

Lara Sofia Marinho de Sousa

Insulina Oral e a Segurança dos Polímeros Usados no Seu Revestimento

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Francisco José de Baptista Veiga e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Lara Sofia Marinho de Sousa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009027377, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo desta Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 18 de julho de 2014.

A aluna

(Lara Sofia Marinho de Sousa)

O Tutor da Faculdade

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. Veiga', written over a horizontal line.

(Professor Doutor Francisco Veiga)

A aluna

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Lara Sofia Marinho de Sousa', written over a horizontal line.

(Lara Sofia Marinho de Sousa)

RESUMO

A nanotecnologia tem disponibilizado meios inovadores de deteção, diagnóstico e tratamento de várias doenças; muitas tentativas e esforços têm sido realizados para desenvolver uma insulinoaterapia para o tratamento da Diabetes, de modo a melhorar a qualidade de vida dos doentes que diariamente administram este fármaco por via injetável. As diversas tentativas têm falhado sobretudo a nível gastrointestinal, devido à dificuldade das atuais formulações ultrapassarem as barreiras fisiológicas que aqui são encontradas, constituindo ainda um grande desafio científico. Contudo, os estudos sobre o impacto toxicológico e os riscos das nanopartículas na saúde humana estão ainda numa fase inicial. Até agora, o sistema terapêutico de insulina oral baseado em nanopartículas mais promissor é aquele que incorpora insulina num complexo nanoparticulado multicamada, constituído por polímeros mucoadesivos, biodegradáveis e resistentes ao ácido.

Esta monografia centra-se na descrição dos avanços da administração da insulina por via oral, abordando as consequências fisiológicas de polímeros naturais e sintéticos *in vivo* e *in vitro*, a nível celular e a nível clínico. A toxicologia das nanopartículas necessita de ser mais estudada, para que seja possível informar as autoridades reguladoras sobre o potencial nanotoxicológico de determinados materiais.

Palavras-chave: Nanopartículas, insulina, toxicologia, administração oral, polímeros naturais, polímeros sintéticos

ABSTRACT

Nanotechnology is providing innovative means to detect, diagnose, and treat disease. Numerous nanoparticle-based approaches have been taken an effort to develop an oral insulin therapy for the treatment of diabetes improving the quality of life of diabetic patients who must routinely receive injections of this drug. A variety of approaches have been studied to overcome the problems encountered with the oral delivery of insulin, but with little success because the actual formulations are limited by various physiological barriers and remains a major scientific challenge.

However, research into the toxicological impact and possible hazard of nanoparticles to human health is still in the beggining. To date, the most promising approaches for nanoparticle-based oral insulin therapy appear to involve the incorporation of insulin into complex multilayered nanoparticles that are mucoadhesive, biodegradable, biocompatible, and acid protected. The current monograph focuses on the advancements in the field of oral insulin via natural and sintetic polymers, discusses about its *in vitro* and *in vivo* implications at the cellular level and clinical level. Nanoparticle's toxicology requires further research in order to inform regulatory authorities about the nanotoxicological potential of certain nanomaterials.

Keywords: Nanoparticles, insulin, toxicology, oral administration, natural polymers, synthetic polymers

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	6
2.	INTRODUÇÃO ÀS NANOPARTÍCULAS	7
3.	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	8
	-Nanopartículas obtidas por polimerização de um monómero	8
	-Nanopartículas obtidas por polímeros pré-formados / macromoléculas	8
	-Purificação das nanopartículas	9
4.	SEGURANÇA E ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	9
5.	APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS A FÁRMACOS PROTEICOS.....	10
	5.1. Absorção oral de fármacos em nanopartículas	10
	5.2. Situação actual da aplicação da insulina oral.....	11
6.	DIABETES E INSULINA.....	12
7.	VANTAGENS DA INSULINA ORAL.....	13
8.	LIMITAÇÕES DA INSULINA ORAL.....	14
9.	ESTRATÉGIAS ORAIS	14
10.	INTRODUÇÃO À TOXICOLOGIA	15
	-Toxicidade e biodegradação dos polímeros	15
	-Citotoxicidade e captação celular.....	15
11.	TOXICOLOGIA E SEGURANÇA DE POLÍMEROS NATURAIS	16
	-Quitosano.....	16
	-Alginato	19
	-Dextrano	20
	-Gelatina	20
12.	TOXICOLOGIA E SEGURANÇA DE POLÍMEROS SINTÉTICOS	21
	-Polialquilcianoacrilatos.....	21
	-Poliacrilamida (PAA)	22
	-Ácido Polimetacrílico (PMAA).....	22
	-Ácido Poliláctecoglicolido (PGLA)	22
13.	PREPARAÇÃO COM SOLVENTES NÃO TÓXICOS.....	22
14.	ESTATUTO REGULAMENTAR DOS COMPONENTES DAS NANOPARTÍCULAS	23
15.	CONCLUSÃO.....	24

ABREVIATURAS

ALT – Alanina transaminase extracelular

DM – Diabetes *mellitus*

GI – Gastrointestinal

GLY – Glicofurool

GRAS – *Generally recognized as safe*

NP – Nanopartículas

PAA – Poliacrilamida

PACA – Polialquilcianoacrilatos

PEG – Polietilenoglicol

PGLA – Ácido Polilacteocoglicólido

PMAA – Ácido Polimetacrílico

SMF – Sistema Mononuclear Fagocitário

TGI – Trato gastrointestinal

TJ – *Tight junctions*

I. INTRODUÇÃO

As proteínas têm-se vindo a tornar fármacos de eleição para o tratamento de numerosas doenças devido à sua seletividade e capacidade de ação e, neste contexto, a insulina têm sido uma das moléculas com mais necessidade de administrar por via oral, dado que a via subcutânea é dolorosa, e segundo a OMS, a Diabetes provoca 3 milhões de mortes por ano, e é previsto que a população diabética duplique até 2030, logo, é urgente providenciar melhores tratamentos que se traduzam numa melhor adesão à terapêutica. Contudo, o desenvolvimento de uma formulação eficaz e segura para administração oral destes fármacos continua a ser um desafio.

O presente trabalho é sobre a insulina oral e a segurança dos polímeros usados no seu revestimento, mais concretamente, sobre a avaliação toxicológica dos diferentes polímeros usados para produzir nanopartículas que veiculem a insulina até ao local alvo, protegendo-a de todo o ambiente agressivo do trato gastrointestinal.

O trabalho é constituído por uma introdução, na qual se faz uma abordagem às nanopartículas, à fisiopatologia da Diabetes, insulina, vias principais de absorção, e às limitações e vantagens da insulina oral.

A segunda parte é inteiramente dedicada à segurança e aos dados e conclusões toxicológicas apuradas em vários artigos científicos, fazendo distinção entre polímeros naturais e sintéticos. Nesta parte é ainda abordada a preparação de nanopartículas com solventes não tóxicos, e o atual estatuto regulamentar de diferentes polímeros que constituem as nanopartículas.

O objetivo deste trabalho é perceber se os polímeros atualmente disponíveis podem ser usados com segurança em formulações de nanopartículas, e quais as perspetivas futuras para o desenvolvimento destas.

2. INTRODUÇÃO ÀS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas (NP) podem ser definidas como sistemas coloidais abaixo da ordem dos micrómetros (mas não necessariamente), constituídos por polímeros (biodegradáveis ou não)(COUVREUR, et al, 1995).

As NP possuem muitas vantagens na administração de fármacos por via oral; estas partículas possuem um tamanho muito pequeno e são capazes de encapsular proteínas ou péptidos, como a insulina, e protege-los da degradação enzimática e do ambiente agressivo do tracto gastrointestinal, permitindo o transporte e absorção pelo epitélio intestinal, melhorando assim a sua farmacocinética, biodisponibilidade e eficácia terapêutica. As NP conferem uma excelente protecção à molécula de insulina e mantém a sua estabilidade no fluido gastrointestinal promovendo uma libertação controlada, facilitando também o transporte paracelular dos fármacos. (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012)

De acordo com o processo de preparação, as NP podem ser nanocápsulas ou nanoesferas.

(Figura 1)

As **nanocápsulas** diferem das nanoesferas na medida em que as primeiras são uma espécie de reservatório, em que um invólucro de material sólido rodeia um núcleo que é líquido ou semi-sólido à temperatura ambiente (15 - 25°C). Nas primeiras formulações de nanocápsulas, o núcleo era composto de óleo, permitindo assim uma elevada quantidade de encapsulamento de fármacos lipossolúveis. As nanocápsulas com um núcleo aquoso são capazes de encapsular compostos solúveis em água. O conteúdo das nanocápsulas é determinado pela natureza da fase dispersa da emulsão ou da microemulsão o que constitui a base da formulação. Geralmente, o material de cobertura polimérica que rodeia o núcleo de líquido é formado graças à polimerização que ocorre na interface entre a fase dispersa e contínua da emulsão ou por precipitação de um polímero pré-formado.

Nanoesferas são partículas da matriz, ou seja, partículas cuja massa inteira é sólida. Estes sistemas de partículas são caracterizados por um tamanho que varia entre várias dezenas de nanómetros a algumas centenas de nanómetros e geralmente possuem forma esférica. Para permanecer bem disperso no líquido de dispersão, as NP precisam de ser estabilizadas por meio de moléculas anfífilas ou agentes coloidais de protecção.

As nanoesferas e as nanocápsulas podem ser usadas como transportadores de fármacos, e estes podem ser ou aprisionados dentro das NP ou adsorvidos à sua superfície, sendo as moléculas frágeis melhor protegidas da degradação enzimática quando são aprisionadas no nanotransportador. Neste caso, a sua associação com o transportador do fármaco deve ser feita durante a preparação das nanocápsulas ou as nanoesferas. No entanto, quando o fármaco é muito susceptível à degradação, que pode ocorrer durante o processo de preparação do transportador, ou mesmo quando não se associa

o fármaco durante a preparação do veículo, ele pode ser carregado por adsorção sobre a superfície de transportadores já preparados. (VAUTHIER AND BOUCHEMAL, 2009)

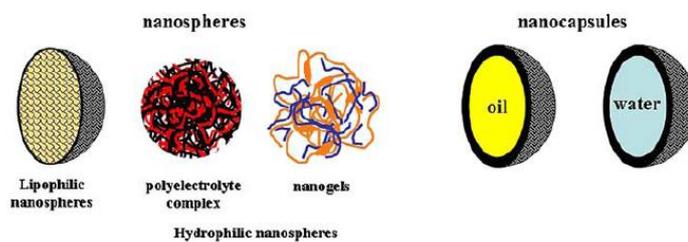


Figura 1 – Nanoesferas e nanocápsulas. (VAUTHIER AND BOUCHEMAL, 2009)

3. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

A maior parte dos métodos para a preparação de NP incluem duas etapas principais: a preparação de um sistema emulsionado corresponde ao primeiro passo, enquanto que, as NP são formadas durante o segundo passo do processo. Este segundo passo é conseguido por precipitação de um polímero formado ou por polimerização de monómeros. Geralmente, o princípio subjacente à segunda etapa dá o nome ao método. Em alguns casos, as NP formam-se ao mesmo tempo que o sistema inicial de emulsificação. Outros métodos não exigem a preparação de uma emulsão antes da obtenção das NP: baseiam-se na precipitação de um polímero pré-formado em condições de formação de dispersão espontânea, graças à auto-montagem (*self-assembly*). (VAUTHIER AND BOUCHEMAL, 2009)

-Nanopartículas obtidas por polimerização de um monómero

Este método baseia-se na introdução de um monómero na fase dispersa de uma emulsão, ou disperso num não solvente do polímero. A reação de polimerização neste sistema ocorre em duas fases: uma fase de nucleação, seguida por uma fase de crescimento.

Exemplo: polialquilcianoacrilatos (vantagens em relação aos outros: bioabsorvíveis por um mecanismo de bioerosão – hidrólise enzimática da cadeia lateral de éster –, e não necessitam de uma fonte de energia para iniciar a polimerização). (COUVREUR, P., DUBERNET, C., E PUISIEUX, 1995)

-Nanopartículas obtidas por polímeros pré-formados / macromoléculas

As moléculas residuais derivadas do processo de polimerização acima referido podem ser mais ou menos tóxicas, o que requer uma purificação; para evitar estes problemas de ordem toxicológica, começaram a ser usadas macromoléculas ou polímeros pré-formados, que podem ser sintéticos (ácido polilácteo; poli (β -hidroxibutirato); PGLA; poli ϵ -caprolactona; etilcelulose; polistireno) ou naturais (albumina; amido; quitosano; alginato; gelatina). (COUVREUR, et al, 1995)

Os diferentes métodos de preparação de NP podem ser: extrusão, coacervação, evaporação do solvente, polimerização, e nebulização.

-Purificação das nanopartículas

Assim que as suspensões de NP são obtidas, pode ainda ser necessária purificação para remover as impurezas e excesso de reagentes envolvidos durante o fabrico. Dependendo do método de preparação, as impurezas incluem solventes orgânicos, óleos, agentes tensoactivos, monómeros residuais, iniciadores de polimerização, sais, e grandes agregados de polímero. A purificação é ainda mais importante quando se querem obter suspensões de NP que podem ser administradas *in vivo* por uma via específica. Por exemplo, as NP sintetizadas pelo método de *salting-out* reverso provêm de suspensões que contêm elevadas concentrações de sal; estas devem ser dessalinizadas antes de ser administradas por via intravenosa. Outro exemplo, água com nanocápsulas dispersas em óleo, proveniente da síntese, podem ser administradas por via oral, no entanto, caso a administração seja por via intravenosa, as NP precisam ser limpas e transferidas para meio aquoso, de modo a cumprir os requisitos da via intravenosa. Existem vários métodos que podem ser aplicados para purificar dispersões de NP: evaporação sob pressão reduzida, centrifugação, ultracentrifugação, filtração através de malha ou filtros, diálise, filtração em gel, ultrafiltração, diafiltração e microfiltração de fluxo cruzado. (VAUTHIER AND BOUCHEMAL, 2009)

4. SEGURANÇA E ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

A espessura da parede do invólucro das nanocápsulas e a porosidade são parâmetros importantes que influenciam a quantidade, a protecção e a libertação do fármaco, que por sua vez, dependem das concentrações do monómero do invólucro e do seu peso molecular. Foram reunidos dados a partir de preparações de nanocápsulas para estabelecer uma correlação entre os pesos moleculares e as concentrações de monómeros e as propriedades da membrana, que incluem a sua espessura, porosidade, flexibilidade e a resistência às condições de armazenamento, e demonstrou-se que a espessura da parede das nanocápsulas depende da concentração dos monómeros lipofílicos e é independente da concentração de monómeros hidrofílicos.

Noutros estudos, verificou-se que o uso de surfactantes ajuda a conservar as suspensões de NP de agregados, durante longos períodos de armazenamento.

Para se conseguir um longo período de armazenamento e em boas condições, as NP são liofilizadas; assim diminuem-se os riscos de contaminação microbiológica, degradação prematura do polímero por hidrólise, instabilidade físico - química devido à agregação e sedimentação de partículas, e perda de atividade biológica do fármaco.

Finalmente, as nanocápsulas liofilizadas devem ser armazenadas a uma temperatura inferior à de transição vítrea da formulação, para manter o estado vítreo do crioprotector e para evitar a agregação das nanocápsulas. (VAUTHIER AND BOUCHEMAL, 2009)

As condições de armazenamento adequadas são a 4°C. (YIN ET AL, 2009)(VIEHOF ET AL, 2013)

5. APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS A FÁRMACOS PROTEICOS

5.1. Absorção oral de fármacos em nanopartículas

Foram realizados muitos estudos que demonstram a captação das NP após a sua administração oral; esta captação pode ocorrer por diferentes mecanismos através do intestino (COUVREUR *et al.*, 1995):

- Via transcelular

Pela via transcelular, as NPs podem ser captadas pelos enterócitos ou pelas células M, células epiteliais especializadas que se encontram nas placas de Peyer (foliculos de tecido linfóide coberto por células M (KHAFAGY *et al.*, 2007)). As células M caracterizam-se pela sua superfície apical achatada, poucos lisossomas, um elevado número de mitocôndrias, e uma fina camada de muco sobre a sua superfície; ao contrário dos enterócitos, as células M captam antígenos e microorganismos do lúmen intestinal, sendo estes depois levados para o sistema imune que se encontra sob a mucosa.

Existem quatro mecanismos para o transporte activo: a fagocitose (maioritariamente nas células M); endocitose mediada por clatrina; macropinocitose; e endocitose mediada por caveolinas. Os diferentes mecanismos podem coexistir para captar as NP no intestino, dependendo dos polímeros usados na sua formação que podem variar com o tamanho da partícula, carga superficial, e mucoadesividade. A captação de NP por enterócitos ou células M é dependente do seu tamanho: partículas pequenas (< 50 - 100nm) são absorvidas por enterócitos, enquanto grandes partículas são mais absorvidas por células M. A forma como a carga à superfície afecta a sua absorção permanece controversa. Após uma contínua absorção de NP pelas células M nas placas de Peyer, alguns problemas ao nível da toxicidade podem aparecer devido a uma indução de resposta imune. (**Figura 2**) (CHEN *et al.*, 2011)

- Via paracelular

A via paracelular corresponde a menos de 1% da área de superfície total do epitélio intestinal, e é a via de entrada preferida das substâncias hidrofílicas, como água, iões e pequenos solutos; esta via é regulada pelas *tight junctions* (TJ), as proteínas que garantem a integridade do epitélio intestinal. O complexo juncional das células é composto por três tipos de proteínas: as *tight junctions* ou *zonula occludens*; *zonula adherens* e *macula adherens* ou desmossomas. As TJ conferem resistência mecânica ao revestimento celular, mantendo as células fortemente ligadas entre si e constituem a maior barreira

para a permeação de substâncias de grande peso molecular. (REKHA AND SHARMA, 2013) As TJ são compostas por uma combinação de proteínas transmembranares, incluindo as claudinas (CLDNs), ocludinas e moléculas de adesão juncional. Estas proteínas transmembranares, nomeadamente as CLDNs, estão envolvidas na selagem entre as células epiteliais adjacentes. (CHEN *et al.*, 2011) (Figura 2)

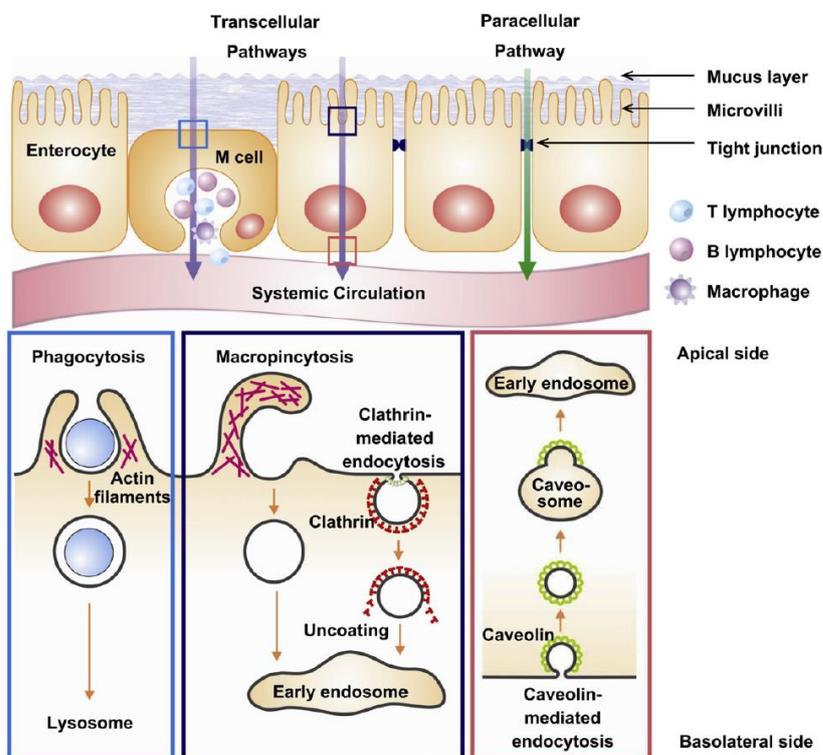


Figura 2 – Diferentes mecanismos de captação de nanopartículas no epitélio intestinal. (CHEN *et al.*, 2011)

5.2. Situação actual da aplicação da insulina oral

A administração oral de proteínas tem sido uma meta a atingir nos últimos anos, devido à maior disponibilidade de novas terapias através do desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante.

Um dos objetivos primordiais da administração oral de proteínas, como a insulina, é obter uma eficácia semelhante às formulações parenterais. A crescente importância das proteínas pode ser atribuída a três principais desenvolvimentos: em primeiro lugar, os métodos analíticos melhorados têm promovido a descoberta de numerosas hormonas e péptidos, que têm encontrado aplicações como produtos biofarmacêuticos; em segundo, a biologia molecular e a engenharia genética permitiram a produção em larga escala de proteínas, anteriormente disponíveis apenas em pequenas quantidades. Por último, existe um maior conhecimento do papel das proteínas reguladoras na fisiopatologia das doenças humanas. Consequentemente, as empresas farmacêuticas de todo o mundo têm desenvolvido tecnologias de administração de proteínas por via oral. (YUN, CHO AND PARK, 2013)

Neste momento, a *Apollo Life Sciences* está a desenvolver o *Oradel*TM, um sistema baseado em NP, que protege e transporta moléculas de insulina inseridas numa matriz de NP constituídas por polímeros à base de hidratos de carbono, revestidas com moléculas de vitamina B12, conseguindo passar o trato gastrointestinal através de transporte ativo. Verificou-se também que a vitamina B12 protege a insulina da digestão enzimática no estômago, assim como facilita o transporte da proteína através do intestino delgado para a corrente sanguínea. Recentemente, a *Apollo Life Sciences* anunciou que tem um método de produção único, no qual até 100% das moléculas de insulina são retidas na matriz das NP *Oradel*TM. Quando administrado por via oral com a formulação *Oradel*TM, os níveis de glicose no sangue foram reduzidos para os limites normais até 12 h em ratos diabéticos. (PARK, KWON AND PARK, 2011)

6. DIABETES E INSULINA

Fisiopatologia da doença: o pâncreas é uma glândula exócrina e endócrina; a parte endócrina é composta pelos ilhéus de Langherhans, os quais produzem hormonas que entram no sistema circulatório. Cada ilhéu é composto por células α que segregam glucagon, e células β que segregam insulina, uma proteína que consiste em duas cadeias polipeptídicas ligadas entre si, por duas pontes dissulfito (**Figura 3**). Os principais alvos da insulina são o fígado, tecido adiposo, músculos, e o centro de saciedade no hipotálamo. As moléculas de insulina ligam-se aos recetores nas células alvo, levando ao aumento, na membrana plasmática, do número de proteínas transportadoras de glicose para dentro da célula. Em geral, a insulina aumenta a capacidade dos seus tecidos alvo para captar e utilizar as moléculas de glicose que não são logo necessárias para fonte de energia, sendo armazenadas sob a forma de glicogénio. Sem insulina, a capacidade destes tecidos para aceitar e utilizar a glicose é mínima; portanto, a insulina é necessária para regular os níveis de glicemia, que podem aumentar drasticamente quando é segregada muito pouca insulina devido à destruição auto-imune dos ilhéus de Langherhans (*Diabetes mellitus* tipo 1), ou quando os recetores desta não respondem à sua presença (*Diabetes mellitus* tipo 2). (SEELEY, R. STEPHENS, T. TATE, 2003)

Mecanismo de ação: a insulina liga-se ao recetor na superfície da célula - alvo; estes recetores variam em número inversamente à concentração de insulina no meio. Com a ligação da insulina e de ATP, o recetor de insulina é fosforilado; este complexo ativa segundos mensageiros que, por sua vez, ativam terceiros mensageiros, iões de cálcio.

Distribuição: uma fração de insulina endógena ou exógena no plasma pode associar-se com certas proteínas, mas a maioria circula no sangue e na linfa na forma livre. O volume de distribuição da insulina aproxima-se ao volume do líquido extracelular.

Metabolismo: o metabolismo ocorre principalmente no fígado e nos rins; 10% da dose administrada aparece na urina. A insulina é, normalmente, filtrada nos glomérulos e depois completamente reabsorvida ou destruída no túbulo proximal; 50% da insulina que atinge o fígado através da veia portal é destruída numa única passagem, nunca chega à circulação geral. Uma enzima, a transhidrogenase insulina glutatião, utiliza o glutatião reduzido para reduzir as pontes dissulfeto da insulina e produzir cadeias separadas. O comprometimento grave da função renal parece afetar em maior extensão a taxa de insulinemia do que a doença hepática. (FERNANDO and FERNANDO, 1991)

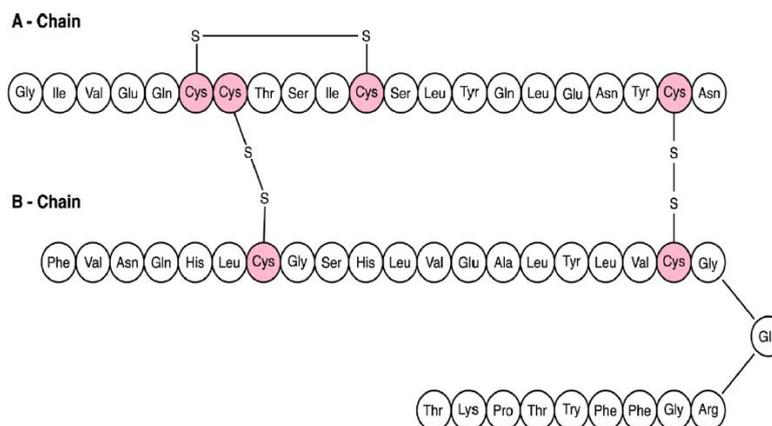


Figura 3 – Estrutura da insulina. (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012)

7. VANTAGENS DA INSULINA ORAL

O fabrico de uma forma oral não tem que obedecer a exigências regulamentares relacionadas com esterilidade, pirogenicidade e outras contaminações específicas. Outra grande vantagem, ao contrário da injetável, é que a administração oral da insulina mimetiza o destino fisiológico desta molécula (KHAFAGY *et al.*, 2007), replicando a dinâmica normal da libertação endógena de insulina, porque atinge o fígado (IYER, KHEDKAR AND VERMA, 2010), e proporciona assim uma melhor homeostase da glicose, o que vai também diminuir a incidência de hiperinsulinemia periférica, que está associada a neuropatia e retinoendopatia. (KHAFAGY *et al.*, 2007)

Outros potenciais benefícios da insulina oral na DM2 incluem a diminuição da progressão da doença, resultante de um início precoce do tratamento, a manutenção do peso devido à menor exposição da insulina nos tecidos periféricos e ausência de hiperinsulinemia pós-prandial tardia (IYER, KHEDKAR AND VERMA, 2010). Verificou-se ainda que a insulina está presente no colostro humano e existem recetores de insulina na membrana luminal e basolateral do enterócito, logo, a sua administração por via oral também apresenta aqui uma vantagem. (SUKHOTNIK *et al.*, 2011)

8. LIMITAÇÕES DA INSULINA ORAL

Existem muitas barreiras fisiológicas que tornam a administração da insulina por via oral um grande desafio. A primeira é o facto de o TGI secretar diversas enzimas como a pepsina, tripsina, quimiotripsina, cboxipeptidase e pancreatina, que normalmente degradam grandes proteínas em pequenos péptidos e aminoácidos.

A insulina que escapa intacta no TGI tem que ser absorvida sistemicamente, e este possui uma camada de células cilíndricas com TJ, que formam uma barreira para a absorção. Existe ainda uma camada de mucina, que atua como um gel filtrante e evita a absorção de grandes moléculas.

Para a insulina oral se tornar uma realidade, têm que ser superados vários desafios: a sua segurança e eficácia precisam de ser demonstradas, a absorção tem que ser reprodutível, os estudos têm que demonstrar que é superior à insulina injetável, e o mais importante, conhecer os seus efeitos a longo prazo, porque a insulina, e fatores de crescimento *insulina-like* aumentam a proliferação e diminuem a apoptose das células epiteliais, o que faz com que esta molécula esteja sempre sob análise das autoridades reguladoras, e implique estudos toxicológicos a longo prazo. (IYER, 2010) (SUKHOTNIK *et al.*, 2011)

9. ESTRATÉGIAS ORAIS

O sucesso da insulina por via oral implica ultrapassar a degradação enzimática, a falta de permeabilidade epitelial, e conservar a bioatividade da insulina durante o processo de preparação da formulação da NP. Têm sido desenvolvidas estratégias orais para maximizar a biodisponibilidade desta molécula, tais como:

- potenciadores de absorção
- inibidores enzimáticos
- sistemas poliméricos mucoadesivos
- sistema de entrega à base de partículas
- sistema de entrega alvo

Contudo, podem resultar algumas desvantagens a partir da co-administração de inibidores enzimáticos, por exemplo, incluindo toxicidade sistémica e digestão de proteínas nutritivas, provenientes da dieta, e também o elevado custo de produção, o que poderia impedir o uso frequente. No entanto, as ligações covalentes entre os inibidores enzimáticos e as NP que veiculam o fármaco podem ajudar os inibidores a manter um estado concentrado nas proximidades da insulina, minimizando assim a possibilidade de efeitos secundários resultantes dos inibidores enzimáticos. (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012)

10. INTRODUÇÃO À TOXICOLOGIA

A resposta farmacológica a uma determinada substância está diretamente relacionada à sua concentração no local alvo. Como a distribuição de uma molécula está relacionada com as suas propriedades físico-químicas, que não estão necessariamente adaptadas à área afectada, são precisas grandes quantidades dessa substância. Assim, a toxicidade surge devido a uma grande quantidade dessa substância em órgãos e tecidos saudáveis.

-Toxicidade e biodegradação dos polímeros

É de consenso geral que os sistemas poliméricos usados no revestimento ou transporte para administração sistémica em humanos têm que ser biodegradáveis; após a sua administração, o polímero vai-se concentrar em determinados compartimentos intracelulares, como os lisossomas, ou tecidos, induzindo uma sobrecarga de material não - metabolizado. Assim, para avaliar um polímero em relação a outro, é essencial avaliar o processo pelo qual este é degradado, assim como estimar a taxa de libertação celular/tecidual dos seus produtos de degradação.

Podemos desde já distinguir biodegradação de bioerosão; na **biodegradação**, a cadeia principal do polímero será hidrolisada por via química e/ou enzimática; na **bioerosão**, a cadeia principal do polímero permanece inalterada, enquanto que, o ataque enzimático das cadeias laterais, provoca a solubilização do polímero, levando à desagregação da nanopartícula. Estes processos não são equivalentes do ponto de vista da sua toxicidade, dado que no primeiro caso, os produtos de metabolização são facilmente filtrados pelo rim, enquanto que, no segundo caso, a excreção completa do material polimérico só ocorre se as NP tiverem sido desenhadas com polímeros de baixo peso molecular. Mas, se a biodegradação/bioerosão é um pré - requisito, não é suficiente para garantir a completa excreção do polímero, porque mesmo que o polímero seja reduzido a pequenos fragmentos, se esses produtos de degradação não passarem a membrana lisossomal, não serão excretados. Portanto, o peso molecular do polímero, o seu mecanismo de degradação, e a difusibilidade dos seus metabolitos têm que ser determinados de modo a permitir a avaliação do risco de sobrecarga do polímero *in vivo*.

-Citotoxicidade e captação celular

A ligação de um fármaco a um polímero pode induzir uma captação celular aumentada desse mesmo fármaco e levar a uma redução da sua difusão, concentrando-se assim em compartimentos intracelulares (lisossomas). Esta abordagem, que é usada para melhorar a biodisponibilidade dos fármacos, pode por outro lado, induzir uma toxicidade inesperada, no caso de compostos que originariamente são pouco tóxicos.

Existem fatores determinantes que conferem toxicidade a determinadas substâncias: a via e a velocidade de absorção celular (que influencia a distribuição celular do complexo fármaco-polímero); a cinética de libertação dos produtos de degradação (no caso da biodegradação), e a velocidade de solubilização do polímero (no caso da bioerosão).

A velocidade de degradação, por exemplo, se for demasiado rápida, cria localmente uma elevada concentração de produtos de degradação, levando à danificação da membrana celular. **(Figura 4)**
(COUVREUR, P., DUBERNET, C., E PUISIEUX, 1995)

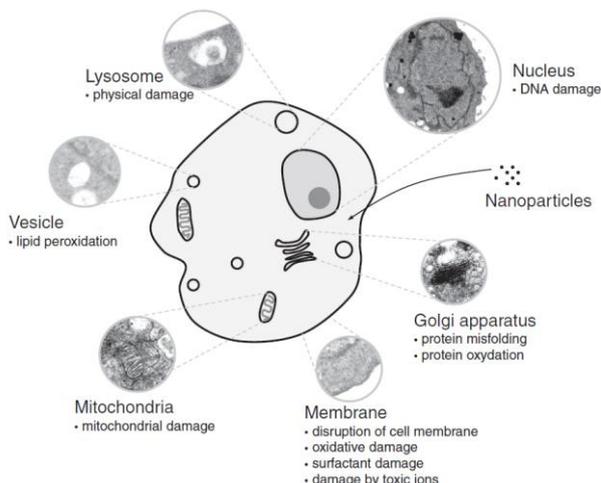


Figura 4 – Interação das NP com as células: alvos intracelulares e mecanismos nanotoxicológicos.
(ELSAESSER and HOWARD, 2012)

II. TOXICOLOGIA E SEGURANÇA DE POLÍMEROS NATURAIS

Os polímeros naturais são geralmente considerados seguros *in vivo* e grande parte já é usada como excipientes em medicamentos. Atualmente, muitos polímeros naturais estão a ser estudados para serem usados como veículos na administração de insulina por via oral. Para além de serem hidrofílicos e biodegradáveis, os polissacarídeos são degradados enzimaticamente e são biocompatíveis. (SONIA and SHARMA, 2012)

-Quitosano

O quitosano é um polímero de origem natural amplamente considerado biodegradável, biocompatível e mucoadesivo. Possui um grupo amina que fica ionizado em meio ligeiramente ácido, permitindo ao polímero aderir a superfícies carregadas negativamente, ex. membranas celulares. As NP de quitosano formam-se instantaneamente após a adição de aniões. A ausência de químicos agressivos no seu processo de produção coloca as NP de quitosano numa posição atrativa para aplicações biomédicas, para além de ser um bom potenciador da permeação no epitélio intestinal.

No entanto, enquanto o polímero de base do quitosano é biocompatível, quando apresentado como NP, pode não ser tão inócuo. As NP de quitosano podem apresentar diferentes perfis de citotoxicidade em função do tamanho das NP e do tipo de células com que interagem. As células hepáticas, por exemplo, mostram respostas diferentes às NP de quitosano, sendo umas menos viáveis que outras, originando necrose e fragmentação de DNA causada pela internalização de NP de quitosano. Isto é importante porque as NP circulantes de quitosano encontram o fígado como o principal órgão de desintoxicação no corpo humano. Esta matéria não se aplica apenas a NP de quitosano injetadas directamente na circulação sistémica, dado que muitos estudos verificaram a capacidade das NP de quitosano modular/alterar a barreira das TJ no epitélio intestinal.

Neste estudo, usando o ensaio MTT, será utilizada uma linha celular progenitora de fígado humano de tecido não tumoral e a actividade enzimática da Desidrogenase Mitocondrial e da ALT, serão marcadores de morte celular e da integridade membranar. Os efeitos na função enzimática do citocromo P450 serão também estudados.

Quanto à actividade Desidrogenase Mitocondrial verificou-se toxicidade evidente nas células progenitoras de fígado humano pelo quitosano (moléculas de quitosano) e pelas NP de quitosano. Foram detectados aumentos da actividade da enzima com o aumento da concentração de quitosano, ao contrário do que aconteceu com as NP, onde a actividade enzimática parece ser mais influenciada pelo tempo de incubação do que pela concentração.

A integridade da membrana celular foi avaliada por fuga da ALT a partir das células do fígado. As células expostas a quitosano até 1% não apresentaram níveis significativamente diferentes de secreção de ALT em comparação com células incubadas com meio de cultura (controlo). Por outro lado, a exposição a concentrações de NP $\geq 0,5\%$ levou a níveis significativamente mais elevados de ALT para o meio extracelular. Em todas as concentrações testadas, as NP foram um indutor mais fraco da secreção de ALT em comparação com 20 mM de acetaminofeno (controlo positivo).

A actividade metabólica de células progenitoras de fígado humano foi medida por um produto fluorescente produzido pelo metabolismo mediado pela CYP3A4. As células expostas ao meio de cultura serviram como controlo. A exposição durante 24h à dexametasona (20 μM), um indutor de expressão da CYP3A4 aumentou a actividade do CYP3A4 em células hepáticas em 5 vezes.

As células expostas ao quitosano exibiram níveis de actividade de CYP3A4 semelhantes às células expostas à dexametasona. Amostras de NP também induziram a actividade do CYP3A4 celular mas, ao contrário das amostras quitosano, o resultado foi dependente da concentração.

A captação celular de qualquer amostra, até concentrações de 0,1%, é limitada. Contudo, aumentando a concentração até 1%, aumenta significativamente a captação de NP, algumas concentrando-se no núcleo e outras no nucléolo. A amostra de quitosano, quando numa concentração de 1%, não apresenta um grau de fluorescência proporcional, nem tão intenso como as NP.

Podemos concluir que as NP são menos mucoadesivas que as moléculas de quitosano, mas são mais facilmente captadas que estas; a captação das NP levou a uma diminuição da viabilidade e proliferação células progenitoras de fígado humano, o que se confirmou através da fuga de ALT das células para o meio extracelular e pela indução do CYP3A4, cuja atividade pode ser um mecanismo de defesa.

Assim, ao usar NP de quitosano como veículo para a entrega de fármacos peptídicos, é necessário avaliar os seus efeitos adversos, principalmente em células tão importantes e que intervêm em vários processos, como as células do fígado. (LOH *et al.*, 2010)

O quitosano também tem sido usado como potenciador de permeação intestinal, através da via paracelular. Para estudar como isto acontece, foram usadas células Caco-2 que morfológicamente se assemelham a células intestinais, e possuem TJ entre si. Depois de tratadas com quitosano, verificaram-se diferentes alterações estruturais na morfologia das TJ, tais como o aumento do espaço intercelular. Os espaços intercelulares foram recuperados após remoção do quitosano; estes resultados demonstram que o quitosano pode abrir reversivelmente as TJ entre as células Caco-2, aumentando assim a permeabilidade da via paracelular. A questão é, saber a abertura reversível das TJ põe em causa a sua integridade; para descobrir isso, avaliaram-se os níveis de genes e proteínas que formam a estrutura intercelular da qual as TJ fazem parte. **(Figura 5)**

Observaram-se mudanças mínimas nos níveis genéticos das outras proteínas estudadas, com exceção da CLDN4, que aumentou bastante a sua expressão após a remoção de quitosano, diminuindo depois gradualmente, até voltar aos níveis de expressão genética das células Caco-2 controlo. Verificou-se também, através de marcadores fluorescentes, que a localização das CLDN-4 coincidia com marcadores lisossomais, sugerindo que a destruição nos lisossomas pode ser a via de degradação das CLDN-4. Conclui-se que as CLDN-4 têm um papel importante na abertura reversível das TJ do epitélio intestinal, mediado pelo quitosano, pois aquando o tratamento das células Caco-2 com quitosano, observa-se uma deslocação de CLDN-4 da membrana celular para o citosol, levando à rutura das TJ e aumentando a permeabilidade paracelular. Após a remoção do quitosano a integridade do epitélio é reconstituída. (YEH *et al.*, 2011)

Noutro estudo, conclui-se que a citotoxicidade das células Caco-2 está relacionada com o tamanho da partícula; quanto maior o tamanho da partícula, menor a toxicidade, daí que as NP de quitosano causem mais dano à membrana celular e fragmentação nuclear que as moléculas de quitosano, que apesar de estas apresentarem uma maior mucoadesividade, são fracamente captadas para o citoplasma devido ao seu tamanho ($\gg 1 \mu\text{m}$). O pH do meio é um parâmetro muito importante porque vai condicionar o tamanho das partículas: a pH 6 estas possuem um menor tamanho que a pH 7.4, devido a uma significativa agregação de partículas a pH neutro.

Neste estudo, a atividade da Desidrogenase Mitocondrial também foi avaliada, e tal como nas células progenitoras de fígado humano, foi verificado um aumento da expressão mitocondrial, como forma de responder à presença das NP de quitosano. (LOH, SAUNDERS and LIM, 2012)

Um estudo *in vivo* em ratinhos, com administração diária de NP, verificou que ao fim de 14 dias não existiam diferenças significativas nos sinais clínicos (diarreia, febre...), nem diferenças ao nível do peso corporal ou reações inflamatórias. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos variaram um pouco entre o grupo controlo e o grupo das NP, contudo, a diferença não era significativa e os valores estavam dentro da normalidade. (SONAJE *et al.*, 2009)

Nos últimos anos, a área de foco tem mudado do quitosano simples para os polímeros derivados do quitosano para preparar NP orais devido às suas propriedades melhoradas. Os polímeros principais são os derivados de quitosano quaternizado, complexos de ciclodextrina, quitosano tiolado, quitosano peguilado e quitosano combinado com outros péptidos.

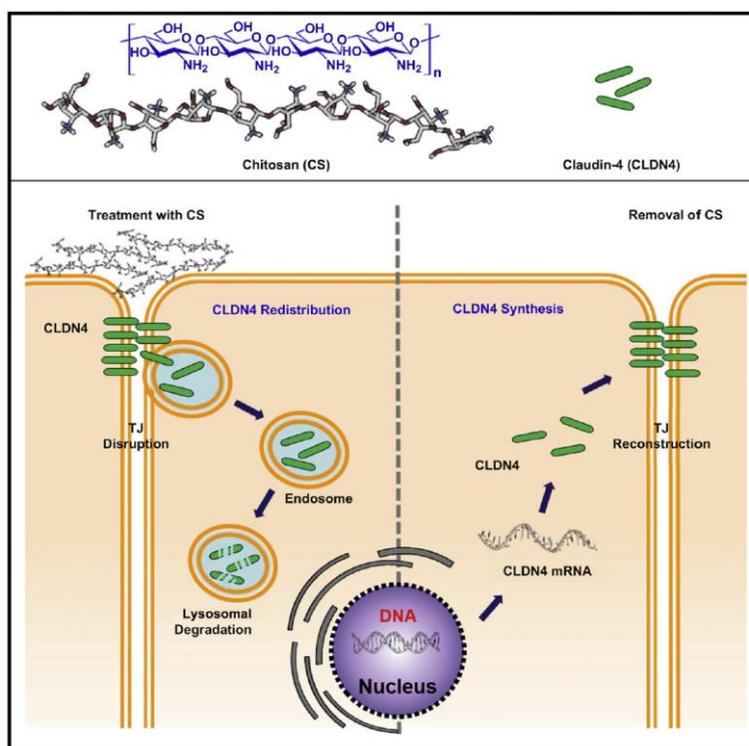


Figura 5 – Mecanismo e consequência da abertura reversível das TJ pelo quitosano. (YEH *et al.*, 2011)

-Alginato

O alginato é um polímero biocompatível, biodegradável e mucoadesivo polianiónico, derivado das algas castanhas da classe das *Phacophyceae* constituídas por dois tipos de monómeros ligados em (1-4): o ácido b-D manurónico (M) e o ácido a-L-gulurónico (G). (CHAUDHURY and DAS, 2011)

-Dextrano

O dextrano é um polissacarídeo bacteriano extracelular não tóxico e altamente solúvel em água, predominantemente constituído por unidades de glucopiranosose com ligações 1-6 de cadeia linear, com um certo grau de ramificação nas ligações 1-3 (SONIA and SHARMA, 2012). A conformação da cadeia de um polímero hidrofílico à superfície da NP pode influenciar bastante a capacidade de a nanopartícula ativar o Sistema complemento. O caso mais evidente é o do dextrano; apesar de as NP revestidas com dextrano tomarem a conformação de *loops* serem altamente ativadas pelo sistema de complemento, concentrando macrófagos do SMF, quando são NP revestidas pelo mesmo dextrano numa conformação em escova, são capazes de escapar à intensa captura pelos macrófagos e permanecer na corrente sanguínea por longos períodos de tempo. (VAUTHIER and BOUCHEMAL, 2009)

Sendo o dextrano um bom estabilizador para magnetite à nanoescala, também tem sido usado em nanopartículas de magnetite, à escala comercial e laboratorial. (DING *et al.*, 2010)

-Gelatina

A gelatina, é um polímero natural derivado do colagénio, com imensas aplicações a nível farmacêutico. As suas nanopartículas necessitam de ligações cruzadas, de modo a proteger as NP da dissolução em água. O glutaraldeído é um conhecido agente de reticulação, e é geralmente usado para preparar as NP de gelatina, contudo possui elevada toxicidade. De modo a evitar o uso desta substância, a alternativa será usar um agente reticulante natural, a genipina. Foi demonstrado que a toxicidade e proliferação celular é significativamente mais baixa e mais elevada, respetivamente, com a genipina do que com o glutaraldeído. As NP de gelatina têm potencial para servir como veículo para transportar fármacos devido à sua simples preparação. Dado que é derivada de bovinos ou suínos, muitas vezes usada na indústria farmacêutica como matéria-prima de cápsulas, pode transmitir doenças devido à origem animal, logo, a sua segurança é questionável. (WON and KIM, 2009)

Para além dos polímeros naturais acima falados, também a **albumina**, o **amido** e a **pectina** são usados em aplicações farmacêuticas e em sistemas para veicular fármacos.

Num estudo desenvolvido por Reis *et al.*, foi administrado por via oral uma dose diária de insulina num sistema nanoparticulado durante 15 dias em ratos *Wistar*. Este sistema era constituído por nanopartículas com Alginato-Dextrano no centro, revestido por Quitosano-PEG, que por sua vez também estava revestido por albumina. Uma avaliação a nível toxicológico usou parâmetros bioquímicos, hematológicos, urinários, assim como sinais clínicos, variação de peso, mortalidade e avaliação histológica de vários tecidos e órgãos, e foi demonstrada ausência de toxicidade por parte destes polímeros naturais.

As diferenças, não significativas, que se encontraram nos ratos teste (tratados com NP) também eram encontradas nos ratos diabéticos não tratados com NP, logo, estas alterações não se podem atribuir à composição das NP, mas sim à fisiopatologia da diabetes e/ou indução de diabetes por Streptozotocina. (Reis *et al.*, 2008)

12. TOXICOLOGIA E SEGURANÇA DE POLÍMEROS SINTÉTICOS

-Polialquilcianoacrilatos (PACA)

Os PACA são constituídos por monómeros, os alquicianocrilatos, e possuem excelentes propriedades adesivas; são considerados polímeros bioerodíveis, logo, a sua completa excreção só ocorre se forem desenhados com um baixo peso molecular. Os seus produtos de degradação são um alquilalcool e o ácido poli (cianoacrilico), que são hidrossolúveis e excretados pelo rim.

Após a sua administração, as NP de PACA são captadas pelo fígado, baço, e em menor extensão, pela medula óssea; dentro dos tecidos as NP são captadas pelos macrófagos do SMF. A avaliação de uma potencial toxicidade necessita que se averigue uma depressão ou estimulação do SMF. Foi observado que as NP de PACA não induzem o SMF após administrações repetidas, apesar de se observar uma depleção de opsoninas. Um ensaio de fase I revelou uma boa tolerância em relação a este polímero. Foram também incubados hepatócitos com estas NP numa concentração de 75 µg/ml medindo a toxicidade através da fuga de LDH, não se observando nenhum tipo de citotoxicidade; contudo, a 150 µg/ml, já se verificou dano na membrana.

Dentro dos PACA, os polímeros com cadeiras laterais mais curtas (polimetilcianoacrilato, polietilcianoacrilato...) revelaram ser mais tóxicos que os polímeros com cadeiras laterais mais longas, independentemente do tipo de células usadas, devido ao facto de estes últimos terem uma velocidade de degradação mais lenta, não apresentando o efeito de *burst release*.

Finalmente foi também estudada a libertação de mediadores inflamatórios mostrando-se que as NP de PACA podem estimular os macrófagos, e a libertação de peróxido de hidrogénio das células, mas não a libertação de citocinas.

Contudo, é de salientar que os estudos *in vitro* têm que ser interpretados com prudência, dado que a proporção quantidade de polímero - células em estudo, é muito maior do que na realidade acontece *in vivo*; a quantidade de produtos de degradação que provocam a toxicidade das NP de PACA, em condições *in vivo*, são eliminados do seu local de degradação, logo o contacto celular seria menor do que se verifica *in vitro*. (VAUTHIER *et al.*, 2003)

-Poliacrilamida (PAA)

A poliacrilamida é um polímero formado por subunidades de acrilamida que pode ser sintetizada numa cadeia linear simples ou com ligações cruzadas; possui a elevada capacidade de absorver água, e por isso forma um gel quando hidratada. A poliacrilamida, por si, é considerada como não-tóxica, contudo, o seu monómero isolado, pode interferir com o sistema nervoso; o seu monómero pode por isso ser considerado como uma impureza. (DJ and RR, 1989)

Foram administradas NP de PAA durante 14 dias, por via intravenosa; os valores séricos foram avaliados ao fim dos 14 dias de exposição e não foi evidenciado nenhum sinal de toxicidade maior nem se verificou perda de peso; com exceção da elevação da fosfatase alcalina, todos os outros parâmetros estavam dentro dos valores normais. A avaliação histopatológica aos pulmões, fígado, rins, coração e baço, não revelou qualquer sinal de toxicidade. As micrografias confocais dos tecidos seccionados mostraram a captação das NP maioritariamente no fígado e no baço, o que leva a concluir que os órgãos do SMF reconhecem as NP após a exposição vascular. (JOLLIET and PHILBERT, 2012)

-Ácido Polimetacrílico (PMAA)

Uma nova classe de hidrogéis de PEG (polietilenoglicol) complexados com PMAA estão a ser amplamente desenvolvidos pelo grupo *Peppas* para administração de insulina por via oral.

Estes complexos de dar resposta às variações de pH no trato GI, providenciando uma melhor proteção à insulina e sem citotoxicidade apreciável. (CHATURVEDI *et al.*, 2013)

-Ácido Polilácteocoglicolido (PGLA)

É muito importante avaliar a citotoxicidade de uma NP para justificar o seu desenvolvimento e uso.

A citotoxicidade das NP de PLGA foram analisadas *in vitro* pelo ensaio MTT com células Caco-2; as conclusões do ensaio mostraram que o polímero não era prejudicial para a sobrevivência ou viabilidade celular, e que o resíduo do solvente orgânico derivado do processo de preparação é muito ligeiro, não influenciando o normal crescimento das células Caco-2. (ZHANG *et al.*, 2012)

13. PREPARAÇÃO COM SOLVENTES NÃO TÓXICOS

O Polietilenoglicol (PEG) e o Glicofurolo (GLY) são dois solventes não tóxicos. Ao contrário dos solventes “standard”, o uso de PEGs melhora a estabilidade dos biofármacos (neste caso, a insulina) e mantêm a atividade do fármaco encapsulado. Os derivados líquidos dos PEGs são também não - irritantes e solventes biocompatíveis. As suas principais vantagens são a baixa toxicidade, miscibilidade com a água.

Usar solventes como acetona, etanol ou acetato de etilo requer um procedimento de remoção total destes solventes, para atingir concentrações residuais em "partes por milhão" de modo a que não

permaneçam riscos toxicológicos. A remoção do solvente é também um processo demorado e dispendioso, e requer testes de controlo da qualidade para confirmar a ausência do solvente removido. Ao invés de usar solventes tóxicos, é sugerida a utilização de PEGs. O GLY e o PEG 300 são ambos não - tóxicos que é realçado pelo uso de destes em produtos parenterais na concentração de até 50% ou 30%, respectivamente.

Ao contrário do método padrão de emulsão múltipla, a degradação do fármaco, devido à interação da proteína com a interface polimérica interior é minimizado com os PEGs.

Com isto, pode-se concluir que a técnicas de preparação mais suaves apresentam um grande potencial para a concepção de NP com proteínas, nomeadamente a insulina. (VIEHOF *et al.*, 2013)

14. ESTATUTO REGULAMENTAR DOS COMPONENTES DAS NANOPARTÍCULAS

As NP têm que satisfazer a rigorosos testes para obter aprovação das autoridades reguladoras. (LOH *et al.*, 2010) Dada a pouca informação disponível, ainda não é possível tirar conclusões exatas sobre o perfil toxicológico das diferentes formulações de nanopartículas e dos seus componentes.

Muitos dos polímeros descritos, já são usados em formulações orais de vários medicamentos que estão atualmente no mercado, sendo que, parte está incluída na lista *Physician's Desk Reference* e na base de dados de produtos inativos da FDA, que é o caso do alginato de sódio; outros estão identificados na base de dados de produtos inativos da FDA, mas não na *Physician's Desk Reference*, ou vice-versa.

O facto de uma substância estar incluída nestas listas não determina a sua segurança para via oral em geral, isto porque a quantidade da substância, dita inativa, em diferentes formulações (neste caso, nanopartículas, o que altera totalmente as suas características físico-químicas), varia consoante o efeito pretendido e a posologia (ex: uma vez por dia ou por semana), levando a uma grande diferença no padrão de exposição; o mesmo se aplica à classificação GRAS da FDA.

Apesar disto, é de salientar, que ainda assim, existem muitas substâncias que foram avaliadas como polímeros ou componentes de NP que ainda não foram identificadas como componentes inativos em medicamentos aprovados, como por exemplo o quitosano, ácido polilácteo, PGLA, e os polialquilcianoacrilatos, contudo isto não implica que não sejam seguros para administração oral.

Portanto, como para qualquer outro medicamento a ser desenvolvido, a inclusão de um dado componente como excipiente (componente inativo) numa formulação de insulina oral para uso humano, necessita de ser justificada técnica e cientificamente, demonstrando a sua segurança através de uma série de ensaios que avaliem a sua toxicidade. (CARD AND MAGNUSON, 2011)

15. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi explicada toda a complexidade que está á volta das nanopartículas, desde os tipos, aos métodos de preparação, que podem partir da polimerização de monómeros ou de polímeros pré-formados; a sua purificação e estabilidade é muito importante, na primeira porque muitas das vezes os métodos de preparação requerem solventes, que se não removidos, são tóxicos para o homem, e a segunda porque pode haver perda de atividade biológica do fármaco dentro da nanopartícula, e degradação prematura.

Para aplicar fármacos proteicos, como é o caso da insulina, por via oral em nanopartículas é necessário um bom conhecimento de todo o trajeto desde o momento da sua administração, até à sua eliminação; no epitélio intestinal, a absorção pode ocorrer por via transcelular ou paracelular, sendo esta regulada pelas *tight junctions*.

Várias estratégias têm sido usadas para melhorar a biodisponibilidade das proteínas; os métodos mais usados incluem potenciadores de absorção, inibidores enzimáticos, entre outros, de forma a proteger o fármaco do ambiente agressivo do trato gastrointestinal. Atualmente, no mercado já existem algumas formulações para administração oral de proteínas, contudo apenas uma assenta num sistema de nanopartículas e com possibilidade de incorporar insulina, o *Oradel™*, desenvolvido pela *Apollo Life Sciences*.

Foram analisados vários artigos científicos de nanopartículas naturais e sintéticas. Quanto ao quitosano, o polímero mais estudado, podemos concluir que nos ensaios *in vitro*, as NP de quitosano parecem estar longe de ser utilizadas para fins terapêuticos com uso crónico, contudo, segundo os ensaios *in vivo*, não existe toxicidade evidente, pelo menos aguda, e o polímero é aparentemente seguro para ser usado na forma de NP. O dextrano possui a particularidade de consoante a conformação dos polímeros à superfície da nanopartícula, ser mais ou menos capturado por macrófagos. Um estudo com nanopartículas com alginato - dextrano no centro, revestido por quitosano - PEG, que por sua vez também estava revestido por albumina, também revelou ausência de toxicidade.

Quanto aos polímeros sintéticos, os polialquilocianoacrilatos (de cadeia longa) revelaram ser relativamente seguros, não mostrando indícios de toxicidade significativa, mesmo *in vitro* onde a proporção quantidade de polímero - células em estudo, é muito maior do que na realidade acontece *in vivo*. A poliácridamida também não revelou toxicidade, contudo, o seu monómero, a acrilamida, sendo considerado uma neurotoxina, não é possível garantir total segurança.

Foram apresentados dois solventes para preparação de nanopartículas não-tóxicos, o PEG e o GLY, como alternativa a outros solventes que possam deixar resíduos que prejudiquem a saúde humana.

O facto de uma substância estar incluída em listas como a *Physician's Desk Reference*, ou na base de dados de produtos inativos da FDA não determina a sua segurança para via oral em geral, isto porque a quantidade da substância dita inativa em diferentes formulações (neste caso, nanopartículas, o que altera totalmente as suas características físico-químicas), varia consoante o efeito pretendido e a posologia.

A nanotecnologia tem demonstrado ser excepcionalmente útil para o futuro da saúde.

Contudo, a nanotoxicologia não se encontra ainda muito desenvolvida. Prova disso, são os poucos estudos toxicológicos que se encontram descritos na literatura e que se referem, na sua maioria, a formulações que são normalmente administradas por outras vias de administração que não a oral.

Um passo crítico na nanotoxicologia é caracterizar todo o sistema nanoparticulado, e isto é muito mais difícil de fazer do que na toxicologia “clássica”, devido às muitas variáveis e parâmetros que se têm que avaliar, como o tamanho da partícula, a forma, rugosidade, carga, composição e revestimento de superfície. Logo, estimar a dose, torna-se ainda mais complexo, porque é necessário perceber em que quantidade é que as nanopartículas estão chegar ao alvo certo.

É por isso necessário desenvolver, num âmbito regulatório, uma pesquisa objetiva e científica, que classifique os polímeros como nanopartículas, e não só na forma de molécula livre.

Contudo, como em tudo que se faz em saúde, o uso terapêutico dos nanomateriais comporta sempre uma avaliação benefício – risco.

BIBLIOGRAFIA

CARD, J., W., MAGNUSON, A., - **A review of the efficacy and safety of nanoparticle-based oral insulin delivery systems.** J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 301, (2011), G956–G967.

Chaturvedi, k., Ganguly, k., Nadagouda, M., Aminabhavi, T., - **Polymeric hydrogels for oral insulin delivery.** Journal of controlled release. 165:2 (2013), 129–38.

CHAUDHURY, A., DAS, S., - **Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents.** AAPS PharmSciTech. 12, (2011), 10–20.

CHENA, M., SONAJE, K., CHEN, K., SUNG, H., - **A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery.** Biomaterials. 32, (2011) 9826–38.

COUVREUR, P., DUBERNET, C., E PUISIEUX, F. - **Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends.** Eur. J. Pharm. Biopharm. 41, (1995), 2-13.

DING, J., TAO, K., LI, J., SONG, S., SUN, K., - **Cell-specific cytotoxicity of dextran-stabilized magnetite nanoparticles.** Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 79 (2010), 184–90.

DJ, KING, RR, NOSS - **Toxicity of polyacrylamide and acrylamide monomer.** Reviews on Environmental Health. 8 (1989), 3–16.

ELSAESSER, A., HOWARD, C., - **Toxicology of nanoparticles.** Advanced drug delivery reviews. 64 (2012), 129–37.

FERNANDO, R., FERNANDO, G., - **International Programme on Chemical Safety** [Em linha], atual. 1991. [Acedido a 2 junho de 2014]. Disponível na internet: <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/insulin.htm#PartTitle:3>.

IYER, H., KHEDKAR, A., VERMA, M., - **Oral insulin - a review of current status.** Diabetes, obesity & metabolism. 12 (2010). 179–85.

WENGER Y., SCHNEIDER R., REDDY G., KOPELMAN R., JOLLIET, O., PHILBERT, M., - **Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Stable Polyacrylamide Nanoparticles Following Intravenous Injection in the Rat.** Toxicol Appl Pharmacol. 251 (2011), 181–190.

KHAFAGY, E., MORISHITA, E., ONUKI, Y., TAKAYAMA. K., - **Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review.** Advanced drug delivery reviews. 59 (2007) 1521–46.

LOH, J., YEOH, G., SAUNDERS, M., LIM, M., - **Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells.** *Toxicology and applied pharmacology.* 249 (2010), 148–57.

LOH, J., SAUNDERS, M., LIM, L., - **Cytotoxicity of monodispersed chitosan nanoparticles against the Caco-2 cells.** *Toxicology and applied pharmacology.* 262 (2012), 273–282.

MUKHOPADHYAYA, P., MISHRAB, R., RANAC, D., KUNDU, P., - **Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review.** *Progress in Polymer Science.* 37 (2012), 1457–1475.

PARK, K., KWON, I., PARK, K. - **Oral protein delivery: Current status and future prospect.** *Reactive and Functional Polymers.* 71 (2011), 280–287.

REIS, C., FIGUEIREDO, I., CARVALHO, R., JONES, J., NUNES, PATRÍCIA, SOARES, ANA F., SILVA, CRISTINA F., RIBEIRO, A., VEIGA, F., DAMGÉ, C., CABRITA, A., AND NEUFELD, R. - **Toxicological assessment of orally delivered nanoparticulate insulin.** *Nanotoxicology.* 2 (2008), 205–217.

REKHA, M., SHARMA, C. - **Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes--future perspectives.** *International journal of pharmaceutics.* 440 (2013), 48–62.

SEELEY, R. STEPHENS, T. TATE, P. - **Anatomia e Fisiologia.** 6ª edição. ed. 633–635 p. ISBN 972-8930-07-0.

SONAJE K., LIN, Y., JUANG, J., WEY S., CHENE, C., SUNG, H. - **In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery.** *Biomaterials.* 30 (2009), 2329–39.

SONIA, A., SHARMA, P. - **An overview of natural polymers for oral insulin delivery.** *Drug discovery today.* 17 (2012), 784–92.

SUKHOTNIK, I., SHAMIR, R., BASHENKO, Y., MOGILNER, J., CHEMODANOV, E., SHAOUL, R., CORAN, A., SHEHADEH, N. - **Effect of oral insulin on diabetes-induced intestinal mucosal growth in rats.** *Digestive diseases and sciences.* 56 (2011), 2566–74.

VAUTHIER, C., DUBERNET, C., FATTAL, E., ALPHANDARY, H., COUVREUR, P. - **Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications.** *Advanced drug delivery reviews.* 55 (2003), 519–48.

VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. - **Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles.** *Pharmaceutical research.* 26 (2009), 1025–58.

VIEHOF, A., JAVOT, A., BÉDUNEAU, A., PELLEQUER, Y., LAMPRECHT, A. - **Oral insulin delivery in rats by nanoparticles prepared with non-toxic solvents.** *International journal of pharmaceutics.* 443 (2013), 169–74.

WON, Y., KIM, Y. - **Preparation and cytotoxicity comparison of type a gelatin nanoparticles with recombinant human gelatin nanoparticles.** Macromolecular Research. 17 (2009), 464–468.

YEH, T., HSU, L., TSENG, M., LEE, P., SONJAE, K., HO, Y., SUNG, H.. - **Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening.** Biomaterials. 32 (2011), 6164–73.

YIN, L., DING, J., HE, C., CUI, L., TANG, C., YIN, C. - **Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery.** Biomaterials. 30 (2009), 5691–700.

YUN, Y., CHO, Y., PARK, K., - **Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery.** Advanced drug delivery reviews. 65 (2013), 822–32.

ZHANGA X., SUNB, M., ZHENG, A., CAOC, D., BI, Y., SUN, J. - **Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration.** European journal of pharmaceutical sciences. 45 (2012), 632–8.