana, EUA), fixados e sujeitos a cortes de 10 μm de espessura a -24°C utilizando um micrótomo (Leica, CM3050 S, Rueil-Malmaison Cedex, França). As lâminas com os tecidos seccionados foram observadas com um microscópio de fluorescência (Olympus DP70, Rungis, França) e com um microscópio confocal de varrimento laser (modelo BioRad MRC-1024) equipado com laser de árgon/kriptón (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemanha). O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 488 nm. As imagens da microscopia confocal de varrimento laser foram processadas, recorrendo a um software denominado de Volocity[®] (Improvision Germany, Tübingen, Alemanha).

2.10.2. Quantificação da captação intestinal da formulação otimizada

Em paralelo com o ensaio anterior, o sangue foi recolhido da veia mesentérica, centrifugado ($3500 \times g$, 15 min) e o plasma sanguíneo foi congelado e armazenado a -80°C até ser sujeito a um processo de extracção da fluorescência.

O conteúdo intestinal também foi recolhido do segmento intestinal por sucessivas lavagens com NaCl a 0,9% (m/V), congelado e armazenado a -80°C até posterior extracção da fluorescência. O volume do conteúdo intestinal final foi registado.

Por outro lado, o segmento intestinal foi sujeito a um processo de raspagem para recolher a mucosa intestinal. A mucosa intestinal foi pesada, congelada e armazenada a -80°C até posterior extracção da fluorescência.

A actividade fluorescente do plasma sanguíneo, conteúdo intestinal, homogenatos da mucosa foi quantificada por espectrofluorometria.

2.10.3. Extracção da fluorescência

O protocolo da extracção da fluorescência foi adaptado para cada um dos tipos de amostra recolhida, nomeadamente o plasma sanguíneo, o conteúdo intestinal e a mucosa intestinal.

2.10.3.1 Extracção da fluorescência do plasma sanguíneo

Todas as amostras de plasma foram quantificadas a partir de 25 μ L de plasma. A esta amostra foi adicionado 1,5 mL de metanol absoluto. De seguida, esta mistura foi centrifugada a 4°C (3000 \times g, 10 min). O sobrenadante foi recolhido e adicionou-se 250 μ L de NaOH a 6 N. Depois da homogeneização, efectuou-se nova centrifugação (mesmas condições). A amostra foi, então, congelada a -20°C, até efectuar o doseamento da fluorescência.

2.10.3.2 Extracção da fluorescência do conteúdo intestinal

O conteúdo intestinal foi sujeito a uma homogeneização. De seguida, as amostras foram sujeitas a ultra-sons em gelo durante 5 s. Recolheu-se 1 mL do homogenato e adicionaram-se 3 mL de metanol absoluto ao mesmo. De seguida, centrifugou-se a mistura a 4°C (3000 \times g, 10 min). O sobrenadante foi recolhido e conservado em gelo. Ao sedimento do homogenato do conteúdo intestinal foi novamente adicionado 2 mL de metanol absoluto. De seguida, centrifugou-se a mistura utilizando as mesmas condições. O novo sobrenadante foi recolhido e adicionado ao sobrenadante anterior. Foram adicionados 500 μ L de NaOH a 6 N a essa mistura. Depois de homogeneizada, a mistura foi sujeita a uma nova centrifugação (mesmas condições). O sobrenadante total foi recuperado e congelado a -20°C até efectuar o doseamento da fluorescência.

2.10.3.3 Extracção da fluorescência da mucosa intestinal

A mucosa intestinal foi sujeita a uma homogeneização com 3 mL de NaCl a 0,9% (m/V) e a mistura foi depois submetida a ultra-sons em gelo durante 5 s. Decorrido esse período, adicionaram-se mais 2 mL de NaCl a 0,9% (m/V) ao homogenato da mucosa intestinal e o volume de homogenato final foi registado. Recolheram-se 2 mL do homogenato da mucosa intestinal e adicionaram-se 3 mL de metanol absoluto. Esta mistura foi centrifugada ($3000 \times g$, 10 min) a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e conservado em gelo. Ao sedimento do homogenato da mucosa intestinal foi novamente adicionado 2 mL de metanol absoluto. De seguida, centrifugou-se esta mistura (mesmas condições) e o novo sobrenadante foi recolhido e adicionado ao sobrenadante anterior. Foram adicionados 500 μ L de NaOH a 6 N ao sobrenadante total e a mistura foi novamente centrifugada (mesmas condições). O sobrenadante foi recuperado e congelado a -20°C, até efectuar o doseamento da fluorescência.

2.10.4. *Quantificação da fluorescência*

As amostras do plasma sanguíneo, conteúdo intestinal e homogenatos da mucosa intestinal foram descongeladas à temperatura ambiente e a actividade fluorescente foi quantificada por espectrofluorometria. O comprimento de onda de excitação e emissão foi de 480 nm e 520 nm, respectivamente. Foram construídas curvas de calibração para o efeito (consultar Anexo V). Foi preparada uma solução-mãe de FITC a uma concentração de 1 mg/mL dissolvida numa mistura de metanol absoluto com NaOH a 6 N e, a partir desta, foram efectuadas diluições sucessivas. As soluções padrão foram centrifugadas ($3000 \times g$, 10 min) a 4°C. A fluorescência contida nas amostras foi analisada por espectrofluorometria, recorrendo a um espectrofotómetro de fluorescência (BioRad, VersaFluorTM, Marnes-la-Coquette, França).

2.11. Análise estatística

Cada valor é apresentado como a média \pm D.P.M.. As diferenças estatísticas foram avaliadas por análise da variância (ANOVA). Diferenças significativas nos valores médios foram avaliadas pelo teste de *t* de Student. Para multicomparação de grupos foram aplicados os pós-testes de Dunnett ou Bonferroni. Para um valor de *P* inferior a 0,05, considerou-se que a diferença era significativa. O programa informático utilizado foi o InStat 2.00 Macintosh software (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

As nanoesferas produzidas através do método de emulsificação/gelificação interna e revestidas por quitosano, PEG e albumina apresentaram uma distribuição granulométrica unimodal, como mostra a Figura VII-2. A Tabela VII-1 descreve a análise granulométrica e o valor do factor SPAN que, neste caso, foi de 1,69.

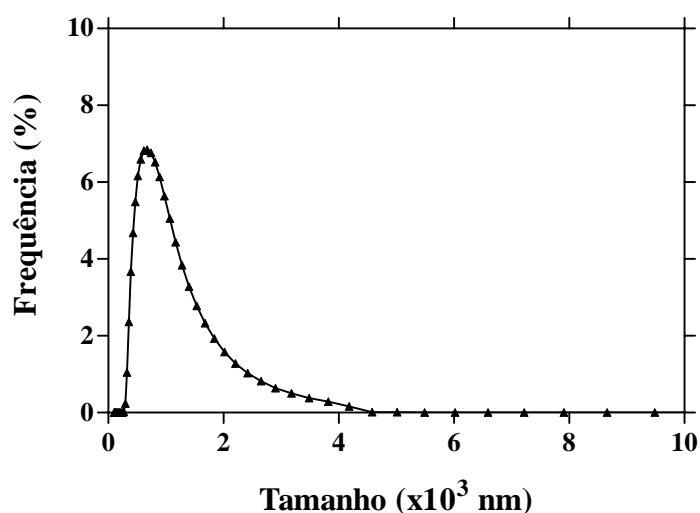


Figura VII-2. Distribuição granulométrica, em número, das nanoesferas obtidas através do método de emulsificação/gelificação interna e revestidas com quitosano, PEG e albumina.

Tabela VII-1. Características granulométricas, expressas em número, das nanoesferas obtidas através do método de emulsificação/gelificação interna e revestidas com quitosano, PEG e albumina.

D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Factor SPAN
470	812	1842	1,69

Nota: D₉₀, D₁₀ e D₅₀ são os diâmetros em número correspondente a 90%, 10% e 50% das nanoesferas de alginato totais.

3.2. Caracterização morfológica das nanoesferas

A morfologia das nanoesferas foi avaliada por SEM. A Figura VII-3 mostra a forma esférica das nanoesferas, após o revestimento com quitosano e PEG. Porém, após o revestimento com a albumina, observou-se uma alteração da morfologia. As nanoesferas perderam a sua forma esférica inicial e sofreram um processo de contração, como evidencia a Figura VII-4.

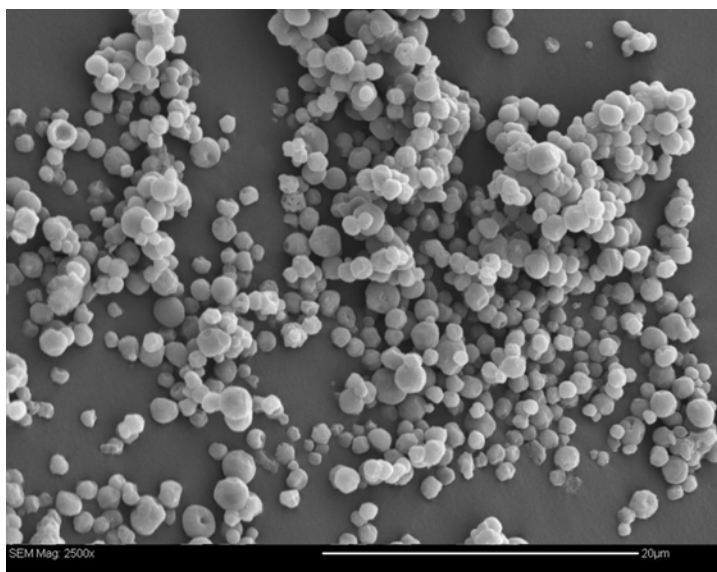


Figura VII-3. Fotografia de SEM, evidenciando a morfologia das nanoesferas contendo insulina e revestidas com quitosano e PEG (ampliação 2500 ×).

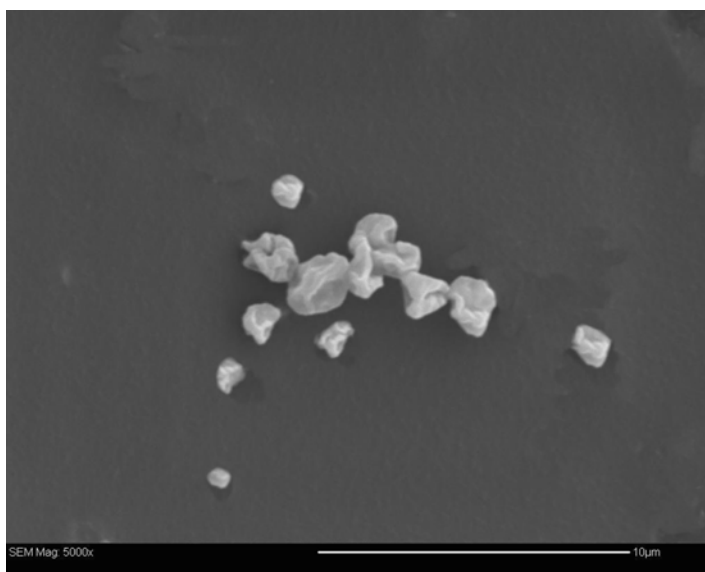


Figura VII-4. Fotografia de SEM, evidenciando a morfologia das nanoesferas contendo insulina e revestidas com quitosano, PEG e albumina (ampliação 5000 ×).

3.3. Potencial zeta das nanoesferas

O valor do potencial zeta das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina foi de $-6,65 \pm 4,31$ mV.

3.4. Eficiência de encapsulação (EE)

O valor de EE encontrado foi de $63,71 \pm 3,83\%$.

3.5. Perfil de libertação *in vitro*

O perfil de libertação da insulina, a partir da nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina, encontra-se representado na Figura VII-5. Observou-se que cerca de 25% da insulina encapsulada foi libertada durante a sua passagem pelo meio ácido (pH 1,2). Esta libertação decorreu rapidamente. Pelo contrário, a libertação de insulina, após a transferência das nanoesferas para o meio intestinal (pH 6,8), ocorreu de forma lenta até valores próximos de 70%, ao fim de 8 h de incubação.

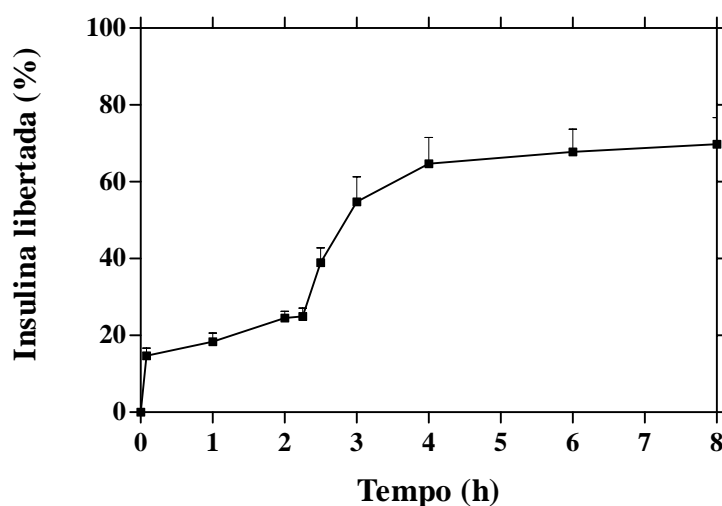


Figura VII-5. Perfil de libertação *in vitro* de insulina, a partir das nanoesferas obtidas pelo método de emulsificação/gelificação interna e revestidas com quitosano, PEG e albumina. Cada ponto corresponde à média de 3 determinações \pm D.P..

A análise do perfil de libertação da insulina a partir das nanoesferas encontra-se descrita na Tabela VII-2. O modelo matemático que mais se ajustou ao perfil de libertação das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina, e para os tempos de dissolução compreendidos entre 0-2 h e 2-8 h, foi o modelo de Baker-Lonsdale, com um coeficiente de correlação, resultante da linearização dos perfis de libertação, de 0,9614 e 0,7666, respectivamente.

Tabela VII-2. Coeficientes de correlação, r^2 , resultantes da aplicação de modelos matemáticos à curva de libertação da insulina, a partir de nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina. Os períodos de 0-2 h e 2-8 h correspondem à incubação em meio ácido a pH 1,2 e tampão fosfato de pH 6,8, respectivamente.

Modelo matemático	0-2 h	2-8 h
Ordem zero	0,6868	0,6436
Ordem um	0,4278	0,5531
Weibull	0,8477	0,7340
Higuchi (square root)	0,8251	0,7096
Korsmeyer-Peppas	0,8539	0,6854 ^a
Baker-Lonsdale	0,9614	0,7666

^aAplicação até $Q/Q_{\infty} < 60\%$.

3.6. Estabilidade enzimática na presença de pepsina

A análise por HPLC de uma solução de referência de insulina (Figura VII-6, a) e da insulina libertada das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina (Figura VII-6, b) revelou um pico cromatográfico com um tempo de retenção para a insulina próximo de 5 min. Porém, na presença de enzima, os resultados demonstraram que a solução de insulina não encapsulada foi completamente degradada após incubação enzimática, já que não foi detectada qualquer proteína ao final de 2 h de incubação (Figura VII-6, c). Pelo contrário, as nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina ofereceram uma protecção significativa à insulina encapsulada após incubação no fluido gástrico artificial a

37°C, durante 2 h (Figura VII-6, d). A percentagem de insulina não degradada determinada foi de $88,25 \pm 12,03\%$, em relação à insulina encapsulada antes da incubação enzimática. O tempo de retenção da insulina não sofreu alterações e está em concordância com o valor obtido com a solução de referência, sem esta ter sofrido acção proteolítica por parte da pepsina (Figura VII-6, a). Procedeu-se, ainda, a uma análise complementar de avaliação do potencial zeta das nanoesferas, após incubação em fluido gástrico artificial contendo pepsina, durante 2 h e a 37°C. O valor de potencial zeta das nanoesferas foi de $+20,8 \pm 2,95$ mV. Considerou-se que, a partir deste ponto, o termo de *nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina*, foi alterado para *formulação otimizada*.

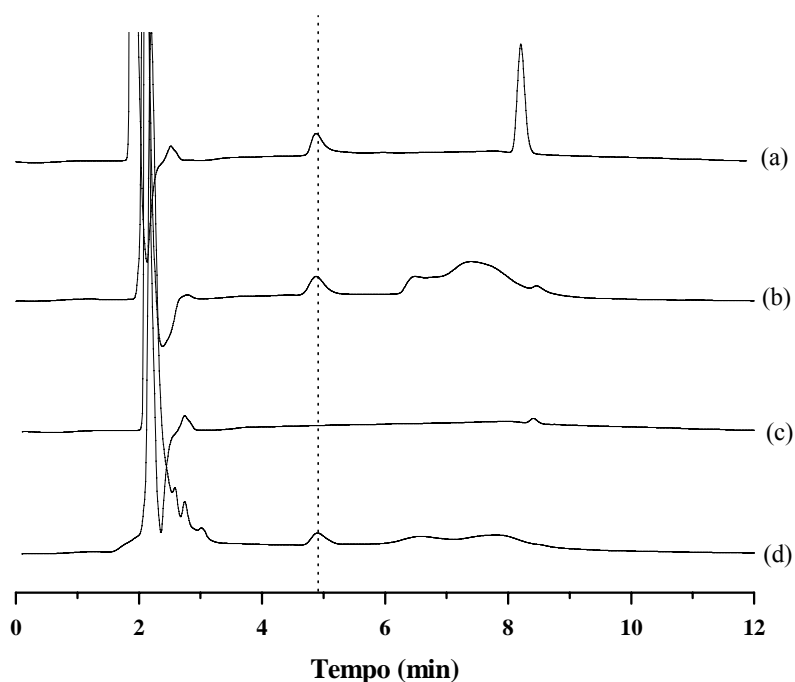


Figura VII-6. Cromatogramas de HPLC: a) solução referência (insulina não encapsulada) dissolvida em tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM mas sem prévia incubação enzimática, b) insulina libertada das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina sem prévia incubação enzimática, c) insulina não encapsulada após incubação enzimática e, finalmente, d) insulina libertada a partir das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina após incubação enzimática. O tempo de retenção da insulina foi de, aproximadamente, 5 min (linha a tracejado). O pico adicional próximo dos 8 min da solução de referência corresponde ao meta-cresol. Os cromatogramas b) e d) apresentaram, ainda, uma banda larga correspondente à albumina e esta encontra--se compreendida entre os 6 e 9 min.

3.7. Efeito terapêutico da formulação otimizada após administração a ratos diabéticos

3.7.1. Administração s.c. da formulação otimizada

Os níveis de glicemia após administração s.c. das nanoesferas com insulina e da insulina não encapsulada encontram-se representados na Figura VII-7. Ambas as formulações conduziram a uma diminuição rápida e intensa da glicemia para níveis próximos de 13% dos valores de glicemia basal, para $t = 4$ h. Posteriormente, os níveis de glucose começaram a aumentar gradualmente até alcançarem os níveis de glicemia dos ratos diabéticos administrados com a solução salina (controlo negativo). Não foram observadas diferenças entre os grupos de animais sujeitos ao tratamento com insulina. Pelo contrário, o grupo controlo negativo, administrado com solução salina, apresentou um comportamento muito diferente em relação aos grupos anteriores. Neste caso, observou-se uma diminuição ligeira dos níveis sanguíneos de glucose entre a 2^a e a 8^a h.

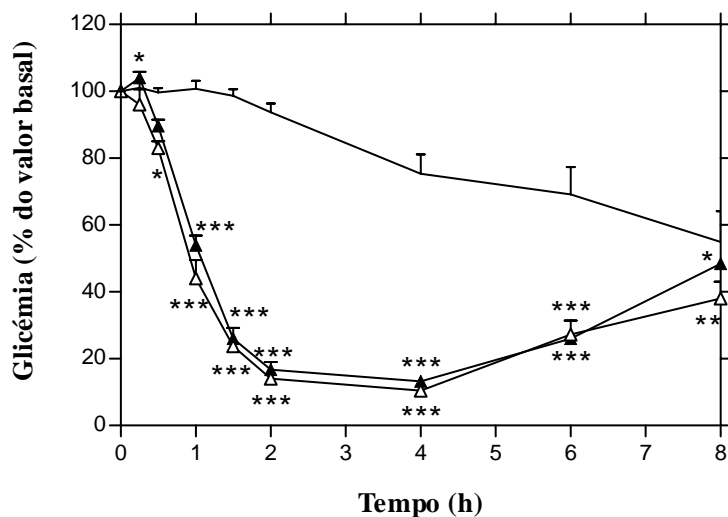


Figura VII-7. Níveis de glicemia dos ratos diabéticos após administração s.c. de: insulina não encapsulada ($-\Delta-$, $n = 6$), nanoesferas contendo insulina ($-\blacktriangle-$, $n = 7$) e NaCl a 0,9% (m/V) ($—$, $n = 9$). A dose de insulina administrada foi de 4 UI/kg. Os níveis de glicemia basal foram 327 ± 21 mg/dL. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M.. Diferenças significativas em relação à solução salina: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

3.7.2. Administração oral da formulação otimizada

3.7.2.1 Efeito terapêutico oral

O efeito terapêutico oral foi avaliado após administração oral das mesmas a ratos diabéticos em jejum. A Figura VII-8 mostra que as nanoesferas com insulina suprimiram o aumento inicial dos níveis de glicémia, observado nas primeiras horas após administração oral da suspensão das nanoesferas. Após esta fase inicial, os níveis de glicémia diminuíram de forma constante, até às 14 h após administração das nanoesferas contendo insulina, atingindo 36% da glicémia basal. Pelo contrário, as nanoesferas vazias e a solução de insulina não encapsulada não reduziram a glicémia e não foram observadas diferenças entre si.

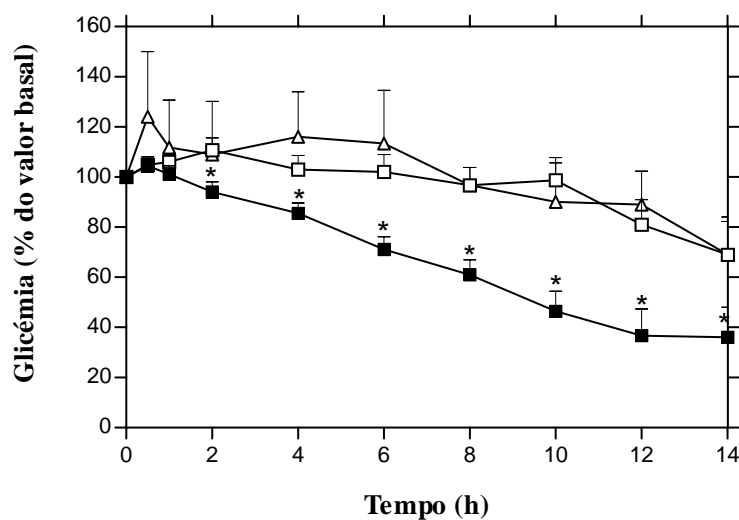


Figura VII-8. Níveis de glicémia dos ratos diabéticos após administração oral de: insulina não encapsulada (—△—, n = 6), nanoesferas contendo insulina (—■—, n = 9) e nanoesferas vazias (—□—, n = 9). A dose de insulina administrada foi de 50 UI/kg. Os níveis de glicémia basal foram 338 ± 24 mg/dL. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M.. Diferenças significativas em relação à insulina não encapsulada e nanoesferas vazias: * $P < 0,05$.

3.7.2.2 Efeito dose-resposta

Com o objectivo de verificar se o efeito na glicémia das nanoesferas era dependente ou não da dose de insulina administrada oralmente, foram estudadas três doses diferentes de insulina (25, 50 e 100 UI/kg). A Figura VII-9 mostra que o efeito oral das nanoesferas foi dependente da dose de insulina administrada.

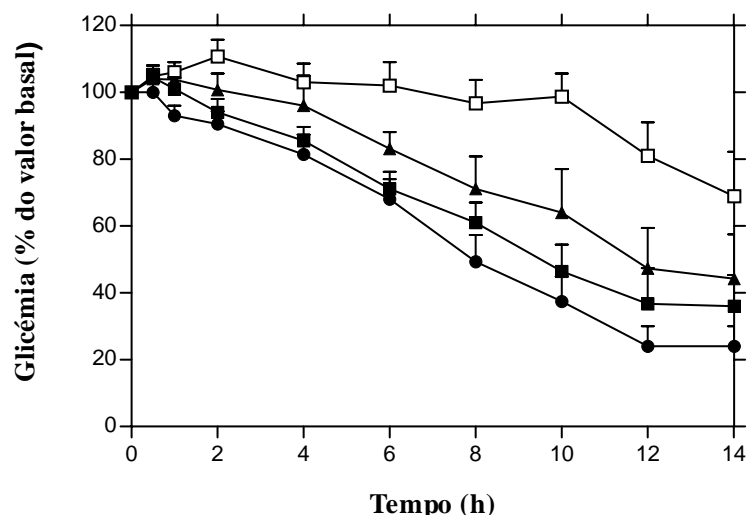


Figura VII-9. Níveis de glicémia dos ratos diabéticos após administração oral das nanoesferas contendo insulina a 25 UI/kg (—▲—, n = 8), 50 UI/kg (—■—, n = 9), 100 UI/kg (—●—, n = 8) e das nanoesferas vazias (—□—, n = 9). Os níveis de glicémia basal foram 390 ± 21 mg/dL. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M..

A dose de insulina mais baixa, 25 UI/kg, foi eficaz 6 h após a administração (-18%, $P < 0,05$), enquanto que as doses mais elevadas (50 UI/kg e 100 UI/kg) reduziram a glicémia, logo após as 4 h de administração oral, em comparação com as nanoesferas vazias ($P < 0,05$).

Entre a 10^a e a 14^a h, foi observada uma ligeira diminuição dos níveis de glicémia para todos os grupos, incluindo o grupo de ratos com nanoesferas vazias. Porém, os níveis de glicémia deste último grupo foram sempre superiores ao valor observado para as nanoesferas com insulina, independentemente da dose de insulina em estudo. Esta diminuição dos níveis de glicémia foi atribuída ao efeito do jejum.

Decorridas 14 h de ensaio, os ratos diabéticos foram alimentados. Após 24 h da administração oral das nanoesferas, a glicémia dos respectivos animais manteve-se baixa, especificamente a -33 e -38% ($P < 0,05$) para nanoesferas contendo insulina a 50 e 100 UI/kg,

em relação aos ratos diabéticos tratados com nanoesferas vazias. Pelo contrário, as nanoesferas com insulina a 25 UI/kg não demonstraram um efeito significativo na glicemia 24 h após a sua administração (-21%), em relação aos ratos diabéticos tratados com nanoesferas vazias.

3.7.2.3 Prova de tolerância à glucose oral (PTGO)

Um outro ensaio para avaliar o efeito terapêutico das nanoesferas contendo insulina foi a PTGO. Verificou-se que, após administração oral de uma solução aquosa de glucose concentrada (2 g/kg peso corporal), os níveis de glicemia dos ratos que tinham sido previamente administrados com nanoesferas vazias aumentou significativamente, até um valor máximo de 347% ($P < 0,001$) em relação ao valor basal após 40 min da administração da glucose, como se verifica na Figura VII-10. Posteriormente, a glicemia diminuiu até aos 180 min de ensaio, atingindo um valor de 227% do valor de glicemia basal.

No caso dos ratos diabéticos administrados com as nanoesferas contendo insulina (50 UI/kg), os níveis de glicemia também aumentaram, mas em menor extensão, atingindo apenas 246% do valor de glicemia basal, após o mesmo período de tempo (40 min com $P < 0,001$). Neste último caso, a diminuição desse valor processou-se de forma lenta e atingiu-se um valor de 165% do valor de glicemia basal.

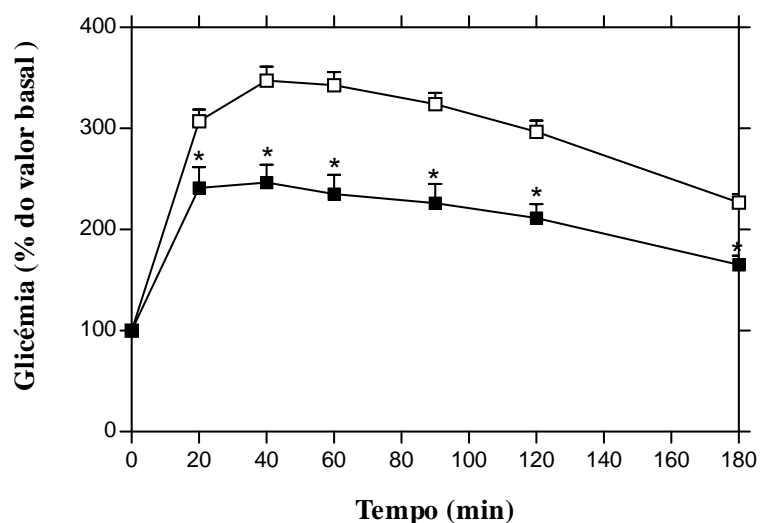


Figura VII-10. Níveis de glicemia dos ratos diabéticos em jejum após administração, em dose única, de uma solução aquosa de glucose (2 g/kg de peso corporal) decorridas 10 h da administração oral, em dose única, de nanoesferas contendo insulina a 50 UI/kg (—■—, n = 12) e nanoesferas vazias (—□—, n = 10). O valor da glicemia basal antes da administração das nanoesferas com e sem insulina foi de 492 ± 23 mg/dL. Esse valor sofreu uma diminuição significativa para 155 ± 16 mg/dL 10 h após a administração das nanoesferas com insulina e antes da administração da solução aquosa de glucose. Cada valor representa a média \pm D.P.M.. *Diferenças significativas em relação às nanoesferas vazias, com $P < 0,05$.

3.7.2.4 Determinação da insulinemia e biodisponibilidade

Um dos principais e mais importantes parâmetros biofarmacêuticos que permite avaliar o efeito biológico *in vivo* de um produto farmacêutico, neste caso das nanoesferas contendo insulina, é o cálculo da biodisponibilidade.

Os resultados obtidos neste ensaio evidenciaram um aumento significativo dos valores residuais de insulinemia nos ratos diabéticos após administração das nanoesferas contendo insulina, como mostra a Figura VII-11. O valor máximo foi atingido 4 h após administração oral das nanoesferas, tendo sido sete vezes superior ao valor basal. Especificamente, o valor de insulinemia basal foi de $35,0 \pm 8,2$ μ U/mL ($t = 0$) e aumentou para $250,8 \pm 19,4$ μ U/mL ($P < 0,001$) quando $t = 4$ h. A insulinemia manteve-se elevada 8 h após a administração das nanoesferas contendo insulina com um valor de $149,4 \pm 12,7$ μ U/mL ($P < 0,001$) e aumentou 12 h após para $225,1 \pm 20,2$ μ U/mL ($P < 0,001$).

A biodisponibilidade foi determinada após o cálculo da AUC, segundo o método dos trapézios (ver Tabela VII-3), tendo sido encontrado um valor de 34,34%, relativamente à insulina s.c..

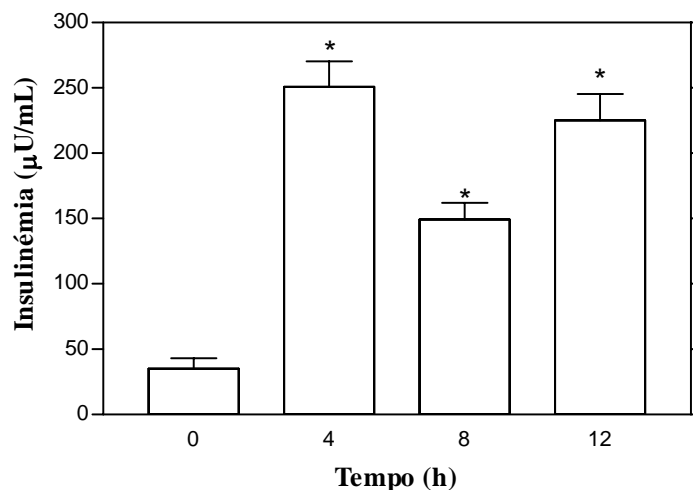


Figura VII-11. Níveis de insulina plasmática dos ratos diabéticos após administração oral das nanoesferas contendo insulina (50 UI/kg) (n = 14). Os valores de insulinemia basal foram $35,0 \pm 8,2 \mu\text{U}/\text{mL}$. Cada valor representa a média \pm D.P.M.. *Diferenças significativas em relação ao valor de insulina plasmática basal (t = 0), com $P < 0,05$.

Tabela VII-3. Biodisponibilidade oral da insulina encapsulada em nanoesferas, em ratos diabéticos, relativamente à insulina não encapsulada (10 UI/kg) administrada pela via s.c..

Via de administração	Dose (UI/kg)	AUC _{0-8 h} (% valores basais \times h)	Biodisponibilidade oral (%)
S.C.	10	3061	
Oral	50	5256	34,34

3.8. Estudos da absorção intestinal da formulação otimizada após administração *in situ* a ratos diabéticos

3.8.1. Visualização da captação intestinal da formulação otimizada

A insulina foi sujeita a um processo de marcação com FITC, tendo este sido realizado com sucesso. A insulina marcada foi então encapsulada, seguindo o protocolo normal de preparação das nanoesferas.

A solução de insulina-FITC não encapsulada foi administrada *in situ* num segmento intestinal isolado. Nos primeiros minutos, não se observou fluorescência no lúmen e nas vilosidades intestinais mas, ocasionalmente, foi observado, ao longo do ensaio, material fluorescente nos domínios das placas de Peyer. Pelo contrário, no caso das nanoesferas contendo insulina-FITC, quando estas foram administradas *in situ* num segmento intestinal isolado observou-se uma forte fluorescência, no lúmen intestinal, após 5 min, como mostra a Figura VII-12 a. Contudo, foi observado um caso particular de presença de fluorescência nas placas de Peyer (um dos seis animais em estudo) (Figura VII-12, b).

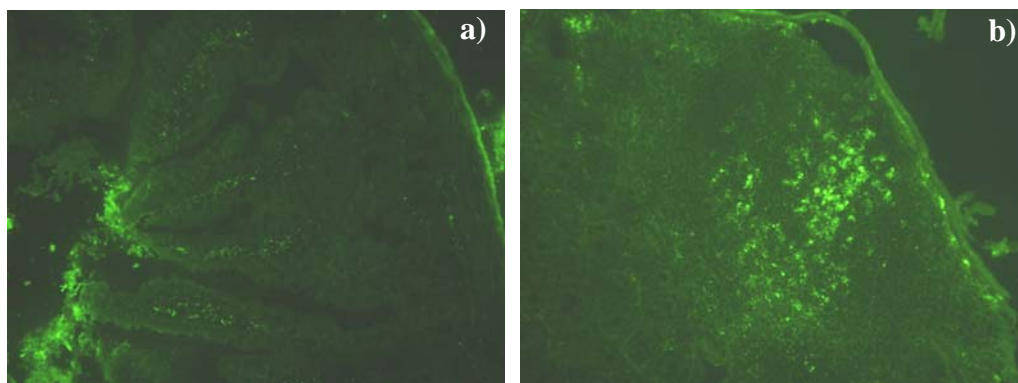


Figura VII-12. Microscopia de fluorescência de tecido intestinal isolado, 5 min após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC. A fotografia a) evidencia o lúmen intestinal. A fotografia b) mostra um caso particular onde foi observada actividade fluorescente nas placas de Peyer. Ampliação: a) 100 e b) 200 \times .

Com a formulação otimizada, a interiorização da fluorescência no segmento intestinal isolado foi aumentando gradualmente com o tempo. A fluorescência máxima foi visualizada 30 min após a administração *in situ*. Durante este período de tempo, observou-se que o material fluorescente aderiu fortemente à parte apical das vilosidades, apresentando um aspecto de filme muito próximo dos enterócitos (Figura VII-13, a). Identicamente, foi observada uma forte fluorescência ao longo das vilosidades intestinais, o que pode reflectir, de alguma forma, a presença de material fluorescente nas estruturas vasculares (Figura VII-13, b-d).

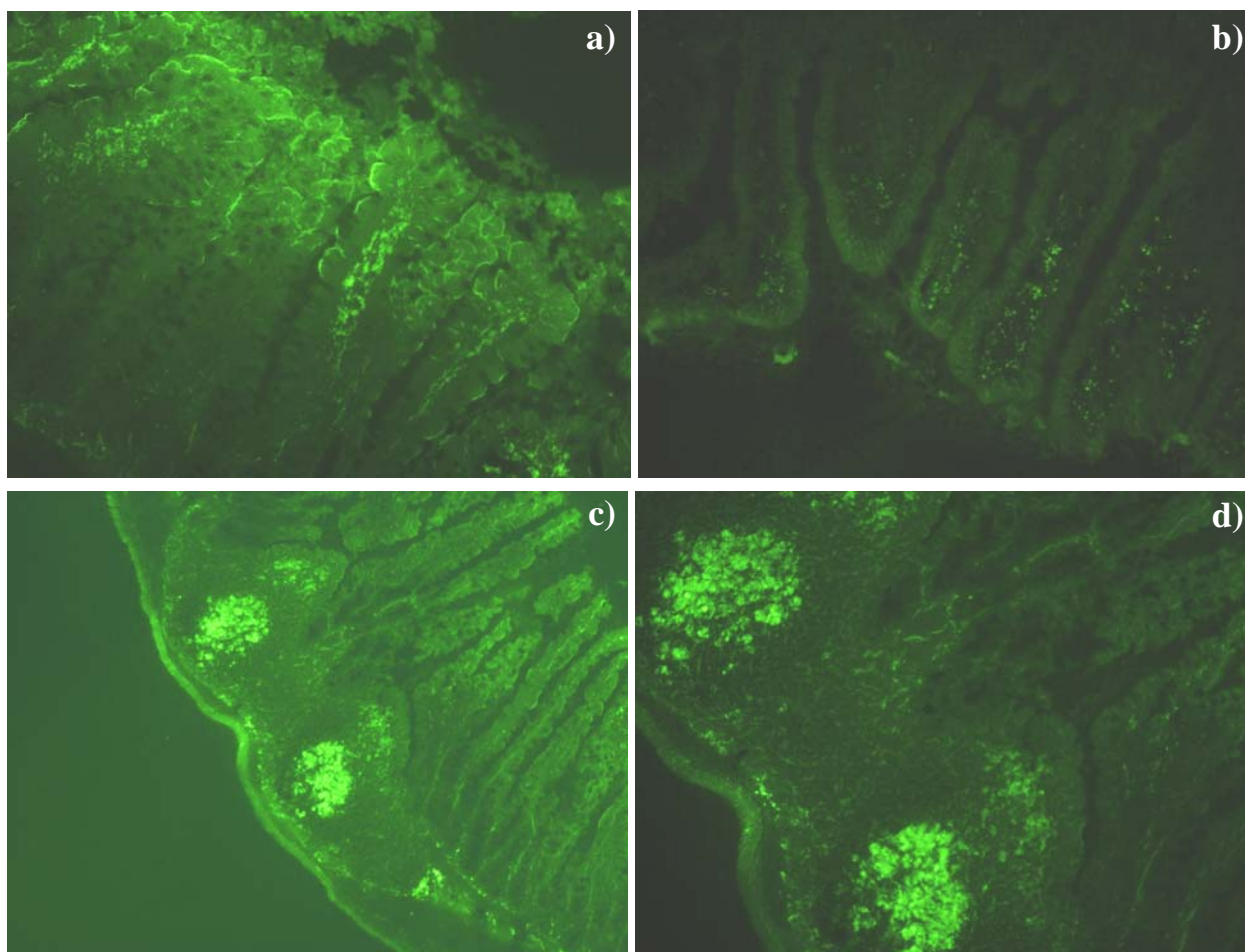


Figura VII-13. Microscopia de fluorescência de tecido intestinal isolado, 30 min após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC. A fotografia a) mostra o filme de material fluorescente nos enterócitos. As restantes fotografias (b-d) mostram uma captação do material fluorescente por parte das placas de Peyer e por parte das estruturas vasculares, ao longo das vilosidades. Ampliação: a) 200; b) 200; c) 100 e d) 200 \times .

A fluorescência também foi evidente nas vilosidades intestinais, ao final de 1 h, como demonstra a Figura VII-14. Porém, a fluorescência começou a diminuir de intensidade decorridas 2 h (Figura VII-15) e 4 h (Figura VII-16) da administração *in situ*. Finalmente, a intensidade da fluorescência diminuiu drasticamente, ao final de 8 h, após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC (Figura VII-17).

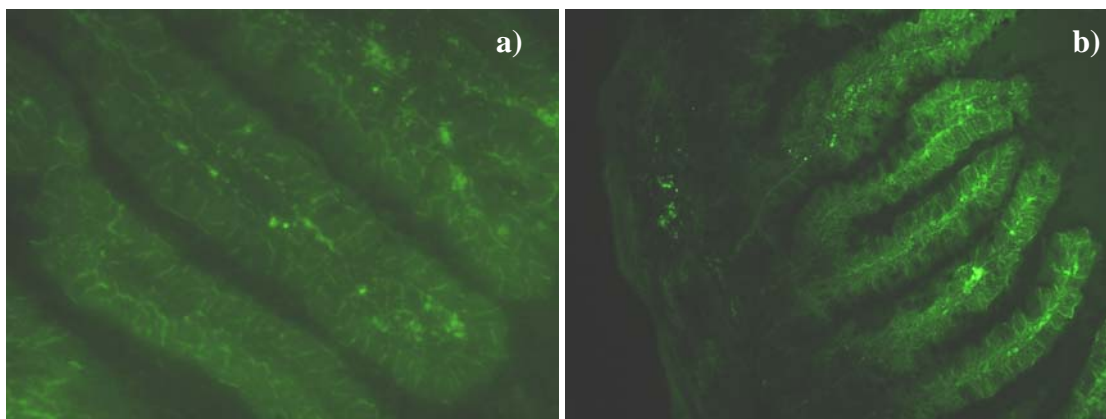


Figura VII-14. Microscopia de fluorescência de tecido intestinal isolado 1 h após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC. As fotografias a) e b) mostram uma captação do material fluorescente, ao longo das vilosidades, por parte das estruturas vasculares próximas da camada muscular mucosa. Ampliação: a) 400 e b) 200 \times .

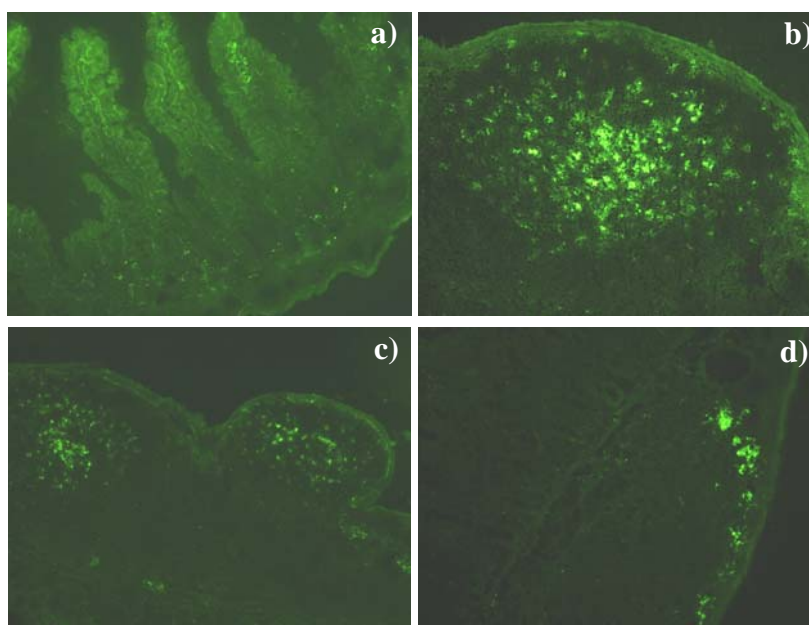


Figura VII-15. Microscopia de fluorescência de tecido intestinal isolado 2 h após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC. As fotografias (a-c) mostram uma diminuição de intensidade de fluorescência nas vilosidades intestinais e nas placas de Peyer. A fotografia d) mostra algumas estruturas vasculares na *lamina propria*, próximo da camada muscular da mucosa intestinal, com uma fluorescência forte. Ampliação: a) 200; b) 400; c) 100 e d) 200 \times .

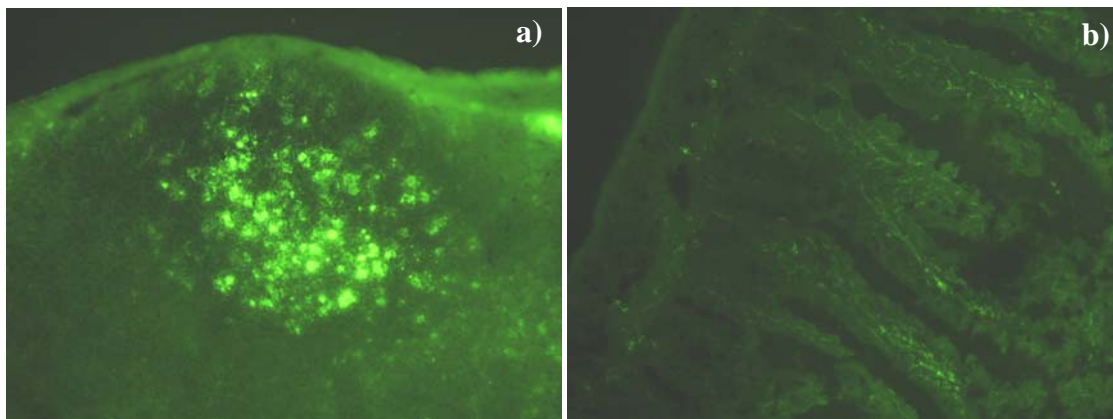


Figura VII-16. Microscopia de fluorescência de tecido intestinal isolado 4 h após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC. Na fotografia a), observa-se, ainda, a presença de fluorescência nas placas de Peyer. Ampliação: a) 400 e b) 200 ×.

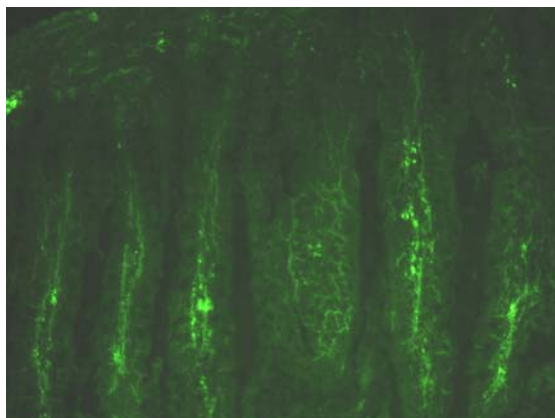


Figura VII-17. Microscopia de fluorescência de tecido intestinal isolado 8 h após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC. Ampliação: 200 ×.

Outra técnica utilizada para a avaliação da presença de material fluorescente na mucosa intestinal foi a microscopia confocal de varrimento laser. Esta técnica relaciona a presença de fluorescência com a sua localização, em termos de profundidade. A Figura VII-18 mostra a presença de pontos fluorescentes com uma localização relativamente profunda no tecido intestinal.

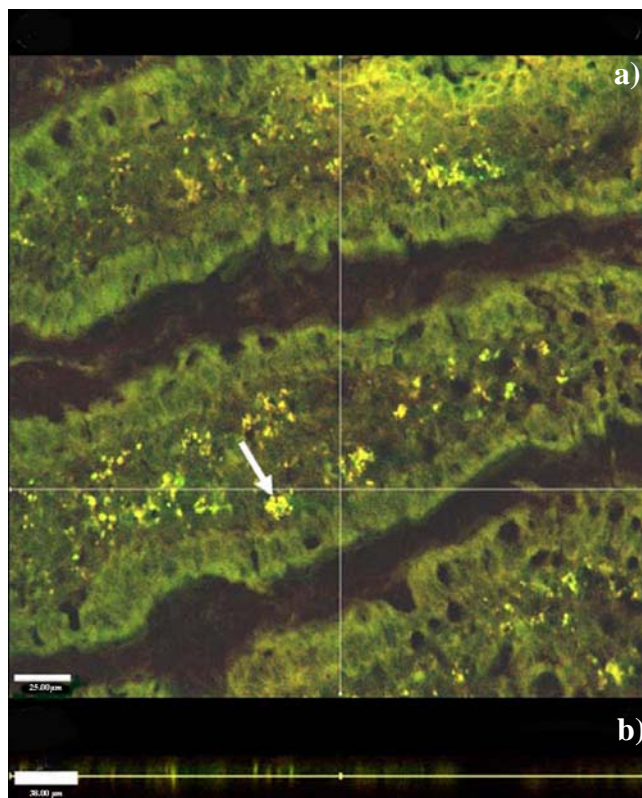


Figura VII-18. Microscopia confocal de varrimento laser do tecido intestinal isolado, em particular as vilosidades intestinais, 30 min após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC. A marcação fluorescente (seta branca) representa as nanoesferas contendo insulina localizadas no centro das vilosidades. As linhas indicam o local onde foram obtidas e analisadas as fotografias. As barras nas fotografias representam 25 µm em a) e 38 µm em b).

3.8.2. *Quantificação da captação intestinal da formulação otimizada*

A actividade fluorescente do plasma, conteúdo intestinal e homogenatos da mucosa foi quantificada por espectrofotometria de fluorescência.

Como se verifica na Figura VII-19, a fluorescência do plasma sanguíneo recolhido através da veia mesentérica aumentou significativamente ao longo do tempo, principalmente, 4 e 8 h após administração *in situ* das nanoesferas, relativamente ao tempo 5 min ($P = 0,0005$).

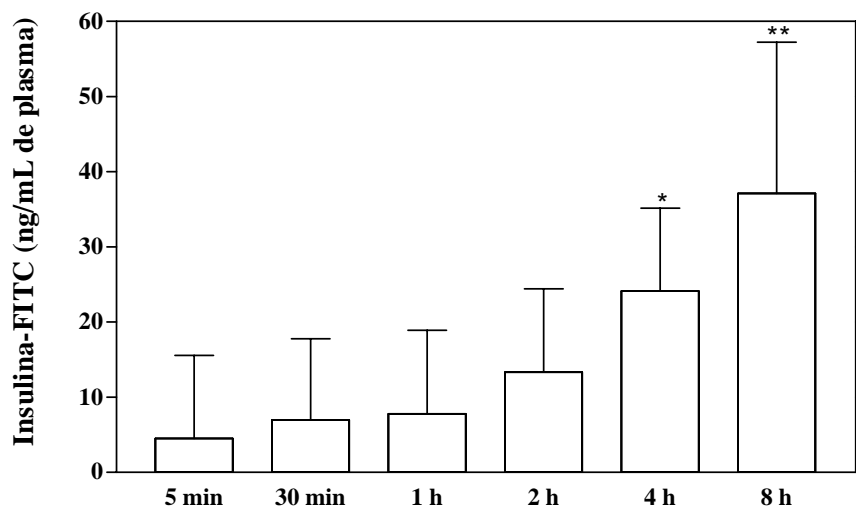


Figura VII-19. Concentração de insulina-FITC no plasma sanguíneo após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC (50 UI/kg). Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. (por grupo $n = 6$). Diferenças significativas em relação ao tempo 5 min: * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Por outro lado, observou-se que a forte fluorescência no conteúdo intestinal diminuiu ligeiramente com o tempo, como representado na Figura VII-20.

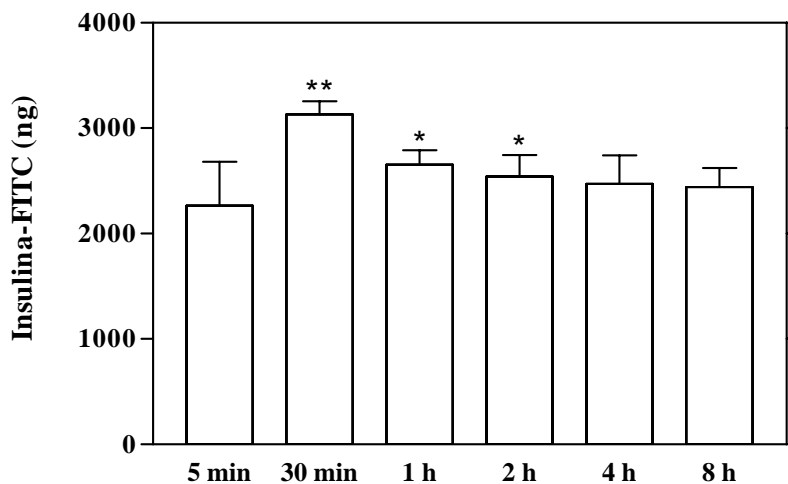


Figura VII-20. Quantidade de insulina-FITC no conteúdo intestinal após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC (50 UI/kg). Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. (por grupo $n = 6$). Diferenças significativas em relação ao tempo 5 min: * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Pelo contrário, e de acordo com a Figura VII-21, a fluorescência da mucosa aumentou progressivamente com o tempo e atingiu o seu valor máximo ao fim de 8 h de administração

in situ ($P < 0,0001$). Observou-se, ainda, que as nanoesferas aderiram fortemente à mucosa intestinal, como mostra a Figura VII-22. O peso da mucosa foi flutuante, tendo sido observado o menor valor às 8 h, após administração das nanoesferas contendo insulina-FITC (Figura VII-23).

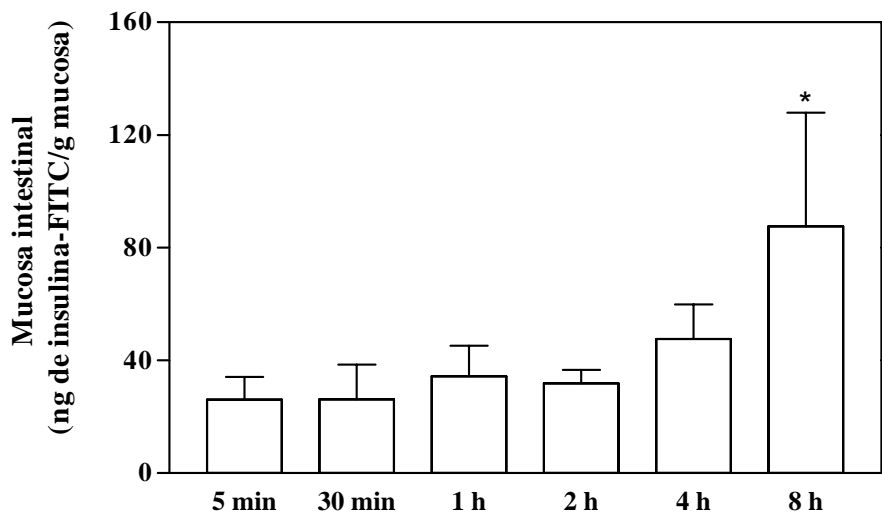


Figura VII-21. Concentração da insulina-FITC na mucosa intestinal após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC (50 UI/kg). Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. (por grupo $n = 6$). Diferenças significativas em relação ao tempo 5 min: $*P < 0,01$.



Figura VII-22. Fotografia da mucosa intestinal. As zonas ligeiramente mais claras correspondem às nanoesferas contendo insulina-FITC fortemente aderidas à mucosa intestinal.

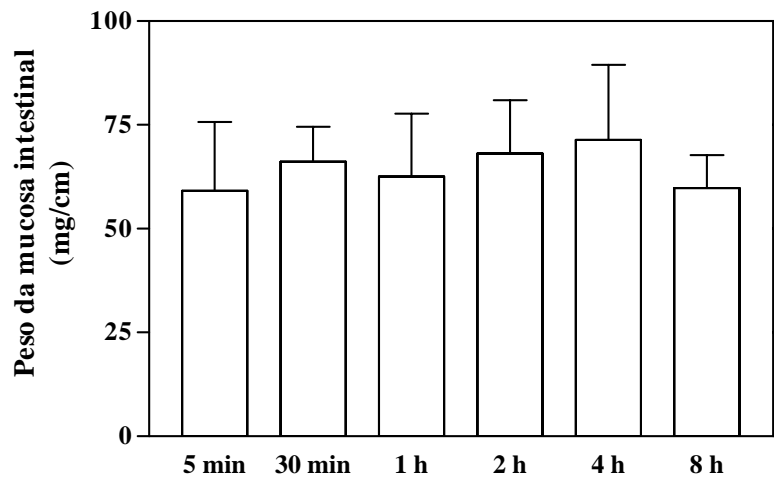


Figura VII-23. Peso da mucosa intestinal por unidade de comprimento do segmento intestinal isolado após administração *in situ* das nanoesferas contendo insulina-FITC (50 UI/kg). Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. (por grupo $n = 6$).

4. DISCUSSÃO

4.1. Caracterização granulométrica das nanoesferas

A análise granulométrica das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina permitiu, mais uma vez, confirmar a presença de partículas poliméricas de dimensões reduzidas. Além disso, no trabalho do presente capítulo, em relação ao anterior capítulo, verificou-se que a inclusão do PEG na formulação provocou um ligeiro aumento no diâmetro das partículas (por exemplo, o valor do D_{10} aumentou de 392 nm para 470 nm, o valor do D_{50} aumentou de 677 nm para 812 nm e o valor do D_{90} aumentou de 1402 nm para 1812 nm). Mesmo assim, a granulometria obtida situa-se muito abaixo do limite granulométrico máximo (10 μm), que é geralmente associado a uma maior captação intestinal das partículas. Tal como tem vindo a ser referido na presente dissertação, o tamanho reduzido das nanoesferas oferece distintas vantagens no que concerne à adesão e à interacção com a mucosa intestinal e à captação a nível intracelular (Win e Feng, 2005). Variadíssimos estudos apontam para uma forte relação entre a facilidade de captação celular e o tamanho reduzido das partículas (Lowe e Temple, 1994; Desai *et al.*, 1996; Hussain, 2001; Prabha *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2005; Katare *et al.*, 2005; Win e Feng, 2005). Esta relação tem igualmente bases matemáticas, como referido pela Equação II-1, em que se reporta uma relação inversamente proporcional entre o diâmetro e o número de partículas captadas, quer pelo tecido intestinal linfóide (placas de Peyer) quer pelo tecido intestinal não linfóide (Desai *et al.*, 1996) e, pela Equação II-2, em que se sugere uma outra relação entre a granulometria e a difusão da partícula, através da mucina intestinal segundo a lei de Stokes-Einstein. Em suma, verifica-se que, em todos os estudos acima citados, ligeiras diferenças na granulometria das partículas poliméricas podem condicionar a ausência ou a presença de uma resposta terapêutica para formulações administradas oralmente e cuja acção depende da passagem para a corrente sanguínea através da mucosa intestinal.

4.2. Caracterização morfológica das nanoesferas

As nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e PEG demonstraram uma forma esférica, mas, o revestimento com albumina alterou a morfologia das nanoesferas, que se mostraram disformes e mais contraídas. Estes resultados suportam a hipótese lançada no capítulo anterior, onde foi descrito que a diminuição da granulometria das nanoesferas, após o revestimento com albumina, parece estar associada à própria estrutura elipsoidal da albumina (Akiyoshi *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 2001). Assim, esta estrutura permitiria uma maior facilidade de difusão da albumina nas nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e, conseqüentemente, resultaria numa interacção facilitada entre a albumina e a membrana de revestimento e matriz polimérica, com uma possível contracção estrutural.

4.3. Potencial zeta

Para além do tamanho da partícula, a carga eléctrica à superfície da partícula é outro factor que influencia, em grande medida, a captação intestinal das partículas, nomeadamente em termos de mucoadesividade (Kumar *et al.*, 2004). A mucoadesividade das partículas pode ser geralmente aumentada pela presença de um potencial zeta positivo, uma vez que o muco intestinal a pH neutro se comporta como um polielectrólito aniónico. Conseqüentemente, a presença de grupos positivos nas partículas pode favorecer essa interacção entre o muco e as partículas (El-Shabouri, 2002). No capítulo anterior foi descrito que o segundo revestimento com albumina conferiu carga eléctrica negativa às nanoesferas. No presente trabalho observou-se que a incorporação de PEG alterou ligeiramente essa carga eléctrica negativa.

O PEG é um polímero não iónico e flexível (Zhu *et al.*, 2007) e, pelo facto de estar ligado ao quitosano, pensa-se que poderá alterar o plano da camada de difusão da nanoesfera (Tobío *et al.*, 2000; Yoncheva *et al.*, 2005). Desta forma, o quitosano ficaria mais distendido, contrabalançando a carga negativa do revestimento com albumina e tornando-se a carga negativa menos intensa.

O efeito da incorporação de PEG no potencial zeta obtido no presente trabalho, encontra-se em conformidade com estudos anteriores, apesar de estes envolverem outros polímeros para além do PEG. Por exemplo, no estudo desenvolvido por Tobío e colaboradores (Tobío *et al.*, 2000) foi demonstrado que o potencial zeta inicial de nanopartículas de PLA foi próximo de -44 mV mas que, após incorporação de PEG nas nanopartículas, esse valor aumentou para -14 mV. Num outro estudo, que envolveu um sistema semelhante de nanopartículas de PLA, foi observado que o potencial zeta inicial estava compreendido entre -40 e -50 mV e, após incorporação de PEG nas nanopartículas de PLA, esse valor ficou compreendido entre -15 a -25 mV (Vila *et al.*, 2004). Um outro estudo que envolveu um sistema diferente de nanopartículas, nanopartículas de ácido poli(metilviniléter-co-maleico anidrido), apresentou um potencial zeta de -58 mV, que, após a incorporação de PEG, se alterou para -44 mV (Yoncheva *et al.*, 2005).

Por outro lado, analisando os resultados do potencial zeta, seria de esperar que a probabilidade de mucoadesão das nanoesferas a nível intestinal fosse baixa após o revestimento com albumina. Porém, esta hipótese pode ser alterada devido ao papel importante que a albumina representa como revestimento. Como referido no capítulo anterior, a principal função da albumina, como segundo material de revestimento, incidiu exclusivamente na prevenção do ataque proteolítico da insulina durante a passagem gástrica por acção da pepsina. Foi, anteriormente, sugerido que a albumina deveria actuar como “alvo enzimático”, impedindo a insulina de ser degradada pela pepsina. Ora, o valor positivo do potencial zeta das nanoesferas obtido após incubação com a pepsina pode, efectivamente, suportar a hipótese anterior. Esta alteração na carga das nanoesferas pode favorecer a mucoadesão à mucosa intestinal, o que foi confirmado após a realização dos ensaios de visualização das nanoesferas no segmento intestinal isolado. Neste ensaio, foi observada a existência de nanoesferas fortemente aderidas à mucosa intestinal.

Por outro lado, estima-se que a presença de uma elevada densidade de carga eléctrica (positiva ou negativa), como se verificou após a incubação com a pepsina, poderá também influenciar a estabilidade das mesmas partículas. É descrito que a repulsão electrostática entre

as partículas com a mesma carga previne a agregação das partículas e aumenta a estabilidade das mesmas (Kumar *et al.*, 2004).

4.4. Eficiência de encapsulação (EE)

O valor relativamente baixo da EE de insulina após incorporação de PEG analisado foi semelhante ao valor obtido com a formulação apresentada no capítulo anterior. Tal facto reforça, principalmente, a hipótese lançada no mesmo capítulo, onde foi referido que o prolongamento do período de revestimento (mais 30 min), sob agitação magnética (100 rpm), pode ter conduzido a uma maior difusão da insulina encapsulada para o meio circundante em relação às nanoesferas revestidas apenas com quitosano e, por conseguinte, ser este, o factor principal responsável pela diminuição da EE de insulina. A hipótese relacionada com a competição entre as espécies químicas envolvidas pode ter igualmente ocorrido. Por outro lado, o facto do valor de EE ser semelhante ao da formulação apresentada no capítulo anterior demonstra também que o PEG não influenciou a EE da insulina.

4.5. Perfil de libertação *in vitro*

O perfil de libertação da insulina das nanoesferas revestidas com quitosano, PEG e albumina evidenciou uma ligeira libertação de insulina (< 25%) em meio ácido (pH 1,2), provavelmente devido à difusão da insulina para a superfície quando foi aplicado o revestimento. A explicação é semelhante à que foi sugerida para a EE. De facto, durante revestimento das nanoesferas, pode ter ocorrido maior difusão da insulina encapsulada para o meio circundante e/ou superfície da nanoesfera, graças ao maior período de revestimento e ao aumento da competição química entre as espécies envolvidas e não à presença ou não de PEG. A percentagem de libertação de insulina a partir das nanoesferas em meio ácido com ou sem PEG foi semelhante.

O perfil de libertação de insulina a pH 1,2 encontrou-se próximo do modelo de Baker-Lonsdale. Este modelo é, geralmente, utilizado para a linearização de ensaios de

libertação de formulações de microesferas ou microcápsulas (Costa, 2002) e está, normalmente, associado a processos de difusão através de uma matriz esférica.

O tempo de dissolução do alginato no meio neutro foi muito semelhante ao perfil obtido com as nanoesferas apenas com quitosano, como foi referido no Capítulo V. Mas, neste caso, o perfil de libertação da insulina manteve-se mais próximo do modelo de Baker-Lonsdale.

4.6. Estabilidade enzimática na presença de pepsina

Os resultados deste ensaio demonstraram o efeito protector que as nanoesferas exercem sobre a insulina na presença da pepsina. Existem poucos trabalhos que abordam a problemática do ataque proteolítico, embora, por exemplo, um estudo desenvolvido por Onal e Zihnioglu, que compreendeu a preparação de macroesferas de alginato revestidas com quitosano, a percentagem de resistência enzimática foi apenas de 5,8% (Onal e Zihnioglu, 2002). As diferenças obtidas relativamente ao presente trabalho poderão estar relacionadas com a composição das partículas poliméricas e a metodologia de preparação das mesmas.

No presente trabalho, observou-se que uma percentagem elevada de insulina encapsulada não foi degradada. Tendo em conta os resultados anteriores do perfil de libertação *in vitro*, sabe-se que menos de 25% da insulina foi libertada após 2 h de incubação em meio ácido mas sem pepsina. Por isso, cerca de 75% de insulina manteve-se encapsulada 2 h após incubação em meio ácido, e só 45% da insulina encapsulada foi libertada após 6 h em tampão fosfato de pH 6,8.

Já com pepsina, os resultados da estabilidade enzimática demonstram que cerca de 90% da insulina encapsulada resistiu à pepsina. Por tudo isto, é de supor que uma fracção significativa de insulina consiga transpor a barreira gástrica devido ao efeito protector das nanoesferas e alcance o seu local de absorção.

O mecanismo de resistência proteolítica é complexo, mas pensa-se que este poderá estar relacionado com acção estabilizadora da estrutura da nanoesfera por parte da albumina e do PEG. Se por um lado, a albumina funcionaria como “alvo enzimático da pepsina”, como se

constatou no capítulo anterior, a introdução do PEG pode ter aumentado a compactação da estrutura polimérica da nanoesfera, estabilizando-a. A função estabilizadora do PEG em polímeros encontra-se descrita na literatura (Prego *et al.*, 2006). Um estudo desenvolvido por Tobío e colaboradores demonstrou a função estabilizadora do PEG em nanopartículas de PLA (Tobío *et al.*, 2000). Os valores obtidos foram elucidativos: na presença de pepsina foram recuperadas cerca de 10% de nanopartículas compostas apenas por PLA contendo um antígeno, enquanto que, na presença de PEG, foram recuperadas cerca de 90% das nanopartículas. Por outro lado, é igualmente descrito que o PEG tem uma função de “repelente para proteínas”, por exemplo, para a pepsina e pancreatina (Yoncheva *et al.*, 2005) e, por conseguinte, poderia ter sido também esta a razão para a maior protecção enzimática à insulina encapsulada observada no presente trabalho.

4.7. Efeito terapêutico da formulação otimizada após administração a ratos diabéticos

Os resultados apresentados no presente capítulo demonstraram que as nanoesferas de alginato, reforçadas com sulfato dextrano e revestidas com quitosano, PEG e albumina protegeram a insulina do ataque proteolítico da pepsina em cerca de 90%, preservaram a actividade biológica da insulina e reduziram a glicémia em ratos diabéticos, quando administradas oralmente.

A redução dos níveis de glicémia foi dependente da dose de insulina. Por outro lado, este efeito foi prolongado, pelo menos durante 24 h, com o efeito máximo observado 14 h após administração oral.

A melhoria da resposta fisiológica à administração de uma solução aquosa de glucose concentrada confirmou a eficácia da insulina quando encapsulada em nanoesferas. A PTGO é considerada um teste de rotina muito utilizado no despiste da Diabetes gestacional em humanos. Neste caso concreto, a realização desta prova permitiu avaliar a rapidez com que a glucose sofreu depuração ou *clearance* do sangue. A administração prévia das nanoesferas contendo insulina conduziu a uma atenuação do aumento dos níveis de glicémia após

administração oral da solução de glucose, comparativamente com as nanoesferas vazias, o que significa dizer que a glucose foi depurada mais rapidamente do sangue dos animais com nanoesferas contendo insulina.

Associado ao efeito na glicemia, foi igualmente observado que os níveis plasmáticos de insulina aumentaram significativamente (sete vezes superior em relação ao valor inicial) após administração oral das nanoesferas contendo insulina, indicando que a insulina foi protegida e absorvida pela mucosa intestinal. O valor de insulinemia residual observado está provavelmente associado a reações cruzadas com a insulina do rato, isto porque, apesar da STZ ser considerada um bom agente químico para induzir a diabetes, esta não assegura a destruição total das células β pancreáticas. Por isso, mesmo com os ratos diabéticos pode ser observada uma produção residual de insulina. Além disso, os níveis residuais de insulinemia após administração oral de nanoesferas contendo insulina foram semelhantes a níveis já anteriormente observados em ratos tratados com nanoesferas vazias ou com insulina não encapsulada. Portanto, o aumento da insulinemia observado após o início do ensaio deve-se exclusivamente à insulina administrada exogenamente.

A biodisponibilidade oral da insulina foi de 34%. Considera-se um valor muito favorável e comparativamente superior a outros valores descritos em trabalhos anteriores (Lowman *et al.*, 1999; Carino *et al.*, 2000; Gowthamarajan e Kulkarni, 2003; Cui *et al.*, 2006; Damgé *et al.*, 2007).

Sabemos que, para aumentar a absorção intestinal de péptidos, em especial da insulina associada às nanopartículas, a investigação pode seguir várias estratégias: (i) mucoadesão, (ii) endocitose da partícula e (iii) aumento de permeabilidade intestinal (Rieux *et al.*, 2006). De facto, o presente trabalho tentou reunir as três situações anteriores.

As propriedades mucoadesivas do alginato, mas principalmente do quitosano e PEG, poderão ter promovido a adesão e a subsequente absorção da insulina por parte dos enterócitos. O mecanismo de mucoadesão do quitosano e do PEG é diferente. O quitosano geralmente liga-se às células epiteliais da membrana através de um mecanismo dependente da carga, resultando uma despolimerização da actina-F e alteração das junções paracelulares (Borchard *et al.*, 1996; Thanou *et al.*, 2001; George e Abraham, 2006). Um exemplo de um

estudo de mucoadesão do quitosano, entre muitos, foi desenvolvido por Wu e colaboradores (Wu *et al.*, 2004). Este estudo envolveu a preparação de lipossomas contendo insulina e revestidos por quitosano. Esta formulação conduziu ao aumento da absorção intestinal da insulina após administração oral em ratos. Já para o mecanismo de mucoadesão do PEG está descrito na literatura que as cadeias de PEG aumentam a adesão à mucosa intestinal, principalmente devido a uma interdifusão do polímero e à interação com a camada do muco (Sahlin e Peppas, 1997; Yoncheva *et al.*, 2005).

A mucoadesão das nanoesferas contendo insulina à mucosa intestinal poderá ser responsável pelo aumento do tempo de residência a nível intestinal e, conseqüentemente, pelo aumento da probabilidade de absorção da insulina, por aumento da concentração do fármaco no seu local de absorção (Smart, 2005). Para além das características físico-químicas de cada um dos compostos, a própria carga eléctrica da nanoesfera pode ter contribuído para o mecanismo da mucoadesão. Os resultados obtidos por determinação do potencial zeta demonstraram que a pepsina, a enzima fisiologicamente abundante no estômago, reduziu as cargas negativas das nanoesferas revestidas por quitosano, PEG e albumina. Conseqüentemente, a carga eléctrica das nanoesferas voltou a ser positiva e, como resultado, as nanoesferas encontravam-se favorecidamente mais mucoadesivas quando atingiram o intestino delgado.

Na área dos sistemas mucoadesivos têm surgido formulações mucodesivas de insulina, como, por exemplo, comprimidos de quitosano (Krauland *et al.*, 2004) e nanoesferas de PLGA e derivados de ácido fumárico (Carino *et al.*, 2000). A biodisponibilidade oral de insulina obtida nestes estudos foi de 1,7% e 11,4%, respectivamente. Para além do quitosano, têm surgido outros polímeros mucoadesivos para formulações de insulina como, por exemplo, o *polycarbophil*[®] (Gowthamarajan e Kulkarni, 2003) ou a PCL com o Eudragit[®] (Damgé *et al.*, 2007). Este último trabalho desenvolvido por Damgé e colaboradores (Damgé *et al.*, 2007) envolveu nanopartículas de PCL e Eudragit[®] contendo insulina com carga eléctrica positiva e confirmou este pressuposto de mucoadesão. Em termos comparativos, a redução da glicémia após a administração oral da formulação do presente trabalho foi dependente da dose, tal como no trabalho desenvolvido por Damgé (Damgé *et al.*, 2007). Contudo, o efeito

na glicemia foi mais pronunciado no presente trabalho (-76% *versus* -40%) e a duração do efeito foi superior (14 h *versus* 8 h). As diferenças obtidas estarão relacionadas com a própria composição das nanoesferas.

Além disso, a granulometria das nanoesferas poderá ter contribuído para a sua endocitose. Todavia, no presente trabalho foi apenas analisada uma formulação e a influência do tamanho das nanoesferas na absorção intestinal não foi alvo de estudo.

Finalmente, a formulação otimizada envolve o quitosano. A presença de quitosano confere carga eléctrica positiva à nanoesfera, o que contribuiu não só para a mucoadesão mas também para o aumento da permeabilidade intestinal da formulação. De facto, o quitosano é um agente promotor de absorção através da abertura das junções paracelulares (Lehr *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 2005), permitindo uma maior absorção da insulina libertada ou encapsulada.

Todavia, o mecanismo de absorção intestinal da insulina não se encontra esclarecido. Os hipotéticos mecanismos de absorção através da mucosa intestinal encontram-se ilustrados na Figura VII-24.

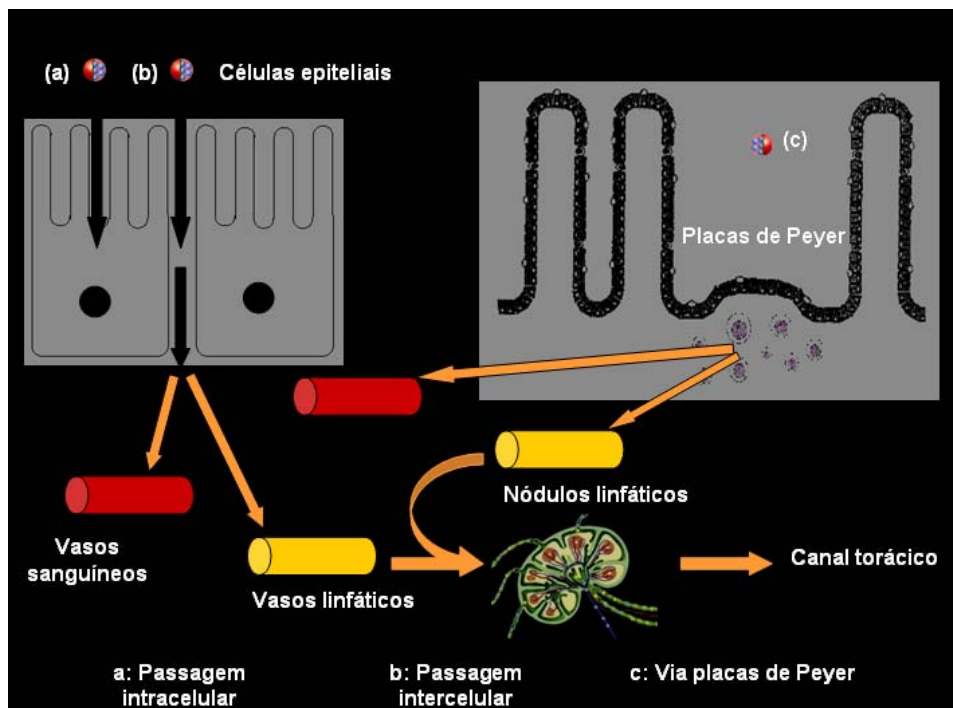


Figura VII-24. Esquema representativo dos três mecanismos possíveis associados à captação de insulina, na sua forma livre ou associada às nanoesferas, no TGI.

Na literatura têm vindo a ser propostos diferentes mecanismos de translocação de partículas através da barreira intestinal: captação através das placas de Peyer e folículos linfóides isolados (Eldridge *et al.*, 1990; Jani *et al.*, 1990; Michel *et al.*, 1991; Damgé *et al.*, 2000), passagem intercelular/paracelular (Aprahamian *et al.*, 1987; Damgé *et al.*, 2000) e, finalmente, captação intracelular via ligação com o receptor celular (Bendayan *et al.*, 1990; Bendayan *et al.*, 1994). O trabalho apresentado neste capítulo pretendeu igualmente prever o mecanismo da absorção intestinal da insulina. Para esse efeito, a insulina foi marcada com FITC e a captação da insulina fluorescente foi analisada por espectrofluorometria e visualizada por microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varrimento laser em segmentos intestinais.

Os resultados obtidos por espectrofluorometria indicaram que a insulina-FITC, na forma livre ou sob associada às nanoesferas, foi captada pela mucosa intestinal. De facto, observou-se uma diminuição da concentração de insulina-FITC, em função do tempo, no conteúdo intestinal em paralelo com um aumento da concentração de insulina-FITC na mucosa intestinal e no sangue mesentérico (plasma). As observações microscópicas confirmaram estes dados. Inicialmente, observou-se uma intensa fluorescência no lúmen intestinal; posteriormente, nas vilosidades intestinais e nas placas de Peyer. A captação do material fluorescente pelas placas de Peyer foi rápida, tendo sido observada a intensidade máxima, ao fim de 30 min. Este resultado está de acordo com um estudo anterior realizado em cães após administração *in situ* no jejuno de nanocápsulas contendo insulina (Aprahamian *et al.*, 1987). No presente trabalho, ambos os resultados, microscópicos e espectrofluorométricos, demonstraram que a insulina libertada das nanoesferas no lúmen ou associada às nanoesferas foi capaz de transpor a mucosa intestinal.

Mas, é igualmente possível que parte da insulina libertada e próxima da parte apical dos enterócitos seja captada pelo mecanismo mediado pelo receptor, como descrito em outros trabalhos (Bendayan *et al.*, 1990; Bendayan *et al.*, 1994; Ziv e Bendayan, 2000). Este mecanismo é muito rápido e, normalmente, acontece pelo compartimento endossomal seguido da transferência para a circulação sanguínea via aparelho de Golgi e para a parte basolateral da membrana plasmática (Dalgé *et al.*, 2007).

Finalmente, é também possível que as nanoesferas contendo insulina tenham sido captadas segundo um mecanismo paracelular (Aprahamian *et al.*, 1987). De facto, o revestimento com quitosano pode ter realmente actuado como promotor de absorção, através da sua capacidade de abertura transitória das junções paracelulares, permitindo a passagem paracelular das partículas mais pequenas (Thanou *et al.*, 2001). Este processo de translocação ocorre, maioritariamente, na extremidade das vilosidades, onde existe uma descamação fisiológica constante dos enterócitos maduros (Damgé *et al.*, 2007) e onde foi possível observar a existência de um filme contínuo de material fluorescente, ao longo dos enterócitos. Porém, a fluorescência mais intensa foi realmente observada nas placas de Peyer, sugerindo que as nanoesferas teriam sido captadas por endocitose pelas células M. Esta fluorescência foi ainda mais pronunciada do que no trabalho desenvolvido por Damgé e colaboradores, previamente citado (Damgé *et al.*, 2007), e poderá ser atribuída à combinação das propriedades mucoadesivas do quitosano e PEG, como aconteceu em trabalhos anteriores (Prego *et al.*, 2006).

Em síntese, a formulação otimizada mostrou-se eficaz, quando administrada oralmente e além disso, apresenta algumas vantagens do ponto de vista toxicológico e biológico. Normalmente, ao contrário de outros estudos anteriores, a presente formulação não contém inibidores enzimáticos. Como se sabe, os inibidores enzimáticos podem causar a inibição de enzimas digestivas e, dessa forma, conduzir a uma digestão incompleta das proteínas da dieta. A acção inibitória pode também aumentar a secreção das enzimas inibidas por um mecanismo *feedback* e proporcionar intoxicações sistémicas, reacções secundárias como, por exemplo, hipertrofia ou hiperplasia do pâncreas (Peppas e Kavimandan, 2006). Por outro lado, a formulação otimizada contém quitosano para promover a abertura das junções paracelulares. Contrariamente a outros compostos promotores de absorção, a acção do quitosano nas junções paracelulares é reversível. A reversibilidade surge como vantagem toxicológica, uma vez que, se o seu efeito fosse permanente e irreversível, para além do fármaco, outras espécies poderiam ser igualmente absorvidas, nomeadamente vírus e bactérias. No entanto, a dúvida que surgiu e que permanece por esclarecer reside em identificar o que é que realmente foi absorvido: se a insulina sob a forma livre ou se a insulina associada às nanoesferas.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que nanoesferas de alginato, reforçadas com sulfato dextrano e revestidas por quitosano, PEG e albumina protegeram a insulina do ataque proteolítico da pepsina, preservaram a actividade biológica da insulina e conduziram a uma redução da glicémia, quando administradas oralmente.

De facto, a redução dos níveis de glicémia foi superior a 75%, após administração de nanoesferas contendo insulina a 100 UI/kg, comparativamente às nanoesferas vazias ou insulina não encapsulada. Estas duas últimas formulações não demonstraram qualquer efeito na glicémia dos ratos diabéticos. A redução da glicémia foi prolongada e dependente da dose. Por outro lado, a melhoria da resposta fisiológica à administração de uma solução aquosa de glucose concentrada confirmou a eficácia da insulina quando encapsulada em nanoesferas. Finalmente, os níveis plasmáticos de insulina aumentaram significativamente (sete vezes superior ao valor inicial), indicando que a insulina foi protegida e absorvida pela mucosa intestinal. A biodisponibilidade oral da insulina em relação à insulina não encapsulada administrada pela via s.c. foi de, aproximadamente, 34%.

O mecanismo de absorção da insulina foi igualmente alvo de estudo, no trabalho apresentado neste capítulo. A insulina foi marcada com FITC e a captação da insulina fluorescente foi analisada por espectrofluorometria e visualizada por microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varrimento laser, em segmentos intestinais isolados. Os resultados obtidos por espectrofluorometria indicaram que a insulina-FITC, na forma livre ou associada às nanoesferas, foi captada pela mucosa intestinal. As observações microscópicas confirmaram estes pressupostos. Ambos os resultados, microscópicos e espectrofluorométricos, demonstraram que a insulina, libertada das nanoesferas no lúmen ou associada às nanoesferas, foi capaz de transpor a mucosa intestinal, provavelmente através de um mecanismo associado às placas de Peyer, mas possivelmente também através de um mecanismo que envolve a passagem intercelular/paracelular e, em última instância, através da captação intracelular via ligação com o receptor celular da insulina. Porém, a dúvida que surgiu nos ensaios desenvolvidos permanece por esclarecer e reside em identificar o que é que realmente foi absorvido: se insulina sob a

forma livre ou se insulina associada às nanoesferas, ou em última instância, as duas situações em simultâneo.

Por fim, uma outra questão, que normalmente surge no decorrer do desenvolvimento de formulações farmacêuticas, relaciona-se com a avaliação toxicológica. O próximo capítulo abordará a problemática da toxicologia da formulação otimizada e alguns aspectos metabólicos associados à administração prolongada da mesma.

6. BIBLIOGRAFIA

- AKIYOSHI, K., NISHIKAWA, T., MITSUI, Y., MIYATA, T., KODAMA, M. e SUNAMOTO, J. (1996) Self-assembly of polymer amphiphiles: thermodynamics of complexation between bovine serum albumin and self-aggregate of cholesterol-bearing pullulan. **Coll. Surf. A: Physic. Eng. Asp.** 112, 91-95.
- AL-AZZAM, W., PASTRANA, E. A. e GRIEBENOW, K. (2002) Co-lyophilization of bovine serum albumin (BSA) with poly(ethylene glycol) improves efficiency of BSA encapsulation and stability in polyester microspheres by a solid-in-oil-in-oil technique. **Biotechnol. Lett.** 24, 1367-1374.
- APRAHAMIAN, M., MICHEL, C., HUMBERT, W., DEVISSAGUET, J.-P. e DAMGÉ, C. (1987) Transmucosal passage of poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine. **Biol. Cell** 61, 69-76.
- BENDAYAN, M., ZIV, E., BEN-SASSON, R., BAR-ON, H. e KIDRON, M. (1990) Morphocytochemical and biochemical evidence for insulin absorption by the rat ileal epithelium. **Diabetologia** 33, 197-204.
- BENDAYAN, M., ZIV, E., GINGRAS, D., BEN-SASSON, R., BAR-ON, H. e KIDRON, M. (1994) Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats: comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. **Diabetologia** 37, 119-126.
- BHADRA, D., BHADRA, S. e JAIN, N. (2006) PEGylated peptide dendrimeric carriers for the delivery of antimalarial drug chloroquine phosphate. **Pharm. Res.** 23, 623-633.
- BORCHARD, G., LUEBE, H. L., BOER, A. G., VERHOEF, J. C., LEHR, C.-M. e JUNGINGER, H. E. (1996) The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions *in vitro*. **J. Control. Rel.** 39, 131-138.
- BROMER, W. W., SHEEHAN, S. K., RERNS, A. W. e ARQUILLA, E. R. (1967) Preparation and properties of fluoresceinthiocarbamyl insulin. **Biochemistry** 6, 2378-2388.

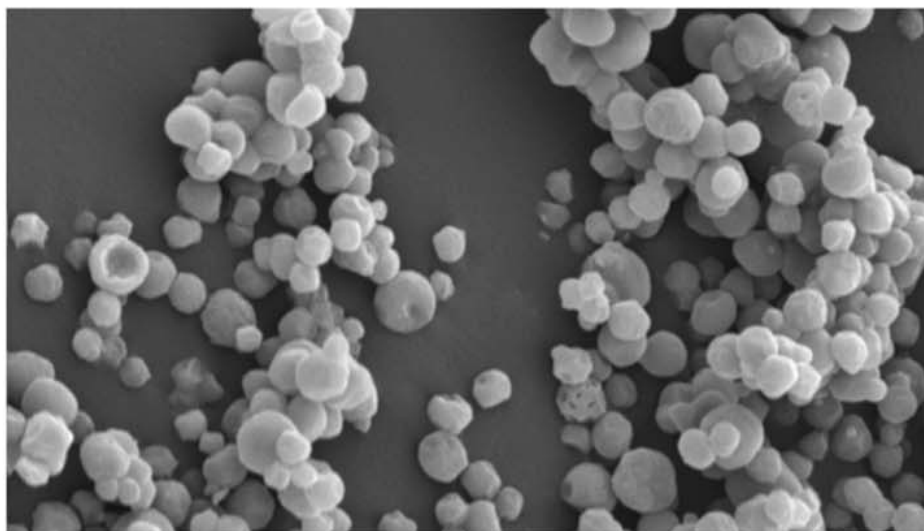
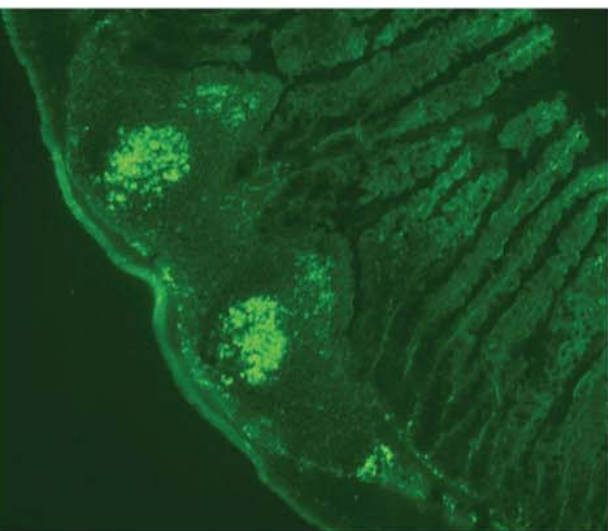
- CALCETI, P., SALMASO, S., WALKER, G. e BERNKOP-SCHNÜRCH, A. (2004) Development and *in vivo* evaluation of an oral insulin-PEG delivery system. **Eur. J. Pharm. Sci.** 22, 315-323.
- CALICETI, P. e VERONESE, F. (1999) Improvement of the physicochemical and biopharmaceutical properties of insulin by poly(ethyleneglycol) conjugation. **S.T.P. Pharma Sci.** 9, 107-113.
- CARINO, G. P., JACOB, J. S. e MATHIOWITZ, E. (2000) Nanosphere based oral insulin delivery. **J. Control. Rel.** 65, 261-269.
- CASTELLANOS, I. J., CRESPO, R. e GRIEBENOW, K. (2003) Poly(ethylene glycol) as stabilizer and emulsifying agent: a novel stabilization approach preventing aggregation and inactivation of proteins upon encapsulation in bioerodible polyester microspheres. **J. Control. Rel.** 88, 135-145.
- CHANDY, T., MOORADIAN, D. L. e RAO, G. H. (1999) Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation. **Artif. Org.** 23, 894-903.
- CHEN, J., CHU, I.-M., SHIAO, M.-Y., HSU, B. R.-S. e FU, S.-H. (1998) Microencapsulation of islets in PEG-amine modified alginate-poly(L-lysine)-alginate microcapsules for construction of bioartificial pancreas. **J. Ferment. Bioeng.** 56, 185-190.
- COSTA, P. (2002) Avaliação *in vitro* da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **RBCF** 38, 141-153.
- CUI, F., SHI, K., ZHANG, L., TAO, A. e KAWASHIMA, Y. (2006) Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation. **J. Control. Rel.** 114, 242-250.
- DAMGÉ, C., APRAHAMIAN, M., HUMBERT, W. e PINGET, M. (2000) Ileal uptake of poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.** 52, 1049-1056.
- DAMGÉ, C., MAINCENT, P. e UBRICH, N. (2007) Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **J. Control. Rel.** 117, 163-170.

- DESAI, M. P., LABHASETWAR, V., AMIDON, G. L. e LÉVY, R. J. (1996) Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. **Pharm. Res.** 13, 1838-1845.
- ELDRIDGE, J. H., HAMMOND, C. J., MEULBROEK, J. A., STAAS, J. K., GILLEY, R. M. e TICE, T. R. (1990) Controlled vaccine release in gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. **J. Control. Rel.** 11, 205-214.
- EL-SHABOURI, M. H. (2002) Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. **Int. J. Pharm.** 249, 101-108.
- FERRER, M. L., DUCHOWICZ, R., CARRASCO, B., TORRE, J. G. e ACUNA, A. U. (2001) The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. **Biophys. J.** 80, 2422-2430.
- GAN, Q., WANG, T., COCHRANE, C. e MCCARRON, P. (2005) Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Coll. Surf. B: Biointerf.** 44, 65-73.
- GEORGE, M. e ABRAHAM, T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. **J. Control. Rel.** 114, 1-14.
- GOWTHAMARAJAN, K. e KULKARNI, G. T. (2003) Oral insulin – fact or fiction? Possibilities of achieving oral delivery for insulin. **Resonance**, 38-46.
- HENTZ, N. G., RICHARDSON, J. M., SPORTSMAN, J. R., DAIJO, J. e SITTAMPALAM, G. S. (1997) Synthesis and characterization of insulin-fluorescein derivatives for bioanalytical applications. **Anal. Chem.** 69, 4994-5000.
- HINDS, K. D., CAMPBELL, K. M., HOLLAND, K. M., LEWIS, D. H., PICHE, C. A. e SCHMIDT, P. G. (2005) Pegylated insulin in PLGA microparticles. *In vivo* and *in vitro* analysis. **J. Control. Rel.** 104, 447-460.
- HINDS, K. D. e KIM, S. W. (2002) Effects of PEG conjugation on insulin properties. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 54, 505-530.
- HUSSAIN, N. (2001) Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 50, 107-142.

- JANI, P., HALBERT, G. W., LANGRIDGE, J. e FLORENCE, A. T. (1990) Nanoparticle uptake by rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particles size dependency. **J. Pharm. Pharmacol.** 42, 821-826.
- KATARE, Y. K., MUTHUKUMARAN, T. e PANDA, A. K. (2005) Influence of particle size, antigen load, dose and additional adjuvant on the immune response from antigen loaded PLA microparticles. **Int. J. Pharm.** 301, 149-160.
- KRAULAND, A. H., GUGGI, D. e BERNKOP-SCHNÜRCH, A. (2004) Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. **J. Control. Rel.** 95, 547-555.
- KUMAR, M. N. R., BAKOWSKY, U. e LEHR, C. M. (2004) Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. **Biomaterials** 25, 1771-1777.
- LEHR, C.-M., BOUWSTRA, J. A., SCHACHT, E. H. e JUNGINGER, H. E. (1992) *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **Int. J. Pharm.** 78, 43-48.
- LI, M.-G., LU, W.-L., WANG, J.-C., ZHANG, X., WANG, X.-Q., ZHENG, A.-P. e ZHANG, Q. (2007) Distribution, transition, adhesion and release of insulin loaded nanoparticles in the gut of rats. **Int. J. Pharm.** 329, 182-191.
- LOWE, P. J. e TEMPLE, C. S. (1994) Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** 46, 547-552.
- LOWMAN, A. M., MORISHITA, M., KAJITA, M., NAGAI, T. e PEPPAS, N. A. (1999) Oral delivery of insulin using pH responsive complexation gels. **J. Pharm. Sci.** 88, 933-937.
- MA, Z., LIM, T. M. e LIM, L.-Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. **Int. J. Pharm.** 293, 271-280.
- MICHEL, C., APRAHAMIAN, M., DEFONTAINE, L., COUVREUR, P. e DAMGÉ, C. (1991) The effect of site of administration in the gastrointestinal tract on the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats. **J. Pharm. Pharmacol.** 43, 1-5.

- MONTEIRO, J. G. e GARRETT, J. (1994) Farmacocinética - Passagem de fármacos através das membranas biológicas. In: Garrett, J., Osswald, W. e Guimarães, S. (eds) **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas**. 3ª ed. Porto Editora, Porto, p. 41-51.
- NA, D. H., MURTY, S. B., LEE, K. C., THANOO, B. C. e DELUCA, P. P. (2003) Preparation and stability of poly(ethylene glycol) (PEG)ylated octreotide for application to microsphere delivery. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** Artigo 4.
- ONAL, S. e ZIHNIÖGLU, F. (2002) Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: oral therapeutic peptide delivery. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.** 30, 229-237.
- PEPPAS, N. A. e KAVIMANDAN, N. J. (2006) Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. **Eur. J. Pharm. Sci.** 29, 183-197.
- PRABHA, S., ZHOU, W.-Z., PANYAM, J. e LABHASETWAR, V. (2002) Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection studies with fractionated nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 244, 105-115.
- PREGO, C., TORRES, D., FERNANDEZ-MEGIA, E., NOVOA-CARBALLAL, R., QUIÑOÁ, E. e ALONSO, M. J. (2006) Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan pegylation degree. **J. Control. Rel.** 111, 299-308.
- RIBEIRO, L. S. S. (2005) Sistemas multicomponentes com ciclodextrinas como estratégia para otimizar a biodisponibilidade oral de fármacos: aplicação em medicamentos de libertação controlada. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- RIEUX, A. D., FIEVEZ, V., GARINOT, M., SCHNEIDER, Y.-J. e PRÉAT, V. (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **J. Control. Rel.** 116, 1-27.
- SAHLIN, J. J. e PEPPAS, N. A. (1997) Enhanced hydrogel adhesion by polymer interdiffusion: use of linear poly(ethylene glycol) as an adhesion promoter. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.** 8, 421-436.
- SMART, J. D. (2005) The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 57, 1556-1568.

- THANOU, M., VERHOEF, J. C. e JUNGINGER, H. E. (2001) Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 52, 117-126.
- TOBÍO, M., GREF, R., SÁNCHEZ, A., LANGER, R. e ALONSO, M. J. (1998) Stealth PLA-PEG nanoparticles as proteins carriers for nasal administration. **Pharm. Res.** 15, 270-275.
- TOBÍO, M., SÁNCHEZ, A., VILA, A., SORIANO, I., EVORA, C., VILA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. (2000) The role of PEG on the stability in digestive fluids and *in vivo* fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. **Coll. Surf. B Biointerf.** 18, 315-323.
- VILA, A. (2002) Design of biodegradable particles for protein delivery. **J. Control. Rel.** 78, 15 - 24.
- VILA, A., GILL, H., MCCALLION, O. e ALONSO, M. J. (2004) Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. **J. Control. Rel.** 98, 231-244.
- WIN, K. e FENG, S.-S. (2005) Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials** 26, 2713-2722.
- WU, Z. H., PING, Q. N., WEI, Y. e LAI, J. M. (2004) Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. **Acta Pharmacol. Sin.** 25, 966-972.
- YONCHEVA, K., LIZARRAGA, E. e IRACHE, J. M. (2005) Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. **Eur. J. Pharm. Sci.** 24, 411-419.
- ZHU, S., QIAN, F., ZHANG, Y., TANG, C. e YIN, C. (2007) Synthesis and characterization of PEG modified N-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles. **Eur. Polym. J.** 43, 2244-2253.
- ZIV, E. e BENDAYAN, M. (2000) Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. **Microsc. Res. Tech.** 49, 346-352.



ENSAIOS TOXICOLÓGICOS
E ESTUDOS DO METABOLISMO
DO SISTEMA NANOMÉTRICO
OPTIMIZADO

CAPÍTULO VIII

1. INTRODUÇÃO

No capítulo anterior, foi descrito que a formulação otimizada, que compreende nanoesferas de alginato contendo insulina reforçadas com sulfato de dextrano e revestidas com quitosano, PEG e albumina, conduziu a uma redução significativa dos níveis de glicemia, quando administrada oralmente a ratos diabéticos. Em paralelo, foi observado um aumento da biodisponibilidade oral da insulina. No mesmo capítulo, demonstrou-se que a insulina-FITC associada às nanoesferas e/ou a insulina-FITC libertada das mesmas foi captada pela mucosa intestinal. Relativamente ao mecanismo envolvido, todas as observações e quantificações descritas no capítulo anterior apontam para a presença simultânea de mais do que um mecanismo de absorção. Todavia, a existir a absorção das nanoesferas com insulina por parte da mucosa intestinal e, principalmente pelo sistema linfático a ela associado, esta absorção levanta algumas questões do ponto de vista toxicológico em duas vertentes diferentes: a primeira, relaciona-se com a possível toxicidade dos compostos presentes no produto final e, a segunda, com a toxicidade dos solventes residuais necessários para a recuperação das nanoesferas. Relativamente aos compostos envolvidos na formulação otimizada, todos eles, sem exceção, são biodegradáveis e vulgarmente classificados pela FDA como GRAS, mas a sua administração crónica poderá, em última instância, acarretar efeitos indesejáveis que condicionem a sua aplicação terapêutica. No que respeita aos solventes orgânicos utilizados no processo de recuperação das nanoesferas, o n-hexano foi o solvente que comportava alguma preocupação, uma vez que se trata de um solvente de classe 2 (ICH, classe 2). Este último foi quantificado por cromatografia de fase gasosa e apresentou níveis muito abaixo do limite permitido pela FDA (consultar Anexo VI).

O presente trabalho pretendeu avaliar o efeito da administração da formulação otimizada a nível toxicológico e metabólico.

A toxicidade é um parâmetro importante que deve ser avaliado no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica. Os estudos toxicológicos, geralmente, recorrem a modelos animais. Mas, mesmo em caso de ausência de efeitos tóxicos em animais de laboratório, a extrapolação para o ser humano deve ser cautelosa e encarada com algumas reservas. A

toxicologia na área da nanotecnologia não se encontra ainda muito desenvolvida. Prova disso, são os poucos estudos toxicológicos que se encontram descritos na literatura (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1995; Kravtsoff *et al.*, 1998a; Kravtsoff *et al.*, 1998b; Gelperina *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006; Tsuji *et al.*, 2006) e que se referem, na sua maioria, a formulações que são normalmente administradas por outras vias de administração que não a oral.

De facto, à medida que a nanotecnologia progride, vão surgindo algumas preocupações associadas à toxicidade dos materiais que compõem as nanopartículas. Seria ideal que as nanopartículas fossem compostas apenas por materiais biodegradáveis, como é o caso da formulação otimizada. Contudo, mesmo essas não deixam de ser estranhas ao organismo e alvo de processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação, tal como acontece com os fármacos nelas encapsulados.

Os ensaios toxicológicos descritos basearam-se numa análise histológica de órgãos e tecidos, parâmetros bioquímicos e hematológicos após administração oral, em dose única diária, da formulação otimizada a ratos diabéticos, durante um período de 15 dias. Apesar de polímeros diferentes, o tempo deste ensaio foi baseado em estudos anteriores com nanopartículas de PACA (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1995).

No âmbito metabólico, desenvolveram-se dois estudos. Para o primeiro, os ratos diabéticos foram alojados em caixas metabólicas individuais, durante um período de 4 dias. As caixas metabólicas (Figura VIII-1) são instrumentos úteis que permitem estudar o metabolismo de fármacos (Vallon e Osswald, 1994) ou alterações hormonais (Koivisto *et al.*, 1974). Neste estudo, avaliaram-se as variações de peso, de volume de urina diário e de proteinúria e quantificou-se a comida e água ingeridas.



Figura VIII-1. Modelo de caixas metabólicas utilizado no ensaio de 4 dias de administração oral de nanoesferas com insulina e nanoesferas vazias.

O segundo ensaio baseou-se na aplicação de técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) ao estudo do metabolismo da glucose. O protocolo experimental foi desenhado com o intuito de avaliar o efeito da administração oral da formulação otimizada durante 15 dias, em ratos diabéticos e normais, no metabolismo da glucose, particularmente a nível hepático.

O fígado desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase da glucose. Este órgão é responsável pela captação da glucose do sangue e seu armazenamento no período pós-prandial e também pela sua produção e libertação para a corrente sanguínea, durante o jejum. A glicémia é o resultado do balanço das vias metabólicas que englobam a formação da glucose (gluconeogénese e glicogénólise) e o consumo da glucose/armazenamento da glucose (glicólise e glicogénese), essencialmente a nível hepático (Jones *et al.*, 2006). As enzimas chave, como a glucose-6-fosfatase (EC 3.1.3.9) e glicogénio sintetase (EC 2.4.1.11), em cada uma destas vias são reguladas, entre outros factores, pela insulina. Geralmente, no estado de jejum, a diminuição de insulina promove a glicogénólise e gluconeogénese, enquanto numa situação pós-prandial, o aumento da concentração de insulina estimula a glicogénese, a glicólise e outras vias metabólicas dependentes da glucose (Newgard, 2004). Após a administração de glucose, a síntese de glicogénio é estimulada pela concentração de glucose, glucose-6-fosfato (G6P) e insulina (Ferrer *et al.*, 2003). Os doentes diabéticos do tipo 1, não dispendo de insulina, são incapazes de manter os níveis de glicémia normais, e é frequente permanecerem em hiperglicémia, no estado pós-prandial. Por outro lado, sabe-se que as reservas do glicogénio de doentes diabéticos do tipo 1 são reduzidas, comparativamente com indivíduos saudáveis (Jones *et al.*, 2006). Como consequência, surgem estados de hipoglicémica em jejum, devido a uma desregulação da produção hepática da glucose (Jones *et al.*, 2006). Na síntese de glicogénio, a contribuição da via directa, a partir do monómero da glucose, é reduzida nos doentes diabéticos do tipo 1, em relação a indivíduos saudáveis (Jones *et al.*, 2006). O presente estudo descreveu um método de análise do metabolismo hepático através de uma prova de tolerância à glucose oral (PTGO), após o último dia de administração da formulação otimizada (após 15 dias de administração oral). Para esse efeito, utilizaram-se dois marcadores: glucose uniformemente marcada com carbono 13 ([U-¹³C]glucose) e água

deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$). A aplicação destes marcadores permite avaliar a captação de glucose sanguínea, a síntese hepática de glicogénio com a determinação das contribuições das vias directa e indirecta, a partir dos esqueletos tricarbonados, e a produção endógena de glucose via glicogenólise ou via gluconeogénese (Figura VIII-2).

A glucose será avaliada, indirectamente, pelo seu derivado denominado por monoacetona glucose ou MAG.

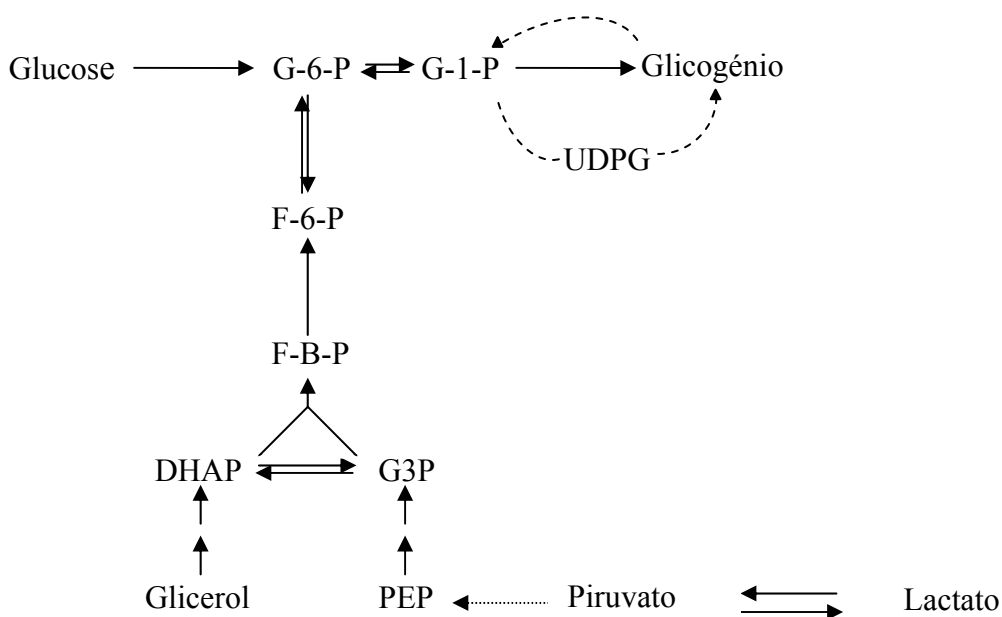


Figura VIII-2. Metabolismo hepático da glucose durante a PTGO (adaptado de Jones, 2007).
 Nota: G-6-P representa a glucose-6-fosfato, G-1-P a glucose-1-fosfato, F-6-P a frutose-6-fosfato; F-B-P a frutose-1,6-bifosfato, DHAP a dihidroxiacetona fosfato, G3P o gliceraldeído-3-fosfato, PEP fosfoenolpiruvato e, finalmente, UDPG a UDP-glucose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O alginato de sódio utilizado foi o indicado no Capítulo III. O carbonato de cálcio ultrafino, o agente emulsivo (Span[®] 80), a parafina líquida e a insulina foram os indicados no Capítulo II. O sulfato de dextrano, quitosano, a albumina e o PEG foram os indicados no Capítulo VII. A STZ do ensaio metabólico nas caixas individuais foi a indicada no Capítulo VI. A STZ para os restantes ensaios foi adquirida à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A D-glucose foi adquirida à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Água deuterada (²H₂O, a 99,9%) e a [U-¹³C]glucose foram adquiridas à Eurisotope (Gif-sur-Yvette, França). A água desionizada utilizada na preparação de soluções foi obtida a partir de um sistema Millipore Elix 5 (Bedford, MA, EUA). O acetonitrilo, o TFA e a água utilizados no sistema de HPLC foram de qualidade adequada. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico, já indicados no Capítulo II.

2.2. Preparação das nanoesferas

As nanoesferas foram preparadas segundo o protocolo descrito nos Capítulos IV e revestidas segundo o protocolo descrito nos Capítulos V, VI e VII.

2.3. Efeito toxicológico da formulação otimizada após 15 dias de administração oral a ratos diabéticos

2.3.1. *Indução da Diabetes Mellitus*

As características dos animais em experimentação, nomeadamente a idade, peso, sexo, condições de acomodação (ciclo diário de luz, temperatura, humidade e qualidade do ar), comida e água foram os indicados no Capítulo IV. O protocolo de indução da diabetes do tipo

1 foi o descrito no Capítulo VI. Os ensaios que se seguem estão de acordo com a legislação em vigor para estudos em animais de laboratório.

2.3.2. Administração oral das nanoesferas

Os animais foram randomizados em 5 grupos, como descreve a Tabela VIII-1 (n = 10 animais por grupo, com excepção do grupo controlo I com apenas 5 animais). As nanoesferas com insulina foram suspensas em água, de modo a obter uma concentração de insulina de 50 UI/6 mL. No caso das nanoesferas vazias e insulina não encapsulada, utilizou-se uma concentração equivalente à anterior em nanoesferas ou em insulina, respectivamente. As formulações orais foram administradas a 6 mL/kg, correspondendo a 50 UI/kg, utilizando a sonda endogástrica descrita nos capítulos anteriores. O volume de água administrado aos restantes animais foi de 6 mL/kg. O tratamento aplicado aos diversos grupos foi único e diário e o ensaio decorreu durante um período de 15 dias. Decorrido o ensaio, os animais foram sujeitos a jejum durante 24 h para a avaliação toxicológica. Os animais foram anestesiados (mistura de quetamina e clorpromazina (10:2, V/V) a uma dose de 2 mL/kg de peso corporal).

Tabela VIII-1. Tratamento dos animais envolvidos no estudo toxicológico.

Grupo	Ratos	Tratamento
Teste	Diabéticos	Nanoesferas com insulina (Formulação otimizada)
Controlos		
I	Normais	Água
II	Diabéticos	Água
III	Diabéticos	Insulina não encapsulada
IV	Diabéticos	Nanoesferas vazias

2.3.3. *Variação do peso corporal e taxa de mortalidade*

Durante o período de ensaio, foi efectuada a monitorização diária do peso dos animais e realizado o registo de eventuais óbitos.

2.3.4. *Estudo histopatológico*

2.3.4.1 Preparação das amostras

Os animais foram anestesiados (mistura de quetamina e clorpromazina (10:2, V/V) a uma dose de 2 mL/kg de peso corporal) e os órgãos foram excisados. Em seguida, procedeu-se à recolha de fragmentos aleatórios de diversos órgãos e tecidos. Foram efectuados cortes do pâncreas, coração, intestino delgado (zona duodeno), intestino grosso (zona do colón e recto), gordura abdominal, artéria aorta e veia cava, pulmão, gónadas, fígado, músculo esquelético, olho, baço e rim. O rim foi aberto longitudinalmente e apenas uma das partes seccionadas foi conservada para observação microscópica. Todos os fragmentos foram fixados para preservação em solução de formol tamponado a 10% (pH 7,2). Este método de fixação permite preservar e endurecer os tecidos e órgãos recolhidos com o mínimo de distorção das estruturas físicas, das características químicas e das propriedades de coloração.

2.3.4.2 Hematoxilina/eosina para identificação de alterações morfológicas dos fragmentos seccionados

Para a observação microscópica, foram preparadas lâminas com coloração de hematoxilina e eosina. Este método é o mais utilizado em histologia experimental. Em termos de especificidade, a hematoxilina confere cor ao núcleo, enquanto a contra coloração do citoplasma das células é conferida pela eosina (Rama, 2003).

Os tecidos e/ou órgãos foram transferidos para um processador de tecidos (Citadel 1000, Shandon, Waltham, MA, EUA) com a finalidade de serem preparados para a inclusão de parafina. Esta preparação consistiu na desidratação progressiva por imersão dos tecidos em

etanol de graduação crescente ($1 \times 70^\circ$, $1 \times 90^\circ$ e $3 \times 100^\circ$) seguida de diafanização com xilol. Os tecidos e/ou órgãos foram depois submetidos a dois banhos de parafina (Histosec em pastilhas, Merck KGaA, Darmstad, Alemanha) à temperatura de fusão ($58-60^\circ\text{C}$). Finalizadas estas operações, a inclusão final da peça histológica em parafina, sob a forma de blocos sólidos, foi realizada num aparelho adequado para o efeito (Histocentre 2/Shandon, Waltham, MA, EUA). Depois de formados, os blocos foram congelados até ao seu seccionamento num micrótomo (Micrótomo rotativo AS 325/Shadon, Waltham, MA, EUA). Os cortes obtidos (3 a $4 \mu\text{m}$ de espessura) foram colocados em banho de água (temperatura $53-55^\circ\text{C}$), montados em lâminas histológicas e secos em estufa a 37°C . As lâminas foram posteriormente desparafinadas por imersão em xilol, seguida de passagem em etanol de graduação decrescente (fase de alcoolização: $1 \times 100^\circ$ e $2 \times 95^\circ$) e lavadas em água (fase de hidratação). Os cortes foram depois submersos em solução de hematoxilina (Merck KGaA, Darmstad, Alemanha) durante 10 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente durante 2 min para remover o excesso de hematoxilina e colocadas em solução de eosina a 1% durante 5 min. O excesso de eosina foi também retirado por lavagem em água corrente durante 2 min. De seguida, efectuou-se a desidratação dos cortes, colocando as lâminas em banhos de etanol de concentrações crescentes (70° , 90° e 100°) e, por último, em xilol. Após a montagem das lâminas usando um meio de montagem sintético (Entellan, Merck KGaA, Darmstad, Alemanha), as lâminas foram observadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E600, Tokyo, Japão) e fotografadas (Nikon FDX-35, Tokyo, Japão).

2.3.5. Parâmetros bioquímicos

Após o sacrifício dos animais, o sangue foi recolhido da artéria hepática, centrifugado ($2500 \times g$, 10 min) e o plasma sanguíneo foi sujeito a uma análise bioquímica. Os parâmetros analisados foram os níveis: da aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1), da alanina aminotransferase (EC 2.6.1.2), da fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1), da γ -glutamil transferase (EC 2.3.2.2), do colesterol, da ureia, do azoto ureico, da bilirrubina total e directa e, finalmente, da creatinina. O aparelho utilizado foi um analisador automático da Synchron

CX4 (Beckman Coulter, Buckinghamshire, Reino Unido). As determinações foram baseadas em métodos padronizados, normalmente usados em laboratórios de análises clínicas.

2.3.6. Parâmetros hematológicos

No sangue total, e utilizando um contador de células (Coulter MaxM, Beckman Coulter, Buckinghamshire, Reino Unido), foram determinados os seguintes parâmetros: número de glóbulos vermelhos, hematócrito, teor de hemoglobina, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, número de glóbulos brancos, percentagem de neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e número de plaquetas.

2.3.7. Análise sumária da urina

No seguimento dos ensaios anteriores, procedeu-se a uma análise rápida das características gerais da urina dos animais sacrificados, nomeadamente a avaliação da bilirrubina, uribilinogénio, corpos cetónicos, ácido ascórbico, glicosúria, proteinúria, hematúria, presença de leucócitos, densidade e pH da urina. Para esta análise, foram utilizadas tiras Combur[®] (Roche, Lisboa, Portugal).

2.4. Estudo do metabolismo

2.4.1. Estudo do metabolismo em caixas metabólicas

2.4.1.1 Indução da Diabetes Mellitus

As características dos animais em experimentação, nomeadamente a idade, o peso, o sexo, as condições de acomodação (ciclo diário de luz, temperatura, humidade e qualidade do ar) foram os indicados no Capítulo VI. O protocolo de indução da diabetes tipo 1 foi o

descrito no Capítulo VI. Os ensaios que se seguem estão de acordo com a legislação em vigor para estudos em animais de laboratório.

2.4.1.2 Administração oral da formulação otimizada

Por disponibilidade logística das caixas metabólicas, este ensaio realizou-se apenas com 2 grupos (n = 6 por grupo): ratos diabéticos tratados com nanoesferas contendo insulina e ratos diabéticos tratados com nanoesferas vazias. O período de habituação às caixas metabólicas foi de 24 h. No dia seguinte, os animais foram sujeitos a um período de jejum de 6 h, mas com acesso livre a água. Finalizado este período, procedeu-se ao início do ensaio. O tempo de ensaio foi de 4 dias. As nanoesferas com insulina foram suspensas em água, de modo a obter uma concentração de insulina de 50 UI/6 mL. No caso das nanoesferas vazias, utilizou-se uma concentração em nanoesferas equivalente às correspondentes nanoesferas com insulina. As formulações orais foram administradas oralmente a 6 mL/kg, correspondendo a 50 UI/kg, utilizando a sonda endogástrica descrita nos capítulos anteriores. A dose de nanoesferas foi única e diária.

2.4.1.3 Quantificação dos parâmetros metabólicos

Peso corporal

A variação do peso corporal foi avaliada, ao longo do ensaio, e calculada a percentagem de variação de peso, em cada dia de ensaio, face ao peso inicial dos animais em estudo.

Consumo de água e comida

O consumo de água e de comida foi avaliado, diariamente, para cada um dos animais em estudo e representado sob a forma de tabela, tendo em conta a massa de comida e o volume de água consumidos, antes do início do ensaio.

Volume de urina e proteinúria

O volume de urina foi avaliado, diariamente, para cada um dos animais em estudo e quantificado. Por outro lado, a urina recolhida, durante 24 h e após o último dia de ensaio, foi analisada e quantificada a proteinúria.

2.4.2. Estudo do metabolismo da glucose pela técnica RMN

2.4.2.1 Indução da Diabetes *Mellitus* e administração oral das nanoesferas

Os protocolos de indução da diabetes tipo 1 e de administração foram os indicados anteriormente, nas Secções 2.3.1. e 2.3.2., com a diferença de que, para este ensaio, o número de animais por grupo foi de cinco, à excepção do grupo controlo I com apenas três animais.

2.4.2.2 Prova de tolerância à glucose oral (PTGO)

A PTGO foi realizada após a administração de uma solução de glucose concentrada, segundo o protocolo que se descreve. No último dia, os animais foram sujeitos a um período de jejum de 8 h. Decorrido esse período, cada grupo foi sujeito a um tratamento específico (Tabela VIII-1). Dez horas após, realizou-se a PTGO. A solução de glucose (2 g/kg de peso corporal) consistiu numa mistura em massa de 90% de glucose não enriquecida e 10% de [U-¹³C]glucose dissolvida em 2 mL de ²H₂O a 99,9%. Para possibilitar um maior

enriquecimento em ^2H na água corporal, foi igualmente administrado 2 mL de $^2\text{H}_2\text{O}$ (i.p.). Após a administração da solução aquosa de glucose, foram registadas as glicémias dos respectivos animais, em intervalos de 10 min, a partir do minuto zero (momento da administração). O aparelho de medição da glicémia foi o Accu-Chek Aviva[®] (Roche, Lisboa, Portugal). Em seguida, os animais foram anestesiados com quetamina (2 mL/kg de peso corporal) e, foram-lhes extraídos cerca de 8 mL de sangue, a partir da veia hepática. Nesta fase, o fígado foi excisado e o metabolismo foi bloqueado por *freeze clamp* em azoto líquido. As amostras foram conservadas a -80°C , até extracção glicogénica.

2.4.2.3 Extracção da glucose do plasma

O sangue total foi tratado com 16 mL de sulfato de zinco a 0,3 N seguido de 16 mL de hidróxido de bário a 0,3 N. Após centrifugação ($2500 \times g$, 10 min), o sobrenadante recolhido foi sujeito a uma cromatografia de fase sólida em coluna gravimétrica constituída por uma resina catiónica e amberlite. O extracto resultante foi, posteriormente, liofilizado e conservado até a conversão da glucose em MAG.

2.4.2.4 Extracção do glicogénio do fígado

A pulverização do fígado foi realizada em atmosfera de azoto líquido e o glicogénio extraído pela digestão do pó resultante com 20 mL de hidróxido de potássio a 30% (m/V), a 70°C durante 30 min. Após extracção, o glicogénio foi precipitado com 8 mL de sulfato de sódio a 6% (m/V) e 50 mL de etanol absoluto. Após este tratamento, as amostras permaneceram a 4°C durante 12 h. Em seguida, foram centrifugadas ($2500 \times g$, 10 min) e o sobrenadante rejeitado. O resíduo sólido foi liofilizado para garantir a remoção completa do álcool.

2.4.2.5 Hidrólise do glicogénio com amiloglicosidase

Suspendeu-se, novamente, o glicogénio em tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII). De seguida, procedeu-se à sua incubação com 16 unidades de amiloglicosidase (*Aspergillus Nigger*) a 55°C, durante 12 h. As amostras foram centrifugadas (2500 × g, 10 min) e o sobrenadante foi recolhido e liofilizado. A glucose presente no resíduo seco foi convertida a monoacetona glucose (MAG).

2.4.2.6 Síntese da monoacetona glucose (MAG)

Com o objectivo de transformar a glucose (tanto do sangue como do glicogénio do fígado) em MAG, o resíduo seco foi suspenso em 3 mL de acetona deuterada a 2% (V/V) e 120 µL de ácido sulfúrico deuterado a 2% (V/V). A mistura foi agitada, durante 12 h, à temperatura ambiente, donde resultou a diacetona glucose. A reacção de acetonação foi interrompida com a adição de 3 mL de água e com o ajuste do pH para 8. A hidrólise da diacetona a MAG foi realizada a 40°C, durante 5 h e a pH 2,3. Posteriormente, o pH da mistura foi aumentado novamente para 8 para estabilizar a molécula de MAG e as amostras resultantes foram secas no evaporador rotativo a pressão reduzida. O resíduo seco foi sujeito a um tratamento com acetato de etilo em ebulição, no sentido de extrair a MAG. Finalmente, o solvente foi removido do extracto isolado por evaporação sob vácuo.

2.4.2.7 Metodologia de RMN

Os espectros foram adquiridos recorrendo a um espectrómetro 500 MHz Varian Unity-500 (11,7 Tesla) da Varian Instruments (Palo Alto, CA, EUA), equipado com uma sonda de 5 mm de banda larga. A MAG foi dissolvida numa mistura de acetonitrilo/DMSO (83,2:16,8, m/m). Os espectros do ²H-RMN foram adquiridos a 50°C, recorrendo a um pulso de 90° com um tempo de aquisição de 1 s e com desacoplamento de banda larga de próton com recurso a uma sequência WALTZ-16. A determinação do enriquecimento em ²H foi

realizada com base em curvas de calibração com padrões de enriquecimento conhecido e construídas para o efeito.

Os espectros de ^{13}C -RMN foram adquiridos também a 50°C no equipamento anterior recorrendo a pulso de 45° e a tempos de aquisição e de preparação de 1,5 s. Este tempo de repetição interpulsos de 3,0 s possibilita uma eficiente relaxação de todos os carbonos da MAG.

Todos os espectros, ^2H e ^{13}C -RMN, foram processados com recurso ao programa NUTSTM (Acorn NMR Inc., Freemont, CA, EUA). A análise efectuada consistiu na deconvulção espectral de cada ressonância. A cada decaimento livre induzido, foi aplicada uma função Lorentziana de apodização de 1 ou 0,5 Hz para espectros de ^2H e de ^{13}C , respectivamente, antes de se proceder à transformada de Fourier.

2.4.2.8 Análise dos dados de RMN

A administração de $^2\text{H}_2\text{O}$ conduz a um determinado enriquecimento da água corporal do organismo. O enriquecimento da água corporal foi determinado de acordo com trabalhos já realizados (Jones *et al.*, 2001). A produção de glucose hepática após a PTGO foi calculada com base no espectro do ^2H -RMN da MAG obtida a partir da glucose sanguínea (Perdigoto *et al.*, 2003). O enriquecimento em deutério em cada posição dos protões da glucose, através do seu derivado MAG, foi quantificado, a partir de uma referência espectral interna. Sabe-se que no equilíbrio G-6-P e F-6-P, há troca do protão ligado ao carbono 2 da G-6-P com os protões da água. Então, existindo $^2\text{H}_2\text{O}$ disponível, essa posição será enriquecida em ^2H , sempre que ocorra esse equilíbrio.

O fígado, como descrito anteriormente, é o principal órgão responsável pela produção endógena de glucose. Independentemente da via metabólica (gluconeogénese ou glicogenólise), toda a glucose exportada incorpora ^2H na posição 2, sempre que existe $^2\text{H}_2\text{O}$ disponível. Assim, a razão entre o enriquecimento desta posição e o enriquecimento da água corporal é indicativo da produção endógena de glucose (essencialmente hepática):

$$\text{Glucose plasmática derivada da G-6-P hepática (\%)} = \frac{\text{Enriquecimento H2}}{\text{Enriquecimento água corporal}} \times 100 \quad \text{Equação VIII-1}$$

O enriquecimento ^2H na posição 5 ocorre ao nível da gluconeogénese, mais concretamente, na reacção que envolve a enzima trioses-fosfato isomerase (EC 5.3.1.1). Assim, sempre que haja disponibilidade de precursores gluconeogénicos e de água deuterada, ocorre enriquecimento de ^2H nessa posição.

As contribuições relativas para a produção de glucose podem ter origem na gluconeogénese e na glicogenólise para a glucose plasmática, segundo as equações que se seguem:

$$\text{Fracção gluconeogénese} = \frac{H5}{H2} \quad \text{Equação VIII-2}$$

$$\text{Fracção glicogenólise} = 1 - \frac{H5}{H2} \quad \text{Equação VIII-3}$$

Os espectros de ^{13}C da glucose (através do seu derivado MAG) apresentam, para o C_1 , diferentes multipletos, conforme a contribuição de cada isotómero. Assim, a $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose é responsável pelo aparecimento de um quarteto no C_1 , dado pela tripla marcação nos C_1 , C_2 e C_5 . O singlete (S) representa a abundância natural de ^{13}C na molécula de glucose (1,11%). O dubleto (D1,2) resulta do acoplamento do C_1 com C_2 e representa os isotómeros enriquecidos em ambos os carbonos, que surgem quando ocorre a metabolização da molécula de $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose, representando, portanto, a componente gluconeogénica.

A contribuição relativa da $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose e da $[\text{1,2-}^{13}\text{C}_2]$ glucose para a ressonância total do C_1 da glucose pode ser determinada pelas seguintes equações:

$$[\text{U-}^{13}\text{C}] \text{glucose (\%)} = \frac{A(Q1,2,5)}{A(Q1,2,5) + A(S) + A(D1,2)} \times 100 \quad \text{Equação VIII-4}$$

$$[1,2-^{13}C_2]glu \text{ cos e } (\%) = \frac{A(D1,2)}{A(Q1,2,5) + A(S) + A(D1,2)} \times 100 \quad \text{Equação VIII-5}$$

Sabendo que a área do singlete corresponde a 1,11% das moléculas de glucose totais, é possível calcular a contribuição percentual da $[U-^{13}C]$ glucose para a glucose total pela Equação VIII-6.

$$\text{Contribuição } [U-^{13}C]glu \text{ cos e } (\%) = \frac{\text{Área quarteto}}{\text{Área sin glete}} \times 1,11 \quad \text{Equação VIII-6}$$

2.5. Análise estatística

Cada valor é apresentado como a média \pm D.P.M.. As diferenças estatísticas foram avaliadas por análise da variância (ANOVA), seguido pelo teste t de Student. Para comparação entre grupos, foi aplicado o pós-teste de Dunnett, à excepção do ensaio toxicológico e do estudo do metabolismo por RMN. Nestas situações, para além do pós-teste Dunnett, foi usado o pós-teste de Bonferroni com o objectivo de avaliar as diferenças entre todos os grupos diabéticos em estudo e não só entre os grupos diabéticos e os ratos normais.

Para um valor de P inferior a 0,05, considerou-se que a diferença era significativa. O programa informático utilizado foi o indicado no Capítulo III.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito toxicológico da formulação otimizada após 15 dias de administração oral a ratos diabéticos

3.1.1. Variação do peso corporal e taxa de mortalidade

Os resultados obtidos demonstraram que os ratos diabéticos perderam peso corporal ao longo do estudo, independentemente do tratamento a que foram sujeitos (Figura VIII-3). Durante o período de tratamento, não se registou qualquer óbito entre os diversos grupos em estudo.

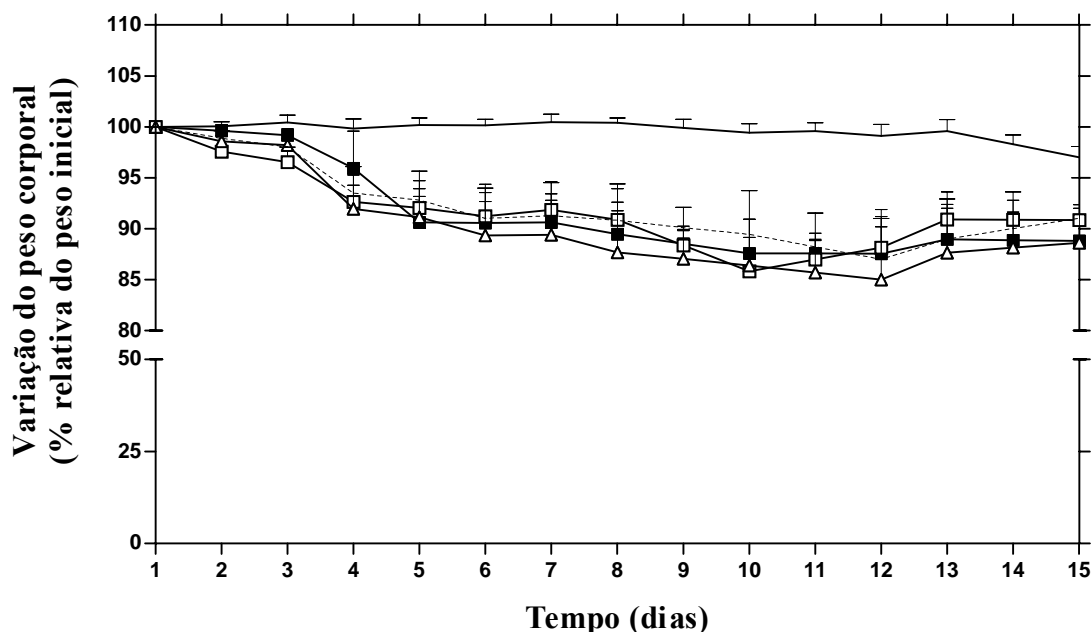


Figura VIII-3. Variação do peso corporal durante o ensaio toxicológico para os diferentes grupos em estudo: grupo teste com ratos diabéticos tratados com nanoesferas contendo insulina (—■—), grupo controle I com ratos normais tratados com água (—), grupo controle II com ratos diabéticos tratados com água (---), grupo controle III com ratos diabéticos tratados com insulina não encapsulada (—△—) e, finalmente, grupo IV com ratos diabéticos tratados com nanoesferas vazias (—□—). O peso inicial dos animais em estudo foi $335,17 \pm 7,80$ g. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. ($n = 10$ por grupo, à exceção do grupo controle I com $n = 5$).

3.1.2. Estudo histopatológico

No grupo controle I, não se observaram alterações degenerativas ou focos hemorrágicos no pâncreas. Os ilhéus apresentaram uma densidade normal para a espécie em causa (ratos *Wistar*) sem sinais de atrofia (Figura VIII-4, a). Nos grupos de animais onde foi induzida a diabetes com STZ, a densidade dos ilhéus foi consideravelmente menor na maioria dos cortes histológicos (Figura VIII-4, b).

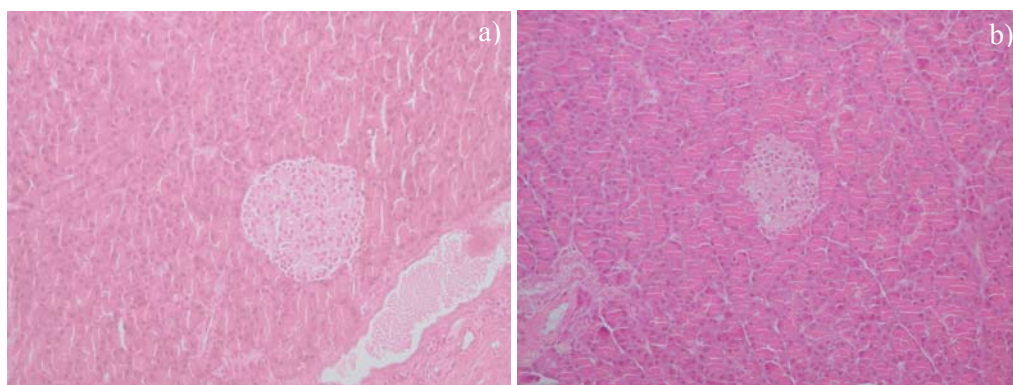


Figura VIII-4. Análise histopatológica do pâncreas: a) rato normal e b) rato diabético. O aglomerado de células mais claras representa o pâncreas endócrino. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 100 ×.

A observação em microscopia dos cortes do coração revelou a ausência de alterações morfológicas e patológicas em todos os grupos, conforme demonstra uma fotografia exemplo do grupo controle IV (Figura VIII-5).

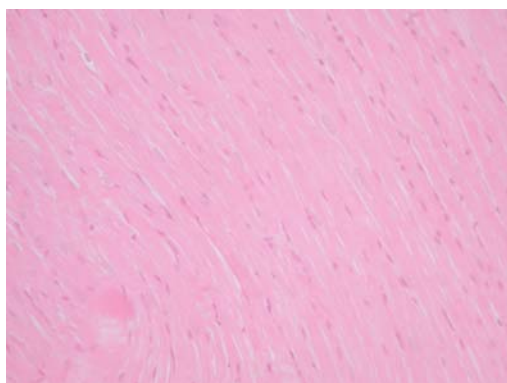


Figura VIII-5. Análise histopatológica do coração do grupo controle IV. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

Relativamente aos cortes do intestino, quer ao nível do intestino delgado (Figura VIII-6) quer ao nível do intestino grosso (colón (Figura VIII-7) e recto (Figura VIII-8)), não foram observadas alterações morfológicas e patológicas entre os diferentes grupos de animais em estudo.

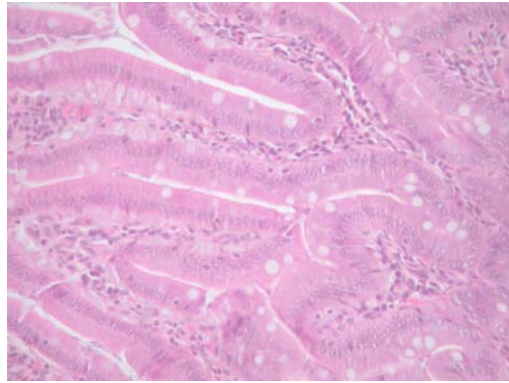


Figura VIII-6. Análise histopatológica do intestino delgado. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 100 ×.

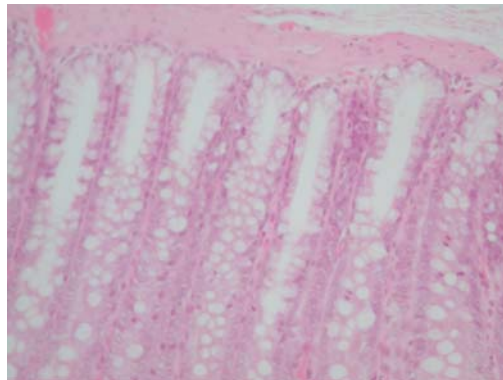


Figura VIII-7. Análise histopatológica do intestino grosso da zona do cólon. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

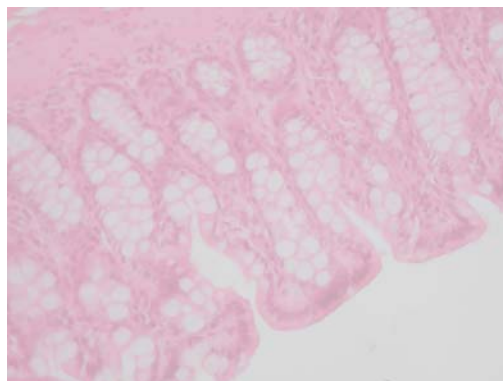


Figura VIII-8. Análise histopatológica do intestino grosso da zona do recto. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

Relativamente à gordura abdominal, mais uma vez, não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos em estudo. Em todos os animais, a observação microscópica da gordura não demonstrou alterações morfológicas indicativas de processo inflamatório ou necrose. Observou-se, contudo, a presença de vasos e septos conjuntivos, aos quais não foi atribuído significado patológico, aceitando que está relacionada com a colheita do próprio tecido (Figura VIII-9).

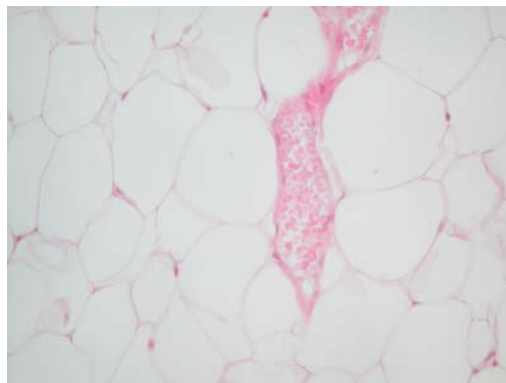


Figura VIII-9. Análise histopatológica da gordura abdominal. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

No que respeita às artérias (Figura VIII-10) e às veias (Figura VIII-11), os cortes histológicos recolhidos para a microscopia não revelaram alterações patológicas e morfológicas em nenhum dos grupos em estudo.

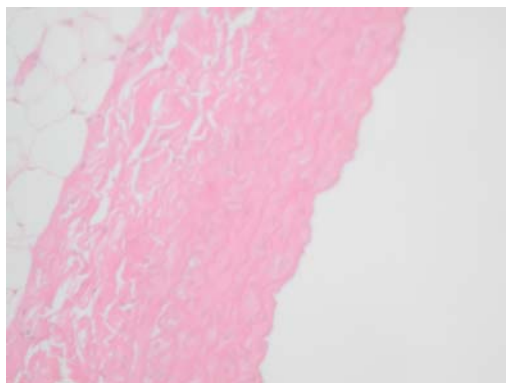


Figura VIII-10. Análise histopatológica da artéria aorta com células adiposas à sua esquerda. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

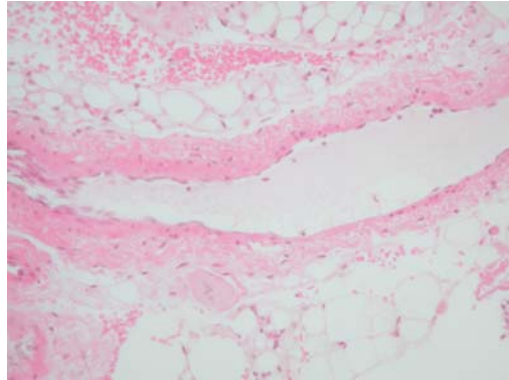


Figura VIII-11. Análise histopatológica da veia cava. O espaço central da fotografia, de forma alongada, representa o lúmen da veia. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

A observação microscópica dos pulmões demonstrou um espessamento do septo alveolar e, em algumas situações, casos de estase, independentemente do grupo de animal em estudo, como demonstra a Figura VIII-12.

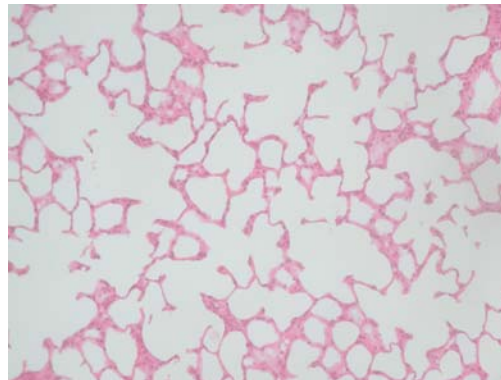


Figura VIII-12. Análise histopatológica dos pulmões com septos espessados. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

No que respeita às gónadas dos animais em estudo, a análise histopatológica não revelou quaisquer alterações morfológicas e patológicas nos diferentes grupos (Figura VIII-13).

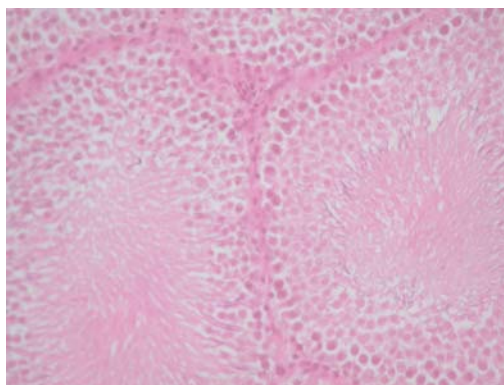


Figura VIII-13. Análise histopatológica das gónadas. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 100 ×.

Relativamente ao fígado dos animais em estudo, a observação microscópica dos cortes do fígado não revelou alterações morfológicas e patológicas (Figura VIII-14, a). Não se observaram alterações degenerativas, nem infiltrados inflamatórios, nem focos de hemorragia ou necrose, excepto num caso do grupo controlo II e num caso do grupo controlo III. Um dos animais do grupo controlo II apresentou focos de necrose e pequenas hemorragias (Figura VIII-14, b). Outra situação de necrose foi observada num caso do grupo controlo III (Figura VIII-14, c).

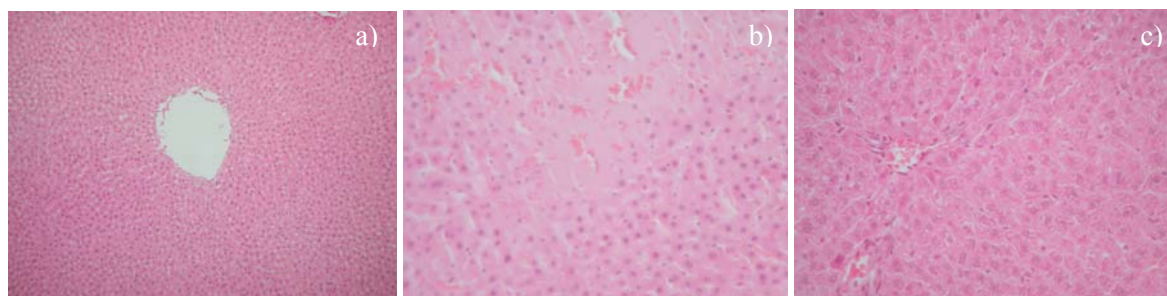


Figura VIII-14. Análise histopatológica de um fígado com: a) hepatócitos no estado normal e com um lúmen de um vaso sanguíneo na parte central da fotografia, b) necrose e focos hemorrágicos do grupo controlo II e c) necrose do grupo controlo III. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

A observação microscópica da retina de todos os animais revelou uma histologia normal (Figura VIII-15, a), à excepção de apenas dois casos com alterações morfológicas: um caso no grupo controlo II, em que foi evidente a formação de um vaso de parede espessada

(Figura VIII-15, b) e um outro caso do grupo controle III, num dos cortes, observou-se o que parece ser um esboço de um neovaso (Figura VIII-15, c).



Figura VIII-15. Análise histopatológica de uma retina: a) normal, b) de um animal do grupo controle II com neovascularização na parte central e, c) de um animal do grupo controle III com esboço de um neovaso. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

A observação microscópica do baço não revelou alterações morfológicas e patológicas em todos os grupos, independentemente do tipo de tratamento (Figura VIII-16).

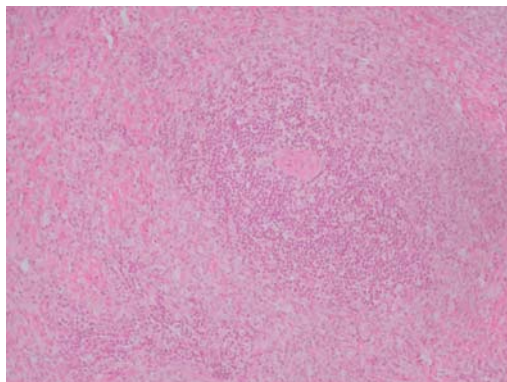


Figura VIII-16. Análise histopatológica do baço com agregado linfóide na parte central. Este nódulo é denominado de polpa branca e está rodeado de tecido altamente vascular denominado de polpa vermelha. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

A observação microscópica do músculo esquelético não revelou alterações morfológicas e patológicas em todos os grupos, independentemente do tipo de tratamento (Figura VIII-17). As fibras musculares esqueléticas encontraram-se, normalmente, agrupadas em feixes alongados com os espaços entre as fibras musculares individuais ocupadas por capilares no endomísio e no perimísio.

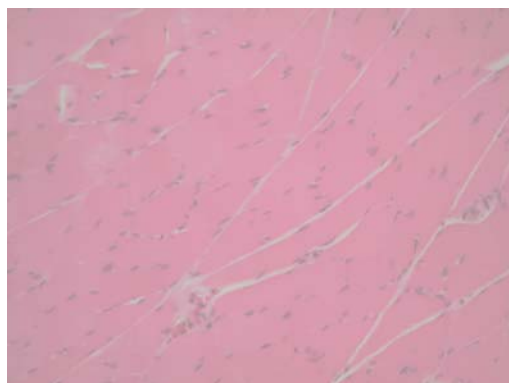


Figura VIII-17. Análise histopatológica do músculo esquelético. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

Finalmente, a observação microscópica do rim não revelou alterações renais morfológicas significativas nem sinais de necrose tubular aguda ou nefrite intersticial (Figura VIII-18, a e b). Contudo, nos rins dos ratos diabéticos observou-se um ligeiro espessamento da membrana basal dos capilares (Figura VIII-18, b). Esta alteração observou-se de modo aleatório e revelou-se independente do tipo de tratamento.

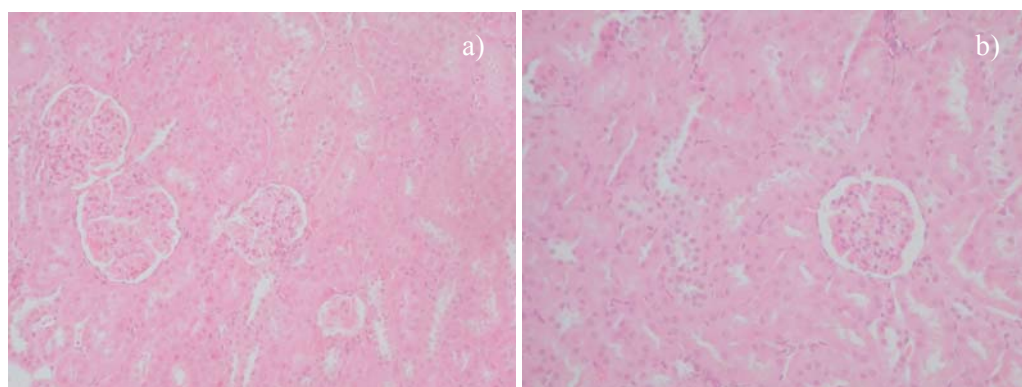


Figura VIII-18. Análise histopatológica de um rim: a) animal normal e b) rato diabético. Técnica de coloração, hematoxilina/eosina. Ampliação 50 ×.

3.1.3. *Parâmetros bioquímicos*

Os parâmetros bioquímicos encontram-se descritos na Tabela VIII-2. Nesta análise, observou-se um ligeiro aumento em alguns parâmetros dos ratos diabéticos em relação aos ratos normais como, por exemplo, o colesterol especialmente para o grupo controlo II e para o

grupo teste. A γ -glutamil transferase foi diferente para todos os grupos diabéticos em relação aos normais, tendo sido observado o menor valor no grupo controlo IV. A fosfatase alcalina aumentou consideravelmente nos grupos controlo II e III, em relação aos restantes grupos diabéticos e normais. Entre os grupos diabéticos, teste e controlo IV, foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controlo III. A ureia e o azoto ureico também aumentaram para todos os grupos diabéticos mas, o menor valor observado, nos dois parâmetros, foi com o grupo teste. Entre os grupos diabéticos foram ainda observadas diferenças entre si, conforme descreve a Tabela VIII-2. Nos grupos diabéticos, os valores das enzimas aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase mais baixos foram observados no grupo teste. Por fim, os valores, creatinina, bilirrubina total e bilirrubina directa foram semelhantes em todos os grupos de animais em experimentação.

3.1.4. Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram semelhantes entre os diferentes grupos de ratos diabéticos, à excepção do número de eosinófilos no grupo teste. O valor observado foi inferior ao valor encontrado nos grupos controlo I e IV. Os níveis de glóbulos vermelhos e hematócrito foram inferiores no grupo controlo III em relação ao grupo controlo I. O valor do volume corpuscular médio do grupo teste foi ligeiramente inferior ao grupo controlo I. O valor de hemoglobina corpuscular média, tanto em massa como em concentração, foi superior para os ratos diabéticos, em comparação com os ratos normais. A análise dos parâmetros hematológicos encontra-se descrita na Tabela VIII-3.

Tabela VIII-2. Parâmetros bioquímicos dos diferentes grupos de animais: grupo teste com ratos diabéticos tratados com nanoesferas contendo insulina, grupo controlo I com ratos normais tratados com água, grupo controlo II com ratos diabéticos tratados com água, grupo controlo III com ratos diabéticos tratados com insulina não encapsulada e, finalmente, grupo controlo IV com ratos diabéticos tratados com nanoesferas vazias. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D. P. M. (n = 10 por grupo, à excepção do grupos de ratos normais com n = 5). Diferenças significativas em relação ao grupo controlo I com * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ pelo pós-teste de Dunnett. Diferenças significativas em relação ao grupo controlo III com # $P < 0,05$ pelo pós-teste de Bonferroni.

Parâmetros bioquímicos	Grupo teste	Grupo controlo I	Grupo controlo II	Grupo controlo III	Grupo controlo IV
Colesterol (mg/dL)	50,2 \pm 1,3*.#	27,0 \pm 2,0	43,6 \pm 6,5*	37,4 \pm 4,7	41,8 \pm 3,8
Aspartato aminotransferase (UI/L)	88,0 \pm 10,8	125,5 \pm 0,5	167,6 \pm 47,9	115,4 \pm 16,9	139,8 \pm 25,9
Alanina aminotransferase (U/IL)	42,0 \pm 7,4	40,0 \pm 3,0	50,0 \pm 4,8	45,0 \pm 5,8	54,2 \pm 9,7
γ-glutamil transferase (UI/L)	4,4 \pm 0,6*	0,5 \pm 0,1	3,6 \pm 0,8*	4,2 \pm 0,6*	3,2 \pm 0,5*
Fosfatase alcalina (UI/L)	3,5 \pm 1,6#	4,0 \pm 0,0#	22,3 \pm 4,5	31,8 \pm 10,3	3,3 \pm 1,9#
Ureia (mg/dL)	94,9 \pm 5,2*	56,0 \pm 4,3	115,1 \pm 4,9**.#	97,7 \pm 12,0*	107,4 \pm 8,8*.#
Azoto ureico (mg/dL)	44,3 \pm 2,4*	26,1 \pm 2,0	53,8 \pm 2,3**.#	45,6 \pm 5,6*	50,1 \pm 4,1*.#
Creatinina (mg/dL)	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,62 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0
Bilirrubina total (mg/dL)	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
Bilirrubina directa (mg/dL)	0,3 \pm 0,4	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1

Tabela VIII-3. Parâmetros hematológicos dos diferentes grupos de animais em experimentação: grupo teste com ratos diabéticos tratados com nanoesferas contendo insulina, grupo controlo I com ratos normais tratados com água, grupo controlo II com ratos diabéticos tratados com água, grupo controlo III com ratos diabéticos tratados com insulina não encapsulada e, finalmente, grupo IV com ratos diabéticos tratados com nanoesferas vazias. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. (n = 10 por grupo, à exceção do grupos de ratos normais com n = 5). Diferenças significativas em relação ao grupo controlo I com * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ pelo pós-teste de Dunnett. Diferenças significativas em relação ao grupo controlo IV com # $P < 0,05$ pelo pós-teste de Bonferroni.

Parâmetros hematológicos	Grupo teste	Grupo controlo I	Grupo controlo II	Grupo controlo III	Grupo controlo IV
Glóbulos vermelhos ($\times 10^{12}/L$)	8,3 \pm 0,2	9,3 \pm 2	8,2 \pm 0,2	7,4 \pm 0,2**	8,1 \pm 0,4
Hemoglobina (g/dL)	15,3 \pm 0,4	13,6 \pm 2,0	14,9 \pm 0,3	13,7 \pm 0,4	15,3 \pm 0,5
Hematócrito	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0**	0,5 \pm 0,0
Plaquetas (gpt/L)	656,3 \pm 96,3	103,0 \pm 2,0	471,8 \pm 105,3	409,3 \pm 125,2	486,3 \pm 140,6
Glóbulos brancos ($\times 10^9/L$)	2,2 \pm 0,3	1,9 \pm 0,3	2,4 \pm 0,4	1,2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,4
Monócitos (%)	2,7 \pm 0,5	2,9 \pm 0,1	4,1 \pm 0,3	3,4 \pm 1,1	2,2 \pm 0,9
Neutrófilos (%)	31,1 \pm 14,7	11,8 \pm 2,0	36,3 \pm 3,0	29,8 \pm 5,8	18,2 \pm 8,1
Eosinófilos (%)	0,9 \pm 0,3* #	1,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2
Basófilos (%)	0,2 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,6 \pm 1,0	0,1 \pm 0,0	2,9 \pm 1,2
Linfócitos (%)	65,1 \pm 14,5	82,4 \pm 2,0	56,3 \pm 3,2	65,9 \pm 5,1	72,8 \pm 7,1
Plaquetas (gpt/L)	656,3 \pm 96,3	103,0 \pm 2,0	471,8 \pm 105,3	409,3 \pm 125,2	486,3 \pm 140,6
Volume corpuscular médio (fL)	54,1 \pm 0,8**	55,0 \pm 2,0	54,7 \pm 0,6	54,9 \pm 0,6	55,5 \pm 0,4
Hemoglobina corpuscular média (pg)	18,5 \pm 0,4**	14,7 \pm 2	18,1 \pm 0,3**	18,6 \pm 0,1**	18,8 \pm 0,3**
Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/L)	341,3 \pm 3,6**	266,0 \pm 2,0	331,2 \pm 2,9**	338,5 \pm 1,8**	338,3 \pm 3,0**

3.1.5. Análise sumária da urina

Na análise sumária da urina, não se detectaram valores mensuráveis de bilirrubina, hematúria e leucócitos em todos os grupos em estudo. Os níveis de uribilinogénio foram

normais, em todos os grupos estudados. A presença de corpos cetónicos foi apenas observada nos animais do grupo controlo III. O ácido ascórbico esteve apenas presente em dois animais do grupo controlo II e um do grupo controlo IV. Observou-se glicosúria em todos os grupos em experimentação, tendo sido verificado a seguinte ordem: grupo controlo III > grupo controlo IV \geq grupo controlo II > grupo teste e praticamente inexistente no grupo controlo I. Por outro lado, a análise qualitativa da urina indicou a presença de proteínas em alguns dos animais de cada um dos grupos estudados. A densidade da urina variou entre 1,01 e 1,02, não tendo sido observadas diferenças entre os grupos de animais em experimentação. O pH da urina esteve compreendido entre 5 a 6,33, sendo que o valor de pH mais elevado foi observado com o grupo controlo I.

3.2. Estudo do metabolismo

3.2.1. Estudo do metabolismo em caixas metabólicas

3.2.1.1 Peso corporal

A Diabetes *Mellitus* tipo 1 é uma doença que induz alterações metabólicas, nomeadamente o peso corporal, consumo de alimentos/água e produção/composição de urina. Relativamente ao peso inicial dos animais, o valor observado foi de $249,66 \pm 7,89$ g. Em termos de variação do peso corporal, observaram-se ligeiras flutuações de peso em ambos os grupos, conforme mostra a Figura VIII-19.

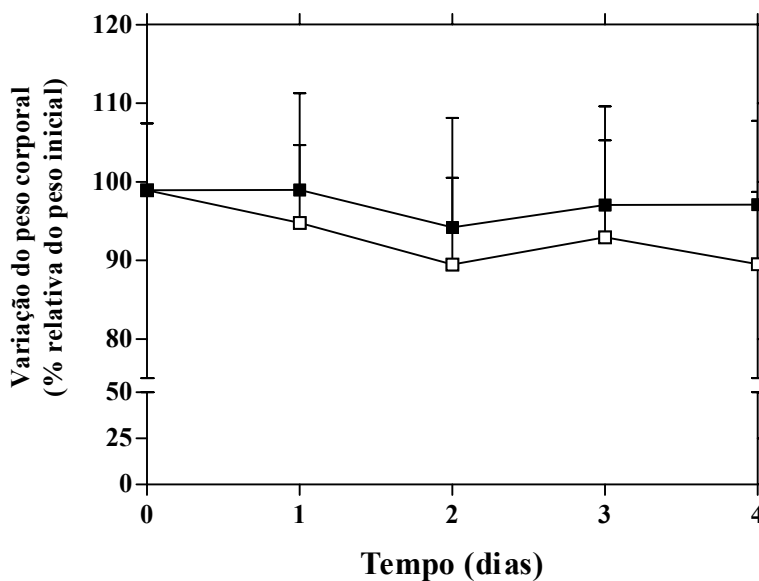


Figura VIII-19. Variação do peso corporal durante o ensaio nas caixas metabólicas após administração oral a ratos diabéticos de nanoesferas com insulina (—■—) e nanoesferas vazias (—□—). Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. (por grupo $n = 6$).

3.2.1.2 Consumo de água e comida

Nesta fase, os animais com nanoesferas contendo insulina consumiram uma menor quantidade de água em comparação com o grupo de animais com nanoesferas vazias, mas apenas no último dia de ensaio. Neste grupo, a redução do volume de água consumido em 24 h foi de 42% (valor médio com $P < 0,001$). Porém, o consumo de comida neste grupo de animais, em 24 h, foi apenas reduzido, em média, de 15%, em relação ao valor inicial. A Tabela VIII-4 mostra os valores de consumo de água e de comida dos grupos em estudo.

Tabela VIII-4. Consumo de água e de comida depois de 4 dias sucessivos de administração oral a ratos diabéticos de nanoesferas com insulina (50 UI/kg) e nanoesferas vazias. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. (por grupo $n = 6$). Diferenças significativas em relação ao grupo com nanoesferas vazias com $***P < 0,001$.

	Nanoesferas com insulina	Nanoesferas vazias
Consumo água (mL/24 h)	76,67 \pm 10,0***	133,0 \pm 3,6
Consumo de comida (g/24 h)	24,3 \pm 1,0	28,8 \pm 4,1

3.2.1.3 Volume de urina e proteinúria

Os valores foram calculados no 5º dia de ensaio, isto é, após 24 h da última administração. O volume de urina dos animais com nanoesferas contendo insulina e nanoesferas vazias foi diminuído para 47% ($P < 0,01$) e 67% ($P < 0,05$), respectivamente em relação ao valor inicial. Verificou-se, ainda, que o grupo com as nanoesferas contendo insulina apresentou níveis de proteinúria mais baixos em relação ao grupo com nanoesferas vazias (Tabela VIII-5).

Tabela VIII-5. Volume de urina e proteinúria depois de 4 dias sucessivos de administração oral a ratos diabéticos de nanoesferas com insulina (50 UI/kg) e nanoesferas vazias. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M. (por grupo $n = 6$). Diferenças significativas em relação ao grupo com nanoesferas vazias com: $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$.

	Nanoesferas com insulina	Nanoesferas vazias
Volume urina (mL/24 h)	62,3 \pm 12,5**	118,0 \pm 11,3
Proteinúria (mg/24 h)	15,1 \pm 2,2*	46,0 \pm 15,2

3.2.2. Estudo do metabolismo da glucose pela técnica RMN

3.2.2.1 Prova de tolerância à glucose oral (PTGO)

Após a administração oral de uma solução aquosa de glucose concentrada (2 g/kg de peso corporal com 10% (m/m) de [U-¹³C]glucose), os níveis de glicémia de todos os grupos diabéticos aumentaram até um valor máximo próximo de 250% do valor basal, como se verifica na Figura VIII-20.

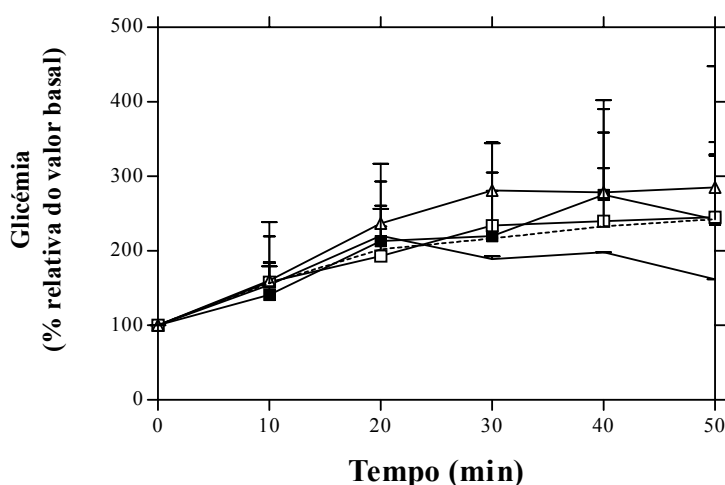


Figura VIII-20. PTGO durante o ensaio metabólico para os diferentes grupos em estudo: grupo teste com ratos diabéticos tratados com nanoesferas contendo insulina (—■—), grupo controle I com ratos normais (—), grupo controle II com ratos diabéticos tratados com água (---), grupo controle III com ratos diabéticos tratados com insulina não encapsulada (—△—) e, finalmente, grupo controle IV com ratos diabéticos tratados com nanoesferas vazias (—□—). Os resultados estão expressos em valores médios ± D.P.M. (n = 5 por grupo, à exceção do grupo controle I com n = 3).

Os níveis de glicémia do grupo controle I também aumentaram até um valor máximo próximo de 200%, após 40 min da PTGO.

O valor de glicémia basal para os ratos diabéticos, antes dos tratamentos descritos na Tabela VIII-1, foi de 510 ± 18 mg/dL. Esse valor sofreu uma diminuição significativa para 120 ± 17 , 270 ± 72 , 180 ± 25 , 210 ± 44 mg/dL, para grupos teste, grupos controle II, III e IV, respectivamente, 10 h após a administração dos diferentes tratamentos e mesmo antes da administração da solução aquosa de glucose. O valor de glicémia basal para os ratos normais foi de 159 ± 26 mg/dL. Esse último valor sofreu uma diminuição significativa para

77 ± 4 mg/dL, 10 h após a administração de água e mesmo antes da administração da solução aquosa de glucose.

3.2.2.2 Análise dos dados de RMN

Enriquecimento da água corporal em $^2\text{H}_2\text{O}$

A administração de $^2\text{H}_2\text{O}$ na PTGO resultou num enriquecimento plasmático de $1,75 \pm 0,09\%$. Estes valores foram determinados, de acordo com a curva de calibração, $y = 107,19x + 1,5$ com $r^2 = 0,9676$, sendo y a razão entre as áreas dos sinais de ^2H da água do plasma e da acetona, normalizada para a razão entre as massas de plasma e acetona, e x o enriquecimento do plasma em $^2\text{H}_2\text{O}$.

Produção endógena de glucose

Na Figura VIII-21 apresenta-se um espectro típico de ^2H -RMN da molécula de MAG obtida a partir da glucose presente no sangue.

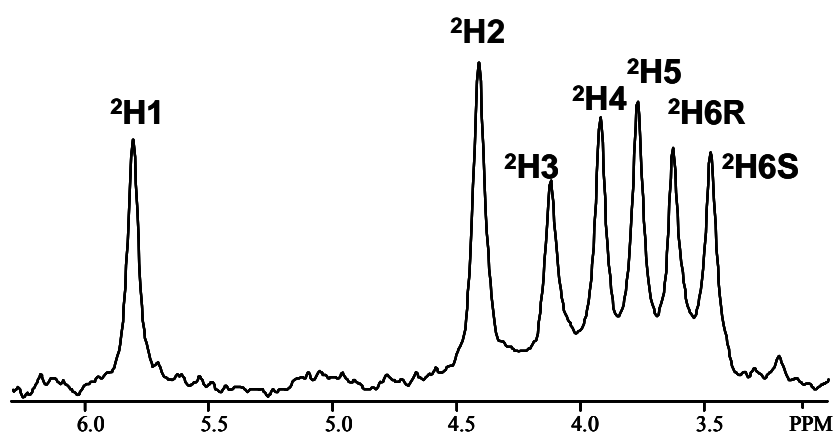


Figura VIII-21. Espectro típico de ^2H -RMN da molécula de MAG.

O enriquecimento absoluto na posição 2 da MAG obtida a partir da glucose sanguínea foi determinado recorrendo à referência interna dos ^2H metílicos da MAG provenientes da acetona deuterada a 1,87%. O enriquecimento em ^2H na posição 2 foi de $0,44 \pm 0,03\%$. A relação entre os enriquecimentos em ^2H da MAG sanguínea e da água corporal (Equação VIII-1) foi semelhante nos vários grupos em estudo, $26,20 \pm 0,02\%$ (Figura VIII-22).

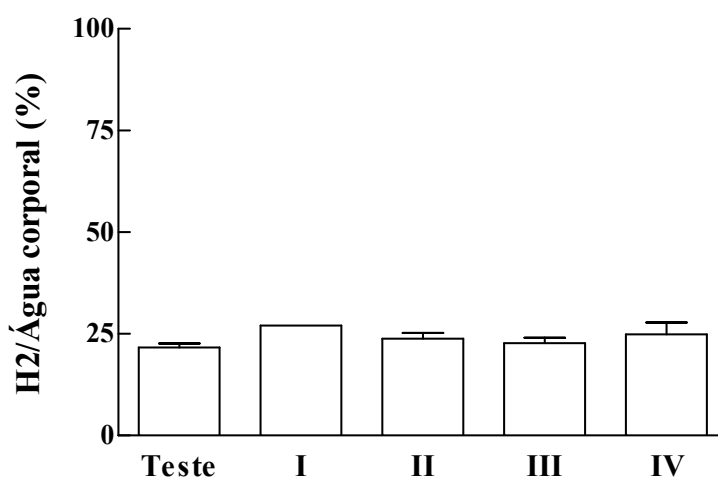


Figura VIII-22. Contribuição percentual da produção endógena de glucose para a glucose total sanguínea.

Contribuição relativa das vias gluconeogénica e glicogenólica para a produção de glucose

A glucose plasmática compreende a glucose absorvida oralmente (marcador intacto) e a glucose endógena que deriva tanto da gluconeogénese como da glicogenólise. A contribuição da gluconeogénese foi calculada segundo a Equação VIII-2. Verificou-se que a gluconeogénese foi a principal via de produção de glucose com cerca de 75% (Figura VIII-23). Este estudo revelou, ainda, que independentemente do tratamento a que os animais foram sujeitos, aquela via foi sempre a primordial, sendo a glicogenólise responsável pelos restantes 25% (Equação VIII-3).

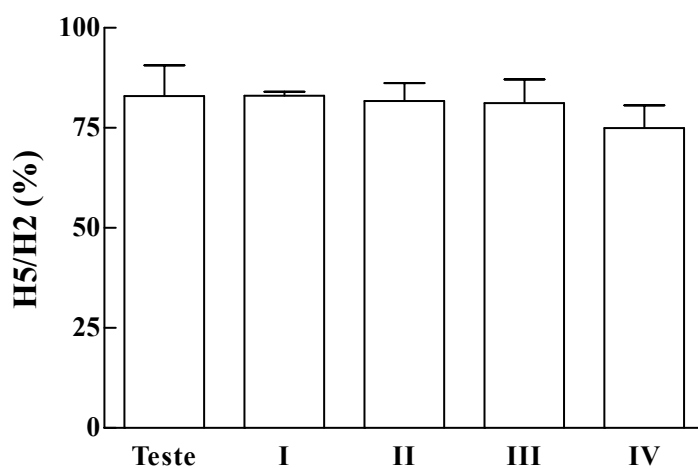


Figura VIII-23. Contribuição da via gluconeogénica para a produção endógena de glucose.

Metabolização da glucose avaliada pela técnica ^{13}C -RMN

O bólus de glucose marcada representou cerca de 5% de toda a glucose plasmática (marcada e não marcada). O espectro típico de ^{13}C -RMN encontra-se representado pela Figura VIII-24.

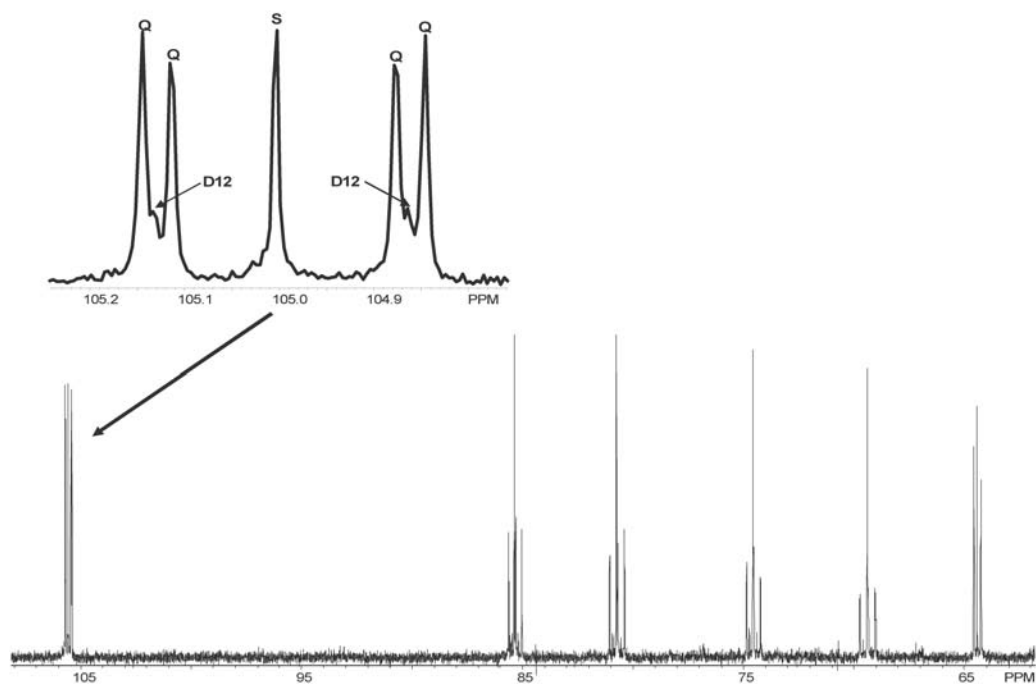


Figura VIII-24. Espectro representativo de ^{13}C -RMN da MAG da glucose plasmática após a PTGO.

O espectro de ^{13}C -RMN confirmou a metabolização da $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose pela via gluconeogénica através do aparecimento do dubleto (D1,2). Foram observadas diferenças de metabolização de glucose entre os ratos diabéticos e os normais (Figura VIII-25). Relativamente à percentagem de glucose não metabolizada, não foram observadas diferenças entre os grupos em estudo (Figura VIII-26).

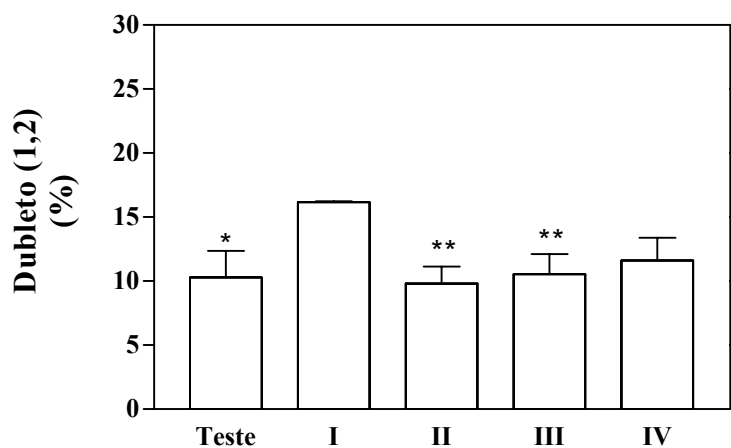


Figura VIII-25. Percentagem de dubleto (D1,2) no espectro ^{13}C da glucose sanguínea em relação ao multipletto. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M.. Diferenças significativas em relação ao grupo controlo I com * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

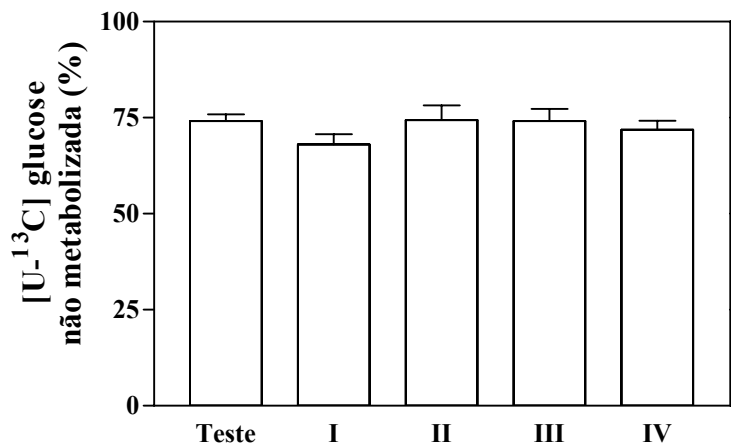


Figura VIII-26. Contribuição do quarteto no espectro ^{13}C da glucose sanguínea em relação ao multipletto. Os resultados estão expressos em valores médios \pm D.P.M..

Produção de glicogénio no fígado

A síntese de glicogénio, avaliada pela incorporação de ^2H na posição 2 da MAG obtida a partir do glicogénio, foi apenas detectada em alguns animais (10 animais num total de 23) e, nestes, a razão do enriquecimento na posição 2, em relação à água corporal, variou entre 5,8% e 65,9%. O enriquecimento médio de ^2H na posição 2 da MAG foi de $0,44 \pm 0,001\%$ e, a via indirecta foi a preferencial para a síntese de glicogénio com cerca de $80,0 \pm 0,02\%$. Face à fraca incorporação de ^2H no glicogénio, não foi realizada a análise dos espectros de ^{13}C -RMN.

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeito toxicológico da formulação otimizada após 15 dias de administração oral a ratos diabéticos

O efeito toxicológico da formulação otimizada foi avaliado, recorrendo a diferentes parâmetros, especificamente à variação do peso corporal, taxa de mortalidade, estudo histopatológico, análise de parâmetros bioquímicos e hematológicos e, finalmente à análise sumária de urina.

Em relação à variação do peso corporal, foi observada uma diminuição (cerca de 10% do peso inicial), provavelmente relacionada com a própria diabetes. Nos animais diabéticos, a ausência de insulina e o conseqüente estado de hiperglicémia conduziram à instalação de um quadro clínico cujos sintomas compreendem, entre muitos outros factores, a perda de peso corporal. Por outro lado, sabe-se que também a própria STZ pode ser responsável pelo efeito redutor no peso corporal dos ratos *Wistar*, como aconteceu em estudos já realizados (Al-Achi e Greenwood, 2001). Porém, face aos resultados descritos no capítulo anterior relativamente ao controlo da glicémia, seria de esperar que os ratos diabéticos do grupo teste mantivessem o peso corporal devido à administração da formulação com insulina. Tal facto não se observou, provavelmente, por insuficiência da dose administrada (1 i.d.), uma vez que, durante o presente trabalho os animais tiveram sempre acesso à comida, contrariamente ao trabalho descrito no capítulo anterior (à excepção do dia antes da indução da diabetes e horas antes do sacrifício).

Outro aspecto muito importante observado no estudo toxicológico foi a taxa de mortalidade. Neste caso, não foi registada nenhuma morte durante o ensaio, o que, de alguma forma, é um bom indicativo a nível toxicológico.

De uma maneira geral, o estudo histopatológico não revelou efeitos toxicológicos significativos a nível dos órgãos e tecidos analisados. As ligeiras alterações detectadas ocorreram em casos isolados e de forma aleatória e não se encontram relacionadas com o tipo de tratamento. Pensa-se que estas diferenças estarão relacionadas com a própria fisiopatologia

da doença e/ou método de indução da mesma. Especificamente, destacam-se as alterações ocorridas a nível hepático, em casos isolados de animais dos grupos controlo II e III. Estas alterações podem estar relacionadas com a própria STZ, uma vez que o tratamento para estes casos foi com água e com insulina não encapsulada, respectivamente. Em estudos anteriores e com condições semelhantes, a STZ revelou efeitos hepatóxicos (Cancercare, 2007). Outros estudos (Kume *et al.*, 2005; Wijkstrom *et al.*, 2005) apresentaram resultados semelhantes ao obtido no presente trabalho, mas a dose de STZ utilizada nestes casos foi superior à dose do presente trabalho.

Por outro lado, este estudo demonstrou ligeiras alterações a nível renal, em todos os ratos diabéticos. As alterações em causa foram independentes do tipo de tratamento dos ratos diabéticos, o que significa que a formulação, por si só, não se revelou nefrotóxica. As alterações observadas a nível renal podem estar relacionadas, mais uma vez, com a própria STZ, como foi demonstrado em estudos já realizados (Cancercare, 2007), mas também com a própria fisiopatologia da diabetes. De facto, as alterações observadas em todos os ratos diabéticos encontram-se em conformidade com as situações patológicas renais que se desenvolvem na diabetes, quer nos estados iniciais quer em estados mais avançados como, por exemplo, a nefropatia diabética (Barbas, 1997). Um dado particularmente interessante, que se observou no estudo histopatológico, foi a proliferação de novos vasos sanguíneos (neovasos) na retina de um rato do grupo controlo II e outro do grupo controlo III. Esta observação pode ser indicativa de um estado diabético mais avançado nestes ratos. As alterações oculares na diabetes podem ser explicadas por dois mecanismos principais: o primeiro, relaciona-se com o aumento da formação de polióis e uma redução do inositol através da acção da aldose-reductase (EC 1.1.1.21) devido ao estado constante de hiperglicémia (Duarte *et al.*, 1997) e, o segundo, envolve a acumulação de produtos avançados da glicação proteica (Duarte *et al.*, 1997). Por isso, a retina desenvolve retinopatia diabética quando exposta a níveis de glicémia elevados (Gabbay, 1975). De uma forma geral, sabe-se que a retinopatia diabética tem 5 estádios: um estágio inicial, que envolve a formação de microaneurismas, um segundo estágio, que envolve o aumento da permeabilidade vascular, e um terceiro estágio que envolve a oclusão vascular. Quando ocorre a oclusão vascular, a retina deixa de ser

correctamente perfundida e resultam zonas isquémicas. Dá-se o 4º estágio da retinopatia diabética. Estas zonas de isquémia são o estímulo para a formação de neovasos, a partir da acumulação de factores de crescimento, como aconteceu nos dois ratos dos grupos II e III do presente trabalho. Por fim, o 5º estágio, da retinopatia diabética, envolve a contracção das proliferações fibrovasculares e do vítreo que pode mesmo resultar na cegueira (Duarte *et al.*, 1997).

Este estudo toxicológico analisou, ainda, o efeito da formulação otimizada nos parâmetros bioquímicos. Geralmente, os metabolitos produzidos da biotransformação de polímeros podem conduzir a casos de hepatotoxicidade (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1995) e a um aumento das enzimas hepáticas ou outros compostos no sangue. A análise bioquímica do plasma dos animais em estudo revelou que apenas alguns parâmetros bioquímicos foram alterados.

O colesterol foi um desses parâmetros. Apesar de ter sido observado um aumento do valor de colesterol nos ratos diabéticos, em relação aos ratos normais, o valor de colesterol observado foi sempre inferior ao valor de referência descrito na literatura ($57,1 \pm 0,8$ mg/dL) (Karakilcik *et al.*, 2005).

Relativamente às enzimas indicadoras da lesão hepática (alanina aminotransferase e a aspartato aminotransferase), os valores obtidos, em todos os grupos de animais, e de uma forma geral, apresentaram-se dentro dos valores de referência, $44,4 \pm 4,7$ UI/L (Inal *et al.*, 2006) e $232,0 \pm 50,6$ UI/L (Inal *et al.*, 2006), respectivamente. Curiosamente, no grupo teste, a aspartato aminotransferase foi ligeiramente inferior aos restantes ratos diabéticos e, mesmo, ratos normais. Este valor pode revelar-se um bom indicador, em termos de toxicidade hepática, isto porque, está descrito na literatura que na presença de alguma alteração hepática, a aspartato aminotransferase sanguínea geralmente aumenta (Lopes, 2007).

Por outro lado, os níveis da enzima γ -glutamil transferase foram superiores em todos os ratos diabéticos, sendo o valor mais elevado observado com o grupo controlo III. Este aumento para todos os ratos diabéticos e independente do tipo de tratamento poderá ser atribuído à própria STZ.

No caso das enzimas localizadas a nível da membrana e indicadoras de colestase hepática, tais como a fosfatase alcalina, observou-se que apenas os grupos de ratos diabéticos com nanoesferas, contendo insulina ou vazias, mantiveram o valor deste parâmetro bioquímico dentro dos valores dos ratos normais. A fosfatase alcalina compreende um grupo de enzimas fosfohidrolases e localiza-se em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, epitélio biliar e no osso, entre outros tecidos e órgãos (Lopes, 2007). Geralmente, qualquer hepatopatia activa pode aumentar os valores de fosfatase alcalina (Lopes, 2007). As maiores alterações dos níveis de fosfatase alcalina ocorrem na presença de casos de obstrução biliar intra e extra-hepática. Nos tumores hepáticos, hepatites e na aplicação de fármacos hepatotóxicos, as alterações nesta enzima são ligeiramente menores em comparação com a obstrução biliar intra e extra-hepática (Lopes, 2007).

A julgar pelos resultados obtidos, a formulação optimizada, com ou sem insulina, não revelou hepatotoxicidade. O aumento das enzimas a nível hepático observado pode, então, estar relacionado com a STZ (Cancercare, 2007). De facto, está descrito que esse aumento das enzimas hepáticas pode ser na ordem dos 25% (Cancercare, 2007). Contudo, sendo a dose STZ igual para todos os grupos, seria de esperar as mesmas alterações hepáticas entre os grupos teste e controlo IV e os restantes grupos de ratos diabéticos. Sugere-se, então, um efeito hepatoprotector da formulação, mas até ao momento, não existem dados experimentais que suportem essa hipótese.

No que respeita à avaliação da função renal, os níveis de ureia e de azoto ureico encontraram-se aumentados, especialmente para os grupos controlo II e IV. Esta alteração pode significar alteração da função renal e a histopatologia confirmou essa mesma alteração. No entanto, como os valores de creatinina para todos os animais e para os grupos em causa se encontram dentro dos valores de referência (Caparroz-Assef *et al.*, 2005), a alteração pode estar a ocorrer a nível extra-renal (Healthbanks, 2007). A explicação para esta alteração extra-renal pode estar relacionada, entre outros factores não determinados no presente estudo, com um catabolismo anormal proteico, devido à fisiopatologia da diabetes e não ao tipo de tratamento de cada grupo de animais.

Este estudo englobou, ainda, a análise de parâmetros hematológicos. Os parâmetros hematológicos foram semelhantes entre os diferentes grupos de ratos diabéticos, à exceção do número de eosinófilos nos grupos teste e grupo controlo IV. Porém, alguns dos parâmetros hematológicos dos ratos diabéticos foram ligeiramente diferentes dos ratos normais, nomeadamente na contagem de glóbulos vermelhos, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e número de plaquetas. Parte dos parâmetros hematológicos citados, mesmo alterados, e de uma forma geral, encontraram-se dentro dos valores de referência, designadamente os glóbulos vermelhos com o valor de referência de $7,2 \pm 1,4 \times 10^{12}/L$ (Priya *et al.*, 1997), hemoglobina corpuscular média com valores compreendidos entre 19-23 pg (Sayim *et al.*, 2005) e, finalmente, a concentração hemoglobina corpuscular média com $37,30 \pm 2,4$ gHb/dL (aproximadamente 373 g/L) (Priya *et al.*, 1997). Relativamente ao número de plaquetas, observou-se que, em todos os animais diabéticos, os níveis de plaquetas se encontravam aumentados em relação aos normais, no entanto sem significado estatístico. Esta trombocitose poderá ser devida à própria fisiopatologia da diabetes (Martin *et al.*, 1995) ou, em última instância, ao método de indução da doença (Al-Achi e Greenwood, 2001). Geralmente, na diabetes, ocorre um aumento da agregação plaquetária, aparecimento de microtrombos, diminuição da vida média das plaquetas, diminuição da actividade fibrinolítica e aumento do Factor de von Willebrand (Lopes, 2007; Medicina, 2007). Fisiologicamente, o aumento da actividade plaquetária nos doentes diabéticos (Yngen *et al.*, 2001) parece estar relacionado com a alteração do metabolismo do ácido araquidónico, a redução da produção de prostaciclina e o aumento da expressão da glicoproteína GPIb e GPIIb/IIIa (Quintana *et al.*, 2001). Além disso, existem outros trabalhos que descrevem que o próprio método de indução da diabetes pode estar relacionado com a alteração da função plaquetária (Tschöpe *et al.*, 1992; Al-Achi e Greenwood, 2001). Um outro aspecto importante, observado no presente trabalho, foi que, no grupo onde foi administrada a formulação com insulina, o valor das plaquetas foi ligeiramente mais elevado, comparativamente aos restantes grupos, mas sem significado estatístico. Existem alguns trabalhos que descrevem o papel da insulina nas plaquetas (Umeda *et al.*, 1982; Hamet *et al.*, 1983; Valentovic e Lubawy, 1983; Tschöpe *et al.*, 1992; Morinelli *et al.*,

1993; Yngen *et al.*, 2001). Em termos gerais, sabe-se que as plaquetas têm receptores insulínicos, à semelhança do que acontece em outras células (Yngen *et al.*, 2001) e a insulina influencia o *turnover* das plaquetas (Hamet *et al.*, 1983). A ser assim, a insulina libertada das nanoesferas poderá ter actuado como potenciador das plaquetas (Tschöpe *et al.*, 1992).

Na análise sumária da urina, detectou-se uma ligeira acidificação da urina nos ratos diabéticos. A poliaciúria, uma das características de estado hiperglicémico, pode ter ocorrido, devido ao aumento da concentração de glucose no filtrado glomerular, excedendo a capacidade de reabsorção das células tubulares e dando origem à diurese osmótica (Lerco *et al.*, 2003). Este mecanismo é responsável pela produção de maior volume de urina com elevada osmolaridade. Também a presença de proteínas na urina é consequência do estado hiperglicémico constante. Nesta situação, poderão ocorrer alterações microvasculares que serão responsáveis pela nefropatia diabética, pela presença de proteinúria persistente e, em última instância, por uma insuficiência renal progressiva (Barbas, 1997). Outro dado importante no presente estudo relacionou-se com a presença de corpos cetónicos, que como se viu, esteve apenas presente no grupo III. Este facto pode reflectir um estado mais avançado da diabetes. Sem a insulina, o organismo não consegue utilizar a glucose normalmente e recorre a outras reservas energéticas como, por exemplo, os lípidos. Durante esta transformação, o fígado produz os corpos cetónicos e alguns destes quando atingem os rins, passam para a urina, juntamente com a glucose (Barbas, 1997).

Em suma, este estudo toxicológico não revelou efeitos tóxicos da formulação optimizada, por si só, na histologia dos tecidos e/ou órgãos, parâmetros bioquímicos, parâmetros hematológicos e na análise sumária da urina. As alterações que se verificaram nestes parâmetros podem ser atribuídas à própria fisiopatologia da diabetes ou ao método da sua indução com STZ ou ao somatório destes dois factores. A ausência de toxicidade da formulação nos níveis citados foi ainda suportada pela taxa de mortalidade obtida ao longo do decorrer do ensaio, que como se verificou foi nula. Por isso, sugere-se que a formulação optimizada não é tóxica, após 15 dias de administração diária. Todavia, será de todo o interesse a realização de estudos mais prolongados e mais específicos na elucidação do

mecanismo da biotransformação dos polímeros da formulação e na determinação da reversibilidade do potencial efeito toxicológico.

4.2. Estudo do metabolismo em caixas metabólicas

A formulação otimizada demonstrou benefícios nos sintomas associados à doença Diabetes *Mellitus* tipo 1, tais como a polidipsia, a poliúria e a proteinúria. O efeito da formulação na polifagia dos animais em estudo foi ligeiro, uma vez que não se observaram diferenças significativas na quantidade de comida consumida entre os dois grupos. A polifagia é um dos sintomas dos doentes diabéticos. A incapacidade de utilização da glucose conduz ao aumento de apetite e ao consumo de comida. Se a célula não recebe normalmente a glucose, é activado um mecanismo de resposta no sistema nervoso central para essa falta de energia e conduz à polifagia (Sindelar e Paul Mystkowski, 2002; ANAD, 2006; Jr., 2006). Além da polifagia, observou-se uma diminuição do peso corporal ao longo do ensaio para os dois grupos e não foram observadas diferenças entre si. Esta flutuação de peso corporal está em conformidade com outros estudos já realizados (Musabayane *et al.*, 2000; Lerco *et al.*, 2003).

Os resultados relativos à quantidade de água consumida e do volume urinário demonstraram um efeito benéfico da formulação otimizada. A explicação para este facto pode basear-se no equilíbrio hidroelectrolítico. Tal como descrito, a regulação da osmolaridade dos fluidos corporais é controlada por um mecanismo homeostático que actua harmoniosamente, ajustando a ingestão e a excreção de água livre pelo rim. A ingestão de água é regulada pelo centro da sede que é estimulado pelos osmo- e quimiorreceptores, localizados nas regiões supraótica e paraventriculares do hipotálamo (Magaldi, 1996). Quando há um aumento da osmolaridade plasmática como, por exemplo, na presença de níveis sanguíneos de glucose elevados, a água do meio intracelular passa para o meio extracelular, o centro da sede é estimulado, promovendo a ingestão hídrica e restabelecendo a osmolaridade do plasma (Lerco *et al.*, 2003). A literatura descreve que a quantidade de água ingerida por um rato sem a doença é de 10 a 12 mL/100g/dia (Havenaar *et al.*, 1999). No

presente estudo, essa quantidade foi muito superior, uma vez que se tratavam de ratos diabéticos. Porém, os ratos diabéticos com nanoesferas contendo insulina ingeriram menor quantidade de água, após um período de 4 dias sucessivos de administração oral. Esta diminuição da quantidade de água ingerida poderá estar relacionada com a melhoria do perfil glicémico descrito no trabalho do capítulo anterior (Secção 3.7.2.1).

Este estudo metabólico demonstrou ainda que o volume urinário dos ratos diabéticos diminuiu com o tratamento com a formulação, provavelmente devido, mais uma vez, a uma melhoria do perfil glicémico e diminuição da quantidade de água ingerida. Por outro lado, o presente estudo demonstrou que os níveis de proteínas na urina das 24 h foram menores nos ratos diabéticos tratados com a formulação contendo insulina, comparativamente com os ratos tratados com nanoesferas vazias. Um estado de hiperglicémia conduz a um aumento intracelular de glucose nas células renais. Este excesso de glucose é metabolizado pelas vias do polioliol e da hexose-monofosfato (Barbas, 1997). A acumulação de polióis no rim provoca hipertonicidade, porque estes compostos são polares e apresentam difícil difusão transmembranária. Desta hipertonicidade renal resulta um influxo de solutos, o que provoca um aumento de volume celular e alteração de concentrações intracelulares de vários iões e compostos químicos. A alteração intracelular mais importante é, provavelmente, a diminuição do mioinositol que provoca uma perturbação severa na permeabilidade da membrana celular e na transmissão de sinais pela via fosfatidilinositol. A activação da via hexose-monofosfato no rim conduz, em última instância, à formação de radicais livres. A acumulação de radicais livres no rim conduz a fenómenos de hiperfusão e de hiperfiltração glomerular. Em paralelo, outras reacções vão decorrendo mas o resultado final poderá resultar numa hipertrofia e hiperplasia do rim, supressão do desenvolvimento celular, alteração dos poros da membrana celular, etc. Esta situação geral, culmina com uma perda de selectividade de filtração e, com o aparecimento de proteínas na urina (Barbas, 1997).

4.3. Estudo do metabolismo da glucose pela técnica RMN

Este estudo avaliou o metabolismo da glucose pela técnica de RMN, após a realização de uma PTGO. Os níveis de glicémia, em média, aumentaram até um valor máximo, 30 min após a administração da solução de glucose concentrada. O período de tempo de aumento da glicémia encontra-se em conformidade com o estudo desenvolvido por Jin e colaboradores (Jin *et al.*, 2003). Além disso, este período de tempo foi suficiente para se observar um enriquecimento ^2H de 1,75% na água corporal. A relação entre os enriquecimentos em ^2H da MAG sanguínea e da água corporal foi semelhante nos vários grupos em estudo, o que sugere taxas de produção de glucose endógena igualmente semelhantes.

Além disso, a glucose plasmática compreende a glucose absorvida oralmente (marcador intacto) e a glucose endógena que deriva, tanto da gluconeogénese, como da glicogenólise. O enriquecimento de ^2H na posição 2 da glucose plasmática acontece, tanto na via glicogenolítica como na gluconeogénica de produção de glucose (Landau *et al.*, 1996). Já o enriquecimento de ^2H na posição 5 da glucose plasmática acontece, exclusivamente, quando a glucose é produzida pela via gluconeogénica (Landau *et al.*, 1996). O cálculo da razão H5/H2 demonstrou que esta última via de produção de glucose foi a principal com cerca de 75%, tal como aconteceu no estudo desenvolvido por Jin e colaboradores (Jin *et al.*, 2003). No entanto, a análise destes resultados revelou uma acção ineficaz da formulação em estudo na produção endógena de glucose, isto porque, se a insulina libertada das nanoesferas tivesse actuado, deveria ter sido inibida a produção endógena de glucose.

Relativamente ao fígado, neste órgão a glucose é armazenada em glicogénio, quer pela via directa quer pela indirecta (Newgard *et al.*, 1983). A via directa pode ser avaliada pela incorporação da molécula intacta [$\text{U-}^{13}\text{C}$]glucose no glicogénio do fígado, mas também pelo enriquecimento em ^2H na posição 2 nas moléculas de glucose do glicogénio. Este estudo foi desenhado de modo a aceder às acções metabólicas da insulina, nomeadamente à estimulação da glicogénio sintetase e à inibição da gluconeogénese. Por outro lado, sabe-se que o enriquecimento em ^2H deverá mais sensível que o ^{13}C , uma vez que, seja qual for a proveniência (glucose não enriquecida e enriquecida em ^{13}C), todas as moléculas dirigidas

para a síntese de glicogénio sofrem incorporação de ^2H na posição 2 (na extensão máxima do enriquecimento da água corporal). A síntese de glicogénio, avaliada pela incorporação de ^2H para alguns animais, não foi observável para todos os animais em estudo. Esta observação pode estar relacionada com a variabilidade inter-individual e não tanto com o tratamento envolvido. Provavelmente, se a PTGO decorresse por um período suficientemente alargado, o efeito da variabilidade inter-individual poderia deixar de ser tão significativo para a síntese de glicogénio.

5. CONCLUSÕES

Uma das grandes preocupações da presente dissertação incidiu no desenvolvimento de uma formulação capaz de veicular insulina oralmente até ao seu local de absorção. No desenvolvimento da formulação, a condição essencial na escolha dos polímeros foi sempre a sua biodegradabilidade. De uma forma geral, todos os componentes da presente formulação são aprovados pela FDA, sendo considerados materiais não tóxicos. No entanto, a formulação envolve o n-hexano durante o processo de recuperação. Mas, mesmo este apresentou níveis de concentração muito abaixo dos valores limites permitidos pela FDA. Contudo, a avaliação toxicológica não ficaria completa sem a realização de um estudo dos eventuais efeitos adversos, decorrente da administração da formulação em animais.

Este estudo toxicológico, que decorreu durante 15 dias, não revelou toxicidade como se comprovou pela histologia, pelos parâmetros bioquímicos e hematológicos e finalmente, pela análise de urina. A ausência de toxicidade nos parâmetros citados foi ainda suportada pela taxa de mortalidade ao longo do decorrer do ensaio, que, como se referiu, foi nula. Daqui se conclui que, num período de 15 dias de administração (1 i.d.), a formulação otimizada não demonstrou toxicidade. Estes resultados orientam a investigação futura desta formulação para a avaliação dos efeitos decorrentes da aplicação terapêutica, durante um período de tempo mais prolongado.

Relativamente à influência desta formulação no metabolismo, o estudo de 4 dias em caixas metabólicas demonstrou que a presente formulação otimizada conduziu a uma melhoria de alguns dos sintomas da doença, nomeadamente a polidipsia, poliúria e proteinúria, mas sem influência significativa na polifagia e no peso corporal.

O estudo específico do metabolismo da glucose que recorreu à técnica de RMN, após uma PTGO, não revelou diferenças na produção de glucose nem na sua principal via de síntese. Esta via foi a gluconeogénica para todos os casos, independentemente do tratamento. Não se pode concluir acerca da eficácia da formulação otimizada na síntese de glicogénio hepático, uma vez que o tempo da PTGO parece ter sido insuficiente. No entanto, este estudo

poderá ser, num futuro próximo, otimizado e ser útil para a caracterização do metabolismo da glucose em modelos animais.

6. BIBLIOGRAFIA

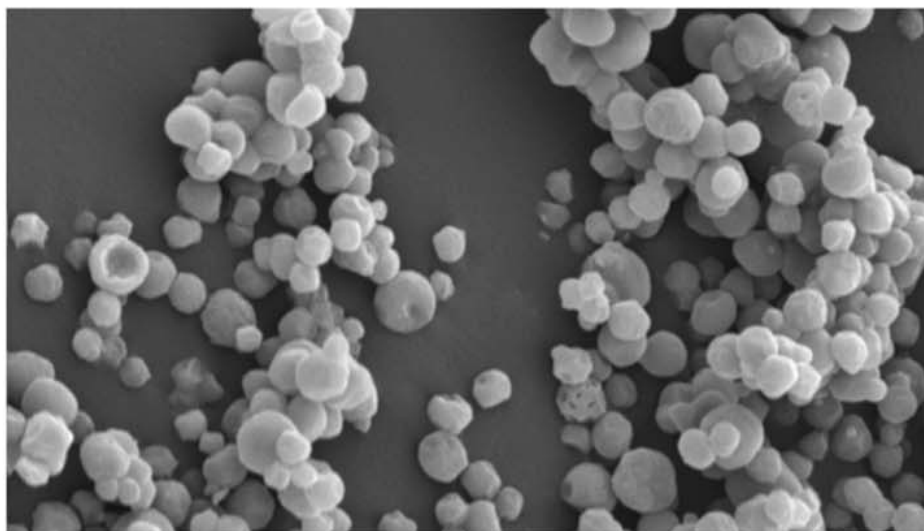
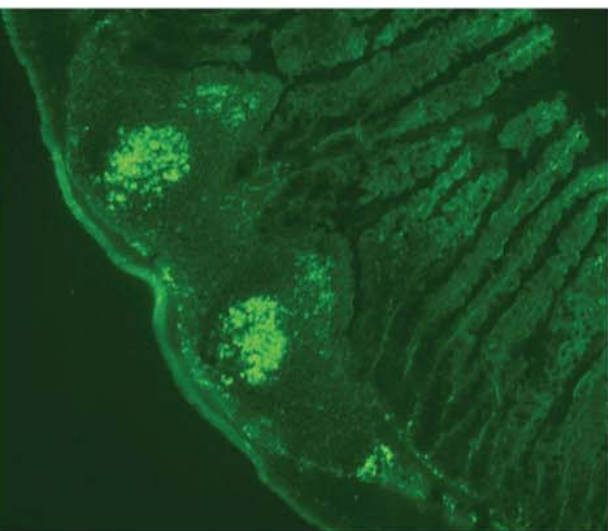
- AL-ACHI, A. e GREENWOOD, R. (2001) A brief report on some physiological parameters of streptozotocin-diabetic rat. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 27, 465-468.
- ANAD (2006) http://www.anad.org.br/html/modules/xt_conteudo/index.php?id=2, consultado em 5/07/2007.
- BARBAS, J. (1997) Nefropatia diabética. In: Duarte, R. (ed.) **Diabetologia Clínica**. Lidel-Edições Técnicas, Lda., p. 255-269.
- CANCERCARE (2007) <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/STREPTOZ.pdf>, consultado em 5/07/2007.
- CAPARROZ-ASSEF, S. M., GRESPAN, R., BATISTA, R. C. F., BERSANI-AMADO, F. A., BARONI, S., DANTAS, J. A., CUMAN, R. K. N. e BERSANI-AMADO, C. A. (2005) Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. **Acta Sci. Health Sci.** 27, 4141-4144.
- DUARTE, R., ZELLER, P. V. e LISBOA, P. E. (1997) Alterações oculares na Diabetes. In: Duarte, R. (ed.) **Diabetologia Clínica**. Lidel-Edições Técnicas, Lda., Lisboa, p. 242-254.
- FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R., FATAL, E., PORQUET, D., FEGER, J. e COUVREUR, P. (1995) Evaluation of liver toxicological effects induced by poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 130, 272-279.
- FERRER, J. C., FAVRE, C., GOMIS, R. R., FERNANDEZ-NOVELL, J. M., GARCA-ROCHA, M., IGLESIA, N. D. L., CID, E. e GUINOVART, J. J. (2003) Control of glycogen deposition. **FEBS Lett.** 546, 127-132.
- GABBAY, K. (1975) Hyperglycemia, polyol metabolism, and complication of diabetes mellitus. **Ann. Rev. Med.** 26, 521-536.
- GELPERINA, S. E., KHALANSKY, A. S., SKIDAN, I. N., SMIRNOVA, Z. S., BOBRUSKIN, A. I., SEVERIN, S. E., TUROWSKI, B., ZANELLA, F. E. e KREUTER, J. (2002) Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. **Toxicol. Lett.** 126, 131-141.

- HAMET, P., SUGIMOTO, H., UMEDA, F. e FRANKS, D. J. (1983) Platelets and vascular smooth muscle: abnormalities of phosphodiesterase, aggregation, and cell growth in experimental and human diabetes. **Metabolism** 32, 124-130.
- HAVENAAR, R., MEIJER, J. C., MORTON, D. B., RITSKES-HOITINGA, J. e ZWART, P. (1999) Biología y manejo de los animales de laboratorio **Principios de la ciencia del animal de laboratorio**. Elsevier, p. 21-82.
- HEALTHBANKS (2007)
<http://www.healthbanks.com/PatientPortal/Public/LinkPublic.do?ArticleID=HW5aa36271>, consultado em 5/07/2007.
- INAL, S., YILMAZ, N., NISBET, C., GUVENC, T. e SAMSUN, T. (2006) Biochemical and histopathological findings of N-butyl-2-cyanoacrylate in oral surgery: an experimental study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** 102, e14-e17.
- JIN, E. S., UYEDA, K., KAWAGUCHI, T., BURGESS, S. C., MALLOY, C. R. e SHERRY, A. D. (2003) Increased hepatic fructose 2,6-bisphosphate after an oral glucose load does not affect gluconeogenesis. **J. Biol. Chem.** 278, 28427-28433.
- JONES, J. (2007) Tracing hepatic glucose and glycogen fluxes with $^2\text{H}_2\text{O}$. In: Roden, M. (ed.) **Clinical diabetes research: methods and techniques**. John Wiley & Sons, Ltd.
- JONES, J. G., FAGULHA, A., BAROSA, C., BASTOS, M., BARROS, L., BAPTISTA, C., CALDEIRA, M. M. e CARVALHEIRO, M. (2006) Noninvasive analysis of hepatic glycogen kinetics before and after breakfast with deuterated water and acetaminophen. **Diabetes** 55, 2294-2300.
- JONES, J. G., MERRITT, M. e MALLOY, C. (2001) Quantifying tracer levels of $^2\text{H}_2\text{O}$ enrichment from microliter amounts of plasma and urine by ^2H NMR. **Magnet. Res. Med.** 45, 156-158.
- JR., D. P. (2006) Central regulation of energy homeostasis. The key role of insulin. **Diabetes** 55, 155-160.
- KARAKILCIK, A. Z., HAYAT, A., AYDILEK, N., ZERIN, M. e CAY, M. (2005) Effects of vitamin C on liver enzymes and biochemical parameters in rats anesthetized with halothane. **Gen. Physiol. Biophys.** 24, 47-55.

- KIM, J. S., YOON, T.-J., YU, K. N., KIM, B. G., PARK, S. J., KIM, H. W., LEE, K. H., PARK, S. B., LEE, J.-K. e CHO, M. H. (2006) Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. **Toxicol. Sci.** 89, 338-347.
- KOIVISTO, V. A., ÅKERBLOM, H. K. e KIVILUOTO, M. K. (1974) Metabolic and hormonal effects of exercise in the severely streptozotocin-diabetic rat. **Diabetologia** 10, 329-335.
- KRAVTZOFF, R., APPELQVIST, T., HADDOUK, H., MANCIAUX, X., CHOLET, G., DE MIGUEL, I., MAJOR, M., BETBEDER, D. e FORSTER, R. (1998a) Preclinical toxicology of biovectorTM nanoparticles: Part II. Local tolerance, genetic toxicology and pharmacokinetics. **Toxicol. Let.** 95, 117.
- KRAVTZOFF, R., LOGET, O., MANCIAUX, X., ATTIA, M., CHOLET, G., DE MIGUEL, I., MAJOR, M., BETBEDER, D. e FORSTER, R. (1998b) Preclinical toxicology of biovectorTM nanoparticles: Part I. General toxicology. **Toxicol. Let.** 95, 116.
- KUME, E., ARUGA, C., ISHIZUKA, Y., TAKAHASHI, K., MIWA, S., ITOH, M., FUJIMURA, H., TORIUMI, W., KITAMURA, K. e DOI, K. (2005) Gene expression profiling in streptozotocin treated mouse liver using DNA microarray. **Exp. Toxicol. Pathol.** 56, 235-244.
- LANDAU, B. R., WAHREN, J., CHANDRAMOULI, V., SCHUMANN, W. C., EKBERG, K. e KALHAN, S. C. (1996) Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. **J. Clin. Invest.** 98, 378-385.
- LERCO, M. M., SPADELLA, C. T., MACHADO, J. L. M., SCHELLINI, S. A. e PAVODINI, C. R. (2003) Caracterização de um modelo experimental de Diabetes *Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrg. Bras.** 18, 136-142.
- LOPES, H. J. J. (2007)
www.goldanalisa.com.br/publicacoes/Enzimas_no_Laboratorio_Clinico.pdf,
consultado em 2/07/2007.
- MAGALDI, A. J. B. (1996) Revisão/atualização em fisiologia e fisiopatologia renal: regulação hormonal da reabsorção de água no ducto colector. **J. Bras. Nefrol.** 18, 401-404.

- MARTIN, F. J., MIGUEZ, J. M., ALDEGUNDE, M. e ATIENZA, G. (1995) Platelet serotonin transport is altered in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci.** 56, 1807-1815.
- MEDICINA (2007)
http://medicina.fm.usp.br/endoresidentes/roteiro/diabetes_mellitus_roteiro.pdf,
consultado em 18/06/2007.
- MORINELLI, T. A., TEMPEL, G. E., JAFFA, A. A., SILVA, R. H., NAKA, M., FOLGER, W. e HALUSHKA, P. V. (1993) Thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin therapy in the rat. **Prostaglandins** 45, 427-438.
- MUSABAYANE, C. T., MUNJERI, O., BWITITI, P. e OSIM, E. E. (2000) Orally administered, insulin-loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats. **J. Endocrinol.** 164, 1-6.
- NEWGARD, C. B. (2004) Regulation of glucose metabolism in the liver. In: DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Keen, H. e Zimmet, P. (ed.) **International textbook of Diabetes Mellitus**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 253-275.
- NEWGARD, C. B., HIRSCH, L. J., FOSTER, D. W. e MCGARRY, J. D. (1983) Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. **J. Biol. Chem.** 258, 8046-8052.
- PERDIGOTO, R., RODRIGUES, T. B., FURTADO, A. L., PORTO, A., GERALDES, C. F. G. C. e JONES, J. G. (2003) Integration of [U-¹³C]glucose and ²H₂O for quantification of hepatic glucose production and gluconeogenesis. **NMR Biomed.** 16, 189-198.
- PRIYA, C. A. Y. B., ANITHA, K., MOHAN, E. M., PILLAI, K. S., MURTHY, P. B. e NADU, T. (1997) Toxicity of fluoride to diabetic rats. **Fluoride** 30, 51-58.
- QUINTANA, X. G., RODRÍGUEZ, M. N. e SABO, A. G. (2001) Las plaquetas en la diabetes *mellitus*. **Rev. Cub. Hematol. Inmunol. Hemoter.** 17, 19-24.
- RAMA, A. C. D. C. R. (2003) Diminuição de toxicidade gástrica da indometacina por complexação com hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.

- SAYIM, F., YAVASOGLU, N. U. K., UYANIKGIL, Y., AKTUG, H., YAVASOGLU, A. e TURGUT, M. (2005) Neurotoxic effects of cypermethrin in *Wistar* rats: a haematological, biochemical and histopathologic study. **J. Health Sci.** 51, 300-307.
- SINDELAR, D. K. e PAUL MYSTKOWSKI, D. J. M., RICHARD D. PALMITER, AND MICHAEL W. SCHWARTZ. (2002) Attenuation of diabetic hyperphagia in neuropeptide Y-deficient mice. **Diabetes** 51, 778-783.
- TSCHÖPE, D., SCHWIPPERT, B., SCHEITLER, B., KIESEL, U., ROTHE, H., ROESEN, P. e GRIES, F. A. (1992) Increased GPIIB/IIIa expression and altered DNA-ploidy pattern in megakaryocytes of diabetic BB-rats. **Eur. J. Clin. Invest.** 22, 591-598.
- TSUJI, J. S., MAYNARD, A. D., HOWARD, P. C., JAMES, J. T., LAM, C.-w., WARHEIT, D. B. e SANTAMARIAK, A. B. (2006) Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part IV: Risk assessment of nanoparticles. **Toxicol. Sci.** 89, 42-50.
- UMEDA, F., ADNOT, S., FRANKS, D. J. e HAMET, P. (1982) Cyclic nucleotide phosphodiesterase and aggregation in platelets from diabetic rats. **Metabolism** 31, 704-709.
- VALENTOVIC, M. A. e LUBAWY, W. C. (1983) Impact of insulin or tolbutamide treatment on ¹⁴C-arachidonic acid conversion to prostacyclin and/or thromboxane in lungs, aortas, and platelets of streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes** 32, 846-851.
- VALLON, V. e OSSWALD, H. (1994) Dipyridamole prevents diabetes-induced alterations of kidney function in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 349, 217-222.
- WIJKSTROM, M., KIRCHHOF, N., GRAHAM, M., INGULLI, E., COLVIN, R. B., CHRISTIANS, U., HERING, B. J. e SCHUURMAN, H.-J. (2005) Cyclosporine toxicity in immunosuppressed streptozotocin-diabetic nonhuman primates. **Toxicology** 207, 117-127.
- YNGEN, M., LI, N., HJEMDAHL, P. e WALLEN, N. H. (2001) Insulin enhances platelet activation *in vitro*. **Thromb. Res.** 104, 85-91.



CONCLUSÕES GERAIS

CAPÍTULO IX

CONCLUSÕES GERAIS

A opção da nanoencapsulação, como método de administração oral de insulina, foi baseada em duas razões principais: por um lado, no tamanho reduzido das nanopartículas e, por outro, na elevada estabilidade em fluidos biológicos. O polímero seleccionado para encapsular a insulina foi o alginato e o método escolhido para a produção de nanopartículas foi o método de emulsificação/gelificação interna.

A presente dissertação demonstrou ser possível a transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica. Esta transposição compreendeu duas fases diferentes: a produção e a recuperação das partículas de alginato.

Na fase da produção das partículas de alginato, esta transposição ocorreu, principalmente, devido a dois factores *major*: velocidade de agitação durante a emulsificação e presença de agente emulsivo. A formulação com melhores características granulométricas foi preparada a uma velocidade de agitação de 1600 rpm, com um diâmetro da hélice de 5,2 cm e um tempo de sonicação do sal insolúvel de cálcio de 30 min, com recurso a óleo de parafina, aplicando concentrações de agente emulsivo de 1,5% (V/V) e de alginato de 2% (m/V). Finalmente, a razão A/O foi de 50/50 (V/V). Este método revelou-se um método de simples execução, de fácil transposição para a escala industrial e executável à temperatura ambiente, permitindo assim, a sua aplicação a fármacos de natureza frágil, como a insulina.

Ultrapassada a fase de produção, surgiu uma outra dificuldade relacionada com o processo de recuperação das partículas de alginato. Verificou-se que, à medida que a granulometria das partículas diminuía, os problemas relacionados com o processo de recuperação das partículas aumentavam. Foram estudadas várias estratégias baseadas em duas vertentes: a primeira, relacionada com a aplicação exclusiva da centrifugação, e a segunda, com a aplicação de agentes desidratantes associada a uma centrifugação com menor força centrífuga ($12.500 \times g$). Ambas as vertentes recorreram ao tampão acetato de pH 4,5 (USP XXVIII) como meio de lavagem. Este estudo demonstrou que a superfície das partículas foi influenciada pelo protocolo de recuperação adoptado, sendo mais rugosa com o uso de agentes desidratantes. A menor granulometria das partículas e o menor número de

ciclos de lavagem foram obtidos com protocolo que associou o tampão acetato de pH 4,5 com agentes desidratantes (acetona, isopropanol e n-hexano) e uma menor força centrífuga ($12.500 \times g$). Este protocolo permitiu obter valores superiores de EE de insulina e de RR.

Uma das preocupações com a aplicação dos protocolos de recuperação com agentes desidratantes foi o uso de solventes orgânicos, que poderiam implicar a alteração da estrutura da insulina encapsulada. A integridade estrutural da molécula de insulina libertada das partículas recuperadas pelos diferentes protocolos de recuperação foi avaliada através de três técnicas distintas: HPLC-UV, HPLC-MS e DC. Ambas as técnicas de HPLC revelaram que a insulina mantém a sua integridade estrutural, independentemente do protocolo de recuperação utilizado. Todavia, os resultados obtidos pelo DC demonstraram uma ligeira alteração estrutural da molécula de insulina para os diferentes protocolos, à excepção do protocolo que associou o tampão acetato de pH 4,5 com os agentes desidratantes, acetona, isopropanol e n-hexano, recorrendo a uma menor força de centrífuga ($12.500 \times g$). O desvio observado nos espectros de DC dos restantes protocolos poderá estar relacionado, em última instância, com a própria complexação da proteína com o polímero alginato, não reflectindo a perda de actividade da insulina. A partir desta fase, e com as alterações na formulação, o termo de *partículas* foi substituído por *nanoesferas*.

Durante a transposição do método de emulsificação/gelificação interna à escala nanométrica, observou-se que as partículas de alginato foram incapazes de reter a insulina, durante a sua incubação em tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXVIII). Foram adoptadas diferentes estratégias para melhorar os resultados obtidos, a primeira das quais baseada na optimização do tipo de alginato. Foram estudados diferentes alginatos com variações no teor em resíduos G e na viscosidade. Os resultados obtidos demonstraram que todos os tipos de alginato foram incapazes, por si só, de reter a insulina encapsulada durante a sua passagem em meio ácido. Na avaliação da granulometria obtida, EE e quantidade de insulina libertada em meio ácido, o tipo de alginato seleccionado nesta fase foi o de baixo teor em resíduos G e baixa viscosidade, especificamente o alginato A0682. Numa segunda fase e seleccionado o tipo de alginato, foram adoptadas estratégias adicionais que consistiram no reforço da matriz polimérica de alginato com a carboximetilcelulose sódica, o polifosfato de sódio, o sulfato de

celulose e o sulfato de dextrano. O melhor compromisso observado entre a granulometria, a EE e a menor percentagem de libertação de insulina durante a incubação em tampão HCl/KCl de pH 1,2, foi obtido com o sulfato de dextrano. A estabilidade das partículas de alginato foi atribuída à formação de um complexo entre a proteína e o polímero aniônico, através de interações electrostáticas. De seguida, a concentração de sulfato de dextrano foi otimizada, tendo sido seleccionada a concentração de 0,75% (m/V). Numa fase posterior, estudou-se a influência da razão cálcio/alginato (m/m) na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V). Foram estudadas diferentes razões cálcio/alginato e avaliados os parâmetros de selecção citados anteriormente. A razão cálcio/alginato de 7% (m/m) reuniu o melhor compromisso nos vários parâmetros analisados. A influência da razão molar ácido/cálcio na matriz de alginato reforçada com sulfato de dextrano a 0,75% (m/V) e com a razão cálcio/alginato (m/m) otimizada também foi alvo de estudo e segundo os mesmos parâmetros de selecção. Neste caso, foi seleccionada a razão molar ácido/cálcio de 3.

A bioactividade da insulina, após produção das nanoesferas e libertação a partir das mesmas, foi avaliada através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, foi desenvolvido um protocolo *in vitro* que permitiu quantificar a bioactividade da insulina. Um ano após ter sido submetida a um processo de nanoencapsulação e na presença de condições de preparação não estéreis, a insulina manteve uma quantidade significativa da sua bioactividade (55% do valor inicial). Este método poderá ser utilizado para a avaliação da bioactividade em futuros estudos de pré-formulação. No que respeita aos resultados *in vivo*, estes revelaram que o efeito terapêutico da insulina encapsulada e libertada das nanoesferas foi equivalente ao da insulina não encapsulada.

Porém, durante os ensaios de determinação do perfil de libertação *in vitro*, foi observado que, apesar de ter sido, praticamente nula a percentagem libertação de insulina a partir das nanoesferas após incubação em tampão HCl/KCl de pH 1,2, a libertação da insulina foi total e instantânea logo após a transferência das nanoesferas para o tampão fosfato de pH 6,8. Nesse sentido, recorreram-se a três diferentes polímeros de revestimento catiónicos: quitosano, PLL e PHMCG. Este estudo demonstrou que a menor granulometria das nanoesferas de alginato foi obtida com a PLL seguida do quitosano e, por fim, a PHMCG. Na

avaliação do potencial zeta, apenas o quitosano foi capaz de inverter a carga eléctrica negativa das nanoesferas de alginato para uma carga positiva, provavelmente devido ao seu PM que lhe confere uma localização mais superficial na nanoesfera. Quanto à EE, observou-se que a adição de um polímero de revestimento diminuiu a EE de insulina, comparativamente com as nanoesferas não revestidas. Este facto parece estar relacionado com o período de revestimento (agitação magnética a 100 rpm durante 30 min) e com a competição entre as espécies químicas envolvidas que resulta numa maior difusão da insulina a partir da matriz polimérica. Entre os polímeros estudados, o quitosano foi o polímero que permitiu obter valores de EE superiores. O perfil de libertação *in vitro* da insulina a partir das nanoesferas de alginato após a utilização de polímeros catiónicos também foi alterado. O efeito de retenção da insulina em tampão HCl/KCl de pH 1,2 devido ao reforço da matriz de alginato com o sulfato de dextrano manteve-se apenas para o quitosano e para a PLL. O efeito de retardamento da libertação de insulina a pH intestinal foi mais significativo com o quitosano. A interacção do quitosano com o alginato foi comprovada através de duas técnicas diferentes: DSC e FITR. Ambas as técnicas confirmaram a formação de um complexo polielectrolítico entre o alginato e o quitosano.

A resistência enzimática da insulina encapsulada foi também avaliada. Nesta fase, observou-se que a formulação anterior, que compreendia nanoesferas de alginato reforçadas com sulfato de dextrano e revestidas com quitosano, foi incapaz de impedir a difusão da enzima pepsina para o interior das nanoesferas e a consequente degradação da insulina encapsulada. A ineficácia da protecção enzimática parece estar associada à própria metodologia (emulsificação/gelificação interna) e às características intrínsecas de cada um dos polímeros, nomeadamente à porosidade do alginato e do quitosano. Por isso, foram desenvolvidas diferentes estratégias que consistiram na aplicação de um segundo revestimento com um polímero e/ou uma proteína: pectina, caseína e albumina. O segundo revestimento com a pectina e caseína influenciou a granulometria das nanoesferas (para maiores granulometrias). Pelo contrário, a aplicação de um revestimento com albumina permitiu uma contracção das nanoesferas, provavelmente devido a um maior empacotamento da proteína na membrana de revestimento e matriz polimérica. Em todas as situações, a EE

diminuiu após o segundo revestimento, possivelmente devido a uma maior difusão da insulina, provocada por um maior tempo de agitação magnética durante o revestimento e pela competição entre as diferentes espécies químicas envolvidas. Em termos de resistência proteolítica da insulina encapsulada à pepsina, este valor aumentou, significativamente, após a aplicação da pectina e albumina. Os valores de resistência foram de $14,3 \pm 2,6 \%$ e $66,9 \pm 1,2\%$ para a pectina e albumina, respectivamente, tendo-se revelado nula para a caseína.

Os resultados da estabilidade enzimática *in vitro* foram confirmados, através de ensaios *in vivo*. As nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e com quitosano e caseína foram administradas oralmente a ratos diabéticos. Ambas as formulações demonstraram incapacidade na diminuição da glicémia. Pelo contrário, as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e pectina conduziram a uma redução da glicémia ligeira 12 h após a sua administração oral. Este resultado está em conformidade com as características físico-químicas da pectina, nomeadamente a sua resistência ao ataque enzimático ao longo do TGI e a sua sensibilidade ao ataque enzimático ao chegar ao cólon. Por último, as nanoesferas de alginato revestidas com quitosano e albumina demonstraram um efeito na redução da glicémia comparativamente superior ao observado com a pectina. O mecanismo proposto para a resistência enzimática baseia-se numa hipotética substituição do alvo enzimático da pepsina (insulina pela albumina). Assim sendo, supõe-se que, durante o tempo de incubação no fluido gástrico artificial, a pepsina degrada maioritariamente a albumina, mais acessível, deixando a insulina encapsulada livre e bioactiva. A redução da glicémia foi ainda mais significativa após administração oral da mesma formulação, mas no estado hidratado e na presença de PEG. Esta última formulação foi sujeita a uma série de ensaios de caracterização físico-química e de caracterização *in vivo* do efeito terapêutico. Neste caso, cerca de 90% das partículas produzidas apresentaram um diâmetro médio inferior a 1842 nm. Esta formulação conferiu uma elevada resistência à insulina durante a incubação com a pepsina e, por isso, foi denominada de *formulação otimizada*. Esta formulação compreende nanoesferas de alginato reforçadas com sulfato dextrano e revestidas por quitosano, PEG e albumina no estado hidratado. A redução dos níveis de glicémia basais

foram superiores a 75% após a administração de nanoesferas contendo insulina a 100 UI/kg, comparativamente às nanoesferas vazias ou insulina não encapsulada, que não revelaram qualquer efeito na glicémia. As nanoesferas contendo insulina produziram um efeito terapêutico prolongado e dependente da dose. Por outro lado, a melhoria da resposta fisiológica à administração de uma solução aquosa de glucose (2 g/kg de peso corporal) confirmou a eficácia da insulina, quando encapsulada em nanoesferas. Finalmente, os níveis plasmáticos de insulina aumentaram significativamente (sete vezes superior ao valor inicial), indicando, que a insulina foi protegida e absorvida pela mucosa intestinal. A biodisponibilidade oral da insulina em relação à insulina não encapsulada administrada pela via s.c. foi de 34%.

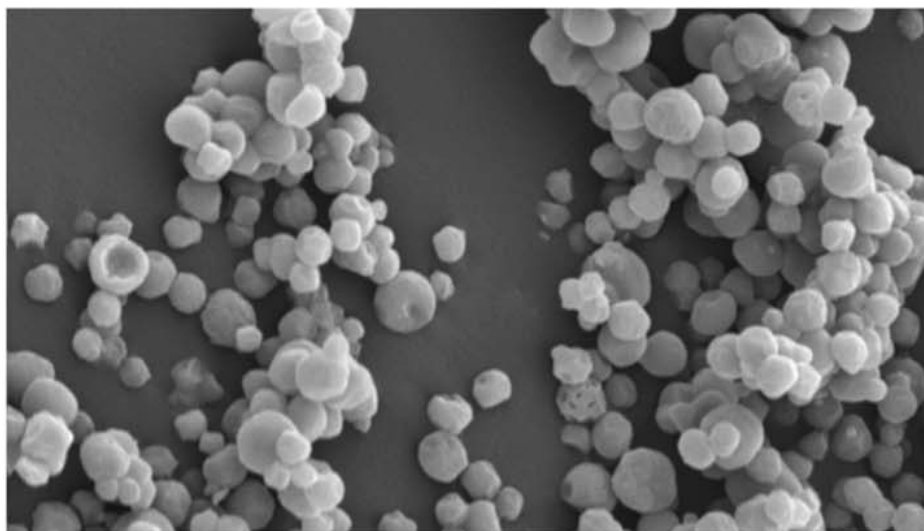
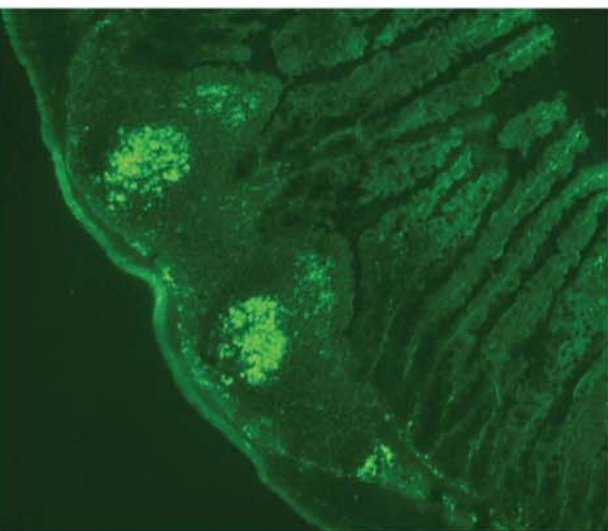
O mecanismo de absorção intestinal da insulina foi igualmente alvo de estudo. A insulina foi marcada com FITC e a captação da insulina fluorescente foi quantificada em segmentos intestinais por espectrofluorometria e visualizada por microscopia de fluorescência e confocal de varrimento laser. Os resultados obtidos por espectrofluorometria indicaram que a insulina-FITC, na forma livre ou sob a forma de nanoesferas, foi captada pela mucosa intestinal. As observações microscópicas confirmaram estes pressupostos. Ambos os resultados, microscópicos e espectrofluorométricos, demonstraram que a insulina-FITC libertada das nanoesferas no lúmen ou associada às nanoesferas foi capaz de transpor a mucosa intestinal, principalmente através de um mecanismo associado às placas de Peyer e passagem intercelular/paracelular, embora a captação intracelular via ligação com o receptor celular não tenha sido excluída. A dúvida que surgiu nos ensaios de captação intestinal reside na identificação do que é, realmente, absorvido: se a insulina sob a forma livre ou se a insulina associada às nanoesferas. Esta questão encontra-se em aberto e será alvo de estudo num futuro próximo.

Uma outra questão, que normalmente surge no decorrer do desenvolvimento de formulações farmacêuticas, relaciona-se com a avaliação metabólica e toxicológica. No desenvolvimento da formulação, a condição essencial na escolha dos polímeros foi sempre a sua biodegradabilidade. Todos os componentes da presente formulação são aprovados pela FDA. A preocupação incidia nos solventes orgânicos utilizados no processo de recuperação.

Mas, mesmo o n-hexano, considerado solvente classe 2 pela ICH, quando doseado por cromatografia em fase gasosa, apresentou níveis muito inferiores ao limite permitido pela FDA. Mesmo assim, para confirmar a não toxicidade da formulação, optou-se pela realização de um estudo toxicológico, após administração oral da formulação otimizada, durante 15 dias sucessivos (1 i.d.). Este estudo toxicológico demonstrou uma ausência de efeitos tóxicos, tanto a nível da histologia dos tecidos e/ou órgãos como a nível dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. A ausência de toxicidade nos parâmetros citados foi ainda suportada pela taxa de mortalidade nula, ao longo do decorrer do ensaio. Daqui se conclui que, num período de 15 dias de administração, a formulação otimizada não revelou toxicidade. Todavia, serão necessários estudos mais prolongados e específicos na elucidação do mecanismo da biotransformação dos polímeros da formulação e na determinação da reversibilidade do potencial efeito toxicológico para complementar esta afirmação.

Por fim, sendo a *Diabetes Mellitus* uma doença crónica, cujas manifestações patológicas sobre os rins, retina e vasos estão nitidamente relacionadas com controlo glicémico às anormalidades metabólicas causadas pela doença, optou-se por um estudo metabólico. Este estudo, realizado em caixas metabólicas, demonstrou que a formulação otimizada conduziu a efeitos benéficos de alguns dos sintomas da doença, ao fim de 4 dias de administração oral, nomeadamente a polidipsia, poliúria e proteinúria, mas sem influência significativa na polifagia e no peso corporal. Seria vantajoso o prolongamento deste ensaio, mas tal prática revelou-se inexecutável, uma vez que se trata de um método muito laborioso.

O estudo específico do metabolismo da glucose que recorreu à técnica de RMN, após uma PTGO, não revelou diferenças na produção de glucose inclusive na sua principal via de síntese. Independentemente do tratamento, a via gluconeogénica foi a mais representativa em todos os grupos. Porém, não se pode concluir acerca da eficácia da formulação na síntese de glicogénio hepático, uma vez que o tempo da PTGO foi insuficiente. No entanto, este estudo poderá ser, num futuro próximo, otimizado e útil para a caracterização do metabolismo da glucose em modelos animais.



PERSPECTIVAS FUTURAS DA
NANOTECNOLOGIA
NA TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

CAPÍTULO X

1. PERSPECTIVAS FUTURAS DA NANOTECNOLOGIA NA TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A nanotecnologia é uma área promissora, mas que só agora está a dar os primeiros passos, mostrando, mesmo assim, resultados surpreendentes como, por exemplo, na produção de semicondutores, nanocompósitos, biomateriais, chips, entre outros. Procedendo a um levantamento de alguns dos produtos disponíveis no mercado, facilmente se percebe essa mesma polivalência, nomeadamente na indústria têxtil, com tecidos resistentes a manchas e que não amarrotam; na indústria de material de desporto, com raquetes e bolas de ténis; na indústria de filtros para protecção solar; na construção civil; na indústria da cola; nos novos sistemas de filtração do ar e da água; na electrónica, com microprocessadores e equipamentos electrónicos, em geral; na indústria química e, finalmente, na área da medicina e da farmácia como, por exemplo, no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos, catéteres, válvulas cardíacas, sistemas *bypass*, implantes ortopédicos, regeneração de tecidos, produtos cosméticos, produtos biotecnológicos, vacinas, etc.

Presentemente, encontram-se disponíveis no mercado mais de 130 fármacos e acima de 125 produtos biomédicos, cujo desenvolvimento envolve técnicas nanotecnológicas. Segundo a FDA, observa-se um aumento de cerca de 70% no crescimento anual de novos produtos que se baseiam em novas nanotecnologias. As áreas de actuação são extensas, desde a terapia oncológica (com cerca de 77 produtos) a áreas de desenvolvimento de outros sistemas de libertação de fármacos (com cerca de 56 produtos). A Tabela X-1 descreve alguns desses produtos já disponíveis no mercado, principalmente, a nível dos EUA, ou cuja disponibilidade ocorrerá brevemente.

Tabela X-1. Produtos nas áreas da medicina e farmácia aprovados pela FDA que envolvem nanotecnologias.

Nome comercial	Indicação terapêutica	Empresa responsável	Referências
Exubera [®]	Tratamento da Diabetes <i>Mellitus</i>	Pfizer Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Janeiro de 2006	www.fda.gov/bbs/topics/news/2006/NEW01304.html
Emend [®]	Anti-emético	Merck & Co., Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Março 2003	www.elan.com/EDT/nanocrystal_technology
Rapamune [®]	Imunossupressor	Wyeth (EUA) Aprovado pela FDA em Agosto de 2000	www.wyeth.com
Abraxane [™]	Citostático	American Pharmaceutical Partners, Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Janeiro de 2005	www.fda.gov/cder/foi/label/2005/021660lbl.pdf
Doxorubicin Transdrug [®]	Citostático	BioAlliance (França) Comercialização prevista para 2007	www.bioalliancepharma.com/products/transdrug.asp
Estrasorb [™]	Terapia hormonal	Novavax, Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Outubro de 2003	www.estrasorb.com/pdf/Esprit-ESTRASORB.pdf
Tricor [®]	Hipocolesterolémico	Abbott Laboratories (EUA) Disponível no mercado desde Dezembro de 2004	www.elan.com/EDT/nanocrystal_technology
NanoOss [™]	Regenerador de tecido ósseo	Angstrom Medica, Inc. (EUA)	www.angstrommedica.com
Megace [®] ES	Estimulante do apetite	Par Pharmaceutical Companies, Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Julho de 2004	www.elan.com/EDT/nanocrystal_technology
Vitoss	Substituto artificial de sangue	Orthovita (EUA) Disponível no mercado desde Fevereiro de 2004	www.orthovita.com/products/vitoss/overview.html
Óxido de zircônio	Aplicação dentária	Altair Nanotechnologies, Inc. (EUA) Disponível no mercado desde Setembro de 2003	www.nanotechwire.com/news.asp?nid=469

Nome comercial	Indicação terapêutica	Empresa responsável	Referências
Apagard®	Aplicação dentária	Sangi Co., Ltd. (Japão) Comercialização prevista para breve	www.sangi-co.com
Lifewave	Cosmético	Lifewave, LLC (EUA) Disponibilidade próxima no mercado	www.thecollagenpatch.com
Neowater™	Substituto químico	Do-Coop Technologies Ltd. (Israel) Disponível desde Fevereiro de 2004	www.docoop.com
Qdot Nanocrystals	Técnicas imagiológicas	Invitrogen Corporation (EUA)	http://probes.invitrogen.com/products/qdot
Trilite™ Technology	Técnicas imagiológicas	Crystalplex Corporation (EUA)	www.crystalplex.com/index.htm
CellTracks®	Métodos de diagnóstico	Immunicon Corporation (EUA) Disponível no mercado desde 2004	www.immunicon.com/technology/technology.html
NanoChip® Technology	Métodos de diagnóstico	CombiMatrix Corporation (EUA) Disponível no mercado desde 2005	www.nanogen.com/products/instrumentation/nanochip400system
EnSeal Sistema Laparoscópico	Dispositivos médicos	SurgRx, Inc. (EUA) Disponível no mercado desde 2004	www.surgrx.com
TiMesh	Dispositivos médicos	GfE Medizintechnik GmbH (Alemanha) Aprovado pela FDA em Março de 2004	www.azonano.com/details.asp?ArticleID=650
Acticoat®	Dispositivos médicos	Smith & Nephew, Inc. (EUA) Aprovado pela FDA em Maio de 2005	www.acticoat.com

As perspectivas futuras da utilização das nanopartículas, na área do desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos, são bastante promissoras devido às suas propriedades singulares, nomeadamente o tamanho sub-celular, a estabilidade, o efeito protector de

fármacos relativamente a condições drásticas, como a presença de enzimas e o gradiente de pH ao longo do TGI.

Além disso e pelo exposto, o trabalho descrito na presente dissertação sugere, portanto, continuidade, no estudo com maior detalhe da formulação otimizada, tanto em termos de uma caracterização físico-química complementar como do efeito terapêutico em outros modelos animais e transposição dos ensaios *in vivo* da formulação para animais de grande porte, mas acima de tudo, o futuro estudo deverá ser encaminhado na elucidação do mecanismo de absorção intestinal da insulina. Explicitando os diferentes objetivos, o trabalho futuro poderia ser planejado nas seguintes etapas:

- Na caracterização físico-química, dever-se-ia estudar, exaustivamente, o papel de cada um dos componentes envolvidos na formulação otimizada. Para isso, seria fundamental recorrer a técnicas de microscopia electrónica de varrimento em todas as etapas do processo, isto é, desde a produção até ao segundo revestimento das nanoesferas; recorrer a técnicas de microscopia electrónica de varrimento associadas a uma análise elementar para certificar que, realmente, ocorre a interacção polielectrolítica entre o alginato e ião cálcio, entre o alginato e a insulina, entre a insulina e o sulfato de dextrano, entre o quitosano e o PEG, entre o quitosano-PEG e o alginato, entre o quitosano-PEG e a albumina e entre a albumina e a pepsina.
- Uma outra caracterização, igualmente importante, incidiria na determinação da dimensão do poro das nanoesferas, através de cromatografia de exclusão molecular. Esta análise permitiria saber se, realmente, o mecanismo proposto para a resistência enzimática com a pepsina foi devido à diminuição de permeabilidade da estrutura da nanoesferas, ou se, por outro lado, se confirmaria a teoria de substituição do alvo enzimático da insulina pela albumina. Nesta fase, seria de todo conveniente uma análise físico-química pormenorizada, com recurso à microscopia electrónica de varrimento da estrutura das nanoesferas, após a degradação enzimática e, finalmente, a uma monitorização do teor de albumina nas nanoesferas que, supostamente, foi degradada por DC, HPLC-UV e HPLC-MS.

- Por outro lado, os ensaios *in vivo* desenvolvidos foram sempre realizados com ratos *Wistar* com diabetes induzida quimicamente com STZ. Actualmente, têm surgido algumas preocupações relacionadas com este tipo de modelo animal. Seria vantajoso, numa fase futura, que fosse igualmente experimentado um outro modelo animal.
- Sendo que a grande dúvida que surgiu na presente dissertação se relacionou com a elucidação do mecanismo de absorção, seria proveitoso adicionar um segundo marcador fluorescente ao polímero (neste caso ao alginato) e proceder aos ensaios intestinais *in situ*, segundo o protocolo experimental descrito anteriormente. Com a marcação dupla, seria possível aumentar a contribuição para o estudo do mecanismo de absorção.
- A presente dissertação descreveu, ainda, ensaios toxicológicos após administração diária da formulação otimizada durante 15 dias, nos quais se observou a ausência de toxicidade. Todavia, seria de todo conveniente que esses ensaios fossem prolongados durante um período de, pelo menos, 3 meses.
- Por fim, a determinação do percurso realizado pelas nanoesferas, após administração oral, por uma técnica mais audaciosa, mas ainda assim exequível, basear-se-ia na realização de uma cintigrafia. Trata-se de uma técnica de diagnóstico que utiliza uma pequena dose de um químico radioactivo (isótopo), denominado marcador, para identificar as áreas do corpo, onde a radioactividade se acumula preferencialmente. O ideal, nesta altura, seria realizar esta técnica, marcando a insulina com um isótopo e desenvolver estes ensaios em animais de grande porte como, por exemplo, o porco.

Por tudo isto e pelo que ainda há a fazer, a presente dissertação serve como estímulo para um trabalho futuro e relança alguma esperança na procura de uma formulação oral de insulina.

A importância da obtenção de uma formulação oral de insulina, como se viu, é enorme. A Organização Mundial de Saúde refere a diabetes como a terceira causa de morte no mundo, atingindo, segundo esta organização cerca de 7,6 % da população mundial. O número de doentes diabéticos tem vindo a aumentar, dramaticamente, nas últimas décadas e, por esse motivo, a diabetes é, actualmente, considerada a epidemia do século XXI. É estimado, pela Organização Mundial de Saúde, que o número de pessoas com diabetes possa ascender dos 171 milhões em 2000 a 220 milhões em 2010, 10% dos quais com diabetes do tipo 1. Em Portugal, calcula-se que existam, no nosso país, entre 250.000 a 500.000 diabéticos, muitos deles ainda por diagnosticar. Estima-se que no ano 2025 existirão cerca de 700.000 diabéticos.

Até ao momento actual, não existe cura para esta doença.

A investigação nesta área aponta não só para a prevenção e para o controlo da doença, com o objectivo de melhorar a qualidade de vida dos diabéticos, mas, sobretudo, para a descoberta de tratamentos igualmente eficazes, mas de uma maior comodidade de forma a aumentar a adesão à terapêutica. Têm-se explorado vias de administração alternativas à insulina s.c., tais como: administração ocular, rectal, vaginal/uterina, nasal, pulmonar, transdérmica, bucal e oral. Actualmente, encontram-se em curso ensaios clínicos nas mais diferentes fases. A Tabela X-2 descreve alguns dos produtos que se encontram em investigação. Em seguida, serão descritos alguns exemplos de estudos desenvolvidos para a administração de insulina.

Tabela X-2. Produtos em desenvolvimento para o tratamento da Diabetes *Mellitus* (adaptado de Lin *et al.*, 2004 e Ghilzai, 2003).

Produto	Via de administração	Empresa responsável
<i>HIM2</i>	Oral	Ncbex Corp.
<i>EMISPHERE</i> [®] <i>delivery</i>	Oral	Emisphere Technologies, Inc.
<i>A1-401</i>	Oral	AutoImmune/Eli Lilly
<i>Macrulin</i>	Oral	Provalis
<i>RAPID IMEDD</i>	Oral	Ariad Pharmaceutical
Cápsula de insulina	Oral	Unigene Lab, Inc.
Insulina bucal	Bucal	Del Rx
<i>RapidMist/Oral-lyn</i> [®]	Bucal	Generex Biotechnology
<i>PEGylation</i>	Bucal	Valentis/Flemington Pharmaceutical Corp.
<i>CAP, BioAir</i> [®]	Ocular	BioSante Pharmaceutical
<i>Exubera</i> [®]	Inalação	Nektar/Pfizer
<i>AERx</i> [®] <i>Insulin</i>	Pulmonar	Aradigm Corp.
<i>MinoSphere (Epic Promaxx)</i> TM	Pulmonar	Epic Therapeutics
<i>Technosphere</i> TM	Pulmonar	Mannkind Biopharmaceutical
<i>AIR</i> TM	Pulmonar	Alkermes/Eli Lilly
<i>Alveair</i> [®]	Pulmonar	Coremed, Inc.
<i>Spiros</i> [®]	Pulmonar	Dura Pharmaceuticals
<i>Aerodose</i> [®]	Pulmonar	AeroGen, Inc.
<i>PulmoRx</i>	Pulmonar	ImaRx Therapeutics
<i>DPI (drug powder inhaler)</i>	Pulmonar	Vectura Ltd.
<i>Touch-Spray</i>	Pulmonar	Odem Ltd./Pari GmbH
Insulina nasal	Nasal	West Pharmaceutical Services
<i>SonoRelease Ultrasound</i>	Transdérmica	ImaRx Therapeutics
Electroforese	Transdérmica	Cygnus Pharmaceuticals
Sonoforese	Transdérmica	Encapsulation Systems
<i>MicroPor</i> TM	Transdérmica	Altea Development Corp.
Sistema transdérmico	Transdérmica	Vector Medical Technologies
<i>Biphaxis</i> TM	Transdérmica	Helix Biopharma Corp.
Sistema transdérmico	Transdérmica	Noven Pharmaceuticals
<i>SonoDerm</i> TM	Transdérmica	ImaRx Therapeutics
<i>SonoPrep</i>	Transdérmica	Sontra Medical
<i>Transfersulin</i> [®]	Transdérmica	IDEA
<i>U-Strip</i> [®]	Transdérmica	Dermisonics Inc.
<i>TPM-02</i>	Transdérmica	Phosphagenics
Células pancreáticas encapsuladas	Transplante	Grupo Shapiro
Biocápsula com membrana de silicone	Transplante	Universidade de Illinois
Bomba difusora com <i>chip</i>	Implante	Universidade de Delaware

Vias de administração alternativas à administração s.c. da insulina

Administração bucal

A administração bucal de insulina aparece na Tabela X-2 como alternativa à insulina s.c.. Nesta área, são poucos os estudos descritos na literatura. Um deles está a ser desenvolvido pela Genex Biotechnology Corporation (Toronto, Canadá), em associação com a Lilly (New Jersey, EUA), com o produto *Oral-lyn*[®], sob a forma de nebulizador (tecnologia designada de *RapidMist*[™]). Actualmente, o *Oral-lyn*[®] encontra-se em ensaios clínicos de fase II. Trata-se de um *spray* para ser aplicado na cavidade bucal. Este nebulizador produz um aerossol de partículas de tamanho uniforme e baseia-se em micelas mistas, contendo insulina com promotores de absorção e estabilizantes (Cernea e Raz, 2006). Os estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos deste sistema, em indivíduos saudáveis e doentes diabéticos do tipo 1, revelaram que o tempo necessário para observar o pico de concentração de insulina foi mais curto (cerca de 25 min), comparativamente com a insulina administrada pela via s.c. (Cernea e Raz, 2006). Uma outra vantagem deste sistema relacionou-se com a sua capacidade de actuação no controlo dos níveis glicémicos pós-prandiais. Infelizmente, este estudo demonstrou uma grande variabilidade farmacocinética e uma biodisponibilidade da insulina relativamente baixa.

Administração transdérmica

Uma outra estratégia alternativa à insulina s.c. baseia-se na administração da insulina pela via transdérmica. Nesse campo, encontra-se em fase de desenvolvimento (ensaios clínicos de fase II) um produto denominado por *Transfersulin*[®] da IDEA (Munich, Alemanha). Este sistema demonstrou uma actividade farmacológica de 50%, relativamente à insulina regular administrada por via s.c. (Pharmalicensing, 2007). Neste produto, observou-se que uma única administração deste sistema conduziu a uma normalização dos níveis de glicémia, durante, pelo menos 16 h (Cernea e Raz, 2006). A empresa Phosphagenics

(Melbourne, Austrália) desenvolveu um transportador vesicular e multilamelar para aplicação tópica de insulina (*lispro* e hexâmeros de insulina). Os ensaios clínicos de fase I demonstraram que este sistema, designado de TPM-02, conduziu à passagem da insulina para a corrente sanguínea sem causar efeitos adversos (Phosphagenics, 2005). Por fim, a empresa Dermisonics Inc. (Irvine, CA, EUA) desenvolveu um adesivo, designado por U-Strip[®], que utiliza ultra-sons para aumentar o tamanho dos poros da pele, permitindo a passagem da insulina através da mesma (Dermisonics, 2007). Actualmente, este sistema está a ser testado em doentes diabéticos do tipo 2 em regime de complementaridade com a insulina regular s.c..

Porém, as alternativas à insulina s.c. que apresentam resultados mais significativos, estão relacionadas com a administração nasal, e, em especial, pulmonar e oral.

Administração nasal

A administração nasal tem sido considerada como a escolha para muitos fármacos peptídicos, mas apresenta várias limitações. Apesar da maioria das formulações nasais de insulina apresentar uma biodisponibilidade de insulina compreendida entre 8 e 15%, este tipo de formulações tem demonstrado uma grande variabilidade inter-individual, variabilidade de doses e alguns casos de irritação nasal (chegando a cerca de 25%, num dos estudos) (Owens *et al.*, 2003). Os estudos clínicos em doentes diabéticos do tipo 1 e 2 revelaram, entre outros dados, que o aumento da insulina plasmática ocorreu rapidamente, mas foram necessárias doses múltiplas para controlar a hiperglicémia pós-prandial. Pelos motivos citados, as indústrias farmacêuticas não apostam fortemente na administração nasal de insulina e, por conseguinte, o seu desenvolvimento decorre mais ao nível académico.

Administração pulmonar

No caso da administração pulmonar de insulina, os resultados são bem mais animadores. Exemplo disso é a recente aprovação da autorização de introdução no mercado, pela FDA, da primeira versão não injectável de insulina, destinada a ser inalada, designada

por Exubera[®] da Nektar Therapeutics Inc. (San Carlos, CA, EUA) em associação com a Pfizer (New York, EUA). Este produto encontra-se em ensaios clínicos de fase III. Trata-se de um pó para inalação apresentado sob a forma de *blisters* de dose unitária e está indicado para o tratamento de doentes diabéticos do tipo 2, que necessitam de terapêutica com insulina, e em doentes diabéticos do tipo 1, em regime de complementaridade. O início de acção é mais rápido do que o da insulina regular s.c.. O pico de concentração é atingido ao fim de 2 h e tem uma duração de acção de, aproximadamente, 6 h. Porém, a biodisponibilidade continua a ser reduzida (cerca de 10% da biodisponibilidade da insulina s.c.), sendo, por isso, frequentemente necessário administrar doses superiores para obter um controlo glicémico óptimo. Este medicamento ainda não está comercializado em Portugal. Outro exemplo é o aerossol líquido desenvolvido pela Aradigm Corporation (Hayward, CA, EUA), em colaboração com a NovoNordisk A/S (Copenhaga, Dinamarca), com o nome AERx[®] Insulin, e que se encontra em fase III nos ensaios clínicos.

Menos desenvolvidos encontram-se os estudos que envolvem o aerossol líquido designado de Aerodose[®] Inhaler da Aerogen Inc. (Sunnyvale, CA, EUA); um outro produto denominado de Technosphere[™] da Mannkind Biopharmaceutical (New York, EUA) e, finalmente, o Spiros[®] System da Dura Pharmaceuticals Inc. (San Diego, EUA) recentemente adquirida pela Elan Corporation (Dublin, Irlanda), que se encontram em ensaios clínicos de fases II, III e I, respectivamente (Cernea e Raz, 2006). Outro produto é o aerossol líquido, Alveair[®], desenvolvido pela Coremed, Inc. (Lake Bluff, IL, EUA), que se encontra na fase I dos ensaios clínicos em 2006.

Todavia, o percurso anterior não é regra geral para todos os produtos. Existem situações que não obtiveram o mesmo sucesso tecnológico, como foi o caso de AIR[™] da Alkermes (Cambridge, MA, EUA) em colaboração com a Eli Lilly (Indianapolis, IN, EUA). A dificuldade da obtenção de um sistema para administração pulmonar da insulina situa-se a vários níveis. Primeiro, este tipo de administração pulmonar nem sempre pode ser facilmente adoptado por qualquer doente diabético. Se a função respiratória estiver comprometida (presença de doenças pulmonares, tabagismo, durante exercício físico, etc.), a utilização deste tipo de administração está contra-indicada. Outra dificuldade relaciona-se com a imprecisão

da dose e a dificuldade de reprodutibilidade de doses. Finalmente, os próprios clínicos são cépticos com a utilização desta administração, principalmente, quando se questiona a função da insulina que permanece nos pulmões sem ser absorvida.

Administração oral

A administração oral continua a ser, como se compreende, a via de administração de insulina mais atractiva. As empresas que lideram esta investigação são a Nobex Corporation (Research Triangle Park, NC, EUA) e a Emisphere Technologies, Inc. (Tarrytown, NY, EUA). A tecnologia empregue em cada um dos casos é diferente. A Nobex Corporation desenvolveu um conjugado insulina-PEG conhecido por HIM2. Os ensaios clínicos em fase II demonstraram que este produto conduziu a um controlo dos níveis de glicémia dos doentes com diabetes tipo 1 e 2 e apresentou uma biodisponibilidade de, aproximadamente, 5% (Still, 2002). No caso da Emisphere Technologies, Inc., o produto desenvolvido baseia-se num transportador orgânico, o N-8[2-(hidroxibenzoílo) amino] caprilato de sódio, que interage, não covalentemente, com a insulina para aumentar a sua absorção. A biodisponibilidade obtida em doentes diabéticos do tipo 2 foi de 13% após 1 h e 2% após 6 h de administração do produto.

Para além destes dois exemplos, existem outros em desenvolvimento, como é o caso do Macrulin da Provalis (Flintshire, Reino Unido), que se baseia numa microemulsão A/O e se encontra em ensaios clínicos de fase II realizados, exclusivamente, em doentes diabéticos tipo 2 (Pharmalicensing, 2007). Outra formulação oral de insulina está a ser desenvolvida pela empresa Elan (Dublin, Irlanda) e encontra-se em estudos clínicos de fase I (Ghilzai, 2003). A empresa, Transgene Biotek (Andhra Pradesh, Índia) desenvolveu nanopartículas poliméricas para a administração oral de insulina, mas os estudos encontram-se numa fase pré-clínica (Transgenebiotek, 2007). Finalmente, a empresa Endorex (Illinois, EUA) propôs um outro produto de insulina oral (Ghilzai, 2003) e que se encontra em fase de ensaios pré-clínicos.

Um outro estudo, que merece particular atenção, está a ser desenvolvido pela Autoimmune Inc. (Pasadena, CA, EUA) com o produto AI-401. Este produto é uma solução

oral de insulina recombinante humana. Ao contrário dos estudos anteriores, esta tecnologia é exclusiva para doentes diabéticos do tipo 1, mas com a particularidade de actuar como agente preventivo da progressão da doença. Esta teoria é vulgarmente designada por “terapia de tolerância oral”. Neste caso, são administradas doses muito pequenas de insulina, de forma a conduzir a uma supressão de células T auto-reactivas. A empresa Autoimmune Inc. tem acordos com a Eli Lilly para o desenvolvimento e a introdução no mercado deste produto.

Embora muitas das estratégias acima citadas sejam capazes de aumentar a biodisponibilidade da insulina, este não é o único critério no desenvolvimento de um sistema viável. A elevada variabilidade da absorção, a concorrência empresarial e os elevados custos de produção são obstáculos difíceis de contornar e, por esse facto, muitos estudos acabam por ser abandonados.

Mas, o futuro das pessoas com Diabetes *Mellitus* tipo 1 é de esperança. Apesar de ainda existir muito a fazer na investigação da diabetes, a ambição de desenvolver novos projectos nesta área continua a ser prática corrente. Surgem novos projectos, abandonam-se outros, mas, o caminho para a obtenção de uma formulação oral de insulina é, em cada ano, mais curto.

2. BIBLIOGRAFIA

CERNEA, S. e RAZ, I. (2006) Non-injectable methods of insulin administration. **Drugs of Today** 42, 405-424.

DERMISONICS (2007) www.dermisonics.com, consultado em 10/06/2007.

GHILZAI, N. M. K. (2003) New developments in insulin delivery. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 29, 253-265.

LIN, C., GOKHALE, R., TRIVEDI, J. S. e RANADE, V. (2004) Recent strategies and methods for improving insulin delivery. **Drug Dev. Res.** 63, 151-160.

OWENS, D. R., ZINMAN, B. e BOLLI, G. (2003) Alternatives routes of insulin delivery. **Diabetes** 20, 886-898.

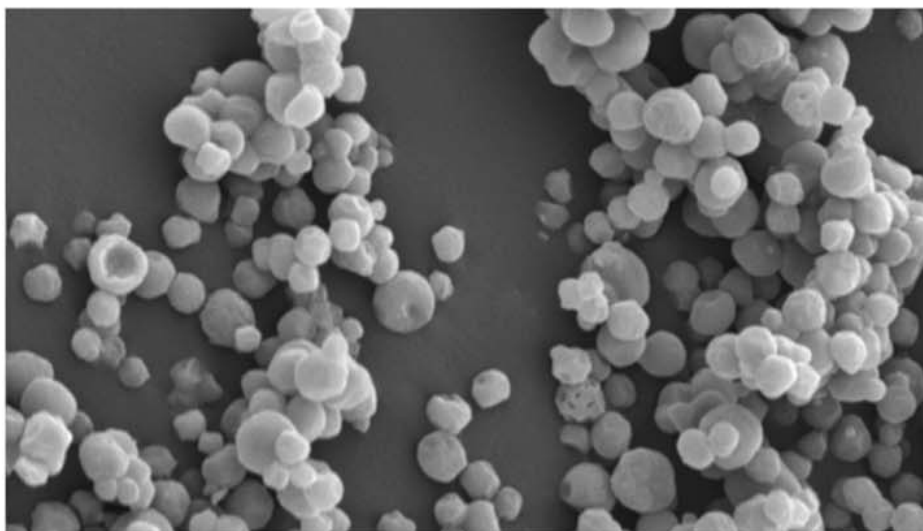
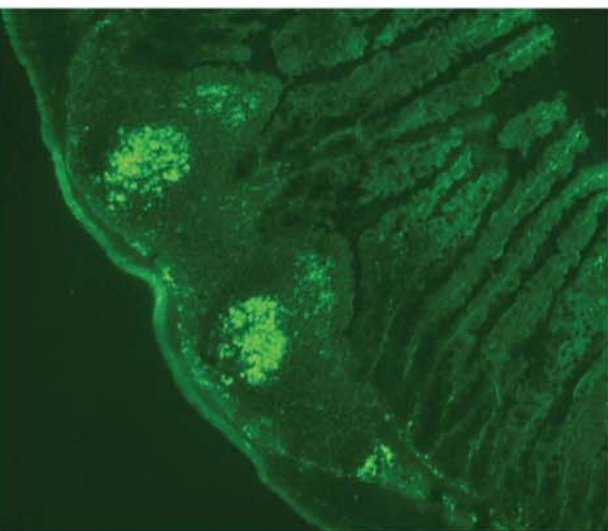
PHARMALICENSING (2007)

http://pharmalicensing.com/articles/disp/1078223148_4044612c99614, consultado em 10/06/2007.

PHOSPHAGENICS (2005) www.phosphagenics.com, consultado em 10/07/2007.

STILL, J. G. (2002) Development of oral insulin: progress and current status. **Diabetes Metabol. Res. Rev.** 18, S29-S37.

TRANSGENEBIOTEK (2007) www.transgenebiotek.com, consultado em 10/07/2007.



ANEXOS

Anexo I

QUANTIFICAÇÃO DA INSULINA PELO MÉTODO DE BRADFORD

No sentido de determinar a eficiência de encapsulação (EE) e o teor de insulina, desenvolveu-se um método de doseamento rápido que permitiu quantificar a insulina pelo método directo (insulina libertada a partir das partículas). O método utilizado para o doseamento da insulina foi o método de Bradford.

O reagente Coomassie é fornecido num kit de 950 mL de reagente líquido e no seu estado final. É incompatível com alguns sais e tampões, detergentes, agentes quelantes como, por exemplo, o EDTA (100 mM) e o citrato de sódio (200 mM), com alguns solventes orgânicos ou com alguns agentes redutores. Para mais informações, consultar www.piercenet.com. Este reagente, se for mantido à temperatura de 4°C, é estável durante 1 ano.

O método de doseamento é linear para concentrações proteicas entre 1 a 25 µg/mL. Basicamente, em meio ácido, o corante Coomassie liga-se aos resíduos de arginina e resíduos aromáticos da proteína tipo histidina, tirosina e fenilalanina. Desta ligação resulta uma alteração de cor do corante, de castanho (465 nm) para azul (595 nm). A quantidade de proteína presente nas amostras é quantificada de acordo com a lei de Beer.

Procedimento

Misturou-se 1 mL de cada amostra a analisar com 1 mL do reagente Coomassie Plus™ e agitou-se vigorosamente (ver Figura AI-1). Após 10 min de repouso à temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas a 595 nm e calculadas as respectivas concentrações de insulina, segundo curvas de calibrações construídas para o efeito.

Para eliminar a interferência da leitura de absorvância do polímero em suspensão, foi realizado o mesmo protocolo com as partículas de alginato, mas sem insulina, isto é, vazias.

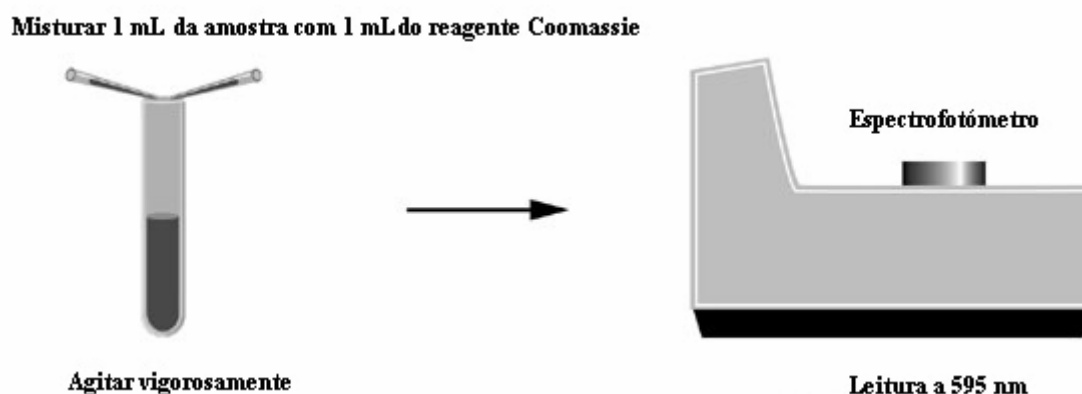


Figura AI-1. Protocolo experimental para o doseamento da insulina.

Determinação do teor e da eficiência de encapsulação (EE) de insulina

Uma quantidade de partículas de alginato liofilizadas (10 mg) foi incubada em 10 mL de tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXVIII) sob agitação magnética (100 rpm, 2 h). De seguida, a suspensão foi centrifugada ($12.500 \times g$, 10 min) e as partículas poliméricas depositadas foram transferidas para 10 mL de tampão fosfato de pH 6,8 (USP XXVIII), sob agitação magnética (100 rpm, 1 h) até completa dissolução. A quantidade de insulina libertada no sobrenadante, após as incubações em tampão de pH 1,2 e neutro, foi determinada, espectrofotometricamente, pelo método de Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce, Pittsburgh, EUA), utilizando um comprimento de onda de 595 nm. O teor (%) e a EE (%) de insulina foram calculados com base nas Equações II-5 e II-6, respectivamente.

Alternativamente, a EE de insulina foi determinada de forma diferente no Capítulo IV. Uma quantidade de nanoesferas liofilizadas (30 mg) foi incubada em 20 mL de tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM, sob agitação magnética (100 rpm, 1 h). De seguida, a suspensão foi centrifugada ($12.500 \times g$, 10 min) e a quantidade de insulina libertada no sobrenadante foi determinada, espectrofotometricamente, pelo método de Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce, Pittsburgh, EUA), utilizando um comprimento de onda de 595 nm. A EE (%) de insulina foi calculada com base na Equação IV-1.

A solução de insulina administrada aos ratos diabéticos nos ensaios *in vitro* do trabalho descrito no Capítulo IV foi quantificada pelo método de Bradford. Uma quantidade de nanoesferas liofilizadas (41,5 mg) foi incubada em 20 mL de PBS de pH 7,4 (USP XXVIII) sob agitação magnética (100 rpm, 2 h), com o objectivo de libertar a insulina a partir das nanoesferas. Após centrifugação ($12.500 \times g$, 10 min), o sobrenadante foi filtrado através de um filtro com um poro de $0,45 \mu m$ e, a quantificação da insulina no filtrado foi realizada segundo o método de Bradford.

Perfil de libertação *in vitro*

Uma quantidade conhecida de partículas de alginato contendo insulina (10 mg) foi incubada em 10 mL de tampão HCl/KCl de pH 1,2 (USP XXVIII) sob agitação magnética (100 rpm, 2 h). A agitação foi realizada numa placa com múltiplos focos. Ao fim desse período, procedeu-se a uma centrifugação ($12.500 \times g$, 10 min) e aspiração do sobrenadante. As partículas poliméricas foram transferidas para 10 mL de tampão fosfato de pH 6,8 (USP XXVIII) e submetidas a agitação magnética (100 rpm, 1 ou 6 h para os procedimentos descritos nos Capítulos II/III e IV, respectivamente). Foram recolhidas amostras de ambos os meios, a tempos pré-determinados. O volume dos meios foi sempre constante, uma vez que as amostras recolhidas foram sempre substituídas com o mesmo volume de tampão fresco. A quantidade de insulina nessas amostras foi determinada, espectrofotometricamente, pelo método de Bradford e a libertação cumulativa de insulina foi calculada de acordo com a Equação II-7. Os ensaios foram realizados em triplicado e as partículas vazias foram submetidas às mesmas condições e consideradas como controlos.

Para cada meio de dissolução da amostra, foi traçada uma curva de calibração (Figura AI-2 e Figura AI-3). Este método demonstrou ser rápido, simples e muito vantajoso para a etapa inicial da presente dissertação. Contudo, quando houve a necessidade de adicionar à formulação em estudo polímeros catiónicos, este método de doseamento da insulina revelou-se incapaz de quantificar a insulina presente na amostra, uma vez que a

intensidade da amostra resultante foi muito evidente, mesmo nas amostras sem insulina. Pela presença de falsos positivos, este método foi abandonado numa fase posterior.

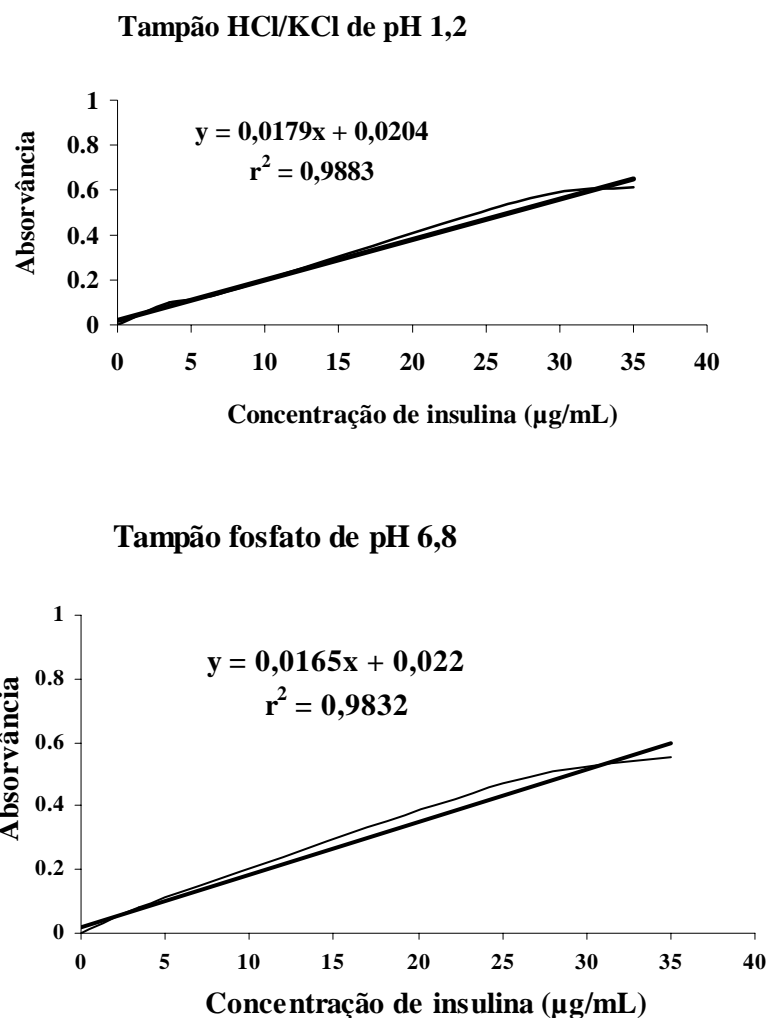
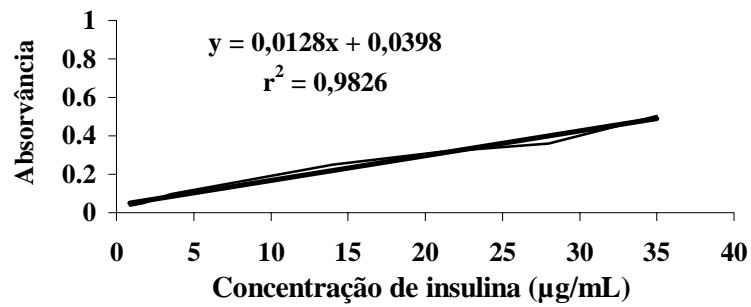


Figura AI-2. Curvas de calibração com os diferentes meios de dissolução da amostra contendo insulina, nomeadamente com o tampão HCl/KCl de pH 1,2 e com o tampão fosfato de pH 6,8.

Tampão fosfato de pH 7,4 com citrato de sódio a 55 mM



PBS de pH 7,4

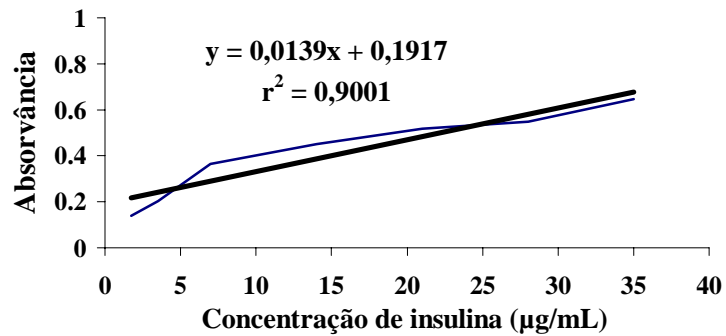


Figura AI-3. Curvas de calibração com os diferentes meios de dissolução da amostra contendo insulina, nomeadamente com o tampão fosfato de pH 7,4 e com PBS de pH 7,4 (USP XXVIII). Nota: A solução de tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contém citrato de sódio a 55 mM.

Anexo II

VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE HPLC PARA O DOSEAMENTO DA INSULINA

O método de doseamento da insulina por HPLC, descrito no Capítulo II e utilizado nos estudos apresentados nos capítulos subsequentes, foi validado segundo as recomendações da EMEA (EMEA., 1995; EMEA., 1996).

A validação foi realizada em paralelo para a quantificação das amostras dissolvidas em tampão HCl/KCl de pH 1,2 e tampão fosfato de pH 6,8, procedendo ao tratamento das soluções padrão, tal como descrito para as amostras. Os parâmetros analisados durante a validação do método HPLC foram: linearidade, precisão e exactidão.

Linearidade

A linearidade define-se como a capacidade de um método analítico originar resultados proporcionais à concentração do analito na amostra. O objectivo da análise deste parâmetro consiste em determinar se as concentrações das soluções do analito a testar se encontram na gama de concentrações, onde a resposta do analito é, linearmente, proporcional à sua concentração.

A linearidade foi avaliada pela determinação do coeficiente de regressão linear obtido a partir do valor médio resultante de três curvas de calibração independentes, construídas com soluções padrão de insulina, cada uma injectada em triplicado. Foi preparada uma solução-mãe a 140 µg/mL por diluição da formulação de Actrapid® (100 UI/mL = 3,5 mg/mL), no respectivo solvente. Por diluições sucessivas da solução-mãe, prepararam-se soluções padrão, com as seguintes concentrações: 2,8, 5,6, 11,2, 14, 28, 42 e 56 µg/mL. As equações de regressão linear obtidas para a área do pico da insulina (y) em função da concentração (x) encontram-se descritas na Tabela AII-1. Verificou-se linearidade entre a área do pico da

insulina e as respectivas concentrações das soluções padrão, no intervalo de concentrações de 2,8 a 140 µg/mL.

Tabela AII-1. Equações de regressão linear obtidas durante o processo de validação.

Curva de calibração	Equação	r ²
Tampão HCl/KCl de pH 1,2*	$y = 24,133x - 34,826$	0,9999
Tampão fosfato de pH 6,8*	$y = 12,002x - 6,0625$	0,9996

*Preparados segundo a USP XXVIII.

Precisão

A precisão de um método analítico exprime a conformidade entre uma série de medições obtidas por determinações múltiplas de uma mesma amostra homogénea, em condições determinadas. A precisão pode ser expressa em termos de repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

A repetibilidade (precisão intra-dia) exprime a precisão nas mesmas condições experimentais, isto é, um método analítico executado por um mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, num período curto de tempo. A precisão intermédia exprime a variabilidade de resultados obtidos, pelo mesmo método analítico, mas em dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, etc. A reprodutibilidade exprime a precisão entre laboratórios, utilizando diferentes equipamentos e diferentes analistas.

Os parâmetros de precisão dependem da concentração do analito, pelo que devem ser determinados para diferentes níveis de concentração do analito. Na validação do presente método, apenas, foi determinada a repetibilidade (ensaio intra-dia) e precisão intermédia (ensaio inter-dias).

Os resultados podem ser expressos pelo desvio padrão, desvio padrão relativo ou coeficiente de variação para cada série de medições. A determinação da repetibilidade foi efectuada através de 10 injeções sucessivas, no mesmo dia, das soluções padrão de insulina com concentrações de 2,8, 14 e 56 µg/mL. O coeficiente de variação associado às

concentrações calculadas para cada série de injeções foi próximo de 10%, inferior a 3% e inferior a 1%, para a mais baixa, intermédia e mais alta concentração testada, respectivamente (Tabela AII-2).

A determinação da precisão intermédia foi realizada de um modo similar à repetibilidade, mas em 3 dias diferentes ($n = 10 \times 3$). Os coeficientes de variação aumentaram com a diminuição de concentração do analito. Os valores obtidos da precisão intermédia foram superiores aos valores obtidos na análise da repetibilidade e diminuíram com o aumento da concentração. Para as concentrações mais elevadas (14 e 56 $\mu\text{g/mL}$), o método de HPLC apresentou uma precisão adequada. Pelo contrário, para a concentração mais baixa (2,8 $\mu\text{g/mL}$), a precisão foi insatisfatória. Quanto ao limite de quantificação, embora não tenha sido definido um limite de quantificação, este deverá situar-se entre 2,8 e 5,6 $\mu\text{g/mL}$, já que a precisão foi adequada para a concentração mais alta, mas não para a concentração mais baixa.

Tabela AII-2. Repetibilidade ($n = 10$) e precisão intermédia ($n = 10 \times 3$) do método de HPLC para o doseamento da insulina dissolvida em tampão HCl/KCl de pH 1,2 e em tampão fosfato de pH 6,8. Os resultados são expressos em coeficiente de variação (CV).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Tampão de pH 1,2		Tampão de pH 6,8	
	Repetibilidade	Precisão intermédia	Repetibilidade	Precisão intermédia
	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
2,8	9,84	15,52	12,18	16,99
14	2,46	2,06	2,56	7,55
56	0,71	1,57	0,89	5,56

Exactidão

A exactidão de um procedimento analítico pode ser definida pela concordância entre a média de uma série de resultados e um valor de referência teórico para um analito. É uma medida de correcção da resposta determinada. Existem vários processos para avaliar a

exactidão, nomeadamente a utilização de materiais de referência certificados, a fortificação das amostras com um padrão certificado ou a avaliação das percentagens de recuperação, ao longo da gama de trabalho (no mínimo três níveis de concentração e em triplicado).

A sua avaliação baseia-se na determinação de erros sistemáticos associados à medição dos resultados. É, frequentemente, expressa em termos de percentagem de recuperação ou de *bias*, isto é, a diferença entre uma média de valores de resultados com o valor aceite como verdadeiro. Este valor pode ser negativo ou positivo, atendendo ao desvio da média dos resultados, face ao valor de referência. Quanto menor for esse valor, mais exacto será o método analítico em questão. Para a determinação da exactidão do método foram preparadas soluções com concentrações de insulina a 8,4, 14 e 35 µg/mL. A percentagem de recuperação e *bias* foram determinadas segundo as seguintes equações:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{[\text{Insulina}]_{\text{Medida}}}{[\text{Insulina}]_{\text{Teórica}}} \times 100 \quad \text{Equação AII-1}$$

$$\text{Bias} = \frac{[[\text{Insulina}]_{\text{Medida}} - [\text{Insulina}]_{\text{Teórica}}]}{[\text{Insulina}]_{\text{Teórica}}} \times 100 \quad \text{Equação AII-2}$$

A percentagem de recuperação variou num limite estreito entre 96,77 a 101,44%, enquanto o valor *bias* variou entre -3,23 a 1,44%, como descreve a Tabela AII-3.

Tabela AII-3. Exactidão do método de HPLC para o doseamento da insulina dissolvida em tampão de pH 1,2 e em tampão fosfato de pH 6,8. Os resultados são expressos em percentagem de recuperação e de *bias* (n = 3).

Concentração (µg/mL)	Tampão de pH 1,2		Tampão de pH 6,8	
	Recuperação* (%)	Bias (%)	Recuperação* (%)	Bias (%)
8,4	98,67 ± 4,58	-1,33	96,77 ± 5,78	-3,23
14	101,44 ± 1,28	1,44	97,80 ± 4,65	-2,10
35	97,88 ± 0,41	-2,12	98,69 ± 0,45	-1,31

*Média ± D.P.

Numa fase posterior da presente dissertação, houve necessidade de dissolver as nanosferas com insulina em tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM. Foram preparadas soluções padrão com concentrações compreendidas entre 4,2 e 140 µg/mL na mesma solução (tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) e citrato de sódio a 55 mM). A equação de regressão linear obtida para a área do pico da insulina (y), em função da sua concentração (x), foi $y = 11,907x - 4,2524$, com um coeficiente de regressão linear de 0,9999, o que demonstrou uma excelente linearidade na gama de concentrações testada. A análise da amostra processa-se de forma directa, tal como aconteceu com as amostras a tampão HCl/KCl de pH 1,2. A dissolução da insulina na solução anterior não alterou o tempo de retenção do fármaco.

Resumindo, os resultados obtidos nesta validação permitiram concluir que a técnica de HPLC desenvolvida para o doseamento da insulina apresenta parâmetros aceitáveis de linearidade, precisão e exactidão.

Anexo III

ANÁLISE ELEMENTAR DAS NANOSFERAS DE ALGINATO REFORÇADAS COM SULFATO DE DEXTRANO

No presente anexo, avaliou-se a presença de grupos sulfatos, elemento enxofre, na matriz de alginato, após a incorporação de sulfato de dextrano. A técnica utilizada foi a microscopia electrónica de varrimento (SEM), recorrendo ao aparelho Jeol-JSM-6301F (Tokyo, Japão).

Em termos de técnica propriamente dita, foi necessário aplicar as amostras num suporte metálico (alumínio) contendo um duplo adesivo, por simples deposição e, proceder à desidratação lenta sob vácuo. As nanosferas secas foram depois revestidas com uma película fina de ouro, recorrendo a um equipamento Ion Sputter JFC-1100 da Jeol (Tokyo, Japão), utilizando um potencial eléctrico de excitação de 10 kV.

A Figura AIII-1 mostra a presença dos seguintes elementos: enxofre, cálcio, sódio, carbono, oxigénio, cloretos e o ouro (este último resultante da técnica de revestimento). Com esta técnica, confirmou-se a presença de grupos sulfatos na matriz de alginato, reforçando, assim, o mecanismo sugerido no Capítulo III, onde se referiu que o sulfato de dextrano interagiu com a proteína encapsulada, favorecendo o seu aprisionamento na matriz polimérica de alginato, durante a sua incubação em meio ácido.

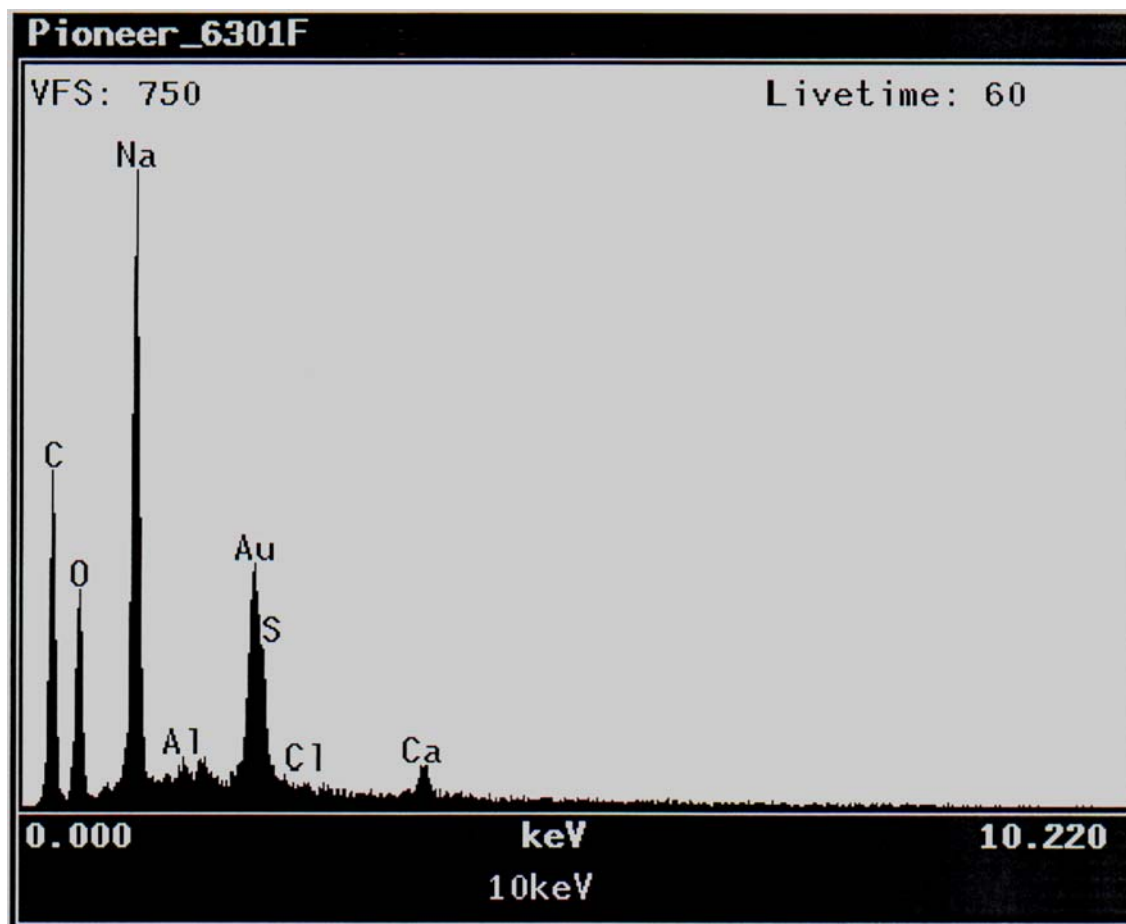


Figura AIII-1. Análise elementar das nanoesferas de alginato com sulfato de dextrano, recorrendo a SEM.

Anexo IV

BIOACTIVIDADE IN VITRO DA INSULINA

O protocolo baseia-se na estimulação de células à insulina, seguida da destruição celular, do isolamento e da quantificação da proteína Akt fosforilada por densitometria. A linha celular escolhida foi mioblastos L6 do rato. As curvas obtidas no estudo do gradiente de concentração de insulina foram lineares com declives compreendidos entre 0,0094 a 0,0099 unidades de intensidade/nM de insulina (Figura AIV-1), com um limite mínimo de detecção de 2% para insulina a 100 nM.

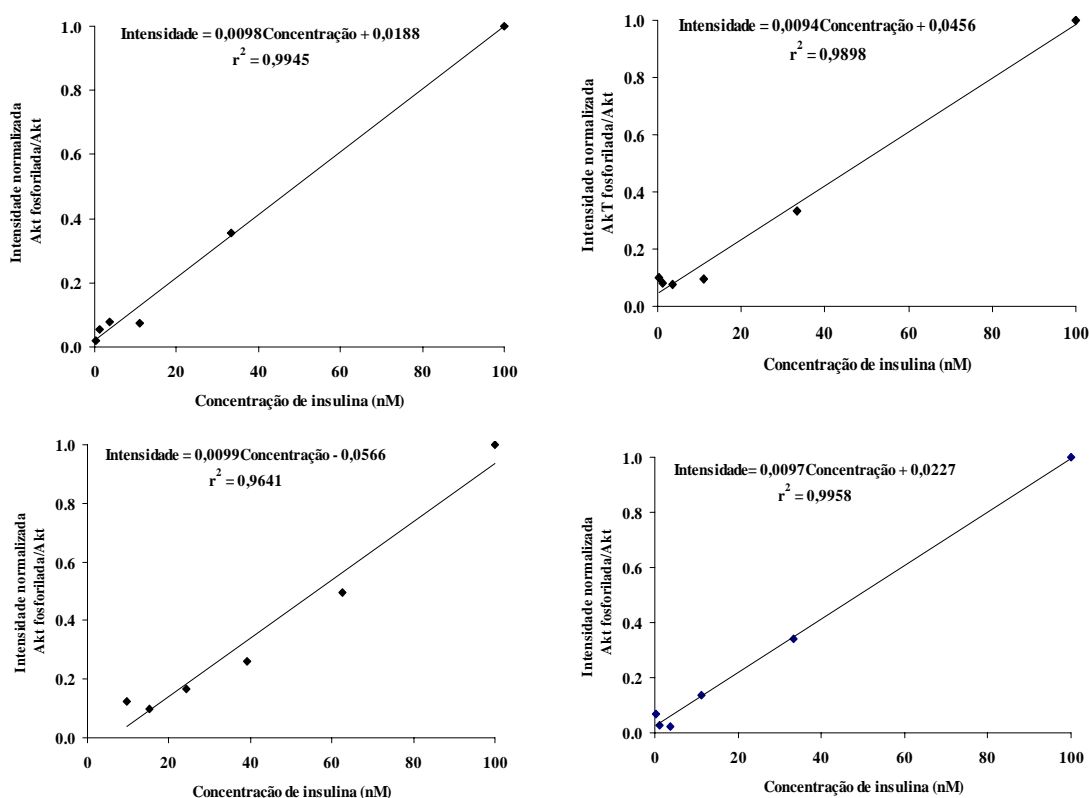


Figura AIV-1. Curvas de calibração obtidas no estudo do gradiente de concentração de insulina para um tempo de estimulação celular de 10 min.

Bioactividade *in vitro* da insulina libertada a partir das nanosferas

A insulina libertada das nanosferas foi sujeita às mesmas condições da insulina não encapsulada. Os mioblastos foram estimulados com insulina libertada a partir das nanosferas. Os lisados celulares foram, igualmente, recolhidos e analisados por *western blot*. A Equação IV-2 foi obtida a partir da curva representada na Figura AIV-2.

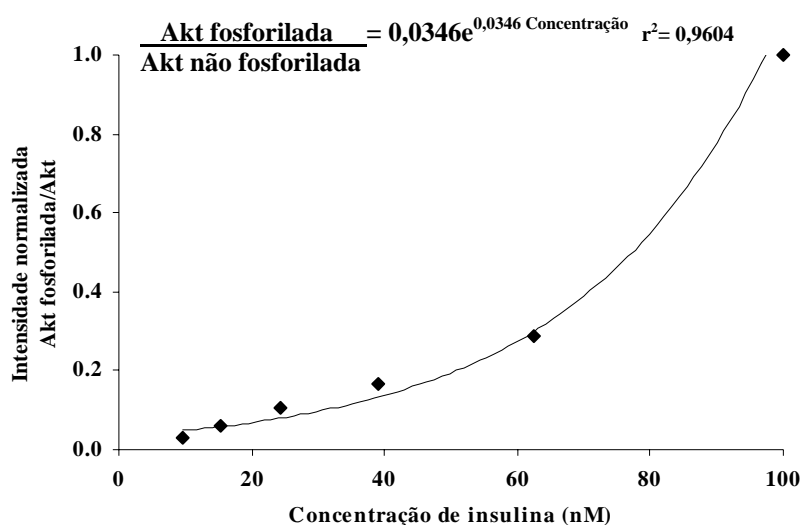


Figura AIV-2. Curva de calibração do estado de fosforilação da Akt a partir da insulina libertada das nanosferas.

Western blot

As proteínas foram separadas através de electroforese em gel de poliacrilamida com a composição descrita na Tabela AIV-1. Resumidamente, depois de separados, os gels foram colocados no tampão de transferência e transferidos para as membranas. As membranas resultantes foram, posteriormente, lavadas com tampão Tris salino com Tween[®] 20 e incubadas com uma solução de anticorpo primário a 4°C, sob agitação lenta, durante 12 h. De seguida, foram aplicados diferentes anticorpos e efectuadas diferentes diluições, como mostra a Tabela IV-2.

Tabela AIV-1. Composição do gel de poliacrilamida.

Gel de separação	Gel de concentração
7,5% Poliacrilamida	3,9% Poliacrilamida (para 2 geles)
5 mL de acrilamida	1,5 mL de acrilamida
10 mL de água destilada	6 mL de água destilada
5 mL de tampão de separação	2,5 mL de gel de concentração
200 µL de APS a 10%	100 µL APS a 10%
20 µL de Temed	10 µL de Temed

Tabela AIV-2. Anticorpos utilizados e respectivas diluições.

Anticorpos	Bloqueador	Anticorpo primário (diluição)	Anticorpo secundário (diluição)
Akt Policlonal de coelho Cell Signaling Technology #9272	Blotto 5%	Albumina* 5% (1:1000)	Blotto 5% (1:10000 anti-coelho)
Akt fosforilada (Ser473) Monoclonal de rato New England BioLabs #9276S	Blotto 5%	Albumina* 5% (1:2000)	Blotto 5% (1:5000 anti-rato)
Akt fosforilada (Ser473) Policlonal de coelho Cell Signaling Technology #9271	Blotto 5%	Albumina* 5% (1:2000)	Blotto 5% (1:10000 anti-coelho)
Actina Monoclonal de rato Santa Cruz Biotechnology sc8432	Blotto 5%	Blotto 5% (1:500)	Blotto 5% (1:5000 anti-rato)
Actina Policlonal de cabra Santa Cruz Biotechnology sc1616	Blotto 5%	Blotto 5% (1:500)	Blotto 5% (1:5000 anti-cabra)
PY99 (p-tirosina) Monoclonal de rato Santa Cruz Biotechnology sc7020	Albumina* 5%	Albumina* 5% (1:2000)	Albumina* 5% (1:5000 anti-rato)

*Albumina bovina sérica.

Anexo V

QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA

As amostras do plasma sanguíneo, conteúdo intestinal e homogenatos da mucosa intestinal foram descongeladas à temperatura ambiente e a actividade fluorescente foi quantificada por espectrofluorometria. O comprimento de onda de excitação e emissão foi de 480 nm e 520 nm, respectivamente. Foram construídas curvas de calibração a partir de uma solução-mãe de FITC a uma concentração de 1 mg/mL dissolvida numa mistura de metanol absoluto com NaOH a 6 N e, a partir desta, foram efectuadas diluições sucessivas. As soluções padrão foram centrifugadas a $3000 \times g$, durante 10 min e a 4°C. A fluorescência contida nas amostras foi analisada por espectrofluorometria, recorrendo a um espectrofotómetro de fluorescência (BioRad, VersaFluor™, Marnes-la-Coquette, França).

As curvas de calibração obtidas encontram-se descritas na Tabela AV-1.

Tabela AV-1. Equações de regressão linear obtidas para a quantificação da fluorescência.

Curva de calibração	Equação	r^2
Plasma sanguíneo	$y = 9381,4x + 1474,5$	0,8982
Conteúdo intestinal	$y = 918,98x - 926,38$	0,9366
Mucosa intestinal	$y = 918,98x - 926,38$	0,9366

Anexo VI

DOSEAMENTO DO N-HEXANO POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

A cromatografia em fase gasosa é uma técnica de separação cromatográfica baseada na distribuição diferencial das espécies entre duas fases não miscíveis, uma fase estacionária contida numa coluna e um gás vector, como fase móvel, que atravessa a fase estacionária. Aplica-se às substâncias, ou derivados das substâncias, que se volatilizam nas condições de temperatura utilizadas.

Na presente dissertação, a cromatografia em fase gasosa foi realizada com *head-space* estático. Esta técnica é uma técnica especialmente adaptada à separação e ao doseamento de compostos voláteis presentes em amostras sólidas ou líquidas. Baseia-se na análise de uma fase de vapor em equilíbrio com a fase sólida ou líquida.

O solvente orgânico a dosear foi n-hexano. A ICH classifica o n-hexano como solvente classe 2. Este solvente deve ser limitado apesar de não ser genotóxico ou causador de toxicidade irreversível no animal. O limite máximo permitido pela FDA é de 290 ppm (FDA, 2007). É ainda considerado pela ICH como um solvente suspeito de toxicidade reversível. Relativamente à acetona e isopropanol, estes dois solventes são classificados pela mesma organização, como solventes de classe 3, o que significa dizer que são considerados solventes de toxicidade baixa para o ser humano e, por esse motivo, o doseamento destes solventes não foi considerado etapa crucial na presente dissertação.

Procedimento

O aparelho utilizado foi Agilent Technologies 6890N Network GC System (Beijing, China) com um detector de ionização de chama (vulgarmente denominado por FID) e a uma temperatura de 250°C. A razão *split* foi de 5:1. O gás de arraste foi o hélio. A coluna de

separação foi DB-1 (30 m × 0,321 mm × 0,25 µm, J&W, Waldbronn, Alemanha). O fluxo da coluna foi a 0,4 mL/min. A temperatura variou entre 50°C até 190°C (velocidade 5°C/min).

Foram preparadas soluções padrão com concentrações de n-hexano a 500, 125 e 75 ppm dissolvidas em tampão fosfato de pH 7,4 (USP XXVIII) contendo citrato de sódio a 55 mM. A equação da recta foi $y = 52,91x - 212,63$, sendo y a área do pico e x a concentração do analito em ppm. A concentração de n-hexano obtida na amostra foi 10 ppm, o que significa dizer que o limite permitido pela FDA não foi atingido (FDA, 2007).

2. BIBLIOGRAFIA

EMEA (1995) Note for guidance on validation of analytical methods: definitions and terminology (CPMP/ICH/381/95). www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/038195en.pdf, consultado em 5/07/2007.

EMEA (1996) Note for guidance on validation of analytical methods: methodology (CPMP/ICH/281/95). <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/028195en.pdf>, consultado em 5/07/2007.

FDA (2007) <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/01b-0431-gdl0001.doc>, consultado em 5/07/2007.

