

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS
DESTINADOS À LIBERAÇÃO MODIFICADA DE ATIVOS
FARMACOTERAPÊUTICOS**

DÉBORA SGORLA

**CASCAVEL
2017**

DÉBORA SGORLA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS
DESTINADOS À LIBERAÇÃO MODIFICADA DE ATIVOS
FARMACOTERAPÊUTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas (área de concentração – Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa – Fármacos e Medicamentos), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti

Co-orientadores: Prof. Dr. Bruno Sarmiento e Prof. Dr. Élcio Jose Bunhak

CASCVEL

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S535d	<p>Sgorla, Débora</p> <p>Desenvolvimento e caracterização de novos materiais destinados à liberação modificada de ativos farmacoterapêuticos./ Débora Sgorla. — Cascavel, 2017.</p> <p>150 f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti Coorientador: Prof. Dr. Bruno Sarmento Coorientador: Prof. Dr. Élcio Jose Bunhak</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017 Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas</p> <p>1. Ácido hialurônico. 2. Etilcelulose. 3. HPMC-AS. 4. Insulina. 5. Nanopartículas lipídico-polimérica. 6. Revestimento polimérico. I. Cavalcanti, Osvaldo Albuquerque. II. Sarmento, Bruno. III. Bunhak, Élcio Jose. IV. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. V. Título.</p> <p>CDD 20.ed. 615 CIP – NBR 12899</p>
-------	---

DÉBORA SGORLA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS
DESTINADOS À LIBERAÇÃO MODIFICADA DE ATIVOS
FARMACOTERAPÊUTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Farmacêuticas (área de concentração – Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa – Fármacos e Medicamentos), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti

Co-orientadores: Prof. Dr. Bruno Sarmiento e Prof. Dr. Élcio Jose Bunhak

Aprovado em 03 / 02 / 2017, Cascavel – PR.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil
Universidade Estadual do Centro Oeste

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti (Orientador)
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Débora Sgorla, nascida em 30 de outubro de 1991. Natural de Medianeira, Paraná – BR. Formada em Farmácia pela Universidade Estadual do Paraná – UNIOESTE, no ano de 2014. Aprovada para o programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE no mesmo ano, ingressou na turma 2015-2017, como bolsista CAPES-FA.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

Gostaria de dedicar este trabalho a vocês, pai mãe e irmão. Foi o cuidado e a dedicação de vocês que deu, em alguns momentos, a esperança para seguir. Assim como a presença significou segurança e certeza de que não estava sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me proporcionado o dom da vida, permitindo estar aqui neste momento.

Aos primeiros mestres, meus pais Ruth Della Giustina Sgorla e Marildo Sgorla pelo apoio, compreensão e dedicação incondicional disponibilizada durante toda a minha vida. Bem como ao meu irmão, Guilherme Sgorla por estar presente em todos os momentos. Obrigada por acreditarem em mim. Vocês são o meu porto seguro. O bem mais precioso.

Aos familiares e amigos, sem citar nomes pois estou rodeada de pessoas que me querem bem e fazem a vida valer a pena. Muito obrigada pelo carinho, incentivo e apoio nessa jornada.

Ao orientador, Dr. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti e co-orientadores, Dr. Bruno Sarmiento e Dr. Élcio Jose Bunhak pela oportunidade concedida, assim como por todos os ensinamentos proporcionados nesta etapa.

Aos professores Dra. Rubiana Mara Mainardes e Dr. Najeh Maissar Khalil por abrirem as portas dos seus laboratórios na Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), para que eu pudesse desenvolver uma parte desta dissertação. Bem como aos seus orientados por me receberem tão bem e, também, por ajudarem no que foi preciso.

Aos professores Dr. Leandro Freire dos Santos, Dr. Fauze Jacó Anaissi e Me. Filipe Quadros Mariani, que colaboraram para a realização dos ensaios EDS e DRX.

A Andreia Almeida, Anna Lechanteur e Flávia Sousa que colaboraram para a realização dos ensaios de citotoxicidade, permeabilidade em modelo intestinal simulado e doseamento da insulina por CLAE, respectivamente. Também ao Pedro Fonte que auxiliou nas revisões de inglês para publicação do artigo do capítulo 2.

A todos os professores que durante o período do mestrado contribuíram para minha formação. E também a Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF - UNIOESTE).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária do Paraná (FA) pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

Desenvolvimento e caracterização de novos materiais destinados à liberação modificada de ativos farmacoterapêuticos

RESUMO

Introdução: O progresso na liberação de ativos farmacoterapêuticos e uma melhor qualidade de vida aos pacientes depende do desenvolvimento de novos e adequados sistemas carreadores de fármacos, visto que diversas formas farmacêuticas convencionais podem desencadear múltiplos efeitos colaterais bem como administrações inconvenientes, que acabam por conduzir a fracas adesões de tratamento ou tratamentos ineficientes. **Objetivos:** Desenvolver novos materiais candidatos à aplicação em sistemas para liberação modificada de fármacos, cujos empregos potenciais estão voltados ao revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais e encapsulação de insulina para administração oral. **Metodologia:** Filmes de revestimento: Inicialmente o ácido hialurônico foi reticulado com trimetafosfato trissódico em meio aquoso alcalino, posteriormente, os filmes foram produzidos através do método de evaporação, por incorporação do biopolímero reticulado e não modificado à dispersão de etilcelulose, em diferentes proporções. As películas obtidas foram caracterizadas em relação à morfologia por microscopia eletrônica de varredura, robustez à permeabilidade ao vapor d'água e capacidade de hidratação em fluidos de simulação fisiológicos. Além disso, a segurança e biocompatibilidade foram avaliadas contra células intestinais Caco-2 e HT29-MTX. Nanopartículas lipídico-poliméricas: Foram produzidas a partir da associação de etilpalmitato e HPMC-AS, por meio da técnica emulsificação-evaporação do solvente modificado, através de sonicação. Posteriormente, as nanopartículas foram caracterizadas em relação ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação, além de morfologia por microscopia eletrônica de varredura, difratometria de raios-X e análise térmica. Também avaliou-se o perfil de liberação *in vitro*, bem como a captação da insulina em modelo de co-cultura tripla e, segurança e biocompatibilidade contra células intestinais Caco-2 e HT29-MTX. **Resultados:** Filmes de revestimento: A permeabilidade ao vapor d'água foi influenciada pelo aumento do conteúdo de ácido hialurônico na formulação final. Quando imersos em fluido de simulação gástrico, os filmes apresentaram menor intumescimento comparado com uma maior hidratação em fluido de simulação intestinal. Simultaneamente, em fluido de simulação intestinal, apresentaram perda

de massa, revelando a habilidade de prevenir a liberação prematura do fármaco em pH gástrico, todavia vulnerável a liberação em meio intestinal. Aliado a estes resultados, a caracterização físico-química sugeriu estabilidade térmica das películas e interação física entre os constituintes da formulação. Por fim, os testes de citotoxicidade demonstraram que tanto as membranas quanto os componentes individuais das formulações, quando incubadas durante 4 h, foram seguras para as células intestinais. Nanopartículas lipídico-poliméricas: A metodologia sugerida produziu nanopartículas com tamanho médio satisfatório, $297,57\text{nm} \pm 29,99$, PDI de $0,247 \pm 0,03$ e potencial zeta de $-19,13 \pm 5,88$. Além disso, alcançou-se alta eficiência de encapsulação, em torno de $83,92 \pm 4,32\%$ e o DSC mostrou um aumento da estabilidade térmica das formulações em relação aos materiais puros, demonstrado pelos picos endotérmicos de desidratação, que diminuíram de intensidade e deslocaram-se para temperaturas superiores. Os resultados do DRX demonstraram alteração do estado cristalino para amorfo, inferindo a incorporação do fármaco. A liberação cumulativa evidenciou que apenas 9% da insulina encapsulada foi liberada após 2 h, alcançando aproximadamente 14% após 6 h, alterando, desta maneira, os resultados de permeabilidade da insulina através de modelo intestinal *in vitro*. Em relação à biocompatibilidade com células Caco-2 e HT29-MTX, as nanopartículas lipídico-poliméricas demonstraram ausência de citotoxicidade após 4 h. **Conclusões:** Os resultados sugerem que os filmes baseados em ácido hialurônico, quando aplicados como material de revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais, poderão prevenir a liberação prematura de fármacos nas condições hostis do estômago, mas controlar a liberação nas porções mais distais do trato gastrointestinal, garantindo a segurança da mucosa intestinal. Já em relação às nanopartículas lipídico-poliméricas, evidências demonstraram que as mesmas poderão proteger a insulina das condições hostis encontradas no TGI, garantindo ainda a segurança da mucosa intestinal, todavia um melhor perfil de liberação, e conseqüentemente, uma melhor captação da insulina podem ser alcançados por otimização da formulação proposta.

PALAVRAS-CHAVE: ácido hialurônico, etilcelulose, HPMC-AS, insulina, nanopartículas lipídico-polimérica, revestimento polimérico.

Development and characterization of new materials for the modified release of pharmacotherapeutic agents

ABSTRACT

Introduction: Progress in the release of pharmacotherapeutic agents and improved quality of life for patients depends on the development of novel and suitable drug delivery systems because a number of conventional pharmaceutical forms can trigger multiple side effects as well as inconvenient administrations, which ultimately lead to poor treatment adhesions or inefficient treatments. **Objectives:** To develop new materials for application in modified drug release systems, whose potential uses are for coating solid oral dosage forms and insulin encapsulation for oral administration. **Methodology:** Coating films: Initially, hyaluronic acid was crosslinked with trisodium trimetaphosphate in aqueous alkaline media. Afterwards, the films were produced by evaporation method by incorporation of the unmodified and crosslinked biopolymer into the ethylcellulose dispersion in different proportions. The obtained films were characterized by morphology by scanning electron microscopy, robustness to water vapor permeability and hydration capacity in physiological simulation fluids. In addition, safety and biocompatibility were evaluated against Caco-2 and HT29-MTX intestinal cells. Lipid-polymeric nanoparticles: They were produced from the association of ethylpalmitate and HPMC-AS, through the modified solvent emulsification-evaporation technique by sonication. Subsequently, the nanoparticles were characterized by size, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency, besides morphology by scanning electron microscopy, X-ray diffraction and thermal analysis. It was also evaluated the in vitro release profile, as well as insulin uptake in a triple co-culture model, and safety and biocompatibility against Caco-2 and HT29-MTX intestinal cells. **Results:** Coating films: The permeability to water vapor was influenced by the increase of hyaluronic acid content in the final formulation. When immersed in gastric simulation fluid, the films presented lower swelling compared to greater hydration in intestinal simulation fluid. Simultaneously, in intestinal simulation fluid, they presented mass loss, revealing the ability to prevent premature drug release at gastric pH, yet vulnerable to release into the intestinal environment. In addition to these results, the physico-chemical characterization suggested thermal stability of the films and physical interaction between the constituents of the formulation. Finally, cytotoxicity tests demonstrated

that both membranes and individual materials were safe for intestinal cells when incubated for 4 h. Lipid-polymer nanoparticles: The suggested methodology yielded nanoparticles with satisfactory mean size, $297.57\text{nm} \pm 29.99$, PDI of 0.247 ± 0.03 and zeta potential of -19.13 ± 5.88 . In addition, high encapsulation efficiency was achieved, around $83.92 \pm 4.32\%$ and DSC showed an improvement in the thermal stability of the formulation compared to individual materials. This is demonstrated by endothermic peaks of degradation that decreased in intensity and moved to higher temperatures. DRX results showed alteration of the crystalline state to amorphous, inferring the drug incorporation. The cumulative release demonstrated that only 9.0% of the encapsulated insulin was released after 2 h, reaching approximately 14% after 6h. These results altered the permeability of insulin through in vitro intestinal model. Regarding the biocompatibility with Caco-2 and HT29-MTX cells, lipid-polymeric nanoparticles did not show toxicity up to 4 hours. **Conclusions:** The results suggest that hyaluronic acid based films may prevent premature drug release under hostile conditions of the stomach but control the release in the more distal portions of the gastrointestinal tract when applied as coating material in solid oral dosage forms. Furthermore, they were safe to intestinal mucosa. Regarding the lipid-polymeric nanoparticles, evidences show that they can protect insulin from the hostile conditions found in the TGI, also guaranteeing the safety of the intestinal mucosa depending on its concentration. However, a better release profile and consequently better insulin uptake can be achieved by optimizing the proposed formulation.

KEY-WORDS: ethylcellulose, HPMC-AS, hyaluronic acid, insulin, lipid-polymeric nanoparticles, polymeric coating.

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 Diferentes grades de HPMC-AS..... 15

Artigo “Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ácido hialurônico reticulado para utilização em processos de revestimento”

Tabela 1 Avaliação morfológica macroscópica das diferentes formulações..... 27

Tabela 2 Valores das médias das espessuras dos filmes isolados..... 28

Tabela 3 Valores de perda de massa e taxa de TVA das diferentes formulações 28

Artigo “Exploração de matrizes lipídico-poliméricas em escala nanométrica para aplicações na entrega de fármacos”

Tabela 1 Lipídeos e polímeros utilizados para produzir nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas carregadas com fármacos..... 56

Artigo “Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídico-poliméricas para encapsular insulina”

Tabela 1 Caracterização de nanopartículas lipídico-polimérica carregadas com insulina, obtidas por sonicação..... 78

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 Processo de formação dos filmes de revestimento.....	05
Figura 2 Estrutura primária do ácido hialurônico composta por repetições de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetil-glucosamina.....	07
Figura 3 Trimetafosfato trissódico.....	09
Figura 4 Etilpalmitato.....	15

Artigo “Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ácido hialurônico reticulado para utilização em processos de revestimento”

Figura 1 Esquema de reação entre ácido hialurônico e trimetafosfato trissódico.	26
Figura 2 Imagens das diferentes formulações.....	27
Figura 3 Perda de massa de filmes isolados em estudo de TVA.....	29
Figura 4 Índice de intumescimento dos filmes isolados após imersão de 150 minutos em FSG (pH 1,2) e FSI (pH 6,8).....	31
Figura 5 Difratoograma DRX das diferentes formulações.....	32
Figura 6 Termograma de DSC das diferentes formulações.....	33
Figura 7 Termograma de TGA das diferentes formulações.....	35
Figura 8 Micrografias das diferentes formulações.....	37
Figura 9 Espectro de absorção IV-FT das diferentes formulações.....	38
Figura 10 Viabilidade celular dos filmes contra linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX	40

Artigo “Exploração de matrizes lipídico-poliméricas em escala nanométrica para aplicações na entrega de fármacos”

Figura 1 Diferentes tipos de nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas, considerando a localização do polímero.....	50
Figura 2 Perfis de resposta de glicose no sangue em circulação após administração subcutânea ou duodenal em ratos diabéticos.....	53
Figura 3 Perfis de concentração plasmática-tempo dos diferentes nanosistemas após administração intravenosa em ratos.....	60

Artigo “Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídico-poliméricas para encapsular insulina”

Figura 1 Cromatograma de solução padrão de insulina em tampão acetato pH 4,7 (100 µg.mL ⁻¹) em função do tempo.....	76
Figura 2 Curva analítica da insulina em tampão acetato pH 4,7 (n=24) utilizando a metodologia revalidada.....	77
Figura 3 Imagens de MEV das nanopartículas lipídico-polimérica e controle lipídico.....	79
Figura 4 Difratoograma DRX dos materiais puros e formulações de nanopartículas lipídico-polimérica.....	80
Figura 5 Termograma de DSC dos materiais puros e formulações de nanopartículas lipídico-polimérica.....	82
Figura 6 Porcentagem de liberação <i>in vitro</i> de insulina, a partir das nanopartículas lipídico-polimérica em tampões HCl (pH 1,2) e fostato (pH 6,8) à 37°C.....	84
Figura 7 Viabilidade celular das nanopartículas lipídico-polimérica contra linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX	85
Figura 8 Perfil de permeabilidade cumulativa <i>in vitro</i> da insulina livre e encapsulada em nanopartículas lipídico-polimérica, através de modelo triplo (co-cultura de células Caco-2:HT29-TX:Raji B).....	86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Ampère – unidade de intensidade de corrente elétrica
Å	Ångström – unidade de medida de comprimento
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AH	Ácido hialurônico
AHR	Ácido hialurônico reticulado
ANOVA	Análise de variância
A/O	Água/óleo
A/O/A	Água/óleo/água
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm ⁻¹	Centímetro recíproco
cm ²	Centímetros quadrado
COO-	Grupos carboxilatos
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodo
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMT1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DRX	Difratometria de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EC	Etilcelulose
EEC	Eficiência de encapsulação
EDS	Espectrometria de energia dispersiva de raios-X
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSG	Fluido de simulação gástrico
FSI	Fluido de simulação intestinal
g	Força centrífuga
GlcNAc	Ácido N-acetil-glicosamina

GlcUA	Ácido D-glicurônico
h	Horas
HCPT	10-hidroxicamptotecina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPMC-AS	Succinato acetato de hidroxipropilmetilcelulose
IV-FT	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
li%	Índice de intumescimento
IMC	Índice de massa corporal
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilo Dalton
keV	Quilo elétron-volt – unidade de medida de energia
kV	Quilovolt – unidade de medida de tensão elétrica
LDC	Conjugados lipídeo-fármaco
m ²	Metro quadrado
MDa	Megadalton – unidade de medida de massa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligramas
mg.Kg ⁻¹	Miligrama por quilograma
mg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mL.min ⁻¹	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mV	Milivolts
m.v ⁻¹	Massa por volume
NaOH	Hidróxido de sódio
NEAA	Aminoácidos não essenciais
NLC	Carreadores lipídicos nanoestruturados
nm	Nanômetros
OH	Grupos hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

PDI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
PHEMA	Metacrilato de poli-hidroxiéilo
PLGA	Ácido poli (lático-co-glicólico)
p.p ⁻¹	Peso por peso
p.v ⁻¹	Peso por volume
p < 0,05	Nível de significância para testes estatísticos
r	Coeficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
AS-R8	Ácido esteárico-octaarginina
SBD	Sociedade Brasileira da Diabetes
SD	Desvio padrão
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
TDF	Fumarato de disoproxil tenofovir
TEER	Resistência elétrica transepitelial
T _g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
TGI	Trato gastrintestinal
TMTF	Trimetafostato trissódico
TVA	Transmissão de vapor d'água
U	Unidade internacional
UI.Kg ⁻¹	Unidades internacionais por quilograma
UR	Umidade relativa
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultra-violeta
v.v ⁻¹	Volume por volume
WGA	Conjugado de gérmen de trigo aglutinina-N-glutaril-fosfatidiletanolamina
Z-average	Tamanho de partícula
°C	Graus Celsius
° s ⁻¹	Graus por segundo
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Revestimento pelicular	4
3.1.1 Etilcelulose.....	6
3.1.2 Ácido Hialurônico	6
3.1.3 Trimetafosfato Trissódico.....	9
3.2 Diabetes <i>mellitus</i>	9
3.2.1 Definição e prevalência do diabetes <i>mellitus</i>	9
3.2.2 Classificação do diabetes <i>mellitus</i>	10
3.2.3 Tratamento do diabetes <i>mellitus</i>	12
3.2.4 Insulina	13
3.2.5 Nanopartículas lipídico-poliméricas	14
4. CAPÍTULO 1	17
Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ácido hialurônico reticulado para utilização em processos de revestimento	17
RESUMO	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 Materiais	20
2.2 Reticulação do ácido hialurônico	21
2.3 Obtenção dos filmes	21
2.4 Avaliação macroscópica e determinação da espessura dos filmes	21
2.5 Estudo da transmissão de vapor d'água.....	22
2.6 Determinação do índice de intumescimento	22
2.7 Análises de difração de Raios-X.....	23
2.8 Análises térmicas.....	23
2.9 Microscopia eletrônica de varredura	23
2.10 Espectroscopia no infravermelho.....	24
2.11 Cultura de células	24
2.12 Estudos de Citotoxicidade	24

2.13 Análise estatística	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 Reticulação do ácido hialurônico	25
3.2 Características macroscópicas e espessura dos filmes.....	26
3.3 Estudo de transmissão de vapor d'água.....	28
3.4 Determinação do índice de intumescimento	30
3.5 Espectrometria de energia dispersiva de raios-X	31
3.6 Difração de raios-X	32
3.7 Análises térmicas.....	33
3.8 Microscopia eletrônica de varredura	36
3.9 Espectroscopia no infravermelho.....	38
3.10 Estudos de citotoxicidade	39
4. CONCLUSÃO	40
AGRADECIMENTOS	41
MATERIAL SUPLEMENTAR	42
5. CAPÍTULO 2	44
Exploração de matrizes lipídico-poliméricas em escala nanométrica para aplicações na liberação de fármacos	44
Resumo.....	45
1. Introdução	47
2. Nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas.....	49
2.1 Tipos de nanopartículas lipídico-poliméricas	49
2.2 Efeitos das interações polímero-lipídeo-fármaco.....	54
3. Aplicação das nanopartículas lipídico-poliméricas na liberação de fármacos....	55
4. Conclusão	64
5. <i>Expert opinion</i>	64
AGRADECIMENTOS	66
6. CAPÍTULO 3	67
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídico-poliméricas contendo insulina	67
RESUMO	68
1. INTRODUÇÃO	69
2. MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.1 Materiais	70
2.2 Produção das nanopartículas lipídico-poliméricas.....	70

2.3 Determinação do tamanho de partícula e do potencial zeta	71
2.3 Análise microscópica	71
2.4 Difração de Raios-X.....	71
2.5 Análise térmica	72
2.6 Determinação de insulina por CLAE-DAD	72
2.7 Eficiência de encapsulação	72
2.8 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	73
2.9 Cultura de células	73
2.10 Análise de citotoxicidade	74
2.11 Avaliação da permeabilidade da insulina.....	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1 Revalidação do método CLAE-DAD para determinação de insulina	75
3.2 Caracterização das nanopartículas lipídico-poliméricas	77
3.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	83
3.4 Análise de citotoxicidade	85
3.5 Permeabilidade da insulina.....	86
4. CONCLUSÃO	87
AGRADECIMENTOS	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
7.1 Revisão Bibliográfica.....	88
7.2 Capítulo 1.....	93
7.3 Capítulo 2.....	98
7.4 Capítulo 3.....	103
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	107
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
ANEXO A – Artigo publicado “Development and characterization of crosslinked hyaluronic acid polymeric films for use in coating processes”	109
ANEXO B – Artigo publicado “Exploitation of lipid-polymeric matrices at nanoscale for drug delivery applications”	120

1. INTRODUÇÃO

Formas farmacêuticas convencionais rotineiramente aplicadas na terapêutica podem desencadear diversos efeitos colaterais advindos, prioritariamente, da distribuição aleatória dos fármacos em diversas regiões do organismo, além das necessárias doses elevadas e/ou frequentes administrações, as quais buscam manter concentrações dos ativos em patamares capazes de produzir o efeito terapêutico esperado. Além disso, alguns fármacos são administrados por vias que não a oral, tornando o tratamento mais difícil para o paciente. Isto, em geral, pode conduzir a diminuição da adesão destes aos tratamentos e conseqüentemente à redução da eficácia medicamentosa. Além deste contexto conduzir, naturalmente, ao comprometimento da qualidade de vida dos pacientes que já se encontram debilitados diante da patologia. Desta forma, o progresso na liberação de ativos farmacoterapêuticos e uma melhor qualidade de vida a estas pessoas depende do desenvolvimento de novos e adequados sistemas carreadores de fármacos.

Aliado a isto se encontra o alto custo e a necessidade de muitos anos de pesquisa, sem efetiva garantia de retorno dos investimentos, quando se pondera a respeito do desenvolvimento de formulações inteiramente novas. Portanto desenvolver sistemas alternativos para liberação modificada de fármacos torna-se um incessante desafio tanto ao meio acadêmico-científico quanto industrial.

Ademais, para proporcionar melhores condições aos pacientes que necessitam fazer uso de vários medicamentos ao longo da vida também é imprescindível avaliar a via de administração desses sistemas alternativos. Assim, é crucial o estabelecimento de estratégias que visem à administração de formas farmacêuticas especialmente destinadas à via oral, uma vez que esta apresenta diversas vantagens, sendo a principal a grande aceitabilidade, sobretudo devido à sua comodidade; é uma via de fácil acesso e não invasiva, que não requer qualquer equipamento ou assistência especial para administração e os medicamentos administrados oralmente são deglutidos da mesma forma que os alimentos.

Uma estratégia que conseguiria cumprir os requisitos acima mencionados é a aplicação de tecnologias diferenciadas para desfrutar dos fármacos já consagrados na terapêutica. Neste sentido, dois bons exemplos são: (1) a aplicação de revestimentos às formas farmacêuticas sólidas orais com o intuito de promover a entrega de substâncias farmacologicamente ativas diretamente no seu alvo de ação, melhorando, desse modo, a eficiência dos tratamentos medicamentosos, aliado à

redução na dose e, conseqüentemente mitigando efeitos colaterais e, (2) a formulação de sistemas capazes de encapsular fármacos como a insulina, cujo tratamento tradicional necessita de múltiplas injeções no decorrer da vida, para também administra-la oralmente, melhorando, desta maneira, a aceitabilidade do paciente ao proporcionar uma administração mais conveniente associada à qualidade de vida dessas pessoas.

Diante do exposto, esta pesquisa foi dividida em duas partes. Na primeira parte propôs-se a reticulação do AH e subsequente formação de material polimérico na forma de películas, candidatas ao processo de revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais destinadas à liberação modificada de fármacos. Esta alternativa parece ser extremamente atraente, uma vez que existe a possibilidade de diminuir a hidrofilia do sistema graças à reticulação com TMFT e/ou combinação com o polímero insolúvel, a EC e aumentar a especificidade à entrega do fármaco devido à presença do AH (reticulado ou não) e sua potencial habilidade de ligar a receptores CD44 presentes em várias células.

Na segunda etapa sugeriu-se o desenvolvimento de nanopartículas lipídico-poliméricas a partir da associação do lipídeo sólido etilpalmitato e do polímero HPMC-AS para encapsulação de insulina, visando à administração oral. Esta escolha chama a atenção diante do potencial de aliviar a dor causada pelas constantes injeções dos tratamentos convencionais, além disso, mimetizaria uma rota mais fisiológica da insulina. Ademais, este sistema carreador poderia superar a degradação enzimática do ativo no trato gastrointestinal e a baixa permeabilidade através das células epiteliais das membranas intestinais, a qual resulta em diminuída biodisponibilidade, obstáculos estes que impedem, ainda hoje, a entrega oral de insulina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho visa promover a pesquisa de materiais candidatos à aplicação em sistemas para liberação modificada de fármacos, cujos empregos potenciais estão voltados ao revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais e encapsulação de insulina para administração oral.

2.2. Objetivos Específicos

Visando cumprir o objetivo geral da pesquisa, os objetivos específicos foram:

- Promover a reticulação do ácido hialurônico na expectativa de modificar sua característica de elevada hidrofiliabilidade;
- Propor a produção de películas a partir de polímero celulósico – EC - Surelease[®] – associado ao ácido hialurônico reticulado e não modificado e, analisar possíveis alterações oriundas da reticulação e associação com EC em ambos os sistemas;
- Avaliar as características macroscópicas e espessura dos filmes;
- Realizar testes de índice de intumescimento e transmissão de vapor d'água, bem como determinar as propriedades do material polimérico obtido a partir de ensaios físico-químicos, usando amostras de filmes isolados oriundos das diferentes associações desenvolvidas.
- Propor a produção de nanopartículas lipídico-poliméricas a partir do lipídeo sólido etilpalmitado associado polímero succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulose para encapsulação de insulina;
- Caracterizar as nanopartículas lipídico-poliméricas;
- Avaliar a eficiência de encapsulação e promover testes de liberação do ativo;
- Determinar a citotoxicidade frente às células Caco-2 e HT29-MTX e testar a permeabilidade da insulina através de modelo intestinal *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Revestimento pelicular

Dentre as vias disponíveis para administração de fármacos, a via oral é considerada a de maior utilização, tanto por ser conveniente quanto pela segurança para administração de medicamentos. Dado a escolha dessa via, a forma farmacêutica habitualmente empregada por ela e amplamente aceita pela população, são os comprimidos, devido às vantagens que apresentam, tais como: maior precisão de dose, produção em grande escala a custo reduzido, melhor estabilidade química e física comparativamente a qualquer outra forma farmacêutica administrada oralmente, são de fácil manuseio e permitem a obtenção de perfis de dissolução especiais (Aulton, 2008; Lachman, Lieberman e Kaning, 2001).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (5ª ed.) a definição de comprimido é dada como “forma farmacêutica sólida contendo uma dose única de um ou mais princípios ativos, com ou sem excipientes, obtida pela compressão de volumes uniformes de partículas”, podendo, ainda, apresentar diferentes formas, tamanhos, marcações na superfície e ser revestido ou não (Brasil, 2010).

Simplificadamente, o revestimento desta forma farmacêutica consiste na deposição de um material sobre a superfície externa dos mesmos, sendo que o revestimento pelicular, especificamente, abrange a aplicação de uma fina membrana de polímero(s) ao redor do comprimido, sendo, portanto, responsável por uma ou mais das seguintes propriedades: mascarar sabores e/ou odores desagradáveis, melhorar a aparência final do produto, prevenir interações entre os constituintes da formulação ou destes com o TGI, aumentar a estabilidade física ou química do fármaco e controlar a libertação do fármaco no comprimido (Aulton, 2008; Lachman, Lieberman e Kaning, 2001).

O processo de formação dos filmes de revestimento ocorre de maneiras ligeiramente diferentes dependendo se o polímero está em solução ou em dispersão polimérica de base aquosa. A formação de película a partir de soluções é um processo relativamente simples uma vez que o polímero se encontra no estado dissolvido. As gotículas aspergidas se espalham sobre a superfície do substrato (comprimido) e, com a evaporação do solvente as cadeias do polímero se interpenetram, passando por um estado de gel e, em seguida, com a secagem formam a membrana, conforme demonstrado na Figura 1(a). Por outro lado, quando

se utiliza uma dispersão polimérica de base aquosa é necessário que as partículas coalesçam a fim de formar um filme contínuo (Figura 1(b)). Inicialmente, as esferas de polímero se encaixam umas as outras após aplicação no substrato, devido à evaporação da água, sendo esta constante durante esta fase inicial do processo. Posteriormente, estas partículas deformam-se para preencher os espaços vazios deixados pela água evaporada e, em seguida, com a secagem continuada, as cadeias de polímeros se unem, formando o filme, processo referido como coalescência (Felton, 2013).

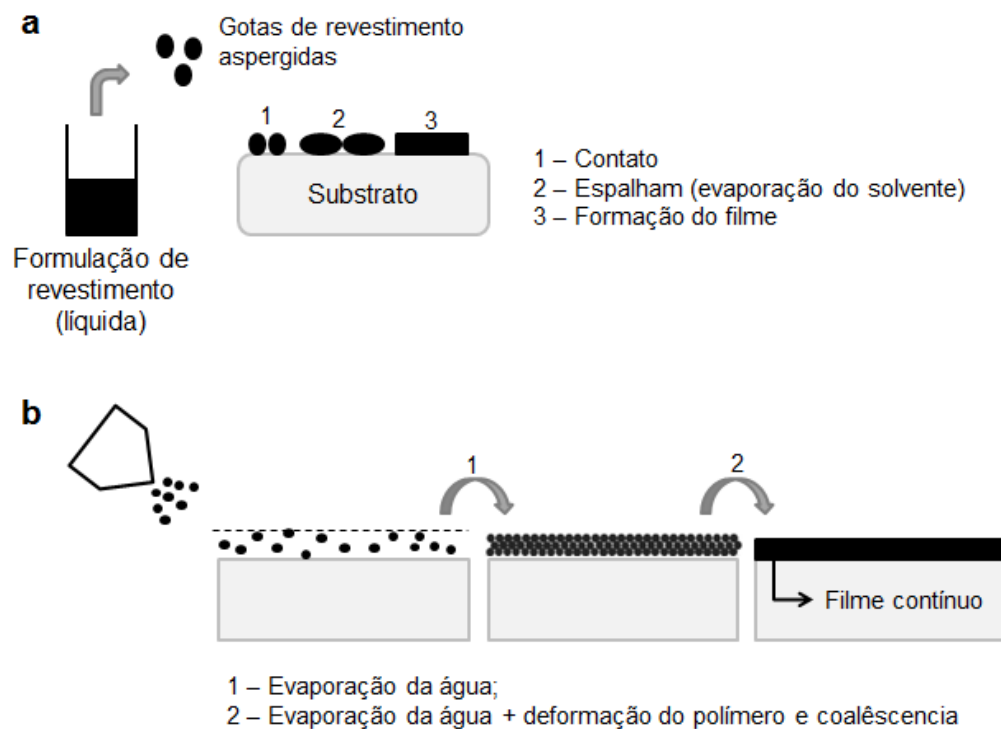


Figura 1 Processo de formação dos filmes de revestimento. **a)** A partir de soluções; **b)** A partir de uma dispersão polimérica de base aquosa.

É importante ressaltar que comprimidos destinados ao revestimento precisam exibir algumas características físicas adequadas, nomeadamente, devem apresentar superfície lisa e ser resistente a abrasão, não podem lascas e, quanto ao formato, o ideal é que sejam esféricos, para permitir sua movimentação no recipiente de revestimento com o mínimo de contato entre os vários comprimidos (Lachman, Lieberman e Kaning, 2001).

3.1.1 Etilcelulose

Quanto ao material de revestimento, diversos polímeros têm sido avaliados e utilizados pela indústria farmacêutica ao longo das últimas décadas. Dentre os polímeros sintéticos de aplicação já consagrada neste setor, merece destaque a EC, material incolor, sem cheiro ou sabor. É completamente insolúvel em água e, por este motivo, é normalmente combinado com substâncias hidrossolúveis, como a hidroxipropilmetilcelulose. Entretanto, sua aplicação baseada em solventes orgânicos apresenta inúmeras desvantagens, desde custos elevados com instalações e do processo até riscos à saúde dos operadores e contaminação ambiental (Bunhak *et al.*, 2007a; Pandit e Shinde, 2010). Sendo assim, tem-se optado pela utilização de pseudolátex de EC, dispersão aquosa a partir do polímero insolúvel, completa e plastificada, empregada em revestimentos para liberação modificada de fármacos, disponível com um conteúdo de sólidos de 25% p.p⁻¹ e encontrada no mercado nos produtos Surelease[®] e Aquacoat[®]. Estas formulações possuem capacidade de formar filmes resistentes e flexíveis, apresentam boas propriedades físico-químicas e toxicidade mínima.

3.1.2 Ácido Hialurônico

Visando o direcionamento do ativo aprisionado no comprimido revestido tem-se pesquisado diversas estratégias, dentre as quais, a utilização de polissacarídeos, polímeros naturais formados pela condensação de várias moléculas monossacarídicas (açúcares) idênticas ou de diferentes tipos (Serverino *et al.*, 2011). Estas substâncias podem ser encontradas em abundância, com elevada disponibilidade, baixo custo e dentro de uma larga diversidade de estruturas.

O AH é um polissacarídeo linear, que apresenta excelentes características como biocompatibilidade, é atóxico, não imunogênico, anti-inflamatório e totalmente biodegradável, despertando, portanto, a atenção de pesquisadores das mais diversas áreas biomédicas e farmacêuticas (El-Aassar *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016). Além disso, a facilidade de modificação estrutural e afinidade por receptores CD44 também gera um interesse extra por esta molécula (Han *et al.*, 2012; Mero e Campesi, 2014).

Pertencente à família dos glicosaminoglicanos, o AH é constituído por unidades dissarídicas repetidas de GlcUA e GlcNAc, conforme apresentado na

Figura 2, unidos alternadamente por ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4). Difere, entretanto, dos demais polissacarídeos desta família por ser o único componente não sulfatado. Apresenta alta hidrofiliicidade e cargas negativas – polímero aniônico –, podendo apresentar-se também na forma de sal sódico – hialuronato de sódio (El-Aassar *et al.*, 2015; Schiraldi, La Gatta e Rosa, 2010).

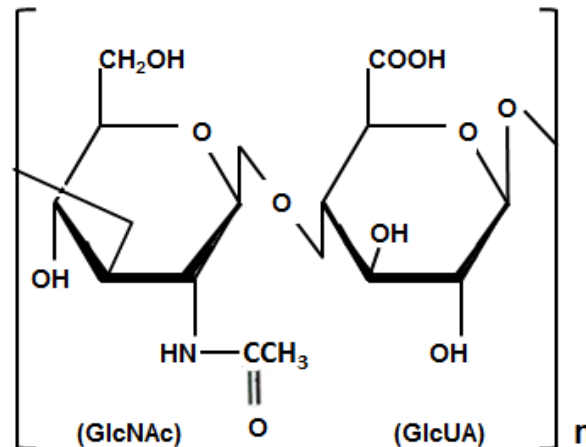


Figura 2 Estrutura primária do ácido hialurônico composta por repetições de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetil-glucosamina.

Nos vertebrados está presente como componente da matriz extracelular (Palumbo *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016), no líquido sinovial das articulações (Pereira Junior *et al.*, 2014), no humor vítreo e cordão umbilical (Han *et al.*, 2012; Schiraldi, La Gatta e Rosa, 2010). Pode também estar envolvido em diversos processos biológicos tais como, adesão, migração e proliferação celular, restauração de feridas e imunidade inata (Kamat *et al.*, 2010).

Diante do potencial e versatilidade deste componente, muitos estudos têm sido conduzidos em diversas áreas de aplicações, existem relatos da utilização do AH em áreas médicas, farmacêuticas e cosméticas. Este polímero tem sido extensivamente empregado na viscosuplementação do fluido sinovial de pacientes com artrite (Ammar *et al.*, 2015; Pereira Junior *et al.*, 2014), como meio hidratante (Mero e Campesi, 2014), no tratamento e diagnóstico de doenças (Lee *et al.*, 2015), em cirurgias oftalmológicas (Shen *et al.*, 2010), preparações para liberação controlada de fármacos (Kumar *et al.*, 2015; Kwon, Kong e Park, 2015; Zhong *et al.*, 2015) e também como componente de uma grande variedade de cosméticos (Pan, *et al.*, 2013).

Destacando sua utilização em sistemas para liberação modificada de fármacos, diversas investigações têm apontado à utilização do AH em carreadores

de ativos antitumorais, devido, sobretudo, a sua afinidade por receptores CD44, que em geral encontram-se superexpressos em diversos tipos de câncer (Jin; Ubonvan e Kim, 2010; Mero e Campesi, 2014; Misra *et al.*, 2011). Portanto, há expectativa de emprego do AH na entrega intracelular específica de fármacos anticancerígenos.

Este biopolímero tem sido aplicado, inclusive, em sistemas de escala nanoparticulada. Oyarzun-Ampuero *et al.*, (2013) propuseram em seu trabalho a produção de nanocápsulas de AH as quais foram capazes de encapsular com sucesso o ativo docetaxel e melhorar seu efeito farmacológico, uma vez que o revestimento hidrofílico proporcionado pela presença do polímero facilitou a interação com células cancerosas. Em outra pesquisa, nanopartículas de AH conjugadas a quitosana foram testadas para liberação de oxaliplatina em câncer colorretal de ratos e, após administração oral observou-se uma melhora significativa na eficácia terapêutica, com um importante efeito inibidor sobre crescimento do tumor, provavelmente devido a maior concentração das nanopartículas no sítio tumoral, com exposição prolongada do fármaco (Jain *et al.*, 2010).

Tran e colaboradores (2014), por sua vez, sugeriram a produção de SLN revestidas com AH para liberação intracelular de vorinostati e, segundo resultados de estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, as SLN funcionalizadas com o polímero exibiram potencial para a quimioterapia, apresentando melhores resultados em linhagens celulares que apresentavam receptores CD44 em maior intensidade.

Apesar de todas as excelentes características é necessário ressaltar que o AH é um polímero que apresenta elevada hidrofiliabilidade, podendo absorver uma grande quantidade de água e expandir até 1000 vezes o seu volume sólido, formando uma rede solta (Mero e Campesi, 2014).

Diante desta propriedade, é possível que quando utilizado isoladamente para formação de filmes de revestimento, o AH poderia formar membranas frágeis e quebradiças. Em consequência, isso poderia acabar promovendo uma liberação prematura dos ativos aprisionados no comprimido revestido, devido à falta de resistência para superar as condições encontradas no TGI superior.

Desta maneira, além de associá-lo a polímeros sintéticos de reduzida solubilidade em água, como o caso da EC, descrita anteriormente, também é possível melhorar essa propriedade do polímero natural através de modificações químicas de sua estrutura. Estas modificações podem ser realizadas antes de associá-lo ao pseudolatex por meio da utilização de agentes reticulantes, como o TMFT.

3.1.3 Trimetafosfato Trissódico

O TMFT (Figura 2) é um sal de baixa toxicidade que não acarreta efeitos adversos aos seres humanos, que pode ser livremente utilizado nos Estados Unidos para reticulação de amidos de qualidade alimentar (Dulong *et al.*, 2004).

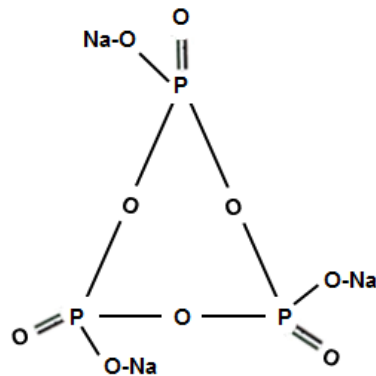


Figura 3 Trimetafosfato trissódico.

Durante a reticulação química das cadeias de biopolímeros com o TMFT ocorre redução da hidrofiliabilidade do sistema uma vez que este sal reage com os grupos hidroxilas presente no polissacarídeo formando ligações éster, estabelecendo expectativa em promover melhor controle na difusão de fluidos e fármacos (Bunhak *et al.*, 2007b; Prezotti, *et al.*, 2012). Autissier *et al.*, (2010) também relatam a reação de reticulação entre polissacarídeo e TMFT, descrevendo que primeiramente os grupos hidroxila do polissacarídeo são transformados em alcoolatos em resposta a presença de NaOH. A etapa seguinte envolve a abertura do anel decorrente do ataque do íon alcoolato no TMFT para formar um intermediário trifosfato. Por último, a adição de outra cadeia de polímero ao produto intermediário leva a formação de um polissacarídeo monofosfato reticulado e pirofosfato inorgânico.

3.2 Diabetes mellitus

3.2.1 Definição e prevalência do diabetes *mellitus*

O DM é uma desordem metabólica de prevalência mundial, que tem aumentado progressivamente, gerando uma grande preocupação nos dias atuais

por ser considerado um importante problema de saúde pública (Ribeiro *et al.*, 2015; Sah *et al.*, 2016). De acordo com a OMS, no senso de 2014 mais de 422 milhões de adultos, ou 8,2% da população mundial, já viviam com DM, principalmente nos países em desenvolvimento. Ainda segundo a OMS, o número de pessoas que apresentam esta desordem quadruplicou desde 1980 (OMS, 2016). Atualmente no Brasil estima-se que mais de 13 milhões de pessoas tenham DM, o que representa 6,9% da população (SBD, 2016a).

Este grande número de diabéticos está relacionado com diversos motivos, dentre os quais pode ser destacado o crescimento e envelhecimento populacional, a maior urbanização, o progressivo aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo, assim como a maior sobrevivência de pacientes que apresentam esta desordem (Chen, Magliano e Zimmet, 2012; SBD, 2016b).

Além de ser considerado um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, o DM é também uma condição crônica. Ocorre devido à falta de ação da insulina, seja esta decorrente da deficiência de produção desse hormônio, incapacidade do organismo em utilizá-la de maneira eficiente, ou seja, resistência a sua ação, ou de ambas. (ADA, 2016a; Bi, Lim e Henry, 2017).

3.2.2 Classificação do diabetes *mellitus*

A classificação do DM é baseada em sua etiologia e apresentação clínica. Sendo assim, existem quatro classes de DM: DMT1, DMT2, DMG e outros tipos específicos (ADA, 2016a; Piero, Nzaro e Njagi, 2014; SBD 2016b). Entretanto os mais pesquisados são o DMT1 e DMT2.

Numericamente o DMT1 representa apenas uma minoria do total de casos de diabetes na população, toda via este é o principal tipo de DM que acomete indivíduos de uma faixa etária mais jovem (ADA, 2016a; Piero, Nzaro e Njagi, 2014). Além disso, o DMT1 está relacionado com um risco substancialmente maior de morte prematura quando comparado com a população geral. Entre os indivíduos diabéticos com idade inferior a 30 anos, essa maior mortalidade pode ser explicada por complicações desta desordem, dentre elas cetoacidose diabética e hipoglicemia. Em contrapartida, doenças cardiovasculares são a principal causa de morte na vida tardia (Lind *et al.*, 2014). A expectativa de vida é reduzida, em média, em mais de 20

anos para pessoas com DMT1 e até 10 anos para indivíduos com DMT2 (Fonte *et al.*, 2015).

O DMT1 caracteriza-se por uma deficiência de insulina motivada por destruição em grau variável das células beta pancreáticas, sendo, geralmente, mais rápida em crianças e adolescentes e mais lenta em indivíduos adultos (ADA, 2016a; Bi, Lim e Henry, 2017; SBD, 2016b).

O DMT2 é a classe mais prevalente, acomete cerca de 90 a 95% dos diabéticos e engloba pacientes que têm resistência à insulina e que normalmente têm deficiência relativa deste hormônio, ao invés de deficiência absoluta (ADA, 2016a; Piero, Nzaro e Njagi, 2014; SBD, 2016b).

A etiologia exata desta classe não é totalmente estabelecida, provavelmente existem diversas causas para esta forma de diabetes, mas acredita-se que ocorra uma interação de fatores genéticos e ambientais. Inicialmente não existe destruição das células beta pancreáticas, entretanto muitos dos indivíduos com DMT2 são obesos, o que pode conduzir a certa resistência à insulina. Já pacientes que não apresentam sobrepeso ou obesidade podem ter um aumento da porcentagem de gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal (ADA, 2016a; SBD, 2016b; Olokoba, Obateru e Olokoba, 2012). Além destes, outros fatores podem estar relacionados com DMT2, dentre os quais inatividade física e sedentarismo, hábitos alimentares inapropriados, identificação anterior de tolerância à glicose, indivíduos fumantes, consumo de álcool, inflamação e hipertensão, bem como fatores não modificáveis, como idade, sexo, predisposição genética e histórico de DMG (Chen, Magliano e Zimmet, 2012; SBD, 2016b; Olokoba, Obateru e Olokoba, 2012).

Entre os problemas associados ao DMT2 está o desenvolvimento de complicações, incluindo risco aumentado para doenças cardiovasculares, nefropatia diabética, retinopatia, neuropatia e amputações de extremidades (Mantovani *et al.*, 2016).

O DMG ocorre quando há qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Esta condição acomete, em média, de 1 a 14% de todas as gestações e pode estar relacionada com aumento dos casos de morbidade e mortalidade perinatais. Já na classe outros tipos específicos de DM enquadram-se formas menos comuns desta desordem, que, entretanto tem como causa defeitos ou processos identificáveis. A apresentação clínica é variável e depende da alteração de base, sendo incluídos nessa categoria

defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, entre outras (ADA, 2016a; SBD, 2016b).

É importante ressaltar que além das categorias descritas acima, ainda existem dois grupos referidos como fatores de risco para o desenvolvimento do DM e doenças cardiovasculares, que, todavia, são apenas consideradas condições de “pré-diabetes”, nomeadamente a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída (SBD, 2016b).

3.2.3 Tratamento do diabetes *mellitus*

O tratamento do DM não inclui apenas o uso de medicamentos (hipoglicemiantes orais e/ou insulina), este deve ser bem mais abrangente. Alcançar aspectos educacionais e relativos aos hábitos de vida do paciente também são prioritários, além disso, o tratamento deve envolver além do paciente propriamente dito, os familiares, uma vez que os diabéticos precisam assumir uma função ativa em seus cuidados. Portanto no plano de tratamento, a educação e o autocuidado devem ser componentes ativos. Ademais, é interessante que a assistência a esses pacientes seja proporcionada, sempre que possível, por uma equipe multidisciplinar, considerando que muitos desses pacientes apresentam diversas comorbidades (ADA, 2016b; ADA, 2016c; SBD, 2016b).

O controle glicêmico é essencial para os pacientes, uma vez que diminui os riscos de desenvolvimento de complicações ou, pelo menos retarda a sua progressão. Desta maneira, a automonitorização da glicemia também deve fazer parte da terapia dos diabéticos (ADA, 2016c; SBD, 2016b).

Em geral o tratamento de DM1 é realizado com administração de insulina e para o DM2 pode ser utilizado apenas hipoglicemiantes orais em terapia única ou combinada e, em alguns casos a administração de insulina também é recomendada (ADA, 2016c; SBD, 2016b). A escolha do medicamento a ser utilizado deve levar em consideração alguns aspectos importantes, dentre os quais: o estado geral do paciente e as comorbidades presentes; os valores das glicemias de jejum e pós-prandial e da hemoglobina glicada; o peso e a idade do paciente, além de possíveis interações com outros medicamentos, reações adversas e contraindicações (SBD, 2016b).

Intervenções relacionadas aos hábitos alimentares e a realização de atividade física regular são fundamentais no tratamento dos diabéticos, tanto para prevenção

quanto para tratamento da obesidade, que juntamente com o envelhecimento são os principais fatores conducentes do DMT2 (ADA, 2016b). A prática de exercícios além de proporcionar um bem-estar físico, melhora do equilíbrio metabólico: ajuda a diminuir os níveis de glicose plasmática, auxilia o organismo a utilizar a glicose de maneira eficiente, ajuda a insulina a trabalhar de forma mais efetiva, além de contribuir para a perda de peso, controle da pressão arterial e dislipidemias (ADA, 2016b; SBD, 2016b).

Já a educação em diabetes é o principal instrumento que garantirá o autocuidado e autocontrole por parte do paciente. Desta maneira, a educação denomina-se como o processo de desenvolvimento dessas habilidades e a incorporação de ferramentas necessárias para atingir as metas estabelecidas em cada etapa do tratamento. Para garantir resultados eficazes é fundamental o trabalho em equipe e que esta, por sua vez, seja qualificada. Além disso, cada diabético deve ser considerado individualmente nas estratégias e etapas do seu tratamento (SBD, 2016b).

3.2.4 Insulina

A insulina é um hormônio peptídeo formado por 51 aminoácidos, que possui a habilidade de controlar os níveis de glicose plasmática, sendo por este motivo o ativo mais usado e eficaz para o tratamento do DM (Fonte *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Shrestha *et. al.*, 2014). Em 1922 esta molécula foi isolada do pâncreas de bovinos na Universidade de Toronto, no Canadá e utilizada no tratamento do primeiro paciente clínico, rendendo aos pesquisadores Banting e Best um Prêmio Nobel, devido a grande importância na pesquisa biomédica (Fonte *et al.*, 2015; Piero, Nzaro e Njagi, 2014).

A insulina é produzida pelas células beta do pâncreas e atua sobre diversos tecidos, como fígado, músculo e tecido adiposo. Sua função fisiológica básica consiste na síntese de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. Seus efeitos sobre o metabolismo de carboidratos incluem a estimulação do transporte de glicose através das membranas musculares e células de adipócitos, a regulação da síntese de glicogénio hepático e a inibição da glicogenólise e gluconeogênese, resultando, ao final, na redução da concentração de glicose plasmática (Piero, Nzaro e Njagi, 2014; Sah *et al.*, 2016).

Apesar da insulina já ser utilizada há mais de 90 anos, foram nas últimas três décadas que ocorreram os maiores avanços na sua produção e forma como ela é utilizada na prática clínica. As diversas apresentações comercializadas diferem entre si com relação a quatro características, nomeadamente: concentração, grau de purificação, origem de espécie e tempo de ação (SBD, 2016b).

Mesmo com seu uso generalizado, as injeções de insulina podem acabar resultando em algum tipo de trauma ou dor dérmica se o paciente não for bem instruído para sua utilização, podendo conduzir a uma fraca adesão ao tratamento por parte do indivíduo diabético (Li *et al.*, 2016).

Desta maneira o desenvolvimento de estratégias para entrega oral de insulina tem despertado muita atenção, pois além de aliviar a dor causada pelas injeções também poderia mimetizar uma rota mais fisiológica da insulina e, portanto, proporcionar uma melhor homeostase da glicose (Fonte *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2014).

Embora haja esforços por parte dos pesquisadores e o desejo dos pacientes, ainda não existe nenhum produto que viabilize a administração oral de insulina, devido à existência de algumas limitações tais como degradação enzimática no TGI e baixa permeabilidade através das células epiteliais das membranas intestinais, resultando em diminuída biodisponibilidade (Lopes *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2014). Entretanto, diversas estratégias têm sido pesquisadas nas últimas décadas: sistemas poliméricos nanoestruturados (Fonte *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2016), sistemas de compósito de hidrogel contendo nanocarreadores glicose-responsivo (Li *et al.*, 2016), SLN (Ansari *et al.*, 2016; Fanguero *et al.*, 2013) e mais recentemente nanopartículas lipídico-poliméricas (Zhang *et al.*, 2012), uma vez que as nanopartículas apresentam um potencial para superar as barreiras para a administração oral de fármacos proteicos, conduzindo ao desenvolvimento de estratégias que possam melhorar a sua biodisponibilidade.

3.2.5 Nanopartículas lipídico-poliméricas

As nanopartículas lipídico-poliméricas têm sido estudadas mais recentemente devido ao seu potencial de encapsular tanto fármacos lipofílicos como também hidrofílicos, sendo estas produzidas com diferentes lipídeos sólidos associados a polímeros sintéticos ou naturais. Além disso, têm demonstrado uma alta eficiência de encapsulação dos ativos avaliados e boa resposta em estudos *in vivo*. Elas têm sido

utilizadas principalmente na terapia contra o câncer devido à habilidade para entrega sitiada do ativo ou também para liberação de proteínas por via oral, como a insulina, uma vez que esses carreadores proporcionam a proteção destas frente à degradação enzimática e melhoram a captação intestinal (Sgorla *et al.*, 2016).

3.2.5.1 Etilpalmitato

O etilpalmitato, representado na figura 4, foi o lipídeo escolhido para o desenvolvimento das nanopartículas lipídico-poliméricas deste estudo. É um produto sintético de grau alimentar, que apresenta-se sólido a temperatura ambiente e também é conhecido como éster etílico de ácido palmítico, sendo uma gordura saturada de 16 carbonos, cuja fórmula molecular é expressa por $C_{18}H_{36}O_2$, com peso molecular de 284.48 g/mol (Sigma-Aldrich).

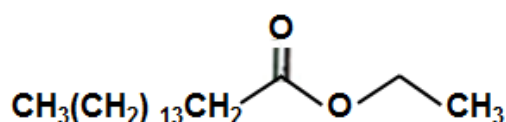


Figura 4 Etilpalmitato.

3.2.5.2 Succinato acetato de hidroxipropilmetilcelulose

O HPMC-AS, também conhecido como succinato acetato de hipromelose, é amplamente utilizado na indústria farmacêutica como excipiente e foi desenvolvido como um material de revestimento entérico aquoso. Este é um derivado da celulose, polímero mais abundante na natureza. É um éster de celulose que apresenta substituição de grupos hidroxipropoxi, metoxi, acetilo e succinilo em três diferentes grades: L, M e H, de acordo com a Tabela 1, sendo que ambas podem apresentar-se em dois tamanhos de partícula: fina (F) ou granular (G) (Dong e Choi, 2008; Friesen *et al.*, 2008; Sarode *et al.*, 2014; Tanno *et al.*, 2004).

Tabela 1 Diferentes grades de HPMC-AS.

Grade	Conteúdo de Acetil (%)	Conteúdo de Succinil (%)	Conteúdo de Metoxil (%)	Conteúdo de Hidroxipropoxi (%)
L	5-9	14-18	20-24	5-9
M	7-11	10-14	21-25	5-9
H	10-14	4-8	22-26	6-10

Esta variação do conteúdo de acetil e succinil é responsável por promover diferentes perfis de solubilidade do HPMC-AS em variadas escalas de pH. O HPMC-AS tipo L representa o polímero com maior relação de substituição de succinil por acetil (razão S/A), enquanto que o tipo H tem uma razão S/A baixa e o tipo M, mediana. Devido a alta relação S/A, o HPMC-AS tipo L dissolve-se em um pH mais baixo, em torno de $\geq 5,5$, comparado com o pH $\geq 6,0$ para o tipo M e o pH $\geq 6,8$ para o tipo H. Desta maneira, a liberação de ativos farmacoterapêutico no TGI pode ser controlada conforme requerido utilizando a adequada grade do polímero. Além disso, pode-se evitar a degradação de certos fármacos ou a irritação do estômago causada por determinados ativos (Dong e Choi, 2008; Sarode *et al.*, 2014; Tanno *et al.*, 2004; Tanno *et al.*, 2008).

4. CAPÍTULO 1

Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ácido hialurônico reticulado para utilização em processos de revestimento

RESUMO: O propósito deste trabalho foi desenvolver e caracterizar um material responsivo baseado em AH para filmes de revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais. A reticulação do AH com TMTS foi realizada em meio aquoso alcalino controlado. Os filmes isolados foram produzidos através do método tradicional de evaporação, por incorporação do biopolímero reticulado e não modificado à dispersão de EC, em diferentes proporções. Posteriormente, as películas foram caracterizadas em relação à morfologia por microscopia eletrônica de varredura, robustez à permeabilidade ao vapor d'água e capacidade de hidratação em fluidos de simulação fisiológicos, gástrico e intestinal. A segurança e biocompatibilidade dos filmes foram avaliadas contra células intestinais Caco-2 e HT29-MTX. A permeabilidade ao vapor d'água foi influenciada pelo aumento do conteúdo de polissacarídeo na formulação final. Quando imersos em FSG, os filmes apresentaram menor habilidade de intumescimento comparado com uma maior hidratação em FSI. Simultaneamente, em FSI os filmes apresentaram perda de massa, revelando a habilidade de prevenir a liberação prematura do fármaco em pH gástrico, todavia vulnerável a liberação em meio intestinal, cujo pH é mais elevado. A caracterização físico-química sugeriu estabilidade térmica das películas e interação física entre os constituintes da formulação. Por fim, os testes de citotoxicidade demonstraram que tanto as membranas quanto os componentes individuais das formulações, quando incubadas durante 4 h, foram seguras para as células intestinais. No geral, estas evidências sugerem que os filmes baseados em AHR, quando aplicados como material de revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais, poderão prevenir a liberação prematura de fármacos nas condições hostis do estômago, mas controlar a liberação nas porções mais distais do TGI, garantindo a segurança da mucosa intestinal.

Palavras-chave: ácido hialurônico, biopolímero, etilcelulose, revestimento polimérico, trimetafosfato trissódico.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sistemas para liberação modificada de fármacos, cuja entrega do ativo farmacoterapêutico seja direcionada a regiões específicas do organismo, exatamente para seu local de ação, evitando a distribuição sistêmica do fármaco ainda é um dos maiores desafios para pesquisadores tanto do meio acadêmico-científico quanto industrial. Neste sentido, a utilização de polissacarídeos, polímeros naturais formados pela condensação de várias moléculas monossacarídicas (açúcares) idênticas ou de diferentes tipos (Serverino *et al.*, 2011), poderá contribuir quando utilizados, em conjunto com polímeros já consagrados pela indústria farmacêutica, como a EC - Surelease[®], no processo de revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais, contribuindo para uma melhor liberação das moléculas ativas para os sítios de absorção intestinal.

O AH é um polissacarídeo linear aniônico, composto por unidades dissacarídicas repetidas de GlcUA e GlcNAc. Ele apresenta excelentes características como biocompatibilidade, atoxicidade e é totalmente biodegradável (El-Aassar *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016). Além disso, o AH apresenta facilidade de modificação estrutural e afinidade por receptores específicos, tais como o CD44 (Han *et al.*, 2012; Mero e Campesi, 2014). Receptores estes que, em geral, encontram-se expressos em maior intensidade em diversos tipos de tumores sólidos (Misra *et al.*, 2011; Saravanakumar *et al.*, 2013). Portanto, há expectativa de emprego do AH na entrega intracelular específica de fármacos anticancerígenos.

Diante do potencial e versatilidade deste biopolímero, um número crescente de aplicações biomédicas tem sido descritas. O AH tem sido extensivamente empregado na viscosuplementação do fluido sinovial de pacientes com artrite (Lùrati *et al.*, 2015), no tratamento e diagnóstico de doenças (Lee *et al.*, 2015), em cirurgias oftalmológicas (Shen *et al.*, 2010), preparações para liberação controlada de fármacos (Kumar *et al.*, 2015; Kwon, Kong e Park, 2015; Zhong *et al.*, 2015) e também como componente de uma grande variedade de cosméticos (Pan, *et al.*, 2013). Além disso, o desenvolvimento de derivados baseados em AH com propriedades melhoradas ou modulados também foi sugerido (Schanté *et al.*, 2011).

No entanto, o AH é um polímero que apresenta elevada hidrofiliabilidade, podendo absorver uma grande quantidade de água e expandir até 1000 vezes o seu volume sólido, formando uma rede frouxa (Mero e Campesi, 2014), provavelmente

incapaz de suportar as condições encontradas no TGI superior quando utilizado isoladamente no processo de formação de filmes de revestimento, podendo promover uma liberação prematura do fármaco aprisionada no comprimido revestido.

Visando vencer esta limitação, o AH pode ter sua estrutura modificada quimicamente, através da utilização de agentes reticulantes, como o TMFT, um sal de baixa toxicidade que não acarreta efeitos adversos aos seres humanos e que reage com grupos hidroxila do polissacarídeo (Dulong *et al.*, 2004; Prezotti, *et al.*, 2012; Souto-Maior *et al.*, 2010).

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi promover a reticulação do AH, com subsequente produção de um material polimérico, na forma de filmes isolados e determinação de suas características para possível emprego como candidato ao processo de revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais destinadas à liberação modificada de fármacos. Esta alternativa possibilitaria a diminuição da hidrofilicidade do sistema graças à reticulação com TMFT aliado a combinação com o polímero insolúvel em meio aquoso, a EC, um componente clássico dos filmes de revestimento. Isto também poderá possivelmente aumentar a especificidade à liberação do fármaco para regiões distais dos TGI devido à presença do AH (reticulado ou não) e sua potencial habilidade de ligar-se a receptores CD44 (Vafaei *et al.*, 2016).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

AH 1,5 MDa, (Sal sódico, fonte biotecnológica: *Streptococcus equi*, *subsp. Zooepidemicus*) fabricado por Contipro (República Tcheca) e adquirido de High Chem comércio e indústria de produtos químicos Ltda. (Brasil). EC - Surelease[®], amostra gentilmente doado pela empresa Colorcon do Brasil e TMTS (Sigma-Aldrich, Brasil). Todos os outros reagentes foram de grade laboratorial. FSG (pH=1,2) e FSI (pH=6,8), sem adição de enzimas, preparados de acordo com USP 35^a ed.

2.2 Reticulação do ácido hialurônico

Inicialmente foi preparada uma solução a 1% de AH em água (pH 12) a qual foi agitada durante 2 h para permitir a completa homogeneização. Em seguida, adicionou-se 20 mL de solução 30% de TMFT em 200 mL da dispersão e agitou-se por mais 2 h, mantendo o pH em 12. Em condições básicas um complexo de éster de fosfato de di-polímero é formado entre o polissacarídeo e o agente reticulante (Gliko-Kabir *et al.*, 2000). Após este processo porções correspondentes às concentrações de 5 e 10% do polissacarídeo modificado foram adicionadas aos meios contendo a dispersão de EC para obtenção dos filmes isolados (Bunhak *et al.*, 2015).

2.3 Obtenção dos filmes

Utilizando-se o método convencional de evaporação do solvente, também denominado *casting process* (Rabito *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013), foram preparadas dispersões poliméricas de base aquosa em sete diferentes proporções, fazendo variar o polímero e/ou o polissacarídeo, mas permanecendo sempre a massa polimérica final de 4% (m.v⁻¹). Todo processo de associação foi realizado através de agitação magnética sob condições de vácuo a fim de evitar a incorporação de ar e possível formação de bolhas nas películas. Posteriormente, as diferentes formulações foram amostradas no volume de 10 mL e vertidas sobre placas de Teflon[®] e mantidas em estufa a 60°C, por 12 h (Rosiaux *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2010) para formação dos filmes contendo EC. Decorrido este tempo as amostras foram removidas das placas a temperatura ambiente.

2.4 Avaliação macroscópica e determinação da espessura dos filmes

Durante a avaliação macroscópica foram analisadas características como homogeneidade e presença ou ausência de bolhas de ar e rachaduras; características estas que podem alterar a integridade dos filmes e interferir em análises subsequentes. A espessura dos filmes foi determinada medindo-se cinco pontos aleatórios com micrômetro (Mitutoyo[®]) (Rabito *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013). Os filmes selecionados foram mantidos em dessecador com sílica gel até o momento dos ensaios.

2.5 Estudo da transmissão de vapor d'água

Inicialmente 10 mL de água destilada foram adicionados ao interior das cúpulas de permeabilidade (tipo Braive Instruments[®]) onde as amostras dos filmes foram fixados. Em seguida, cada conjunto (cúpula + água destilada + filme) foi pesado e armazenado em dessecador com sílica gel a temperatura ambiente. As pesagens subsequentes ocorreram nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 h, sendo o teste realizado em triplicada para cada associação. Após cada intervalo de pesagem a sílica era trocada por outra desidratada. A diferença de peso de cada cúpula nos respectivos intervalos de tempo foi registrada e utilizada na Equação 1 para calcular a taxa de TVA, transportada através dos filmes. A TVA foi padronizada para um período de 24 h (Oliveira *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013).

$$\text{Equação (1)} \quad TVA = \frac{g \cdot 24}{t \cdot a}$$

onde: g é a massa perdida, t representa o tempo em horas durante o qual o peso perdido será acompanhado, e a representa a área do filme, a qual foi de $0,001\text{m}^2$.

2.6 Determinação do índice de intumescimento

As diferentes características de hidratação do material polimérico obtido foram determinadas por avaliação do intumescimento. Resumidamente, amostras dos filmes isolados em suas diferentes proporções foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm^2 , acomodadas em placas de Petri e deixadas em estufa a 50°C , onde permaneceram por 15 h, para atingir a perda total da umidade. Na sequência foram armazenados em dessecadores contendo sílica gel durante a realização do experimento. Amostras das diferentes associações foram inicialmente pesadas em balança analítica para a determinação da massa seca e, imediatamente imersa em recipientes contendo FSG ou FSI por períodos de tempo predeterminados (1 a 10, 30, 60, 90, 120 e 150 min), mantidos à temperatura de 37°C . Cumpridos os intervalos para a hidratação as películas foram removidas dos meios utilizando-se uma pinça, enxugadas entre duas folhas de papel de filtro, para remoção do excesso de água, e em seguida pesadas novamente. Para o cálculo de quantificação do li% foi utilizada a Equação 2 (Oliveira *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013).

$$\text{Equação (2)} \quad Ii\% = \frac{\text{massa do filme intumescido} - \text{massa do filme seco}}{\text{massa do filme seco}} \times 100$$

2.7 Análises de difração de Raios-X

A análise química dos filmes isolados foi avaliada em um espectrômetro de energia dispersiva de raios-X (EDS), modelo SwiftED-3000, com filamento de tungstênio como fonte de elétrons, operado a 15 keV. Já a DRX foi realizada em um difratômetro Bruker, modelo D2 Phaser, com uma fonte de emissão de cobre ($\text{CuK}\alpha=1,5418 \text{ \AA}$), operado a 30 keV, corrente de 10^{-3} A , com uma janela de trabalho de $7 - 60^\circ\text{C}$ e incremento de $0,02^\circ \text{ s}^{-1}$.

2.8 Análises térmicas

Para a análise de DSC uma pequena quantidade das amostras (aproximadamente 6 mg) foi aprisionada em cadinhos de alumínio fechados e submetidas ao programa de aquecimento controlado, de $25 - 280^\circ\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto. Os ensaios foram conduzidos em atmosfera inerte, com fluxo de argônio de 50 mL por minuto, utilizando-se equipamento DSC Q100 – TA Instruments. Já para a TGA as curvas foram obtidas na faixa de temperatura de $25 - 800^\circ\text{C}$, com a mesma taxa de aquecimento (10°C por minuto), utilizando-se aproximadamente 6 mg das amostras em cadinhos de cerâmica abertos e atmosfera inerte. O fluxo de argônio foi de 100 mL por minuto e o equipamento empregado um TGA 2950 – TA Instruments.

2.9 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de filmes isolados foram avaliadas microscopicamente secas e após intumescimento em FSG e FSI. Posteriormente a hidratação, as membranas foram congeladas para conservação de sua estrutura e, então liofilizadas (-55°C durante 6 h) em liofilizador Terroni[®] modelo LT 1000 (Bunhak *et al.*, 2015). Em seguida, as amostras foram metalizadas com liga ouro/paládio, colocadas em fita de carbono e analisadas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo, através de equipamento JEOL *JSM-6340-F*, operado a 2 KeV.

2.10 Espectroscopia no infravermelho

Os filmes isolados foram analisados por espectroscopia na região do IV-FT, em um aparelho modelo Vertex 70v – Bruker Corporation (Alemanha), com faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 100 varreduras. Os espectros de absorção de infravermelho foram obtidos após preparação de pastilhas de amostra com KBr.

2.11 Cultura de células

As células Caco-2 (clone C2BBE1) foram obtidos da ATCC (EUA) e a linha de células HT29-MTX foi gentilmente cedida pelo Dr. T. Lesuffleur (INSERMU178, Villejuif, França). O meio de cultura DMEM (Lonza), foi suplementado com 10% (v.v⁻¹) de FBS (Merck Millipore), 1% (v.v⁻¹), penicilina (100 U/mL, Merck Millipore), estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$, Merck Millipore) e 1% (v.v⁻¹) de NEAA (Merck Millipore). MTT e DMSO foram obtidos da Sigma-Aldrich, Triton X-100 a 1% da Spi-Chem, os frascos de cultura e as placas de cultura de tecidos de 96 poços foram adquiridos da Corning Inc., EUA. As placas foram lidas no espectrofotômetro de microplacas (Biotek Sinergia 2, EUA) e as células foram mantidas em uma incubadora (ESCO CelCulture[®] CO₂, Singapura) a temperatura de 37°C, CO₂ a 5% e atmosfera saturada de água.

2.12 Estudos de Citotoxicidade

O potencial de citotoxicidade dos filmes EC 00:100 AH, EC 00:100 AHR, EC 100:00 AH, EC 95:05 AH, EC 90:10 AH, EC 95:05 AHR e EC 90:10 AHR foi testado contra células Caco-2 e HT29-MTX, células de câncer colorretal, usando o reagente MTT. As células Caco-2 (passagem 51 – 54) e HT29-MTX (passagem 41 – 43) cresceram separadamente em frascos de cultura em meio completo, consistindo em DMEM suplementado com 10% (v.v⁻¹) de FBS, 1% (v.v⁻¹) de L-glutamina, 1% (v.v⁻¹) de NEAA e 1% (v.v⁻¹) da mistura de antibiótico-antimitóticos (concentração final de penicilina de 100 U/mL e estreptomicina de 100 U/mL), sendo o meio de cultura substituído em dias alternados. As células foram semeadas (200 μL) em poços de placas de cultura de tecidos de 96 poços com 1×10^4 células por poço para a linha celular HT29-MTX e 2×10^4 células por poço para Caco-2, e incubadas a 37°C em

uma atmosfera de ar com CO₂ a 5% durante 24 horas. Depois disso, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 200 µL de PBS. Em seguida, foi substituído por 200 µL de meio morno fresco com as duas concentrações, 0,5% e 1% (m.v⁻¹) dos filmes descritos anteriormente. Um controle negativo (1% de Triton X-100) e um controle positivo (meio de incubação com células) foi incluído. Após 4 h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio foi descartado e as células lavadas duas vezes com 200 µL de PBS. Finalmente, foi adicionado 200 µL de solução MTT por poço (concentração final de 0,5 mg.mL⁻¹) e incubou-se no escuro durante 4 h. Decorrido o tempo, a solução MTT foi removida e descartada e então, foram adicionados 200 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazano de MTT. As placas foram colocadas em um agitador orbital durante 15 min no escuro. A absorbância foi medida utilizando um espectrômetro de microplacas a 570 e 630 nm. Os resultados foram analisados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Equação (3) Viabilidade (\%)} = \frac{\text{valor experimental} - \text{controle negativo}}{\text{controle positivo} - \text{controle negativo}} \times 100$$

2.13 Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e representados como médias ± SD. Os resultados dos ensaios obtidos foram inicialmente estudados pela ANOVA para múltiplas comparações, utilizando p<0,05. Posteriormente, quando o conjunto desses valores forneceu parâmetros significativos, foi realizada aplicação das médias dos dados obtidos no teste de múltipla comparação de *Tukey*, com o objetivo de comparar as diferentes composições poliméricas. Estas análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism*[®] (versão 5.03).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Reticulação do ácido hialurônico

O processo de reticulação de AH com TMFT foi estabelecida numa proporção estequiométrica, assumindo desta forma, que cada mol de TMFT reage com três pares de hidroxila do AH, para se obter um material modificado com menor hidrossolubilidade. O esquema da reação está apresentado na Figura 1.

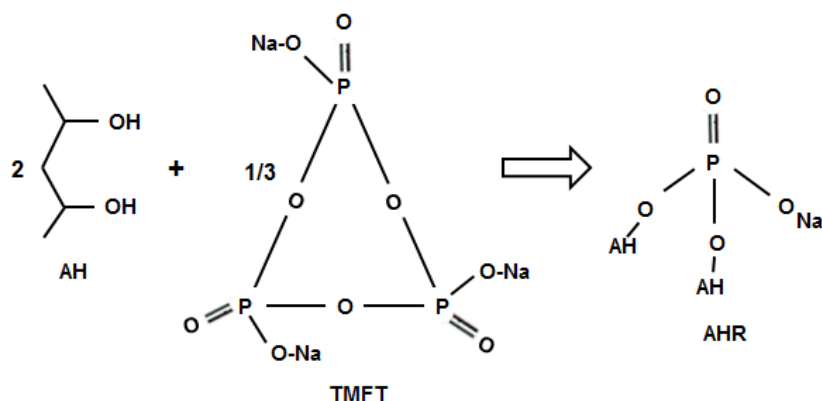


Figura 1 Esquema de reação entre ácido hialurônico e trimetafosfato trissódico.

3.2 Características macroscópicas e espessura dos filmes

A verificação das características morfológicas macroscópicas dos filmes é de fundamental importância, considerando a necessária manutenção da integridade das películas para obtenção de resultados confiáveis nas análises posteriores, especialmente para os ensaios de TVA. Sendo assim, filmes que apresentaram qualquer tipo de defeito foram excluídos (Oliveira *et al.*, 2011; Rabito *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013). Conforme observado na Figura 2, as diferentes formulações permitiram a formação de filmes isolados com características imprescindíveis aos ensaios previstos, ou seja, ausência de bolhas de ar e/ou rachaduras. Também foi evidenciada, macroscopicamente, a homogeneidade na distribuição dos polímeros envolvidos, caracterizando provável compatibilidade na dispersão dos constituintes. Entretanto o aumento da concentração do AH ou AHR, cuja função era proporcionar especificidade ao material polimérico obtido, ocasionou variação da aparência das membranas, como diminuição da transparência e flexibilidade ao manejo manual. Todos esses dados estão resumidos na Tabela 1.

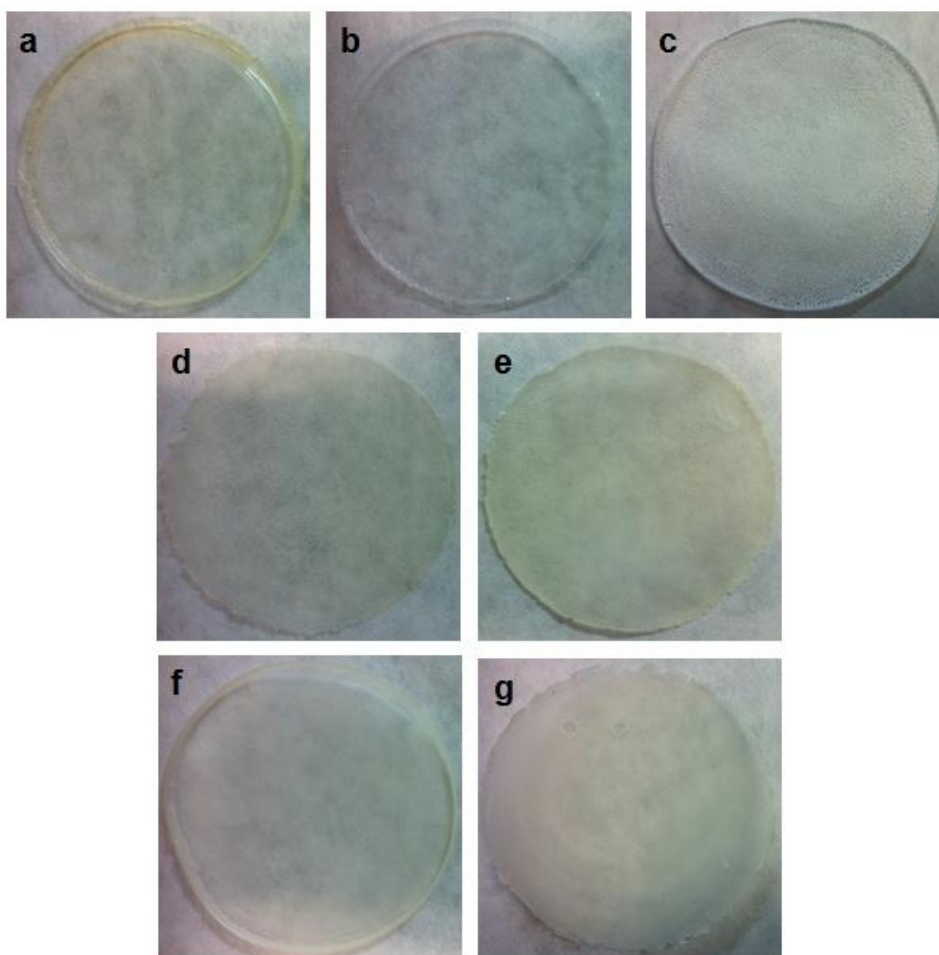


Figura 2 Imagens das diferentes formulações. **a)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **b)** Filme controle do polissacarídeo EC 00:100 AH **c)** Filme controle do polissacarídeo reticulado EC 00:100 AHR **d)** EC 95:05 AH **e)** EC 95:05 AHR **f)** EC 90:10 AH e **g)** EC 90:10 AHR.

Tabela 1 Avaliação morfológica macroscópica das diferentes formulações.

Associação polimérica	Homogeneidade	Rachaduras	Bolhas de ar	Transparência	Flexibilidade
EC 100:00 AH	0	0	0	+++	+++
EC 00:100 AH	0	0	0	+++	+++
EC 00:100 AHR	0	0	0	+	++
EC 95:05 AH	0	0	0	++	++
EC 90:10 AH	0	0	0	+	+
EC 95:05 AHR	0	0	0	+	++
EC 90:10 AHR	0	0	0	+	+

0: ausência de alterações visíveis, +: fracamente presente, ++: moderadamente presente, +++: fortemente presente.

Em relação à espessura também foi demonstrada alterações nas diferentes formulações em comparação ao filme controle (Tabela 2). Além disso, a baixa variabilidade das triplicatas indica que o método escolhido foi reprodutível, garantindo a formação de películas com espessuras homogêneas. Estudos anteriores também relataram efeitos semelhantes, em que o polissacarídeo tanto

reticulado quanto não modificado influenciou no aumento da espessura das películas formadas (Bunhak *et al.*, 2007; Souto-Maior *et al.*, 2010).

Tabela 2 Valores das médias das espessuras dos filmes isolados. Cada valor representa a média \pm SD de três medidas independentes (n=3).

Formulação	Espessura (mm)
EC 100:00 AH	0,0607 (\pm 0,0011)
EC 95:05 AH	0,0822 (\pm 0,0059)
EC 90:10 AH	0,0912 (\pm 0,0090)
EC 95:05 AHR	0,1076 (\pm 0,0205)
EC 90:10 AHR	0,1260 (\pm 0,0109)

3.3 Estudo de transmissão de vapor d'água

A avaliação da permeabilidade, aplicando a técnica de TVA em filmes isolados é considerada um método simples em comparação com métodos tradicionais de difusão, mas que fornece resultados importantes acerca do material polimérico, candidato ao processo de revestimentos em sistemas de liberação modificada de fármacos (Souto-Maior *et al.*, 2010).

De acordo com a Tabela 3, a TVA foi afetada pela composição polimérica das membranas. Um aumento na concentração do AHR ou AH influenciou no aumento da taxa de TVA, confirmado pela perda de massa dos conjuntos (cúpula + água + filme) – Figura 3. Já foi relatado que filmes de AH não são efetivos como barreira a umidade devido à natureza hidrofílica, bem como os filmes de glucomanano de konjac (Li *et al.*, 2015).

Tabela 3 Valores de perda de massa e taxa de TVA das diferentes formulações. Cada valor representa a média \pm SD de três medidas independentes (n=3).

Formulação	Valores perdas de peso (g/120h)	TVA (g/m ² 24h)	g/h
EC 100:00 AH	1,6767 (\pm 0,0488)	335,34	0,0139
EC 95:05 AH	2,1517 (\pm 0,1557)	430,34	0,0179
EC 90:10 AH	2,9004 (\pm 0,0766)	580,08	0,0241
EC 95:05 AHR	1,6016 (\pm 0,2614)	320,32	0,0133
EC 90:10 AHR	2,1372 (\pm 0,2118)	427,44	0,0178

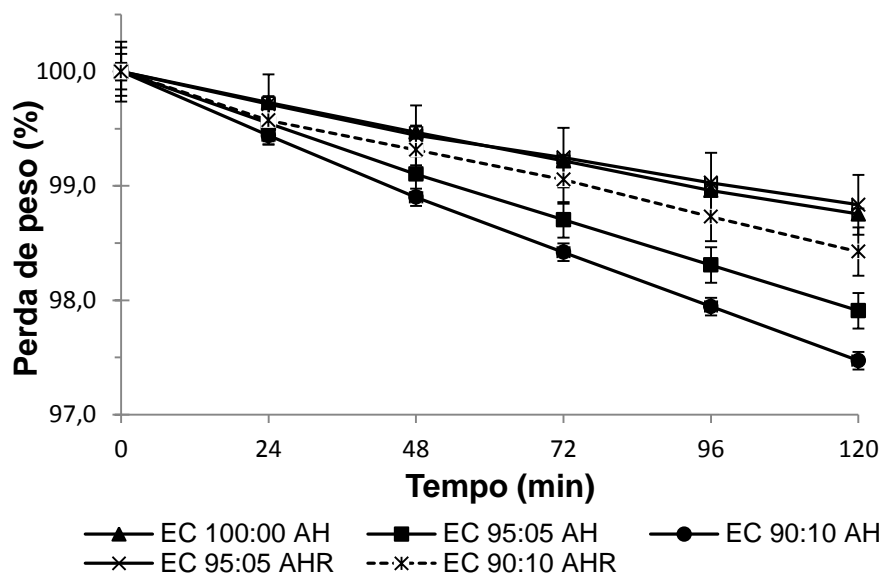


Figura 3 Perda de massa de filmes isolados em estudo de TVA.

O aumento na hidrofiliidade do sistema foi causado pela adição do polissacarídeo não modificado, rico em grupos OH que interagem com as moléculas de água, formando ligações de hidrogênio. Entretanto, observa-se também que quando se utilizou o AHR na formação dos filmes essa permeabilidade foi reduzida quando comparada à mesma concentração de AH, ficando as taxas mais próximas do filme controle (EC). Este fato já era esperado e pode confirmar que o processo de reticulação do polímero natural com o TMFT diminuiu a hidrofiliidade do material, sendo que esta melhoria no comportamento hidrofílico ocorre devido à diminuição dos grupos OH disponíveis para interagir com a água.

A ANOVA revelou que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) das diferentes associações em relação ao controle. Entretanto, quando o conjunto desses valores foi submetido ao teste de múltipla comparação de Tukey, apenas as proporções EC 90:10 AH versus EC 100:00 AH, EC 95:05 AH e AHR e EC 90:10 AHR, além de EC 95:05 AH versus EC 95:05 AHR e EC 95:05 AHR versus EC 90:10 AHR apresentaram parâmetros significativos.

De maneira semelhante ao encontrado nesta pesquisa, outros autores avaliando a pectina adicionada ao Kollicoat SR30D e a influência da β -ciclodextrina em um polímero acrílico também observaram essa mesma tendência (Oliveira *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2009). Além disso, Souto-Maior *et al.*, (2010) também concluiu em seu trabalho que a ligação dos grupos hidroxilas da pectina com o TMFT promoveu uma redução da hidrofília dos filmes produzidos com uma dispersão aquosa de polimetacrilato (Eudragit® RS 30 D) associado à pectina fosfatada e um

oligossacarídeo prebiótico, sendo esta característica importante para o controle da difusão de fluidos e fármacos quando aprisionados nos sistemas.

3.4 Determinação do índice de intumescimento

Neste estudo a determinação do li% foi utilizada para avaliar o grau de hidratação dos filmes isolados oriundos das diferentes formulações, frente aos fluidos de simulação fisiológicos (FSG e FSI). A partir da ANOVA evidenciou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as associações quando comparadas ao controle. Contudo, quando o conjunto desses valores foi submetido ao teste de múltipla comparação de Tukey, apenas o controle (EC 100:00 AH) versus as proporções EC 95:05 AHR, EC 90:10 AH e AHR e a composição EC 95:05 AH versus ambas associações reticuladas foram estatisticamente significativas em FSG. Já em FSI apenas o controle EC 100:00 AH versus as proporções EC 90:10 AH e AHR, a composição EC 95:05 AH versus EC 90:10 AH e AHR e EC 95:05 AHR versus EC 90:10 AH e AHR apresentaram $p < 0,05$.

Os resultados do li% após 150 min de imersão nos fluidos, mantidos a 37°C, são mostrados na Figura 4. Percebe-se que há uma dependência no grau de intumescimento conforme a composição dos filmes e pH do fluido. Em FSG as membranas associadas ao AH apresentaram um menor grau de hidratação, isso ocorre devido ao pH ácido, que proporciona um maior entrelaçamento da malha polimérica aniônica. Ao contrário, em FSI, cujo pH é mais elevado, ocorre ionização dos grupos COO⁻ que leva à repulsão das cadeias e determina uma expansão da rede, sendo esses espaços, então, ocupados pela água, explicando a maior hidratação. Estes resultados encontram similitude com trabalhos prévios (Souto-Maior *et al.*, 2008, 2010). Além disso, a mesma relação entre o li%, composição dos filmes e pH do meio foi reportada em outra pesquisa que estudou as características de filmes produzidos a partir de Eudragit[®] FS 30 D (polímero pH-dependente) e arabinoxilano (Rabito *et al.*, 2012).

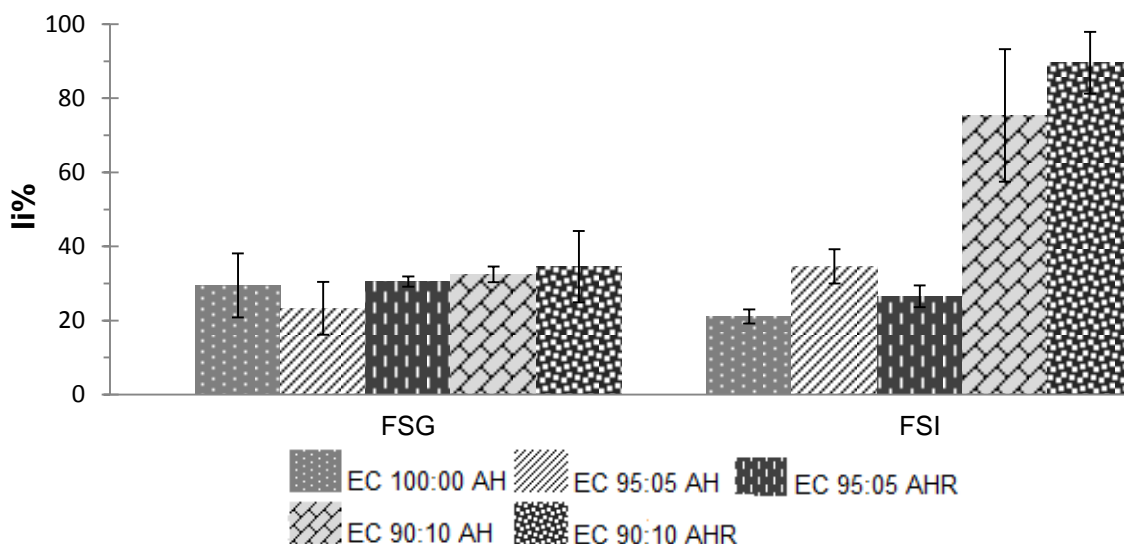


Figura 4 Índice de intumescimento dos filmes isolados após imersão de 150 min em FSG (pH 1,2) e FSI (pH 6,8).

Este comportamento de intumescimento pH-dependente verificado, dependente da escolha do polissacarídeo, mostra-se bastante interessante, uma vez que deve contribuir para evitar a liberação prematura de fármaco nas porções superiores do TGI, que possui baixo pH, todavia vulnerável aquelas faixas de pH mais elevadas da porção distal do TGI (Maior *et al.*, 2008).

No FSI as películas da proporção EC 90:10 AH apresentaram desintegração parcial, o que foi observado pela perda de massa entre os intervalos de intumescimento. Este comportamento pode ser relacionado à expansão polimérica e elevada hidrossolubilidade do AH, que permite a migração deste para o meio. Resultados semelhantes também foram relatados durante avaliação de filmes contendo EC e sulfato de condroitina (Bunhak *et al.*, 2007). Essa desintegração parcial também foi constatada nas membranas da proporção EC 90:10 AHR, entretanto em grau menor, o que novamente demonstra a atuação do TMFT sobre o polissacarídeo durante a reticulação e consequente diminuição de sua hidrofiliabilidade.

3.5 Espectrometria de energia dispersiva de raios-X

As análises por EDS forneceram a identificação qualitativa dos elementos presentes nos filmes isolados e avaliou a homogeneidade com que foram dispersos. Os resultados presente no material suplementar, sugerem que houve uma boa homogeneidade do carbono (referente ao esqueleto do polímero) nas formulações

EC 100:00 AH, EC 00:100 AH, EC 90:10 AH e EC 90:10 AHR, entretanto nas proporções EC 00:100 AHR, EC 95:05 AH e EC 95:05 AHR esta foi menos homogênea. Em relação às películas produzidas com AHR também houve a identificação de fósforo, referente ao precursor TMTS, indicando que o processo de reticulação promoveu a incorporação deste componente ao esqueleto carbônico do polímero e a presença de sódio, também relacionado à estrutura do TMTS e/ou resíduos da base utilizada para correção do pH, o qual foi mantido em torno de 12, durante o processo.

3.6 Difração de raios-X

A partir do grau de organização do material polimérico é possível determinar sua natureza amorfa ou cristalina, sendo isto observado na Figura 5. De acordo com os espectros DRX os filmes apresentaram natureza amorfa, com exceção da formulação EC 90:10 AHR, que apresentou uma natureza mais cristalina. Isto ocorre porque esta formulação apresenta uma maior quantidade de AHR na sua composição e a modificação química do polissacarídeo com o TMTS tornou a estrutura deste mais organizada. Entretanto os filmes EC 95:05 AHR e EC 90:10 AHR não apresentaram o mesmo padrão de comportamento. Ademais, percebe-se que a adição do polissacarídeo alterou a estrutura das membranas.

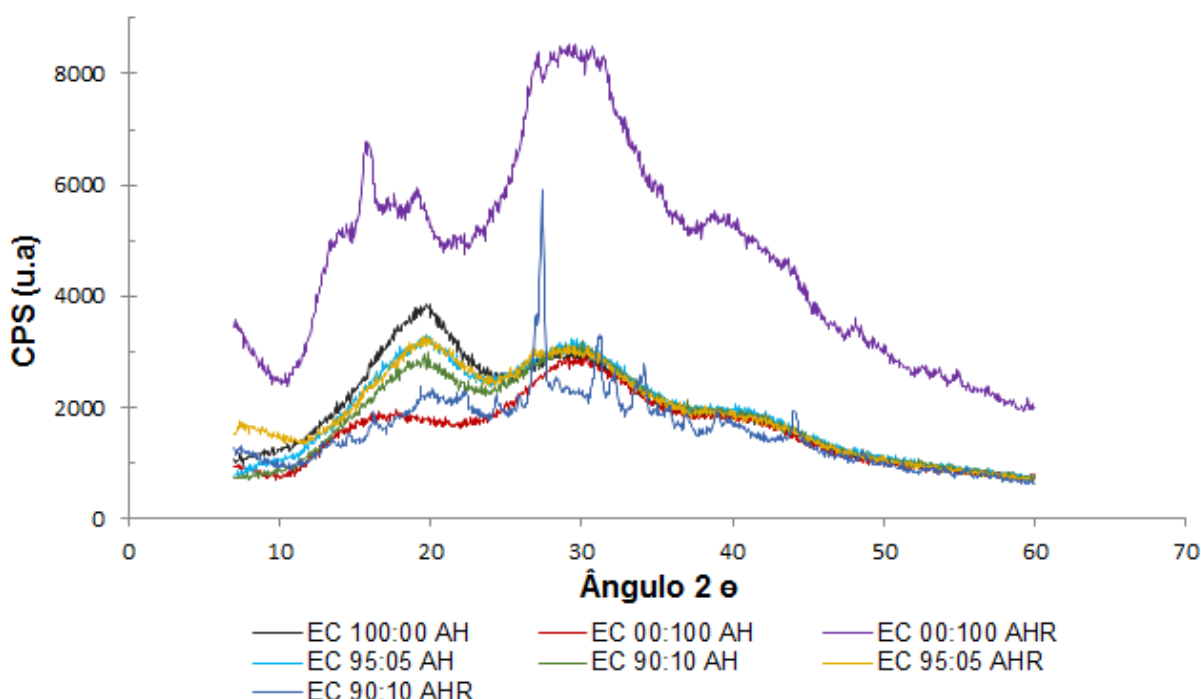


Figura 5 Difratograma DRX das diferentes formulações.

3.7 Análises térmicas

A fim de investigar a estabilidade térmica tanto do polímero sintético, assim como, do polissacarídeo puro ou modificado, nas diferentes formulações candidatas, foram conduzidos dois experimentos. A Figura 6 mostra as curvas de DSC dos diferentes filmes obtidos sob atmosfera inerte na faixa de temperatura de 25 a 280°C.

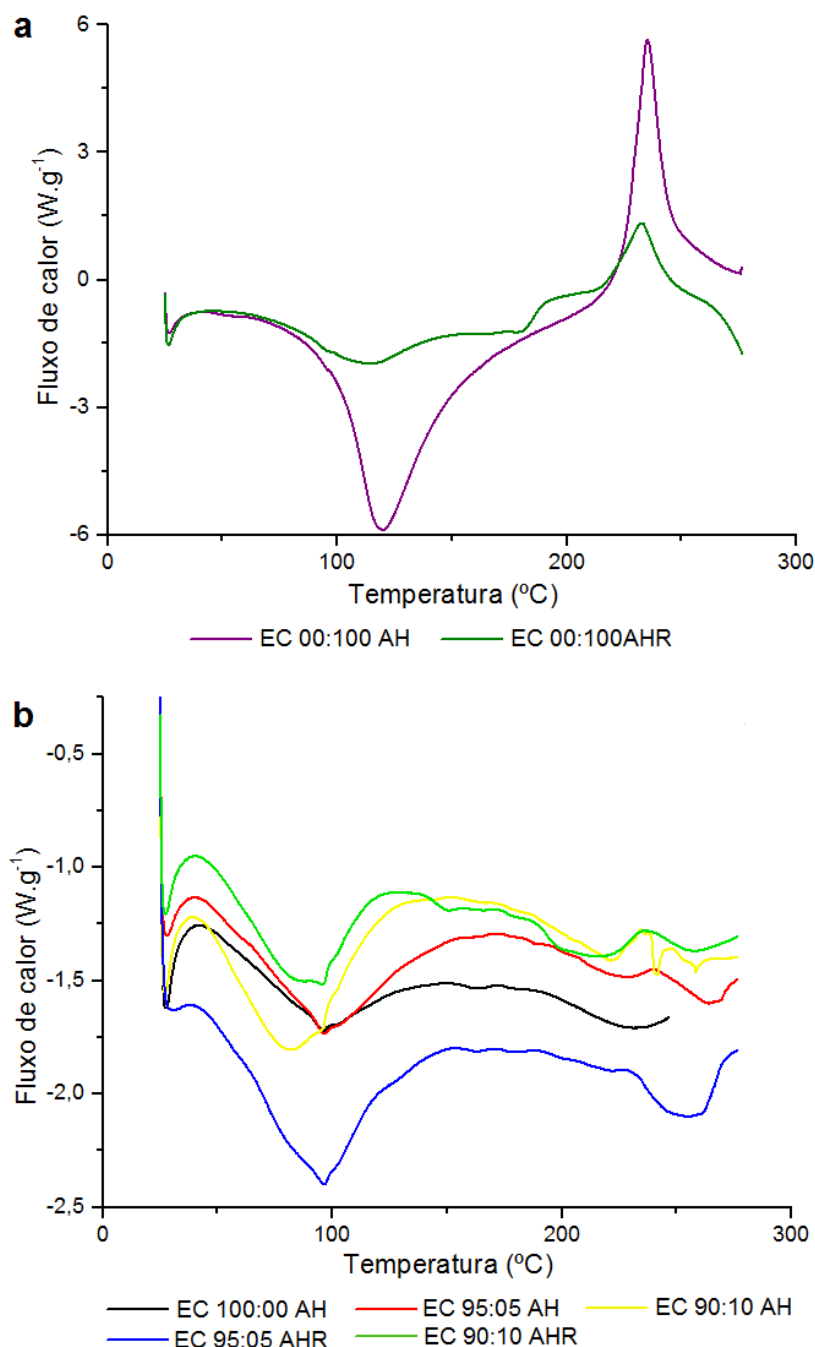


Figura 6 Termograma de DSC das diferentes formulações. **a)** Filmes controle do polissacarídeo natural e reticulado (EC 00:100 AH e EC 00:100 AHR,

respectivamente) **b)** Filmes controle do polímero sintético EC 100:00 AH e das associações: EC 95:05 AH, EC 95:05 AHR, EC 90:10 AH e EC 90:10 AHR.

Comparando o comportamento do AHR com o AH não modificado, de acordo com a Figura 6(a), pode-se observar que o pico endotérmico de desidratação do AHR diminuiu de intensidade e deslocou-se para temperaturas mais baixas quando comparado com o AH (108,85 e 120,31°C, respectivamente). Esse resultado sugere que o polissacarídeo modificado com TMFT apresenta menor quantidade de grupos carboxílicos disponíveis para interagir com moléculas de água, porque a incorporação do TMFT diminuiu a hidrofiliabilidade do biopolímero. Estas evidências encontram-se em acordo com resultados similares obtidos durante a avaliação do comportamento térmico de pectina natural e modificada (Maior *et al.*, 2008). Ademais, nos dois termogramas observa-se um pico exotérmico em 234,9 e 232,79°C referente ao pico de decomposição do AH e AHR, respectivamente. Este fato encontra amparo em investigações prévias conduzidas com este polissacarídeo (Collins e Birkinshaw, 2008).

Para o filme controle (EC 100:00 AH) – Figura 6(b) – percebe-se um pico endotérmico na faixa de 95,55°C que é atribuído à evaporação da água livre que não foi completamente removida após a secagem dos filmes. Picos semelhantes também são observados para as diferentes composições investigadas, conforme Figura 6(b), em 96,32, 96,32, 82,83 e 84,11°C para EC 95:05 AH, EC 95:05 AHR, EC 90:10 AH e EC 90:10 AHR, respectivamente. Posteriormente, na curva do filme EC 100:00 AH nota-se outro evento endotérmico em 222,98°C, bastante similar ao encontrado por Alves *et al.*, (2009), que relatou o mesmo evento a uma temperatura de aproximadamente 223°C, seguido pela decomposição da amostra de EC em aproximadamente 355°C.

Desta maneira os perfis de degradação revelam que os filmes de EC:HA são termicamente estáveis até 200°C. Assim, o material polimérico proposto pode ser utilizado para o revestimento, uma vez que estes processos são realizados em temperaturas inferiores a 60°C.

Além disso, não foi possível observar alterações referentes à T_g dos compostos nas curvas de DSC provavelmente devido à interferência atribuída à presença de umidade.

A Figura 7 mostra as curvas de TGA das diferentes formulações dos filmes obtidos sob atmosfera inerte na faixa de temperatura de 25 a 800°C. De acordo com esta figura o padrão de decomposição do polissacarídeo demonstra que a

reticulação proporcionou um aumento de sua estabilidade térmica, percebida pelas taxas de perda de massa inferiores do AHR em relação ao AH no decorrer da curva de TGA de ambas as amostras. Já na curva de TGA da EC, evidencia-se um padrão de decomposição com dois estágios de perda de massa, que se referem às etapas inicial e final de degradação do polímero sintético. O primeiro estágio ocorre em torno de 319,50°C e representa uma perda percentual de massa de 78,88%. O segundo evento térmico observado em 360,20°C está associado à degradação final do polímero, que envolve a perda de massa de 3,24%. Estes dados estão em acordo com trabalho de Lomakim *et al.*, (2011), que relatam 316°C como temperatura inicial de decomposição da EC e temperatura máxima de 363°C.

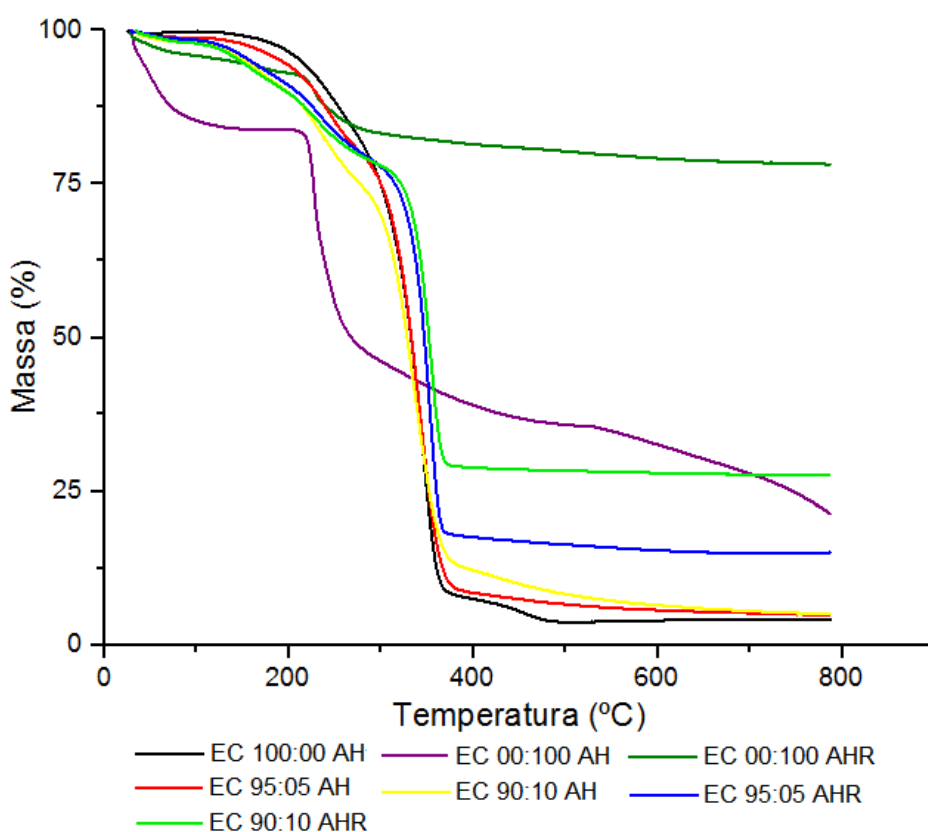


Figura 7 Termograma de TGA das diferentes formulações.

Em relação às curvas representativas da decomposição térmica das diferentes associações poliméricas, revela-se uma melhoria na estabilidade térmica dos filmes EC após a incorporação do polissacarídeo, refletindo na redução da perda de massa em relação ao controle do polímero sintético isolado. Comportamento semelhante foi observado após a adição de HA em compósitos 3D baseados na mistura de quitosana e colágeno. Em outras palavras, isso significa que a amostra foi mais resistente à decomposição térmica (Sionkowska *et al.*, 2016).

3.8 Microscopia eletrônica de varredura

Os resultados das micrografias eletrônicas de varredura das películas podem ser observados na Figura 8. De acordo com as micrografias da Figura 8 A(a), B(a) e C(a) pode ser verificado que praticamente não houve alterações quando foram comparadas as amostras de filmes EC 100:00 AH seco e submetidos a condição de imersão nos fluidos fisiológicos de simulação, mantendo um aspecto mais liso e homogêneo em ambas as situações. Entretanto, mudanças nas características morfológicas podem ser observadas quando o polissacarídeo foi adicionado nas formulações das películas. Em FSG (Figura 8B) percebe-se uma superfície heterogênea, provavelmente relacionada à presença do polímero natural. Também foi possível visualizar um desarranjo da malha polimérica, que, todavia foi mais proeminente quando as amostras foram imersas em FSI, conforme observado na Figura 8C, a qual demonstra que a malha polimérica apresentou-se mais relaxada. Isto se deve ao fato, previamente discutido na análise de li%, que em faixas de pH próximo ao básico ocorre ionização dos grupos COO⁻ que determina uma expansão da malha polimérica e conseqüente migração do AH para o meio. Além disso, quando se compara o aspecto dos filmes produzidos com AH e AHR evidencia-se a existência de um arranjo diferenciado para as formulações produzidas com a mesma concentração de polímero natural.

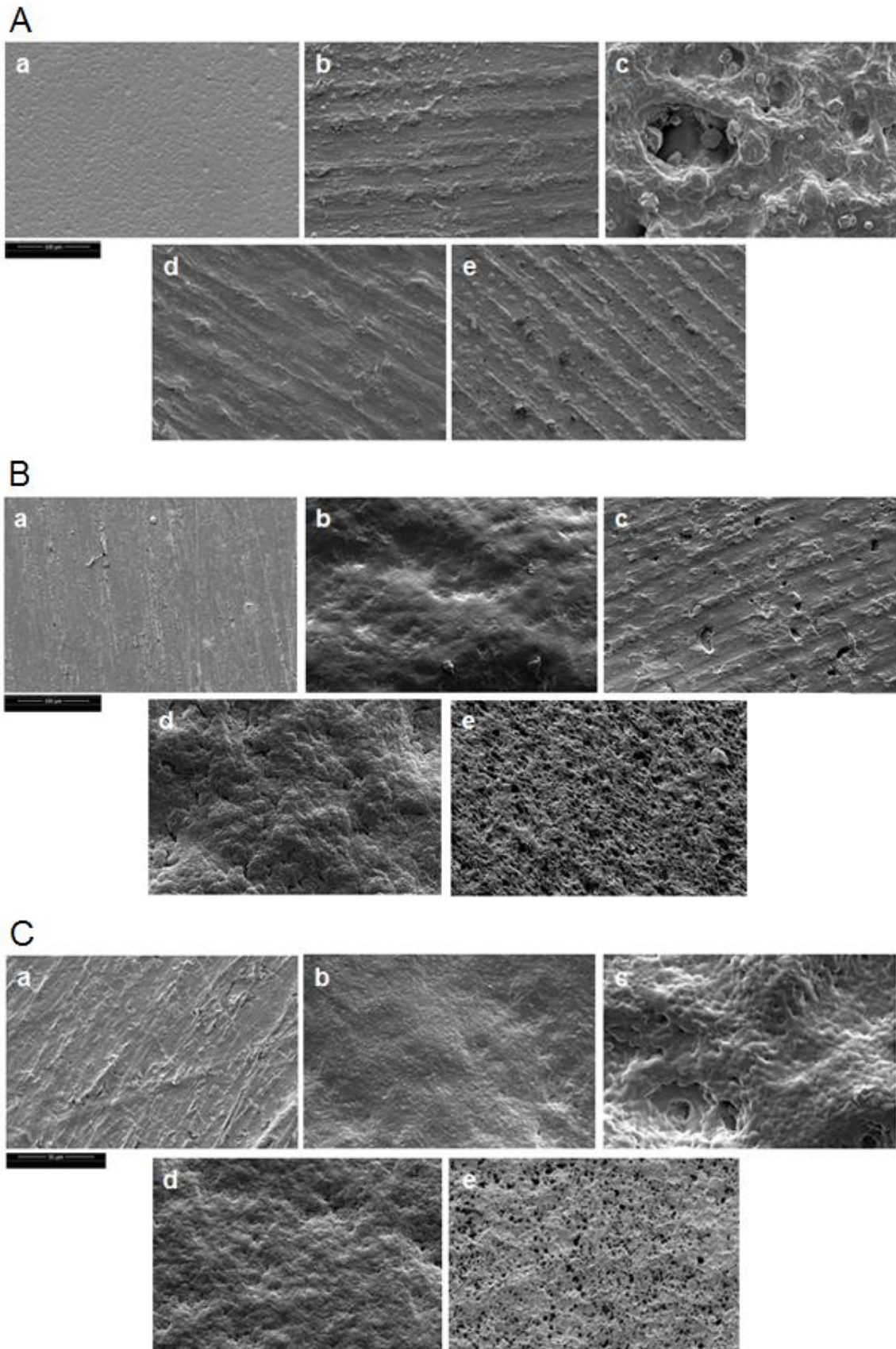


Figura 8 Micrografias das diferentes formulações. **A)** Secas **B)** Após imersão em FSG e **C)** Após imersão em FSI. **a)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **b)** EC 95:05 AH **c)** EC 95:05 AHR **d)** EC 90:10 AH e **e)** EC 90:10 AHR.

As micrografias de formulação EC 90:10 AHR corroboram os resultados encontrados nos testes de DRX e DSC para esta mesma composição, demonstrando uma estrutura mais ordenada. Além disso, devido ao arranjo da estrutura, pode-se observar a presença de poros após a imersão nos fluidos de simulação fisiológicos. No entanto, é possível notar que a formulação EC 90:10 AHR aparece mais intumescida em FSI, confirmando os resultados da análise li%.

3.9 Espectroscopia no infravermelho

A Figura 9 mostra o espectro IV-FT das diferentes formulações de filmes na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Para o filme controle de EC (Figura 9(d)), as bandas características indicam o estiramento OH ao redor de 3500 cm^{-1} , vibrações do complexo CH_3 em 1375 e 1450 cm^{-1} correspondente a pequenas bandas referentes às vibrações do complexo CH_3 , respectivamente. O estiramento COC do éter cíclico também é observado em 1100 cm^{-1} (Fernández-Pérez *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015).

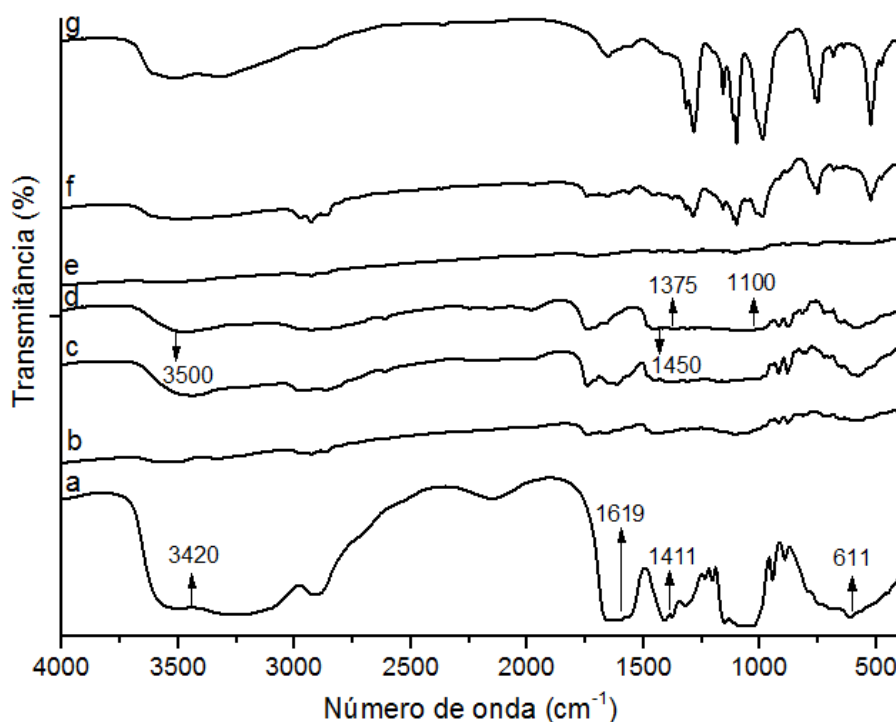


Figura 9 Espectro de absorção IV-FT das diferentes formulações. **a)** Filme controle do polissacarídeo EC 00:100 AH **b)** EC 95:05 AH **c)** EC 90:10 AH **d)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **e)** EC 95:05 AHR **f)** EC 90:10 AHR e **g)** Filme controle do polissacarídeo reticulado EC 00:100 AHR.

A Figura 9(a) mostra os padrões de absorção do AH natural em 611, 1411, 1619 e 3420 cm^{-1} atribuídos ao estiramento C–O–C, à presença do grupo C–O em combinação com C=O, grupo amida secundário e estiramento dos grupos OH, respectivamente. Esses resultados estão em acordo com aqueles obtidos em trabalhos prévios (Reddy e Karunakaran, 2013). Já no espectro do filme controle de AHR observamos o surgimento de uma deformação axial na região do número de onda de 1040 a 910 cm^{-1} , correspondente aos grupamentos fosfato ligado ao polissacarídeo após a reticulação, assim como referido por Codagnone *et al.* (2004) quando analisaram a goma guar natural e reticulada também com TMFT, observaram a mesma deformação na mesma região do número de ondas desta pesquisa.

Ademais, foi possível observar que as amostras das diferentes formulações poliméricas apresentaram bandas semelhantes quando comparados aos filmes controle, conforme Figura 9(b), (c), (e), (f). Isto indica a possível existência de apenas mistura física entre os constituintes das diferentes formulações propostas na fabricação dos filmes isolados, pois não houve deslocamento nem formação de novas bandas e/ou picos. Resultados semelhantes foram descritos durante a avaliação da influência dos aditivos α -glucoligossacarídeo e/ou Tween[®] 80 na formação de filmes isolados de EC (Alves *et al.*, 2009).

Estas evidências se tornam significativas, pois dessa maneira conservam-se as propriedades dos dois materiais utilizados, podendo utilizá-las em sinergismo, tanto a característica de sítio-alvo-especificidade do polissacarídeo, associado a tempo-dependência da EC, potencialmente melhorando o controle na liberação de fármacos.

3.10 Estudos de citotoxicidade

A fim de determinar a toxicidade dos filmes, foi conduzido a avaliação pelo método MTT contra linhagens celulares intestinais, durante 4 h que refere-se ao tempo máximo de permanência no TGI, como já previamente descrito (Antunes *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2014).

Como descrito na Figura 10, tanto os filmes quanto os componentes individuais mostrarem-se seguros para as células epiteliais intestinais. Quando comparamos os resultados com o controle positivo, que representa cada linhagem celular incubada apenas com o meio completo, verificou-se que quase todas as

películas apresentam uma viabilidade celular muito semelhante (ou mesmo maior) de 100%, o que indica que estes materiais são compatíveis com o organismo biológico. Por outro lado, existem algumas diferenças estatísticas significativas quando se comparam os resultados obtidos para um filme de 0,5% de concentração ($m.v^{-1}$) com aquele de concentração de 1,0% ($m.v^{-1}$). Estes resultados eram esperados uma vez que a concentração de filme duplica para o mesmo número de células. No entanto, sem toxicidade evidente, todos os filmes investigados são compatíveis com o ambiente biológico, podendo ser utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos, respeitando o conceito de biocompatibilidade.

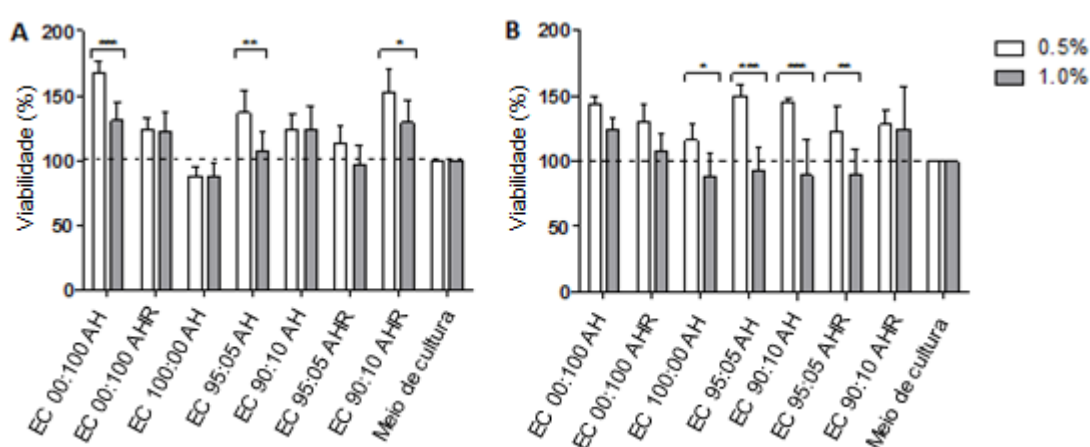


Figura 10 Viabilidade celular dos filmes EC 00:100 AH, EC 00:100 AHR, EC 100:00 AH, EC 95:05 AH, EC 90:10 AH, EC 95:05 AHR e EC 90:10 AHR contra linhagens celulares Caco-2 (A) e HT29-MTX (B), respectivamente, em concentrações de 0.5% e 1.0% após incubação durante 4 h. Os valores são representados como médias \pm SD ($n = 6$). (*), (**) e (***) denotam diferença significativa ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$), respectivamente.

4. CONCLUSÃO

Polímeros naturais têm se tornado uma importante ferramenta, juntamente com polímeros sintéticos já consagrados pela indústria farmacêutica, para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos destinados à aplicação em sistemas de liberação modificada de fármacos, cujo emprego potencial está voltado ao revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais. Além disso, a presença do polissacarídeo pode ajudar a proporcionar um incremento de propriedades, tais como o direcionamento para liberação de fármacos no local de ação, devido a sua afinidade por receptores CD44. Em suma, o presente estudo revelou que o processo de reticulação do AH melhorou sua característica hidrofílica e proporcionou a

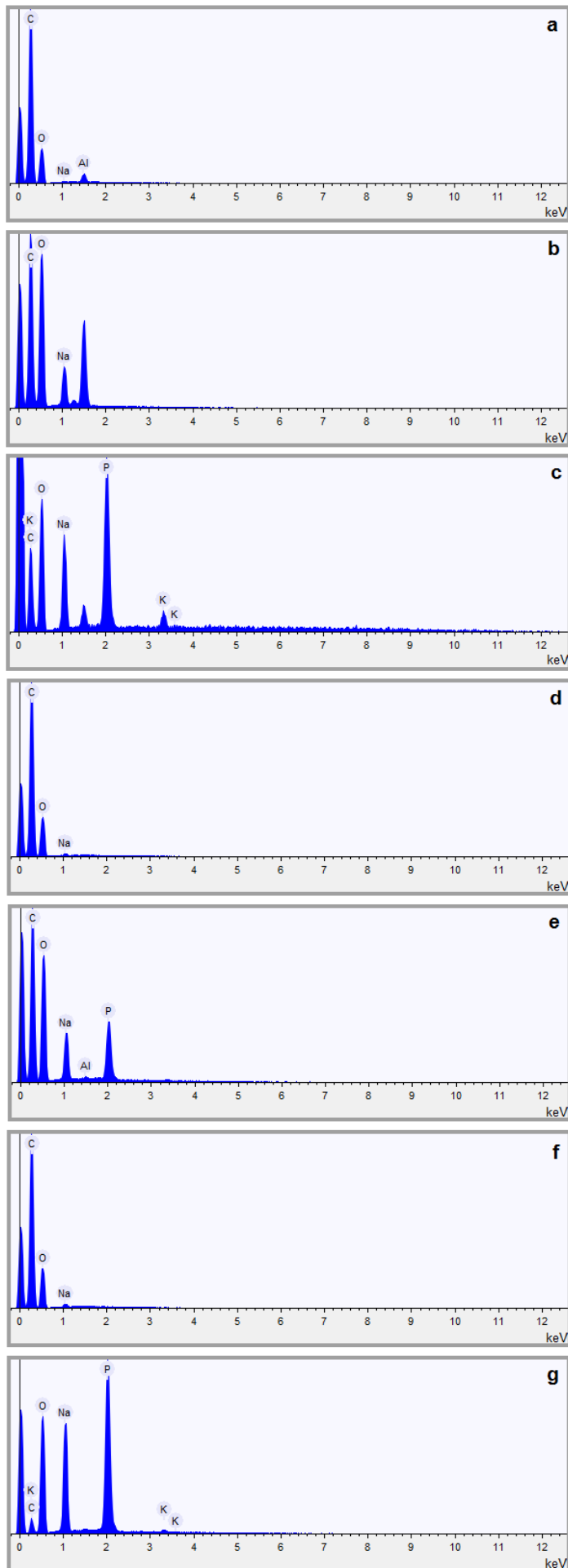
formação de filmes isolados adequados aos ensaios previstos. O aumento da concentração do polissacarídeo nas membranas favoreceu a permeabilidade em relação ao controle (EC). Quando imersos em FSG, as diferentes formulações apresentaram um menor grau de hidratação, entretanto, em FSI, os filmes apresentaram perda de massa. Este fenômeno está provavelmente relacionado à migração do biopolímero para o meio, comprovado pelos ensaios de MEV, que demonstraram a presença da malha polimérica mais dilatada nesta faixa de pH. Ademais, a caracterização físico-química sugere estabilidade térmica das películas e interação física entre os constituintes da formulação. Sendo assim, estas evidências corroboram para que o material polimérico proposto possa ser utilizado em processos de revestimento, também suportado pela ausência de citotoxicidade às células intestinais. Essas características podem favorecer a aplicação deste material para obtenção de promissores sistemas de liberação controlada de fármacos, para administração por via oral. Entretanto, para isso, faz-se necessária a realização de estudos adicionais de dissolução e funcionalidade, afim de avaliar o papel positivo do material de revestimento.

AGRADECIMENTOS

Débora Sgorla gostaria de agradecer a bolsa de mestrado financiada pelo Programa CAPES/FA (Chamada Pública 11/2014) e Bruno Sarmiento agradece o suporte financeiro do projeto do Programa Ciências Sem Fronteiras, Pesquisador Visitante (Chamada de Projetos MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs nº 09/2014) ambos ligados ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF-UNIOESTE/ Paraná/ Brasil). Este trabalho também foi financiado pela FEDER – Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional fundos através do COMPETE 2020 – Programa Operacional para a Competitividade e Internacionalização (POCI), Portugal 2020, e por fundos portugueses através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia / Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, no âmbito do projeto "Instituto de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde" (POCI-01-0145-FEDER-007274). À empresa Colorcon do Brasil pela amostra de Etilcelulose - Surelease®. Aos professores Dr. Leandro F. dos Santos, Dr. Fauze J. Anaissi e Me. Filipe Q. Mariani, que colaboraram para a realização das técnicas de caracterização (EDS e DRX) deste trabalho.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os dados suplementares associados a este artigo são apresentados a seguir:



Espectro EDS das diferentes formulações. **a)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **b)** Filme controle do polissacarídeo EC 00:100 AH **c)** Filme controle do polissacarídeo reticulado EC 00:100 AHR **d)** EC 95:05 AH **e)** EC 95:05 AHR **f)** EC 90:10 AH e **g)** EC 90:10 AHR.

5. CAPÍTULO 2

Exploração de matrizes lipídico-poliméricas em escala nanométrica para aplicações na liberação de fármacos

Resumo

Introdução: O progresso na liberação de fármacos e uma melhor qualidade de vida para os pacientes dependem do desenvolvimento de novos e adequados sistemas carreadores, com ausência de efeitos inequívocos, baixa toxicidade sistêmica e efeitos colaterais reduzidos. Nanopartículas lipídico-poliméricas têm sido exploradas para a produção de nanocarreadores devido as suas características e aplicações, tais como alta EEC, estabilidade físico-química e propriedades de liberação controladas.

Áreas abordadas: Nesta revisão são descritas diversas nanopartículas híbridas obtidas a partir da mistura de um polímero a uma matriz lipídica. Esta associação pode potencializar a eficácia dos sistemas de liberação de fármacos, devido à melhoria na EEC e capacidade de carga, adequando à liberação do ativo farmacoterapêutico de acordo com o propósito terapêutico e aumentando sua captação, por direcionamento a receptores específicos. Ao contrário das nanopartículas lipídicas, estas nanopartículas híbridas podem diminuir a rápida liberação inicial e promover uma liberação mais sustentada e localizada do fármaco.

Expert Opinion: Nanopartículas lipídico-poliméricas são veículos versáteis para a liberação de fármacos por diferentes vias de administração e tratamento de múltiplas doenças. Diferentes lipídeos sólidos, polímeros, tensoativos e técnicas têm sido investigados para a produção desses transportadores, revelando a importância da sua composição para alcançar as características ótimas para a entrega dos ativos farmacoterapêuticos.

Palavras-chave: nanopartícula híbrida, lipídeo, nanopartícula lipídico-polimérica, nanopartícula, polímero.

Destaques do artigo

- * SLN são consideradas veículos seguros para a entrega de fármacos e são compostas de lipídeos no estado sólido as temperaturas ambiente e corporal.
- * Para superar algumas desvantagens das SLN, diferentes nanopartículas baseadas em lipídeos tem sido desenvolvidas, tais como os NLC, LDC e mais recentemente as nanopartículas lipídico-poliméricas.
- * Estes sistemas de nanopartículas híbridas podem incorporar fármacos com diferentes propriedades físico-químicas e, ser administrados por diferentes rotas, de acordo com o alvo terapêutico.
- * As nanopartículas lipídico-poliméricas têm mostrado resultados promissores para a entrega de fármacos.

1. Introdução

O desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos é uma demanda constante para assegurar o progresso na terapia medicamentosa, principalmente devido a grande quantidade de moléculas bioativas que ainda possuem alguns inconvenientes intrínsecos relacionados com a falha terapêutica, tais como a baixa solubilidade e permeabilidade, a rápida eliminação do organismo e alta toxicidade de fármacos (Charcosset, El-Harati e Fessi, 2005; Mehnert e Mäder, 2001). Neste contexto, a nanotecnologia revolucionou o desenvolvimento de novas terapias. O desenvolvimento de sistemas para liberação de fármacos em nanoescala está fornecendo ferramentas que permitem a captação destes através das barreiras fisiológicas, elevando sua biodisponibilidade e diminuindo sua toxicidade e efeitos adversos.

Na década de 1990 as SLN foram introduzidas com o propósito de reunir as vantagens de outros carreadores coloidais como as nanopartículas poliméricas, nanoemulsões e lipossomos (Hou *et al.*, 2003; Müller, Mäder e Gohla, 2000; Uner e Yener, 2007), entretanto, evitando algumas de suas desvantagens (Müller, Radtke e Wissing, 2002). O diâmetro médio das partículas frequentemente fica na faixa de 50-1000 nm e, são compostas de lipídeos no estado sólido às temperaturas ambiente e corporal (Battaglia e Gallarate, 2012; Ekambaram e Abdul Hasan Sathali, 2012; Müller, Radtke e Wissing, 2002). Os lipídeos utilizados para produzir as SLN são fisiologicamente bem tolerados, apresentando menor risco de toxicidade aguda e crônica (Mehnert e Mäder, 2001; Saupe e Rades, 2006). Além disso, as SLN também podem controlar e/ou direcionar a entrega do fármaco, melhorar a estabilidade dos ativos e, conseqüentemente, melhorar a sua biodisponibilidade, ademais podem facilmente ser transpostas para produção em escala industrial (Ekambaram e Abdul Hasan Sathali, 2012). Devido a todas estas características as SLN têm atraído cada vez mais atenção nos últimos anos e têm sido amplamente estudadas para encapsular fármacos anti-cancerígenos (Wong *et al.*, 2007), incorporar ou adsorver proteínas e peptídeos (Almeida e Souto, 2007) e também para ser utilizadas na liberação de genes (Bondi e Craparo, 2010). Além do mais, as SLN foram testadas em diferentes vias de administração, como a parenteral (Joshi e Müller, 2009; Wissing, Kayser e Müller, 2004), oral (Luo *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2007), ocular (Seyfoddin, Shaw e Al-Kassas, 2010), pulmonar (Weber, Zimmer e Pardeike, 2014), dérmica (Müller, Radtke e Wissing, 2002; Pardeike, Hommos e

Müller, 2009) e retal (Din *et al.*, 2015). Embora as SLN apresentem muitas vantagens, algumas limitações também foram relatadas, tais como baixa capacidade de carga de fármaco, elevado teor de água das dispersões que pode acarretar na expulsão dos compostos ativos durante o armazenamento, as transições polimórficas e cristalinidade do lipídeo (Mehnert e Mäder, 2001; Wissing, Kayser e Müller, 2004). Para superar estas desvantagens, uma nova geração de nanopartículas lipídicas constituída por NLC e LDC foi desenvolvida através da introdução de modificações na SLN.

Os NLC são produzidos por mistura de diferentes blendas de lipídeos sólidos e líquidos (óleos), preferencialmente na razão de 70:30 a 99: 1, diminuindo o ponto de fusão das misturas comparado ao lipídeo sólido sozinho. A consequência natural para a matriz lipídica é um aumento da capacidade de carga do fármaco, devido a matriz menos ordenada, que resulta em mais espaços disponíveis para os fármacos no núcleo das nanopartículas, reduzindo a potencial expulsão do composto ativo durante a armazenagem (Müller, Radtke e Wissing , 2002; Pardeike, Hommoss e Müller, 2009; Weber, Zimmer e Pardeike, 2014). Já os LCD foram desenvolvidos como uma abordagem diferenciada para melhorar a capacidade de carga de fármacos hidrófilos, de modo que a lipofilicidade desses fármacos possa ser aumentada pela sua conjugação com lipídeos e, qualquer um deles possa ser preparado por formação de sal ou por ligação covalente (Battaglia e Gallarate, 2012; Joshi e Müller, 2009; Muchow, Maincent e Muller, 2008).

Recentemente, uma nova abordagem para melhorar as características das nanopartículas à base de lipídeos tem sido baseada na modificação da matriz lipídica com polímeros, criando uma matriz lipídico-polimérica carregada com fármacos. Essas plataformas estão completamente descritas nesta revisão. A associação física entre polímeros e lipídeos na mesma partícula é capaz de aumentar a EEC e capacidade de carga de fármacos, tendo como vantagem a presença de porções do polímero para atingir receptores específicos das células e diminuir a rápida libertação inicial geralmente associada às SLN. Estas partículas híbridas são boas alternativas para diminuir a toxicidade sistêmica e o número de administrações, consequentemente reduzindo os efeitos colaterais e melhorando a adesão ao tratamento pelos pacientes.

O objetivo desta revisão foi descrever plenamente os resultados mais recentes da utilização de nanopartículas lipídico-poliméricas. Assim, é importante entender como os polímeros podem melhorar as características das matrizes

lipídicas, quais polímeros têm sido estudados até o momento e como eles são incorporados na matriz para carrear os fármacos, se eles são hidrofílicos ou lipofílicos e também as diferentes doenças que podem ser potencialmente tratadas a partir da utilização desses carreadores.

2. Nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas

2.1 Tipos de nanopartículas lipídico-poliméricas

Os polímeros podem estar presentes nas nanopartículas em quatro diferentes maneiras: (1) envolvendo o núcleo lipídico sólido, (2) complexado com o fármaco, (3) disperso na matriz lipídica sólida, ou (4) no núcleo polimérico (Figura 1). Por exemplo, quando a zidovudina, um modelo de ativo hidrofílico, foi encapsulado em uma nanopartícula lipídico-polimérica, o polímero pemulen criou uma camada em torno da matriz de Cutina[®] HR. Neste sistema carreador, o lipídeo em que a droga estava dispersa necessitava de características polares, uma vez que a zidovudina é hidrofílica, de modo que os grupos hidroxila da Cutina[®] HR podem proporcionar um ambiente parcialmente hidrofílico para acomodar a droga no interior da matriz sólida. O polímero pemulen, o qual é uma macromolécula anfipática devido à presença tanto de regiões hidrofílicas (blocos de ácido poli-acrílico) quanto lipofílicas (unidades de metacrilato), pode ajudar a reduzir a tensão interfacial entre o lipídeo e a fase aquosa externa, facilitando a encapsulação da zidovudina (Kumbhar e Pokharkar, 2013). Além disso, o pemulen pode criar uma barreira de difusão que pode ajudar no controle de liberação do fármaco (Pokharkar, Jolly e Kumbhar, 2015).

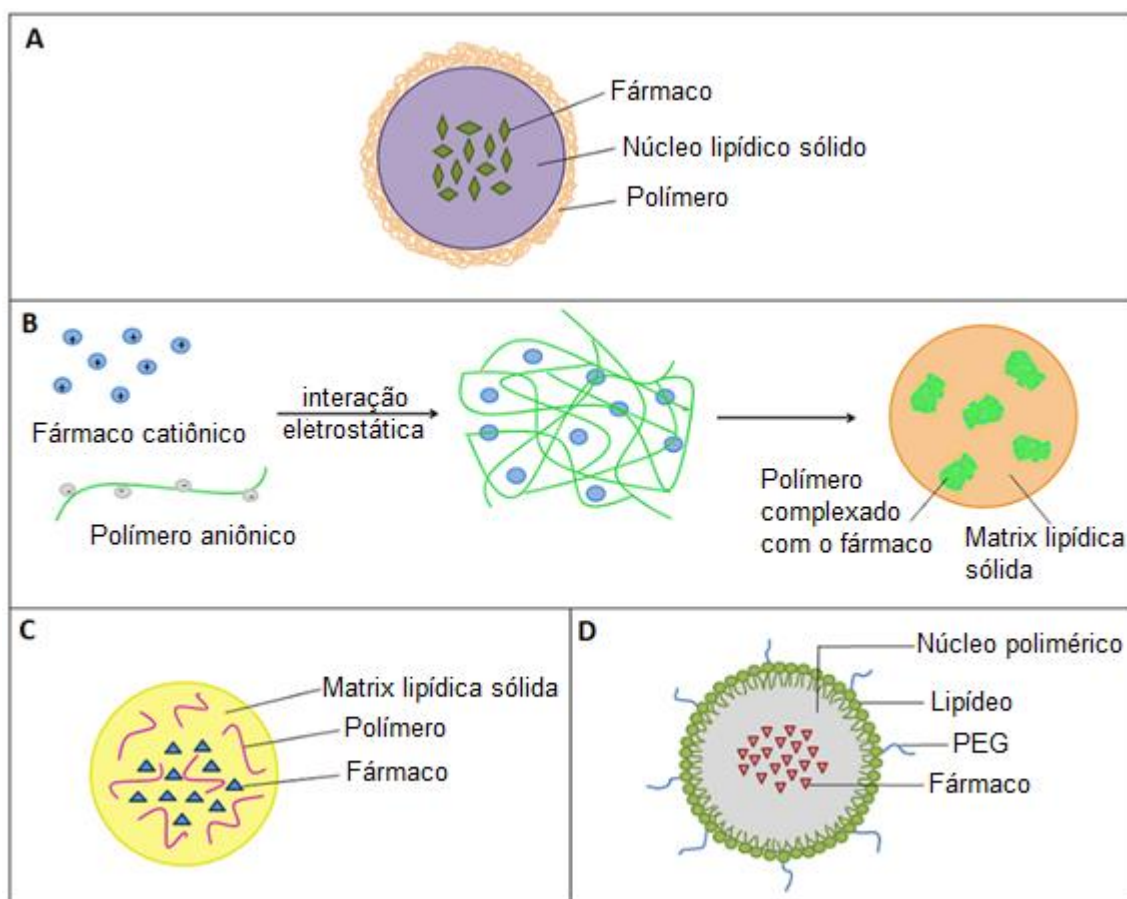


Figura 1 Diferentes tipos de nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas, considerando a localização do polímero. (a) envolvendo o núcleo lipídico sólido, (b) complexado com o fármaco, (c) disperso na matriz lipídica sólida, ou (d) formando um núcleo polimérico.

A formação do complexo iônico entre polímeros aniônicos e fármacos catiônicos pode aumentar a sua encapsulação no interior das nanopartículas lipídico-poliméricas, melhorando sua biodisponibilidade. Exemplos disso é a produção de nanocarreadores contendo sulfato de dextrano para entrega de doxorrubicina / verapamil ou quinidina / verapamil (Wong *et al.*, 2004) e complexo de alginato de sódio – sulfato de polimixina B encapsulado em SLN (Severino *et al.*, 2015). Este último revelou ser menos tóxico do que a polimixina livre e melhorou a concentração inibidora mínima contra as cepas avaliadas. Em adição a complexação iônica entre o sulfato de dextrano e doxorrubicina, Ramasamy *et al.* (2014) desenvolveram um transportador em que o núcleo lipídico sólido contendo o complexo foi revestido com duas camadas de polímeros para potencializar as características de entrega das nanopartículas. A primeira camada foi composta de quitosana interagindo com AH por interação eletrostática, em que as cadeias mais curtas do AH se difundem entre as cadeias longas do polímero quitosana. O HA

pode ser útil para controlar a cinética de libertação do fármaco e atuar como porção de direcionamento, garantindo uma constante exposição no local do tumor e, assim, apresentando uma citotoxicidade sistêmica reduzida, além de aumentar o efeito terapêutico da doxorubicina.

Outra estratégia utilizada é a incorporação da curcumina em nanopartículas lipídico-poliméricas compostas por ácido esteárico como o lipídeo sólido, PHEMA como polímero e Pluronic F68 como emulsionante. Estas nanopartículas permitiram uma alta carga de fármaco e o esforço conjunto para encapsular a curcumina pareceu ser promissor, devido ao potencial de circulação sistêmica por longo prazo (Kumar *et al.*, 2014). Além disso, em alguns trabalhos, o PLGA foi muito importante para formar a emulsão primária A/O emulsão durante a preparação das SLN, sendo que quando o seu conteúdo aumentou, a estabilidade da emulsão foi melhorada bem como a EEC e a capacidade de carregamento do fármaco também aumentou (Wang *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011).

Uma estratégia diferente pode utilizar o polímero para criar o núcleo das nanopartículas e, este ser circundado por lipídeo conjugado com cadeias de PEG, permitindo um longo tempo de meia-vida plasmática. Estas nanopartículas tendem a acumular-se no citoplasma das células e a libertação do fármaco pode ocorrer por hidrólise progressiva da matriz polimérica no ambiente lisossomal (Mandal *et al.*, 2016; Palange *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014).

A maioria das nanopartículas lipídico-poliméricas apresenta uma libertação controlada ou sustentada do fármaco, com a rápida libertação inicial reduzida. Abbaspour *et al.* explicam que a rápida libertação inicial pode estar relacionada com a acumulação dos fármacos hidrofílicos na interface O/A e na camada exterior das nanopartículas durante a preparação destas. Por outro lado, quando o fármaco está aprisionado no núcleo lipídico, uma libertação mais prolongada seria alcançada (Abbaspour *et al.*, 2014). Portanto, a incorporação do polímero (ionicamente complexado com o fármaco ou disperso na matriz lipídica) pode facilitar o particionamento do fármaco na fase lipídica, aumentando a quantidade de fármaco aprisionado no interior da matriz lipídica e resultar numa libertação mais prolongada do fármaco. Polímeros circundando o núcleo lipídico sólido podem oferecer uma barreira para a difusão do fármaco incorporado e da mesma forma resultar em um melhoramento do perfil de libertação mais sustentado.

Ainda falando sobre a estabilidade, em algumas pesquisas foram estudados o perfil estabilidade das nanopartículas lipídico-poliméricas armazenadas. Em alguns

deles avaliou-se durante 1 ou 2 semanas outros 1-6 meses ou até um ano (em diferentes condições de temperatura). Em todos os testes, não houve alterações significativas nas características de nanopartículas híbridas, tais como o tamanho das partículas, potencial zeta, ou porcentagem de encapsulação do fármaco, o que demonstra a sua estabilidade sobre diferentes condições. Por exemplo, Ridolfi *et al.* (2012) avaliaram as nanopartículas lipídico-poliméricas durante 1 ano a 4 °C ao abrigo da luz. Os resultados indicaram uma alta estabilidade física, explicada pelos altos valores de potencial zeta ($55,9 \pm 3,1$ no tempo zero e após 1 ano de $63,7 \pm 2,7$ mV). Em geral, as partículas podem ser dispersas de forma estável quando o valor absoluto do potencial zeta fica acima de 30 mV devido à repulsão elétrica entre as partículas.

Pokharkar *et al.* (2015) avaliaram a estabilidade das nanopartículas híbridas armazenadas em três temperaturas diferentes, a 4°C, 25°C / 60% de UR, e 40 °C / 75% UR e também obtiveram bons resultados. Ao fim de 6 meses, os tamanhos foram de $240 \pm 2,1$, $248 \pm 3,42$, e $251 \pm 4,2$ nm e a EEC foi calculada como sendo $82,19 \pm 2,1\%$, $80,73\% \pm 3,7$ e $78,91 \pm 2,19\%$, para cada temperatura, respectivamente. Ademais, o potencial zeta também permaneceu entre $-40,16 \pm 2,53$ e $-43,16 \pm 3,13$ mV em todas as três condições de temperatura.

Além disso, todas as nanopartículas lipídico-poliméricas tinham uma morfologia semi-esférica a esférica e o tamanho médio de partícula variou entre 50 e 900 nm. Estas partículas de tamanho submícron e também o estado sólido dos transportadores fisiológicos baseados em lipídeos favorecem as aplicações farmacêuticas e biofarmacêuticas das nanopartículas lipídico-poliméricas.

Microesferas desenvolvidas para entrega cólon-específica de fármacos alcançaram uma liberação controlada pH-dependente do fármaco (Gao *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2013). A captação das microesferas carregadas com HCPT no TGI superior foi diminuída e aumentou no tecido colônico. Isto foi confirmado por estudos farmacocinéticos que compararam os resultados entre microesferas híbridas e entéricas. Após administração oral, as microesferas entéricas liberaram a HCPT no íleo ou região ileocecal, resultando em uma maior concentração do fármaco para absorção sistêmica antes de atingirem o cólon. Por outro lado, devido à lenta e incompleta liberação da HCPT a partir das microesferas lipídico-poliméricas no íleo terminal, o tempo do pico de absorção do fármaco foi retardado para 6 h (em contraste com 2 h das microesferas entéricas), sendo facilmente retidas pela

mucosa quando alcançam o cólon, e diminuindo a possibilidade de biodisponibilidade sistêmica.

Testes *in vitro* mostraram que a insulina encapsulada em nanopartículas preparadas com SA-R8, passam através de uma monocamada de células Caco-2 de forma mais eficiente do que a insulina não encapsulada (Zhang *et al.*, 2012). Além disso, as nanopartículas lipídico-poliméricas carregadas com insulina promoveram uma internalização 8 vezes maior do hormônio nestas células comparadas com SLN carregadas com insulina. A Figura 2 mostra os perfis de glicose em resposta à administração subcutânea ou duodenal em ratos diabéticos-estreptozocina e encontra-se em acordo com os estudos acima mencionados, que estas nanopartículas híbridas são uma ferramenta útil para a entrega de macromoléculas através das membranas celulares. De acordo com os autores, as nanopartículas lipídico-poliméricas alcançaram bons efeitos hipoglicêmicos, com um máximo de glicose sanguínea abaixo de 29,7% em 1,5 h, melhor do que as SLN carregadas com insulina, que foi de 73,2% em 2 h.

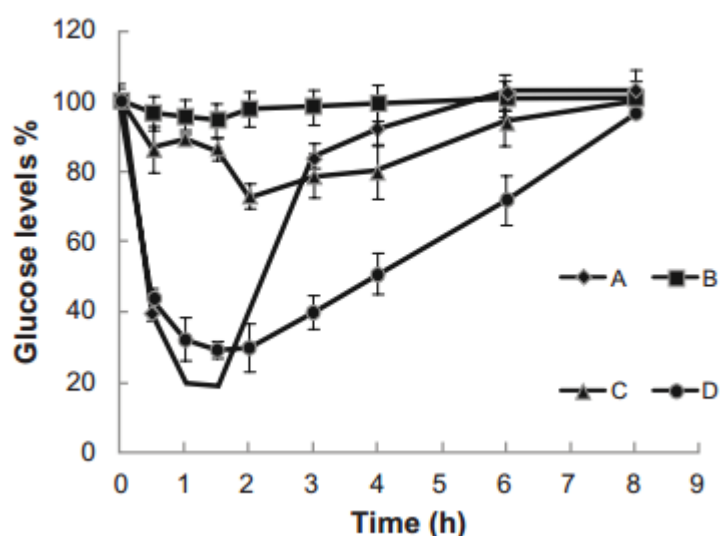


Figura 2 Perfis de resposta de glicose no sangue em circulação após administração subcutânea ou duodenal em ratos diabéticos. (A) administração subcutânea de insulina (2 UI.kg^{-1}); (B) solução padrão de insulina (25 UI.kg^{-1}); (C) administração duodenal de Ins-SLN (25 UI.kg^{-1}); (D) SA-R8.Ins-SLN (25 UI.kg^{-1}). Adaptado com permissão a partir de Zhang *et al.*, 2012.

Outro transportador, as nanopartículas lipídico-poliméricas preparadas com WGA também melhora a absorção intestinal de insulina (Zhang *et al.*, 2006). Estas nanopartículas protegeram a insulina da degradação por enzimas digestivas em

testes *in vitro* e em testes *in vivo* exibiram melhores efeito hipoglicêmico após administração oral. Este sistema apresentou uma biodisponibilidade relativa de insulina de 7,11% em comparação com insulina subcutânea e SLN carregadas com insulina com apenas 4,99%. Estes resultados ocorreram porque as nanopartículas lipídico-poliméricas melhoraram a absorção intestinal da insulina, diminuindo os níveis de glicose no sangue.

2.2 Efeitos das interações polímero-lipídeo-fármaco

As nanopartículas lipídico-poliméricas podem ser administradas por diferentes vias, por isso é importante entender como os polímeros podem interferir na interação célula-matriz lipídica ou como o conjunto lipídeo-polímero atuam em nível celular.

A via nasal foi escolhida para analisar a liberação do TDF encapsulado em nanopartículas híbridas em um gel (Pokharkar, Jolly e Kumbhar, 2015). A permeação do fármaco através da mucosa nasal foi melhorada por ação do ácido láurico, que pode aumentar a fluidez dos fosfolipídios da membrana, e do polímero pemulen que pode abrir as junções apertadas aumentando o transporte via paracelular. Estudos histopatológicos após a permeação das nanopartículas não mostrou efeito significativo na estrutura de mucosa.

A quitosana é conhecida por suas propriedades bioadesivas, de modo que quando este polissacarídeo é utilizado para administração tópica de um fármaco é possível aumentar a retenção do fármaco no local de ação, dado que suas cargas positivas ajudam na adesão à pele, carregada negativamente. Além disso, a atividade antimicrobiana da quitosana pode ser somada a certos componentes ativos. Em seu estudo, Ridolfi *et al.* (2012) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas lipídico-poliméricas carregadas com tretinoína em queratinócitos, porque estas são as células residentes predominantes na epiderme, e observaram ausência de citotoxicidade. Além disso, uma melhor atividade antibacteriana contra *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* foi alcançada com as nanopartículas híbridas. Foi necessária uma baixa concentração de nanopartículas lipídico-poliméricas para inibir o crescimento destas bactérias, em comparação com SLN carregadas com tretinoína.

A administração de HCPT e insulina foram avaliadas por via oral. Para o primeiro, o polímero (Eudragit S100) empregou um papel importante para distribuir o fármaco para o local da ação (Gan *et al.*, 2013). Por outro lado, os polímeros usados

na fabricação de nanocarreadores para a administração de insulina foram responsáveis por proteger o hormônio da degradação enzimática e aumentar a sua absorção e efeito hipoglicêmico [38,39]. Assim, em ambos os casos, os polímeros foram usados para proteger os fármacos do ambiente hostil do TGI superior.

A via parenteral é a mais comum para administração de fármacos anticancerígenos e os polímeros influenciam a cinética de liberação do fármaco, prolongando o tempo de meia-vida plasmática e diminuindo as interações desnecessárias entre proteínas do plasma e as nanopartículas. As nanopartículas lipídico-poliméricas formuladas por Palange *et al.* (2014) foram constituídas por um núcleo polimérico que foi responsável pela liberação do fármaco através de hidrólises progressivas no ambiente lisossômico. Por outro lado, a camada lipídica e cadeias de PEG que formaram um revestimento de superfície, proporcionariam uma meia-vida plasmática mais longa.

3. Aplicação das nanopartículas lipídico-poliméricas na liberação de fármacos

Ambos os polímeros sintéticos e naturais são utilizados para produzir novos sistemas de entrega de fármacos. A Tabela 1 resume a composição de várias nanopartículas lipídico-poliméricas modificadas e também descreve os fármacos que foram incorporados nas nanopartículas híbridas, além de mostrar que estes sistemas podem encapsular diferentes componentes ativos, de várias classes terapêuticas.

Tabela 1 Lipídeos e polímeros utilizados para produzir nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas carregadas com fármacos.

Lipídeo	Polímero	Fármaco encapsulado	Arranjo da matriz	Referência
Compritol 888 ATO	Eudragit S100	HCPT	Polímero complexado com o fármaco no interior da matriz lipídica	36, 37
Ácido esteárico	Sulfato de dextrina	Doxorubicina, Verapamil e Quinidina Clindamicina	Polímero complexado com o fármaco no interior da matriz lipídica	24, 34
Ácido esteárico	Alginato de sódio	Clindamicina	Polímero complexado com o fármaco no interior da matriz lipídica	34
Ácido esteárico	Metacrilato de poli-hidroxietilo	Curcumina	Matriz lipídico-polimérica	27
Cutina [®] HR	Pemulen [™]	Zidovudina	Polímero envolvendo o núcleo lipídico	22
Ácido Dodecanoico	Sulfato de dextrina	Verapamil	Polímero complexado com o fármaco no interior da matriz lipídica	40
Miristil miristato	Quitosana	Tretinoína	Polímero envolvendo o núcleo lipídico	35
Álcool cetílico	Alginato de sódio	Polimixina B	Polímero complexado com o fármaco no interior da matriz lipídica	25
Ácido esteárico	PEG	Bitartarato de vinorelbina	Matriz lipídico-polimérica	50
Óleo de rícino hidrogenado	PLGA	Insulina Plasmídeo de DNA	Matriz lipídico-polimérica	28-30
Ácido esteárico	Polímero do óleo de soja	Doxorubicina	Polímero complexado com o fármaco no interior da matriz lipídica	51
Monoestearina	Quitosana	Doxorubicina	Polímero envolvendo o núcleo lipídico	48
Monoestearina	Conjugado de PEG-ácido esteárico	Paclitaxel	Matriz lipídico-polimérica	49
Ácido esteárico + fosfolipídio de soja	SA-R8	Insulina	Polímero envolvendo o núcleo lipídico	38

Ácido esteárico + lecitina	WGA	Insulina	Polímero envolvendo o núcleo lipídico	39
Ácido laurílico	Pemulen™	Fumarato de disoproxil tenofovir	Polímero envolvendo o núcleo lipídico	23
Compritol 888 ATO	Sulfato de dextrina, quitosana e ácido hialurônico	Doxorubicina	Polímero complexado com o fármaco no interior da matriz lipídica e este envolto por polímeros	26
Ácido esteárico + lecitina de soja + óleo de soja	Ácido hialurônico	5-fluorouracil e cisplatina	Polímero envolvendo o núcleo lipídico	42
Fosfatidilcolina de soja hidrogenada e 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [metoxi (polietilenoglicol)-2000 (DSPE-PEG2000)	Policaprolactona	Erlotinibe	Lípídeo envolvendo o núcleo polimérico	33
DPPC e DSPE-PEG2000	PLGA	Curcumina	Lípídeo envolvendo o núcleo polimérico	31
Lecitina e DSPE-PEG2000	PLGA	Verde de indocianina	Lípídeo envolvendo o núcleo polimérico	32

DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina; PEG: polietilenoglicol; PLGA: ácido poli (lático-co-glicólico); SA-R8: conjugado ácido esteárico-octaarginina; WGA: conjugado de germen de trigo aglutinina-N-glutaril-fosfatidiletanolamina.

Eudragit S100 é um polímero sintético utilizado para a produção de microesferas lipídico-poliméricas para entrega cólon-específica de fármacos, com uma liberação do fármaco dependente do pH (Gao *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2013). Conseqüentemente, uma menor toxicidade sistêmica e uma terapia mais eficaz provavelmente podem ser conseguidas com estas partículas, porque o lipídeo (Compritol 888 ATO) e o polímero (Eudragit S100) têm uma ação sinérgica para a liberação do fármaco ao local de ação. Este sinergismo ocorre devido ao arranjo do lipídeo e polímero, que permite a libertação do fármaco para o cólon porque o lipídeo sólido impede o rápido ou prematuro intumescimento do polímero e, assim, ajuda a controlar a libertação do fármaco. Por conseguinte, o polímero forma uma película em ambas as superfícies interna e externa da matriz lipídica, permitindo a libertação do fármaco sensível ao pH e a matriz lipídica pode restringir a propriedade de intumescimento do Eudragit, diminuindo a libertação prematura do fármaco causada pelo intumescimento do polímero. O revestimento polimérico é formado durante o processo de liofilização, devido a uma solidificação anterior do lipídeo em relação ao polímero. O Compritol 888 ATO pode solidificar imediatamente após ser pulverizado, mesmo antes da imersão em nitrogênio líquido, ao passo que o Eudragit S100 não solidifica até que ele entre em contato com o nitrogênio líquido; assim, a maior parte do polímero pode condensar-se na superfície do lipídeo solidificado durante o processo. O fármaco modelo destes estudos foi a HCPT, um análogo semissintético da camptotecina, um fármaco insolúvel, que tem sua absorção sistêmica reduzida consideravelmente após administração desses transportadores, pois o sistema poderia promover uma libertação prolongada, diminuindo a libertação do fármaco no TGI superior e alvejar seletivamente o tecido doente no cólon.

O sulfato de dextrina é um polissacárido aniônico e polímero natural utilizado para formar complexos com fármacos catiônicos, para melhorar a EEC dos fármacos em SLN ou nanopartículas lipídico-poliméricas (Abbaspour *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2008; Ramasamy *et al.*, 2014; Severino *et al.*, 2015). Este polímero comumente utilizado com um peso molecular de 5 kDa forma interações eletrostáticas com os componentes ativos, influenciando na sua liberação sustentada, uma vez que as fortes interações iônicas formam um complexo hidrofóbico, prolongando a sua retenção na matriz lipídica, a qual é representada pela Figura 1 (b). A complexação do sulfato de dextrina com fármacos pode ser afetada pelo grau de substituição, comprimento da cadeia e densidade de ramificação do polímero aniônico. Além disso, as interações do complexo com a matriz lipídica sólida podem influenciar no

perfil de libertação do fármaco, o qual ocorre, principalmente, por mudança iônica e difusão.

O alginato de sódio, outro polímero natural biocompatível é obtido a partir de algas castanhas e o seu peso molecular varia entre 150-170 Da. Ele tem sido empregado na melhoria da lipofilicidade de fármacos catiônicos por complexação e, em específico, para antibióticos, tais como a clindamicina e polimixina B, dois fármacos amplamente utilizadas para o tratamento de certos tipos de doenças infecciosas. A formação do complexo é extremamente importante para aumentar a capacidade de carga de fármaco e a EEC do ativo hidrofílico nas nanopartículas à base de lipídeos (Abbaspour *et al.*, 2013; Severino *et al.*, 2015). A encapsulação do complexo em nanopartículas lipídicas é geralmente realizada por homogeneização a alta pressão. Em um teste de sensibilidade aos antibióticos, Severino *et al.* demonstraram que o complexo alginato de sódio / polimixina (relação 1:1) encapsulado em nanopartículas lipídicas aumentou a solubilidade do fármaco na membrana bacteriana, aumentando a inibição total do crescimento bacteriano (Severino *et al.*, 2015).

O AH, um polissacarídeo biodegradável e biocompatível, tem despertado para várias aplicações biomédicas (Chang *et al.*, 2015; Nagarwal, Kumar e Pandit, 2012; Tsai *et al.*, 2016; Ying *et al.*, 2011). Han *et al.* (2012) demonstraram que o AH, peso molecular de 1000 kDa, foi incapaz de abrir as junções apertadas entre as células epiteliais, sugerindo que pode apresentar uma boa segurança a longo prazo. Além disso, a afinidade do AH para os receptores CD44 super expressos em muitas células tumorais, faz deste polímero natural um ligando potente para o direcionamento da liberação de fármacos anticancerígenos (Chang *et al.*, 2015; Nagarwal, Kumar e Pandit, 2012; Ramasamy *et al.*, 2014). Anteriormente, Ramasamy *et al.* (2014) produziram nanopartículas híbridas para liberação retardada de doxorubicina. A droga foi complexado com sulfato de dextrina e suspensos numa matriz lipídica revestida com duas camadas de polímeros, a primeira formada pela quitosana de baixo peso molecular e externamente revestidas com AH de 3 kDa. Os grupos carboxilo do AH interagem ionicamente com os grupos amina da quitosana e, esta camada pode controlar a degradação da matriz lipídica e minimizar a adsorção de proteínas e a opsonização na corrente sanguínea, prolongando à meia-vida plasmática das nanopartículas. Após administração de uma dose intravenosa única (10 mg.kg^{-1}) de cada nanopartícula em ratos, o fármaco livre foi rapidamente eliminado da circulação (no prazo de 6 h) em comparação com as nanopartículas

híbridas que mantiveram os níveis terapêuticos do fármaco durante todo o período de estudo (Figura 3). Além disso, estudos farmacocinéticos revelaram que as nanopartículas lipídico-poliméricas carregadas com doxorubicina apresentaram um tempo de retenção máximo, seis vezes maior do que o fármaco livre e 1,5 vezes maior do que a doxorubicina encapsulada em SLN.

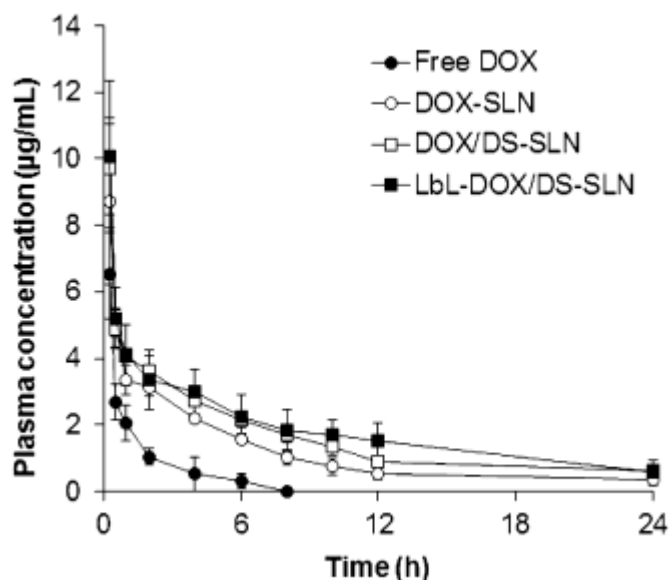


Figura 3 Perfis de concentração plasmática-tempo dos diferentes nanosistemas após administração intravenosa em ratos. Adaptado com permissão, a partir de Ramasamy *et al.*, 2014.

Em outro estudo, foi desenvolvido um NLC carregado com cisplatina e revestido com AH. Esses carreadores foram administrados em ratos BALB/c, e demonstraram ser eficazes para inibir tumores gástricos (Qu *et al.*, 2015). Os autores propõem que a toxicidade sistêmica inferior das nanopartículas revestidas em comparação com a cisplatina livre e os transportadores não revestidos, ocorreu provavelmente devido à presença de AH e a sua afinidade para receptores específicos (Nagarwal, Kumar e Pandit, 2012). Tanto a cisplatina quanto o 5-Fluoracil são indicados para a quimioterapia de câncer gástrico, no entanto, eles apresentam algumas desvantagens, tais como nefrotoxicidade no caso da cisplatina, e mucosite, náusea e emese no caso de 5-Fluoracil. Estes inconvenientes podem ser evitados pela sua encapsulação no carreador desenvolvido.

A curcumina, um composto natural hidrofóbico extraído da *Curcuma longa*, tem demonstrado propriedades anticancerígenas, mas pode sofrer degradação em pH alcalino e tem uma fraca biodisponibilidade oral. Para superar estes problemas e promover uma liberação prolongada, a curcumina foi encapsulada em

nanopartículas híbridas preparadas com ácido esteárico e PHEMA, um polímero hidrofílico obtido a partir de metacrilato de 2-hidroxietilo (Kumar *et al.*, 2014). Estas nanopartículas lipídico-poliméricas podem ser promissores nanocarreadores devido ao seu potencial de circulação sistêmica a longo prazo, resultante da combinação do PHEMA e ácido esteárico preparado com copolímeros tensoativos não iônicos (Pluronic F-68) como agente emulsionante. Este sistema de entrega de fármaco demonstrou ser um método alternativo eficaz potencial em relação aos tratamentos convencionais para o tratamento de tumores na linha celular MCF-7.

Pemulen é um emulsionante polimérico comercial com elevado peso molecular (cerca de 500 kDa), composto por copolímeros reticulados de ácido acrílico e uma porção hidrofóbica. Ele é capaz de formar uma rede de gel em volta do núcleo lipídico carregado com fármaco (preparado com Cutina[®] HR ou ácido láurico), de modo que a concentração do polímero é um fator importante na estabilização das dispersões de nanopartículas lipídico-poliméricas que contêm agentes ativos hidrófilos (Kumbhar e Pokharkar, 2013; Pokharkar, Jolly e Kumbhar, 2015). O pemulen pode formar uma barreira que ajuda a encapsular fármacos e controlar a sua liberação a partir da matriz de nanopartículas. Pokharkar, Jolly e Kumbhar (2015) descrevem a formação de uma forte ligação de hidrogênio entre o grupo amino do fármaco e o grupo carboxila do polímero. Este fármaco foi o TDF, um inibidor da transcriptase reversa de nucleotídeos que atua contra o HIV, mas que é uma molécula de baixa biodisponibilidade oral. Para superar este problema, como mencionado anteriormente, foi criada uma nanopartícula lipídico-polimérica para a sua administração por via nasal, usando ácido láurico associado com pemulen.

A quitosana é um polissacarídeo com propriedades biodegradáveis, biocompatíveis e bioadesivas. Uma vez que este polímero é carregado positivamente pode aderir a epitélios carregados negativamente e as membranas mucosas. Pode ser empregado em várias aplicações farmacêuticas, tais como a administração oral de insulina (Ying *et al.*, 2011), entrega ocular de fármacos (Yuan *et al.*, 2008) e, mais especificamente, para a córnea (Wan *et al.*, 2008) e também pode exibir atividade antibacteriana (Wong *et al.*, 2006). A quitosana tem sido utilizada em combinação com SLN para o tratamento tópico da acne, formando um revestimento sobre a superfície dos nanotransportadores (Ridolfi *et al.*, 2012). Neste sistema, o polissacarídeo (massa molar de 296,6 kDa e grau de desacetilação de $82,83 \pm 3,63\%$) aumentou a retenção de tretinoína no local de aplicação, melhorando a atividade antibacteriana e aumentando, assim, a eficácia terapêutica.

Derivados de quitosana também podem ser associados com SLN para a liberação de fármacos antitumorais (Jin, Ubonvan e Kim, 2010; Ramasamy *et al.*, 2014). Oligossacarídeo de quitosana, com peso molecular de 450 kDa, foi adsorvido sobre a superfície de carga negativa das SLN através de interação eletrostática, a qual pode controlar a taxa de liberação dos fármacos. O revestimento das SLN com oligossacarídeos de quitosana poderia reduzir a rápida liberação do medicamento comparativamente a SLN sem polímero (Jin, Ubonvan e Kim, 2010).

O PEG é um polímero comumente utilizado em produtos farmacêuticos e como aditivo em alimentos. A modificação de nanocarreadores com PEG é útil para inibir a absorção celular por sistemas mononucleares de fagocitose, aumentando a meia-vida plasmática das nanopartículas. SLN PEGuiladas têm sido aplicadas no desenvolvimentos de carreadores carregados com fármacos anticancerígenos, tais como o paclitaxel e bitartarato de vinorelbina, sendo observada uma boa biocompatibilidade das nanopartículas. A fagocitose durante a circulação sanguínea diminuiu e a absorção das nanopartículas por células cancerosas melhorou (Han *et al.*, 2012; Mukhopadhyay *et al.*, 2015).

Semelhante a outros fármacos anticancerígenos, o paclitaxel é eficaz contra muitos tumores sólidos, mas a sua aplicação é limitada pela pobre hidrofiliabilidade. Assim, o paclitaxel pode ser encapsulado em nanopartículas lipídico-poliméricas para melhorar a sua citotoxicidade (Mukhopadhyay *et al.*, 2015). Outra droga, o bitartarato de vinorelbina, um alcaloide da vinca semissintético, tem excelente hidrofiliabilidade, mas pode ser degradado a temperaturas elevadas, assim, para reter essa droga, é necessário utilizar uma técnica sem exposição ao calor, tal como a técnica de homogeneização a frio (Han *et al.*, 2012).

O PLGA é um polímero biocompatível e biodegradável aprovado pelo FDA (Wang *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2011; Zha *et al.*, 2011). O PLGA é uma molécula anfifílica, composta de ácido láctico (hidrofóbica) e ácido glicólico (hidrofílica), e pode ser usado para carregar peptídeos e proteínas hidrófilas ou plasmídeo de DNA em SLN. Ele tem sido usado numa vasta gama de pesos moleculares, entre 5-143 kDa, e pode desempenhar um papel importante para superar as dificuldades de encapsular proteínas hidrófilas ou DNA em SLN, e, em seguida, melhorar o seu potencial terapêutico. Além disso, nanopartículas lipídico-poliméricas baseadas em PLGA e associadas com PEG podem, ainda, originar uma meia-vida plasmática prolongada (Palange *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). A degradação dos nanotransportadores em pH ácido (5,0), como no ambiente lisossomal da célula

evita a perda de droga em locais com pH diferente, como durante a circulação (pH 7,4) e também maximiza a dose entregue às células-alvo (Palange *et al.*, 2014). O fármaco testado neste estudo foi de curcumina e devido à atividade anti-inflamatória foi utilizado para modular a expressão de proteínas envolvidas na proliferação de células de tumor, adesão e migração, diminuindo o processo metastático. Então, quando encapsulados em nanopartículas lipídico-poliméricas, o fármaco foi ativo em dois alvos diferentes, as células de câncer de mama circulantes (MDA-MB-231) e células endoteliais inflamadas.

Um polímero aniônico à base de óleo de soja foi obtido a partir de óleo de soja epoxidado e utilizado para produzir um novo sistema de nanopartículas lipídico-poliméricas para entrega de fármacos anticancerígenos (Qu *et al.*, 2015). Para formar o polímero hidrolisado, o óleo de soja epoxidado foi polimerizado por eterato dietílico de trifluoreto bórico e, em seguida hidrolisado com hidróxido de sódio. Após a produção, o peso molecular médio do polímero foi determinado por cromatografia de permeação em gel e verificou-se ser de cerca de 4,9 kDa. O complexo de doxorrubicina e polímero aniônico a base de óleo de soja foi encapsulado em SLN de ácido esteárico, e observou-se uma melhor eficácia contra células de câncer de mama resistentes a múltiplas drogas.

Outro polímero biodegradável amplamente utilizado na entrega de fármacos é a policaprolactona, o qual pode ser utilizado para distribuir fármacos de baixo peso molecular como o erlotinibe (Mandal *et al.*, 2016). Este medicamento é usado para tratar câncer de pulmão através da inibição do receptor do fator de crescimento epidérmico da tirosina quinase. A sua encapsulação em nanopartículas lipídico-poliméricas pode superar os efeitos adversos da administração oral. O transportador desenvolvido mostrou um perfil de liberação bifásico, sendo a difusão o mecanismo predominante de liberação do fármaco, e observou-se uma redução significativa da viabilidade celular de células A549 depois de 72 h, em comparação com uma solução erlotinibe. Além disso, observou-se uma acumulação de nanopartículas no citoplasma das células.

Um corante tricarbocianina, o verde de indocianina encapsulado em nanopartículas híbridas foi utilizado para avaliar a sua biodistribuição e acumulação em células tumorais (Zhao *et al.*, 2014). Estas nanopartículas melhoraram a estabilidade do corante e seu tamanho influenciou a endocitose e acumulação no tumor. Além disso, demonstraram ser seguras em estudos *in vivo*, sendo boas ferramentas para diagnóstico por imagem do câncer e para terapia fototérmica.

A nanotecnologia aplicada para a entrega de insulina tem sido profundamente questionada para evitar as administrações desconfortáveis do tratamento convencional do diabetes. A insulina apresenta alta hidrofiliabilidade, que dificulta a sua incorporação em núcleos lipídicos, enfrenta degradação em pH ácido e tem baixa biodisponibilidade oral (Wang *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012). Obviamente, a sua administração oral com biodisponibilidade aceitável, traria uma enorme contribuição para o tratamento do diabetes, melhorando a adesão do paciente. Foram desenvolvidos duas diferentes estratégias para modificar SLN e promover a administração oral de insulina (Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012). Uma usando o WGA e a outra usando AS-R8. Ambas SLN modificadas induziram a captação de insulina após a administração oral, e ensaios *in vitro* revelaram que esses sistemas foram capazes de proteger a insulina da degradação por enzimas digestivas e mostrou um melhor efeito hipoglicêmico.

4. Conclusão

De um modo geral, os resultados demonstraram um bom potencial das nanopartículas lipídico-poliméricas até o momento. As suas características, tais como morfologia, tamanho, carga superficial, estabilidade foram positivas, indicando um possível desempenho final de sucesso do sistema de libertação de fármacos para aplicações farmacêuticas e biofarmacêuticas. Um grande número de diferentes fármacos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, foram encapsulados nas nanopartículas híbridas com elevada EEC devido à associação entre lipídeos sólidos e polímeros, que favorecem o particionamento do ativo na fase lipídica e também melhoria do perfil de libertação, resultando numa libertação controlada de fármacos. Além disso, estas nanopartículas têm sido formuladas para administração por diferentes vias de administração, para tornar o seu acesso mais específico para o local de ação.

5. Expert opinion

As SLN têm atraído grande atenção desde o seu desenvolvimento no início da década de 1990, uma vez que mostraram boa biocompatibilidade, sendo bem tolerado pelo corpo humano. Apesar de ser considerado um veículo seguro para a libertação de fármacos, as SLN apresentam algumas desvantagens, tais como baixa

capacidade de carga de droga e liberação prematura do fármaco. Para superar estes inconvenientes, novos tipos de nanopartículas lipídicas foram desenvolvidos, como os NLC, LDC e as nanopartículas lipídico-poliméricas. Estas últimas são produzidas utilizando diferentes estratégias para facilitar a incorporação de fármacos no interior das matrizes lipídico-poliméricas. Em relação à entrega dos fármacos, é extremamente importante alcançar uma alta EEC e capacidade de carga dos ativos, garantindo a sua eficácia terapêutica. As nanopartículas lipídico-poliméricas desenvolvidas até o momento têm mostrado elevada EEC e capacidade de carga dos fármacos, além de bom desempenho *in vivo*. Ademais, estas nanopartículas híbridas têm o potencial para carregar ambos os fármacos hidrofílicos e lipofílicos e alvejar a sua entrega aos tecidos ou órgãos específicos.

As nanopartículas lipídico-poliméricas podem ser produzidas com diferentes lipídeos sólidos e polímeros de origem sintética ou natural, mas a sua combinação deve ser cuidadosamente considerada para evitar interações indesejáveis um com o outro e com o fármaco, que afetam negativamente as características do carreador. Quando a composição da nanopartícula híbrida é adequadamente considerada, ela pode encapsular uma grande variedade de componentes ativos, e ser administrada através de diferentes vias, de acordo com o alvo terapêutico. Os polímeros das nanopartículas híbridas podem desempenhar papéis importantes no prolongamento do tempo de meia-vida plasmática das nanopartículas, protegendo a estabilidade do fármaco, criando uma barreira de difusão que possa controlar a cinética de liberação dos fármacos e também atuar como porção de direcionamento para a entrega específica dos fármacos.

As nanopartículas híbridas têm sido utilizadas principalmente na terapia contra o câncer devido à sua capacidade para entrega do fármaco no alvo de ação, aumentando a eficácia da terapia e reduzindo os efeitos secundários potenciais, além de toxicidade; ou ainda usadas para administrar proteínas, tal como a insulina para administração oral, devido à capacidade dos transportadores para proteger as proteínas contra a degradação enzimática e aumentar a absorção intestinal. Estas capacidades das nanopartículas têm o potencial de melhorar drasticamente a qualidade de vida dos pacientes. Além dos resultados positivos obtidos até agora, o desenvolvimento de mais trabalhos são necessários para compreender profundamente as interações das nanopartículas híbridas com as células, revelando possíveis problemas de toxicidade e mostrando sua aplicação segura. Além disso, as interações entre polímeros, lipídeos e fármacos no interior das nanopartículas

têm de ser claramente compreendido para assegurar a estabilidade do fármaco bem com os mecanismos de liberação e seu direcionamento.

Os desenvolvimentos em curso das nanopartículas lipídico-poliméricas propuseram que estes transportadores são bons candidatos para a entrega uma ampla variedade de fármacos e para alcançar o mercado no futuro. Portanto, a qualidade de vida dos pacientes poderia ser imensamente melhorada e as condições patológicas graves poderiam ser tratadas por esses carreadores promissores.

AGRADECIMENTOS

B. Sarmiento gostaria de agradecer o suporte financeiro do projeto do Programa Ciências Sem Fronteiras, Pesquisador Visitante (Chamada de Projetos MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs nº 09/2014). D. Sgorla agradece a bolsa de mestrado financiada pelo Programa CAPES/FA (Chamada Pública 11/2014), ambos ligados ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF-UNIOESTE/ Paraná/ Brasil). P. Fonte agradece a Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal (SFRH/BD/78127/2011) pelo suporte financeiro. Os autores não têm outras afiliações relevantes ou envolvimento financeiro com qualquer organização ou entidade com um interesse financeiro ou conflito financeiro com o assunto ou materiais discutidos no artigo além dos divulgados.

6. CAPÍTULO 3

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídico-poliméricas
contendo insulina**

RESUMO: Este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de produzir e caracterizar um sistema carreador baseado em nanopartículas lipídico-polimérica contendo insulina, com o propósito de administrá-la por via oral. Esta alternativa torna-se atraente, haja visto que, além de aliviar a dor causada pelas constantes injeções do tratamento convencional do diabetes, as nanopartículas lipídico-polimérica também poderiam mimetizar uma rota fisiológica para a insulina. As nanopartículas, produzidas a partir da associação de etilpalmitato e HPMC-AS, por meio da técnica emulsificação-evaporação do solvente modificado, foram caracterizadas em relação ao tamanho, PDI, potencial zeta, EEC, morfologia, difratometria de raios-X e análise térmica. Além disso, conduziram-se estudos de liberação *in vitro*, bem como avaliação do transporte da insulina e, segurança contra células intestinais Caco-2 e HT29-MTX. As nanopartículas lipídico-polimérica desenvolvidas obtiveram tamanho médio satisfatório, $297,57\text{nm} \pm 29,99$, PDI de $0,247 \pm 0,03$ e potencial zeta de $-19,13 \pm 5,88$. Ademais, alcançou-se alta EEC (aproximadamente 84%) e o DSC demonstrou um aumento da estabilidade térmica das formulações em relação aos materiais puros, evidenciado pelos picos endotérmicos de desidratação, que diminuíram de intensidade e deslocaram-se para temperaturas superiores. Os resultados do DRX demonstraram alteração do estado cristalino para amorfo, inferindo a incorporação do fármaco. Na liberação cumulativa apenas 9% de insulina foi liberada após 2 h, totalizando aproximadamente 14% após 6 h, alterando, desta maneira, os resultados de permeabilidade através de modelo intestinal *in vitro*. Em relação à biocompatibilidade, as nanopartículas lipídico-poliméricas demonstraram ausência de citotoxicidade após 4 h. Por consequência, as evidências sugerem que estas poderão proteger a insulina das condições hostis encontradas no TGI, garantindo ainda a segurança da mucosa intestinal.

Palavras-chave: administração oral, carreador lipídico-polimérico, etilpalmitato, HPMC-AS, insulina, nanosistema.

1. INTRODUÇÃO

O DM é uma desordem metabólica de prevalência mundial, que tem aumentado progressivamente, gerando uma grande preocupação nos dias atuais por ser considerado um importante problema de saúde pública (Ribeiro *et al.*, 2015; Sah *et al.*, 2016). Além disso, é uma condição crônica que ocorre quando a ação da insulina está prejudicada, podendo ocorrer devido à deficiência de produção desse hormônio, incapacidade do organismo em utilizá-la de maneira eficiente, ou seja, resistência a sua ação, ou de ambas (ADA, 2016a; Bi, Lim e Henry, 2017).

A insulina é um hormônio peptídeo formado por 51 aminoácidos, que possui a habilidade de controlar os níveis de glicose plasmática, sendo por este motivo o ativo mais usado e eficaz para o tratamento de DM (Fonte *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2014). Sendo, em geral, utilizada no tratamento de pacientes com DM1 e, em alguns casos, sua administração também pode ser recomendada para indivíduos com DM2 (ADA, 2016b; SBD, 2016).

Apesar do uso generalizado, as injeções de insulina podem resultar em algum tipo de trauma ou dor dérmica se o paciente não souber aplicar corretamente e, conseqüentemente conduzir a uma fraca adesão do tratamento (Li *et al.*, 2016). Desta maneira, o desenvolvimento de estratégias menos invasivas, como por exemplo, a administração oral de insulina, além de aliviar a dor causada pelas injeções, também poderia mimetizar uma rota fisiológica da insulina e, portanto, proporcionar uma melhor homeostase da glicose (Fonte *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2014).

Entretanto a existência de alguns obstáculos ainda impede a entrega oral de insulina, tais como degradação enzimática no TGI e baixa permeabilidade através das células epiteliais das membranas intestinais, resultando em diminuída biodisponibilidade (Lopes *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2014). Haja visto estas limitações, diversos pesquisadores tem apostado no estudo de sistemas nanoparticulados, devido ao potencial para superar as barreiras para a entrega oral de fármacos proteicos, conduzindo ao desenvolvimento de estratégias que poderiam melhorar a sua biodisponibilidade. Dentre estes sistemas, nanopartículas poliméricas (Fonte *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2016), sistemas de compósito de hidrogel contendo nanocarreadores glicose-responsivo (Li *et al.*, 2016), nanopartículas lipídicas sólidas (Ansari *et al.*, 2016; Figueiro *et al.*, 2013) e mais recentemente nanopartículas lipídico-poliméricas (Zhang *et al.*, 2012).

As nanopartículas lipídico-poliméricas têm despertado a atenção devido ao seu potencial de encapsular tanto drogas lipofílicas como também hidrofílicas, sendo produzidas com diferentes lipídeos sólidos associados a polímeros sintéticos ou naturais. Além disso, têm demonstrado uma alta EEC dos ativos avaliados e boa resposta em estudos *in vivo* (Sgorla *et al.*, 2016).

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi propor o desenvolvimento de nanopartículas lipídico-poliméricas a partir da associação de etilpalmitato e HPMC-AS contendo insulina, visando à administração oral.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Lipídeo sólido etilpalmitato, adquirido da empresa Sigma–Aldrich (Brasil); polímero HPMC-AS em três diferentes grades (ASHF, ASLG e ASMG) foi gentilmente doado pela empresa Ashland. A insulina utilizada foi a Insulina Levemir[®] – Flex Pen[®] (insulina detemir produzida por tecnologia de DNA recombinante) e foi obtida de uma farmácia comercial na cidade de Guarapuava (Paraná – Brasil). Todos os outros materiais aplicados foram de grau analítico ou equivalente.

2.2 Produção das nanopartículas lipídico-poliméricas

As nanopartículas lipídico-poliméricas foram preparadas por adaptação da metodologia proposta por Fonte *et al.* (2012), a qual consiste do método emulsificação-evaporação do solvente modificado, baseado na técnica de dupla emulsão (água/óleo/água – A/O/A).

Em primeiro lugar foi preparada a fase oleosa por dissolução do lipídeo etilpalmitato e/ou do polímero HPMC-AS (nas três diferentes grades) em 2,0 mL de acetona em um tubo Eppendorf através de aparelho de vórtex. As diferentes proporções de etilpalmitato/HPMC-AS testadas foram 100mg/0mg, 75mg/25mg e 50mg/50mg, respectivamente. Para impedir a exposição ao solvente orgânico esta etapa foi conduzida em capela (exaustor) e a manipulação dos tubos abertos foi evitada a fim de minimizar a evaporação dos mesmos.

Posteriormente a fase aquosa interna, composta de 25U de insulina, equivalente a 3,5 mg da droga, foi adicionada a solução orgânica lipídica e

misturada durante 4 min, usando um sonicador (EcoSonics – Ultronic) a amplitude de 70%. Este passo produziu a emulsão A/O. Em seguida, a primeira emulsão foi vertida em um recipiente de vidro contendo a fase aquosa externa (Tween 80 – 2%, p.v⁻¹; 10 mL) e misturadas por 4 min, usando o aparelho sonicador com a mesma amplitude anterior (70%), produzindo, desta maneira, a emulsão A/O/A.

A seguir esta emulsão A/O/A foi colocada no rotaevaporador por 25 min para permitir a evaporação do solvente orgânico e formação da dispersão de nanopartículas lipídico-polimérica. Por último, foram centrifugadas a 17.500 g durante 45 min. Realizada a centrifugação, estas foram ressuspensas em água destilada e armazenadas a temperatura de 4°C.

2.3 Determinação do tamanho de partícula e do potencial zeta

Após a produção as nanopartículas foram analisadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (*Dynamic Light Scattering* – DLS) usando aparelho Particle Size Analyser – 90 Plus (Brookhaven[®]), fixado o ângulo de 90° e temperatura de 25°C. Antes da avaliação as amostras eram adequadamente diluídas em água ultrapura. Os resultados fornecidos eram Z-average e PDI. Já para a avaliação do potencial zeta as amostras foram diluídas em solução de KCl 1mM e as leituras realizadas utilizando equipamento Zetasizer – Nano series (ZS90).

2.3 Análise microscópica

Para a avaliação morfológica das nanopartículas lipídico-poliméricas estas foram caracterizadas através de MEV com emissão de campo, aplicando voltagem de aceleração de 15 keV. As amostras devidamente diluídas foram depositadas sobre o suporte metálico (*stubs*) e secas em estufa. Após, as amostras foram metalizadas com ouro, seguido por secagem e posterior obtenção das imagens.

2.4 Difração de Raios-X

A análise da cristalinidade dos compostos das nanopartículas lipídico-poliméricas foram obtidas por meio de DRX, realizada em um difratômetro Bruker, modelo D2 Phaser, com fonte de emissão de cobre (CuK_α= 1,5418 Å), operado a 30

keV e corrente de 10^{-3} A, com uma janela de trabalho de 5 – 60°C e velocidade de aquisição de $1^{\circ}.\text{min}^{-1}$.

2.5 Análise térmica

Para o ensaio de DSC, uma pequena quantidade de amostra (aproximadamente 10 mg dos materiais puros e das nanopartículas lipídico-poliméricas) foi aprisionada em cadinhos de alumina e submetidas ao programa de aquecimento controlado, de 20 – 500°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto e com vazão de $100 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$. Os ensaios foram conduzidos em atmosfera de nitrogênio, utilizando-se equipamento SDT Q600 – TA Instruments. A célula de DSC foi previamente calibrada no eixo de temperatura utilizando padrões de zinco, oxalato de cálcio e safira.

2.6 Determinação de insulina por CLAE-DAD

A avaliação da concentração de insulina livre foi realizada através de CLAE com DAD, em temperatura ambiente, seguindo metodologia previamente validada por Sarmiento *et al.* (2006). A fase móvel era bombeada a taxa de $1 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ e composta inicialmente por acetonitrila e solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,1%, na proporção de 30:70 (v.v⁻¹), a qual foi substituída durante os primeiros 5 minutos por uma solução 40:60 (v.v⁻¹) e, esta mantida constante de 5 a 10 min de corrida. O volume de injeção foi de 20 μL e a detecção no comprimento de onda de 214 nm. O sistema CLAE era equipado com uma coluna XTerra RP 18, tamanho de partícula de 5 μm , diâmetro interno de 4,6mm por 250mm de comprimento (Waters[®], USA) (Sarmiento *et al.*, 2006).

A revalidação do método foi realizada a partir de avaliação da linearidade, por meio da construção de uma curva de calibração preparada utilizando-se soluções padrões de Insulina Levemir[®] – Flex Pen[®] nas concentrações de 10; 30; 40; 50; 60; 70; 80 e 100 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,7.

2.7 Eficiência de encapsulação

A determinação de insulina associada às nanopartículas lipídico-poliméricas (EEC) foi calculada indiretamente através da diferença entre a quantidade total

utilizada para preparar as nanopartículas lipídico-poliméricas e a quantidade de insulina que permaneceu no sobrenadante após centrifugação (última etapa da produção), de acordo com a Equação 1 (Sarmiento *et al.*, 2011). A concentração de insulina no sobrenadante foi determinada por CLAE-DAD tal como descrito anteriormente.

$$\text{Equação (1) } EEC\% = \frac{\text{Quantidade total de insulina} - \text{insulina livre no sobrenadante}}{\text{Quantidade total de insulina}} \times 100$$

2.8 Estudo de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos a fim de estimar o perfil de liberação da insulina após administração oral das nanopartículas lipídico-poliméricas. Respeitando as condições *sink* – proporção de 10:1 insulina (mg) e meio (mL), respectivamente – as nanopartículas lipídico-poliméricas contendo insulina foram acondicionadas em tampão HCl (pH 1,2) e incubadas, sob agitação magnética de 100 rpm, a 37°C por 2 h. Decorrido a avaliação inicial em pH ácido, a mesma amostra foi isolada por centrifugação (17.500 g durante 45 min), transferida para tampão fosfato (pH 6,8) e novamente incubada a 37°C sob agitação, durante 4 h (Fonte *et al.*, 2012). Em intervalos predeterminados (30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) uma alíquota de amostra foi coletada para determinação da insulina e este volume substituído por tampão fresco. Esta determinação foi novamente realizada através do método CLAE-DAD.

2.9 Cultura de células

As células Caco-2 (clone C2BBE1) foram obtidos da ATCC (EUA) e a linha de células HT29-MTX foi gentilmente cedida pelo Dr. T. Lesuffleur (INSERMU178, Villejuif, França). O meio DMEM (Lonza), foi suplementado com 10% (v.v⁻¹) de FBS (Merck Millipore), 1% (v.v⁻¹), penicilina (100 U/mL, Merck Millipore), estreptomicina (100 µg/mL, Merck Millipore) e 1% (v.v⁻¹) de NEAA (Merck Millipore). MTT e DMSO foram obtidos da Sigma-Aldrich, Triton X-100 a 1% da Spi-Chem e os frascos de cultura e as placas de cultura de tecidos de 96 poços foram adquiridos da Corning Inc., EUA. As placas foram lidas no espectrofotômetro de microplacas (Biotek Sinergia 2, EUA) e as células foram mantidas em uma incubadora (ESCO

CelCulture[®] CO₂, Singapura) a temperatura de 37°C, CO₂ a 5% e atmosfera saturada de água.

2.10 Análise de citotoxicidade

O potencial de citotoxicidade das nanopartículas lipídico-poliméricas vazias e contendo a insulina encapsulada foi testado em células Caco-2 e HT29-MTX, células de câncer colorretal, usando o reagente MTT. As células Caco-2 (passagem 51 – 54) e HT29-MTX (passagem 41 – 43) cresceram separadamente em frascos de cultura em meio completo, consistindo em DMEM suplementado com 10% (v.v⁻¹) de FBS, 1% (v.v⁻¹) de L-glutamina, 1% (v.v⁻¹) de NEAA e 1% (v.v⁻¹) da mistura de antibiótico-antimitóticos (concentração final de penicilina de 100 U/mL e estreptomicina de 100 U/mL), sendo o meio de cultura substituído em dias alternados. As células foram semeadas (200 µL) em poços de placas de cultura de tecidos de 96 poços com 1 x 10⁴ células por poço para a linha celular HT29-MTX e 2 x 10⁴ células por poço para Caco-2, e incubadas a 37°C em uma atmosfera de ar com CO₂ a 5% durante 24 h. Depois disso, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 200 µL de PBS. Em seguida, foi substituído por 200 µL de meio morno fresco com variadas concentrações (100, 50, 25, 12,5 e 5 µg.mL⁻¹) das nanopartículas lipídico-poliméricas descritas acima. Um controle negativo (1% de Triton X-100) e um controle positivo (meio de incubação com células) foi incluído. Após 24 h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio foi descartado e as células lavadas duas vezes com 200 µL de PBS. Finalmente, foi adicionado 200 µL de solução MTT por poço (concentração final de 0,5 mg por mL) e incubou-se no escuro durante 4 h. Decorrido o tempo, a solução MTT foi removida e descartada e então, foram adicionados 200 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazano de MTT. As placas foram colocadas em um agitador orbital durante 15 min no escuro. A absorbância foi medida utilizando um espectrômetro de microplacas a 570 e 630 nm. Os resultados foram analisados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Equação (2) Viabilidade (\%)} = \frac{\text{valor experimental} - \text{controle negativo}}{\text{controle positivo} - \text{controle negativo}} \times 100$$

2.11 Avaliação da permeabilidade da insulina

Para os estudos de permeabilidade foram semeadas células Caco-2 e HT29-MTX, na proporção 90:10 e concentração de 7×10^4 células/cm², em placas de cultura de células Transwell® de 12 poços e, deixadas crescer durante 14 dias, trocando-se o meio todos os dias. Decorrido este tempo, foram adicionadas células Raji B - 1×10^5 células/cm² - na câmara basolateral e incubadas por mais 7 dias, a fim de induzir a mudança de fenótipo das células Caco-2 em células M. Posteriormente, os estudos foram conduzidos do compartimento apical (pH 6,5) para o basolateral (pH 7,4), em tampão HBSS-HEPES a temperatura de 37°C e sob agitação orbital de 100 rpm. A concentração inicial apical, tanto para a insulina em solução quanto para a insulina encapsulada nas nanopartículas lipídico-poliméricas, foi de 100 µg/mL, em um volume final de 1,5 mL. Em intervalos de tempo pré-determinados (0,25, 0,5, 1, 2 e 3 h) foi retirada uma amostra do compartimento basolateral e o mesmo volume substituído por tampão HBSS-HEPES fresco (pH 7,4). A concentração de insulina nas amostras foi quantificada por Kit comercial de detecção. Além disso, a integridade da monocamada celular foi avaliada através da TEER (Araújo *et al.*, 2014; Fonte *et al.*, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Revalidação do método CLAE-DAD para determinação de insulina

Estudos anteriores procuraram estabelecer condições cromatográficas para quantificação da insulina associada a carreadores nanoparticulados, simples, com melhor resolução do pico cromatográfico, menor tempo de análise e baixo custo. Fatores estes que contribuem para o estabelecimento de um método analítico que permita a análise de um grande número de amostras e evitem a possível degradação devido ao longo tempo de análise (Sarmiento *et al.*, 2006).

Um cromatograma típico para o método revalidado está representado na Figura 1. O pico de insulina relativamente simétrico tem um tempo de retenção de aproximadamente 6,1 min.

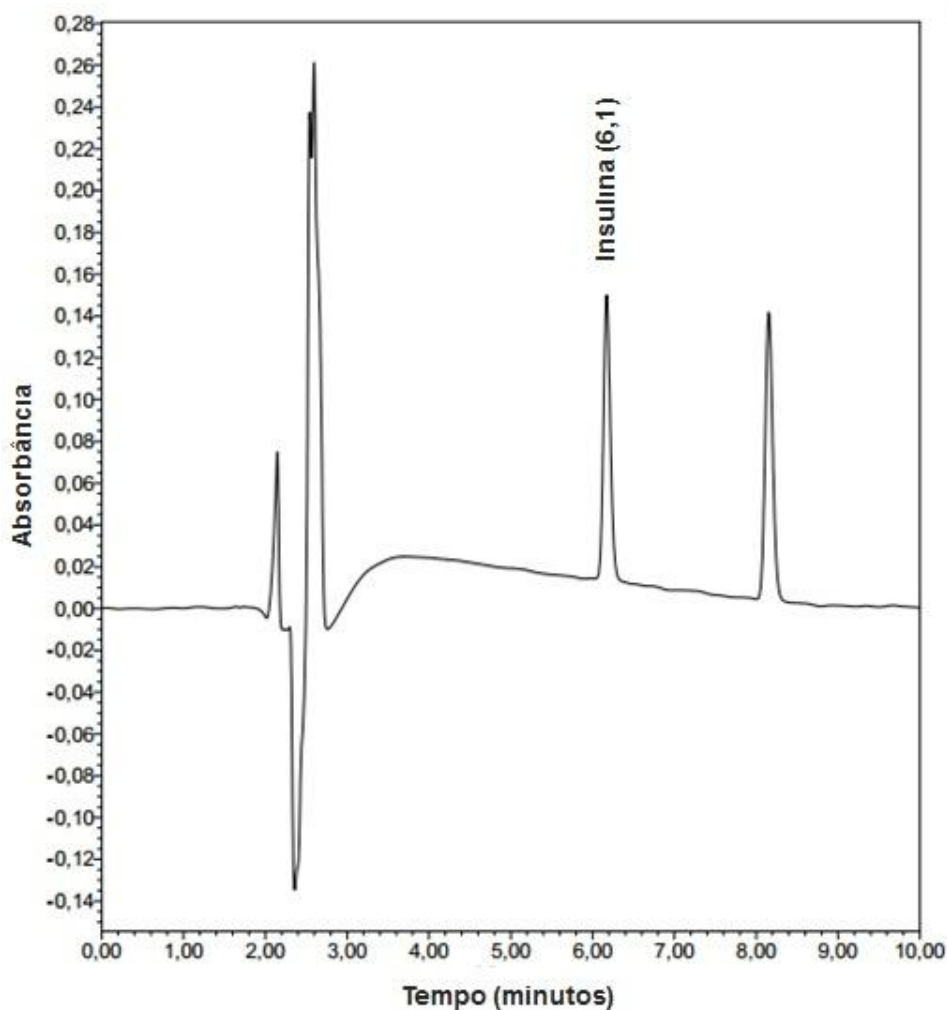


Figura 1 Cromatograma de solução padrão de insulina em tampão acetato pH 4,7 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em função do tempo. Fase móvel acetonitrila: solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,1% (30:70 – 40:60 v.v⁻¹), fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detecção em 214nm e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$.

A curva analítica foi obtida a partir de oito níveis de concentração, entre 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, intervalo no qual foi observada a linearidade do método analítico, conforme demonstrado na Figura 2.

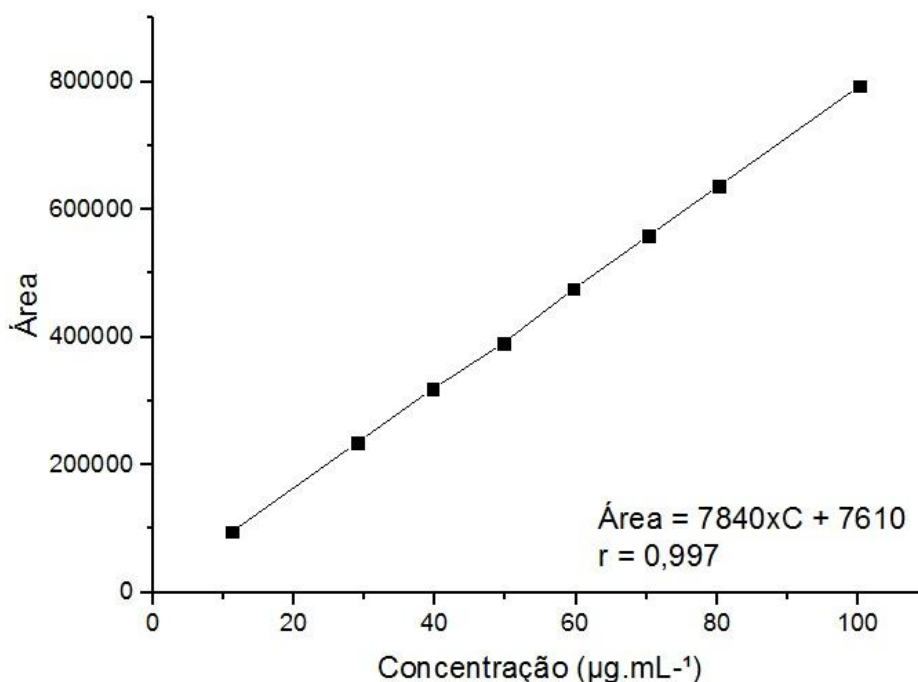


Figura 2 Curva analítica da insulina em tampão acetato pH 4,7 (n=24) utilizando a metodologia revalidada.

Cada nível de concentração foi avaliado em triplicata. Além disso, uma boa linearidade foi observada na escala estudada. O r obtido foi de 0,997, demonstrando um resultado satisfatório, uma vez que este parâmetro indica a qualidade da curva analítica, dado que, quanto mais próximo a 1 for o r , menor será a dispersão dos dados experimentais, conseqüentemente, mais confiável será a determinação das concentrações da insulina a partir do método em questão (Ribani *et al.*, 2004).

3.2 Caracterização das nanopartículas lipídico-poliméricas

A HPMC-AS é utilizado pela indústria farmacêutica como material de revestimento entérico aquoso, sendo por este motivo escolhida para ser associada ao etilpalmitato, com posterior formação das nanopartículas lipídico-poliméricas. Desta maneira, espera-se obter adequado perfil de liberação do fármaco no TGI, uma vez que é possível controlar a liberação de ativos conforme a grade do polímero utilizado. Aliado a isto, a proteção da insulina frente à degradação é passível de ser alcançada, diante das propriedades do polímero.

Diferentes formulações foram preparadas objetivando encontrar uma que apresentasse, inicialmente, melhores características em relação ao tamanho, PDI e potencial zeta, padronizando como referência a nanopartícula lipídica (etilpalmitato/HPMC-AS – 100/00). Em geral o processo de sonicação originou

partículas em escala nanométrica, que, entretanto, variaram em relação à média do tamanho de partícula de acordo com as proporções de etilpalmitato/HPMC-AS testadas. Os dados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 Caracterização de nanopartículas lipídico-poliméricas carregadas com insulina, obtidas por sonicação. Cada valor representa a média \pm SD de três medidas independentes (n=3).

Matriz	Tamanho (nm \pm SD)	PDI	Potencial Zeta (mV \pm SD)
Etilpalmitato/HPMC – 100/00	254,53 \pm 12,09	0,197 \pm 0,01	-13,93 \pm 2,32
Etilpalmitato/HPMC-ASHF – 75/25	345,00 \pm 33,14	0,304 \pm 0,02	-19,83 \pm 2,50
Etilpalmitato/HPMC-ASHF – 50/50	702,53 \pm 215,02	0,436 \pm 0,05	-23,50 \pm 1,41
Etilpalmitato/HPMC-ASLG – 75/25	297,57 \pm 29,99	0,247 \pm 0,03	-19,13 \pm 5,88
Etilpalmitato/HPMC-ASLG – 50/50	Descartada	-	-
Etilpalmitato/HPMC-ASMG – 75/25	403,63 \pm 62,35	0,465 \pm 0,20	-20,63 \pm 3,94
Etilpalmitato/HPMC-ASMG – 50/50	Descartada	-	-

Dois formulações foram descartadas devido à instabilidade e não formação das nanopartículas. Já as formulações etilpalmitato/HPMC-ASHF – 75/25 e etilpalmitato/HPMC-ASLG – 75/25 foram as que obtiveram os menores *Z-average*, aproximadamente 345 e 297,57 nm, respectivamente. Bem como os melhores valores de PDI em comparação com a nanopartícula lipídica de referência, 0,302 e 0,247, para cada uma das formulações respectivamente e 0,197 para a formulação etilpalmitato/HPMC – 100/00; ademais o potencial Zeta permaneceu em torno de -19 mV para ambas. Sendo assim, para que pudesse ser escolhida uma dentre estas duas que apresentaram os melhores parâmetros, foram realizadas as determinações da EEC da insulina.

A nanopartícula lipídica de referência alcançou uma EEC de 87,33% (\pm 5,42), já as formulações obtiveram 44,09 \pm 22,63% e 83,92 \pm 4,32%, respectivamente. Portanto, diante destes resultados, a formulação etilpalmitato/HPMC-ASLG – 75/25 foi escolhida para proceder à caracterização estrutural bem como os testes de liberação *in vitro*, análise de biocompatibilidade e avaliação do transporte de insulina.

Além disso, comparado a outros estudos que propuseram o desenvolvimento de nanopartículas lipídico-poliméricas para encapsular insulina, a formulação sugerida neste trabalho apresentou a melhor EEC. Zhang e colaboradores (2006) desenvolveram uma formulação através da associação de ácido esteárico e lecitina, como componentes lipídicos, e WGA, como componente polimérico, e alcançaram uma EEC máxima de 40.18 \pm 6.32%. Em outra pesquisa, nanopartículas lipídico-

poliméricas desenvolvidas utilizando-se um conjugado de SA-R8 e fosfolípidos de soja, obtiveram uma EEC de $76,54 \pm 2,18\%$ (Zhang *et al.*, 2012).

Inicialmente as micrografias das nanopartículas lipídico-poliméricas bem como do seu controle lipídico, mostrados nas Figuras 3(A) e (B), respectivamente, mostraram que estas apresentam um formato esférico, com superfície lisa e regular, condizente com as leituras em DLS.

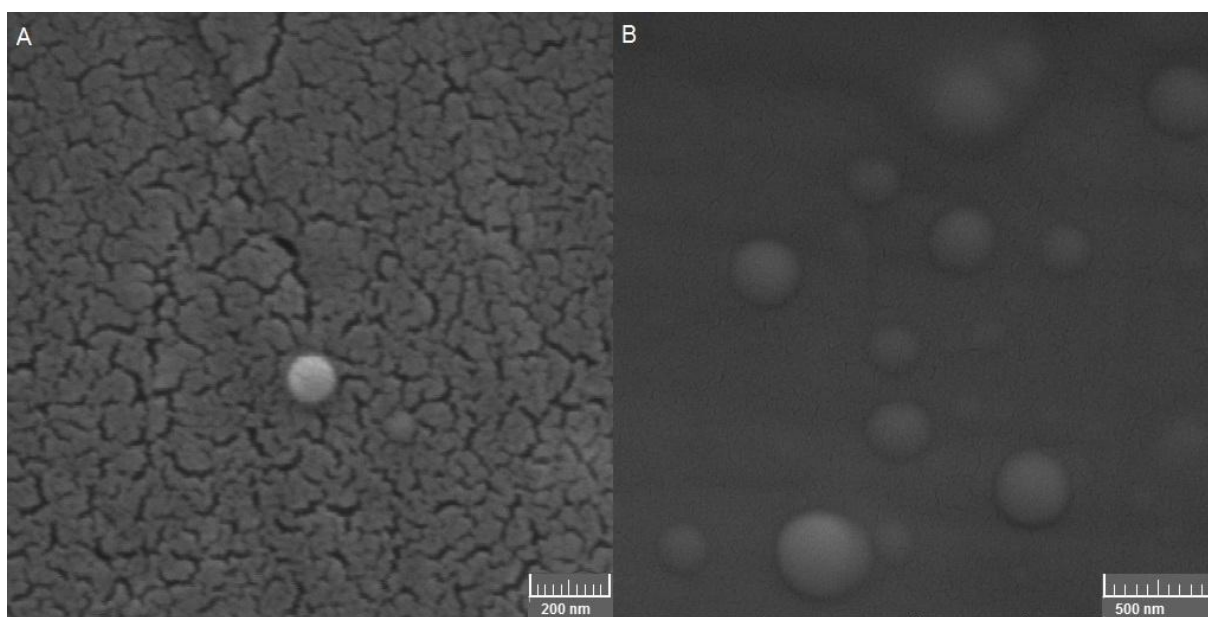


Figura 3 Imagens de MEV das nanopartículas **A)** lipídico-polimérica (etilpalmitato/HPMC-ASLG – 75/25) e **B)** controle lipídico (etilpalmitato/HPMC-AS – 100/00).

Também foram realizadas análises por difratometria de raios X, cujos difratogramas dos materiais puros bem como das nanopartículas lipídico-poliméricas vazias e associada com a insulina, são apresentados na Figura 4. O DRX é uma técnica não destrutiva que revela informações detalhadas sobre a estrutura cristalográfica de materiais (Jenkins e Snyder, 2012). Essas determinações desempenham um papel importante em variadas aplicações científicas, uma vez que, conhecendo-se a estrutura de um dado composto, é possível correlacionar estrutura e função, assim como, compreender determinadas propriedades físicas, químicas e biológicas do composto em questão.

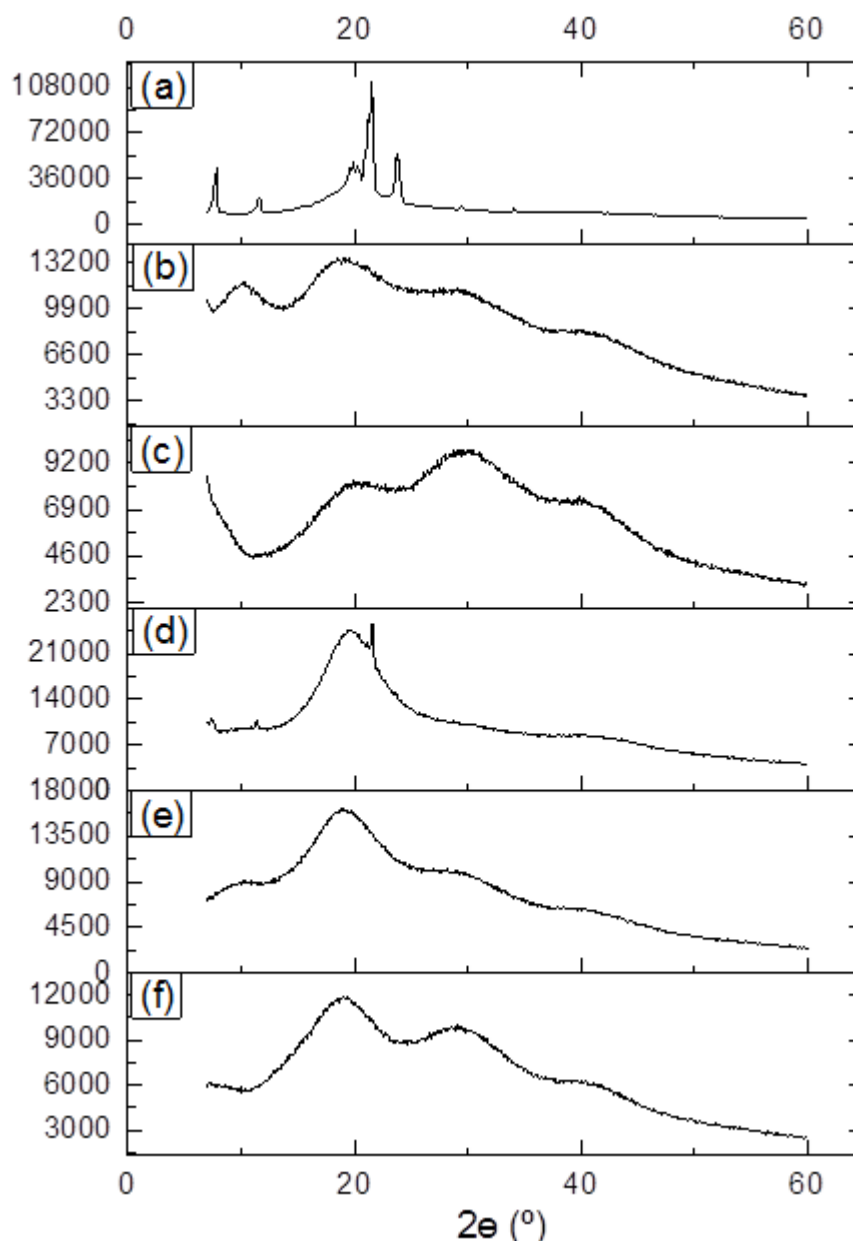


Figura 4 Difratoograma DRX dos materiais puros e formulações de nanopartícula lipídico-polimérica. **a)** lipídeo etilpalmitato, **b)** polímero HPMC-ASLG, **c)** insulina, **d)** mistura física dos três constituintes da formulação, **e)** nanopartícula lipídico-polimérica vazia e **f)** nanopartícula lipídico-polimérica contendo a insulina encapsulada.

Nas análises DRX do lipídeo – Figura 4(a) – são observados picos bem definidos em 2θ entre 5° e 30° , inferindo sua natureza cristalina. Já o HPMC-ASLG puro, Figura 4(b), apresentou difração em $2\theta = 11,7^\circ$ e $20,18^\circ$, similar ao relatado por Sakata *et al.* (2006), em aproximadamente, 10° e 20° , demonstrando sua natureza mais amorfa. Posteriormente, ao analisar a mistura física do lipídeo, polímero e insulina, nas mesmas proporções utilizadas para a produção das nanopartículas, de acordo com a Figura 4(d), percebe-se que vários picos apresentados pelo etilpalmitato desapareceram ou diminuíram de intensidade, demonstrando que há

uma interação entre estes constituintes. Por último, quando observa-se os padrões de difração de raios-X das formulações de nanopartículas lipídico-poliméricas não carregadas e associadas à insulina, Figuras 4(e) e 4(f), respectivamente, nenhum pico é visualizado, confirmando uma estrutura menos ordenada e sugerindo estar na sua forma amorfa. Como visto na análise de DRX, a modificação da cristalinidade é essencial pois está fortemente associada à incorporação de fármaco e sua taxa de libertação. Estes dados também sugerem que a insulina permanecerá aprisionada nas nanopartículas lipídico-poliméricas durante a vida útil.

Em estudo anterior para liberação oral de insulina, foram produzidas nanopartículas de sílica revestidas com polímeros (Andreani *et al.*, 2014). De acordo com estes autores, quando analisados isoladamente, os polímeros apresentaram-se no estado cristalino, entretanto, a intensidade dos picos das nanopartículas revestidas com os polímeros é diminuída, refletindo uma estrutura menos ordenada. Por outro lado, quando a insulina foi adicionada as formulações, houve um suporte da alta cristalinidade destas em comparação com as nanopartículas não carregadas. Sendo assim, diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, a solubilização da insulina nas soluções de polímero pode ter uma tendência para cristalizar as formulações durante o armazenamento. Diante do exposto, acredita-se que as nanopartículas lipídico-poliméricas aqui sugeridas possam ser mais estáveis para encapsular a insulina.

A fim de investigar a estabilidade térmica tanto dos materiais puros, bem como, das nanopartículas lipídico-poliméricas, foram conduzidos ensaios em atmosfera inerte na faixa de temperatura de 20 a 500°C. A Figura 5 mostra as curvas de DSC de ambas às amostras.

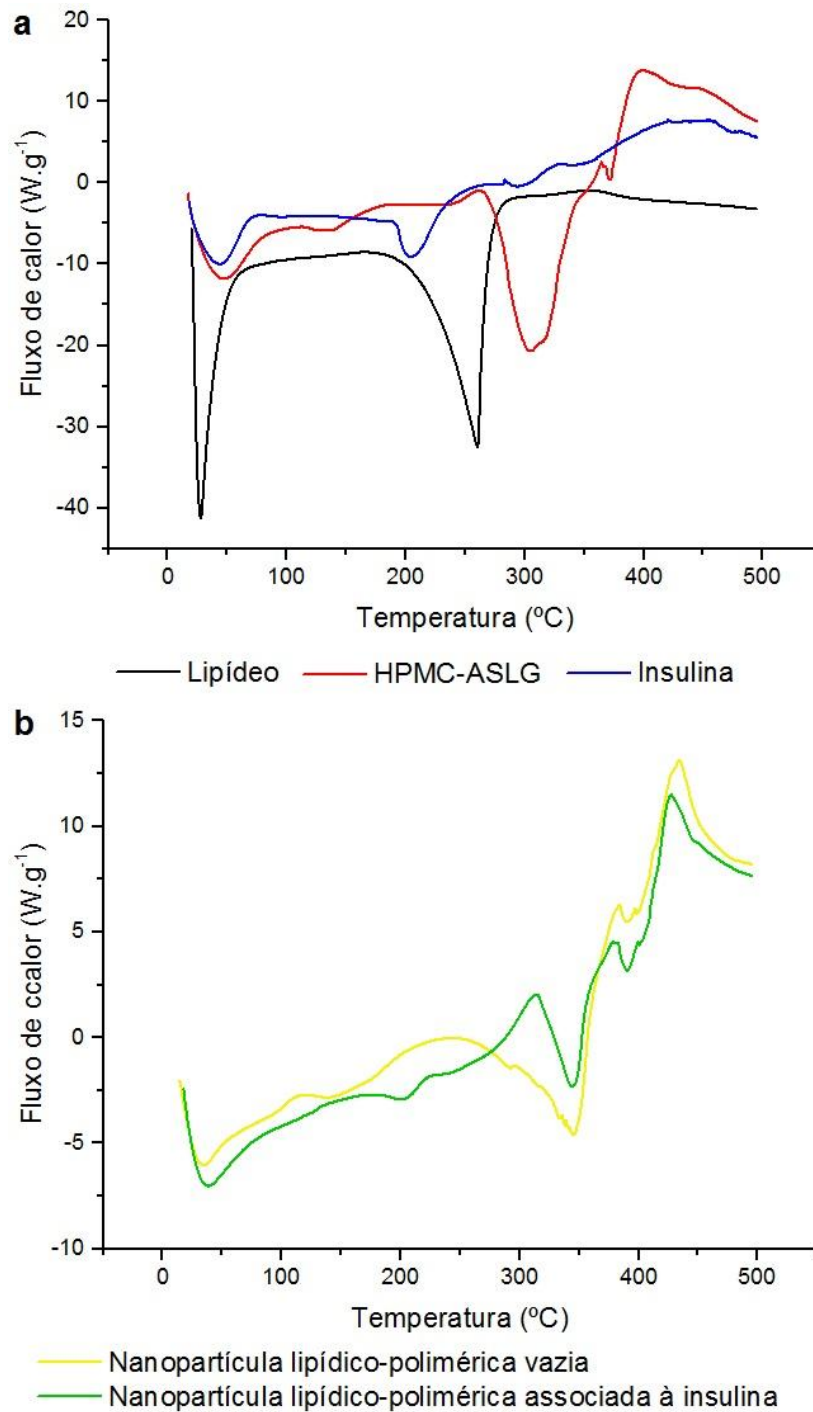


Figura 5 Termograma de DSC dos **a)** materiais puros (lipídeo etilpalmitato, polímero HPMC-ASLG e insulina) e das **b)** formulações de nanopartículas lipídico-poliméricas (vazias e contendo a insulina encapsulada).

Analisando o comportamento do HPMC-ASLG, de acordo com a Figura 5(a), pode-se observar que o polímero apresenta um pico mais amplo abaixo de $100^{\circ}C$, o qual é atribuído à evaporação da água absorvida a partir do polímero durante o aquecimento (Chopra, Sinha e Singh, 2008). Posteriormente, percebe-se outro evento de absorção de calor de entalpia em torno de $160^{\circ}C$, este último é referente ao evento de fusão (Bianchi *et al.*, 2011; Lorevice *et al.*, 2014). Além disso, um

próximo evento térmico é observado em torno de 300°C e está relacionado à degradação dos éteres de celulose, que inclui os processos paralelos de desidratação e desmetoxilação (Yin *et al.*, 2006). Em contrapartida, ao avaliar o perfil do lipídeo etilpalmitato, ainda na Figura 5(a), é possível visualizar dois eventos endotérmicos, o primeiro em aproximadamente 26°C atribuído ao ponto de fusão e o segundo, em aproximadamente 260°C referente à sua degradação. Em relação à insulina, também na Figura 5(a), inicialmente o pico em temperaturas próximas a 30°C pode estar relacionada à evaporação de umidade residual do processo de liofilização da insulina e, em seguida, em aproximadamente 100°C ocorre à desnaturação da proteína (Fang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2013).

Comparando o perfil térmico das formulações de nanopartículas lipídico-poliméricas vazias e contendo a insulina encapsula, de acordo com a Figura 5(b), com os componentes puros, infere-se que houve interação entre eles. Além disso, os picos endotérmicos de degradação diminuíram de intensidade e deslocaram-se para temperaturas mais altas quando comparado com os materiais puros. Esse resultado sugere que houve um benefício sobre estabilidade térmica das nanopartículas lipídico-poliméricas.

3.3 Estudo de liberação *in vitro*

Alguns inconvenientes ainda impedem a administração oral de insulina, como por exemplo, a degradação promovida pelo ambiente fortemente ácido encontrado no estômago bem como degradação enzimática e sua baixa biodisponibilidade oral (Han *et al.*, 2012). A fim de transpor estes obstáculos, uma opção que tem sido amplamente pesquisada é a incorporação deste ativo em nanopartículas, com o objetivo de fornecer proteção ao fármaco, bem como proporcionar uma rota mais fisiológica de administração (Han *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012). Sendo assim, os estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos a fim de estimar o perfil de liberação da insulina após administração oral das nanopartículas lipídico-poliméricas. Os resultados são apresentados na Figura 6.

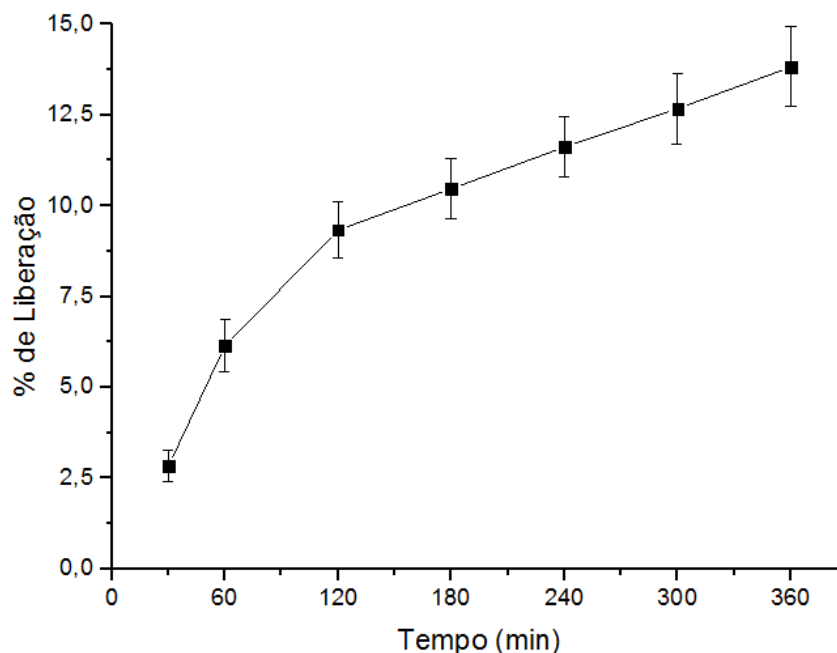


Figura 6 Porcentagem de liberação *in vitro* de insulina, a partir das nanopartículas lipídico-polimérica em tampões HCl (pH 1,2) e fostato (pH 6,8) à 37°C.

A fim de mimetizar as condições encontradas no TGI, as nanopartículas lipídico-poliméricas permaneceram durante 2 h em contato com tampão HCl (pH 1,2), seguido por incubação em tampão fosfato (pH 6,8) por mais 4 h, totalizando 6 h de estudo.

O perfil de liberação da insulina a partir das nanopartículas lipídico-poliméricas demonstrou que aproximadamente 9,0% da insulina encapsulada foi liberada após 2 h, totalizando aproximadamente 13,8% de liberação cumulativa ao final do estudo. Perante estes resultados, acredita-se que a formulação proposta (etilpalmitato/HPMC-ASLG 75/25) será capaz de proteger a insulina das condições hostis encontradas no TGI. Apenas uma pequena parcela da insulina encapsulada será liberada e entrará em contato o meio ácido encontrado no estômago. Entretanto, é desejável que essas nanopartículas lipídico-poliméricas proporcionem uma maior liberação quando alcancem o intestino, disponibilizando a insulina para sua absorção. Para isto acontecer, poderão ser testadas algumas estratégias que visem a melhoria da formulação, como por exemplo, alterações nas proporções de etilpalmitato e/ou de HPMC-ASLG, bem como mudanças no tempo ou amplitude de sonicação.

3.4 Análise de citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade foram conduzidos utilizando-se duas linhagens celulares intestinais diferentes, as células Caco-2 semelhantes aos enterócitos e que representam aproximadamente 90% das células intestinais e as células HT29-MTX que denotam as células caliciformes e são aproximadamente 10% do total de células intestinais, sendo assim, essas linhagens celulares são adequados modelos *in vitro* para mimetizar o epitélio intestinal (Araújo *et al.*, 2014). A viabilidade celular foi avaliada após exposição de ambas as linhagens celulares contra variadas concentrações de insulina livre e das nanopartículas lipídico-poliméricas vazias e contendo a insulina encapsulada, a fim de compreender se existe qualquer toxicidade dependente da concentração.

Considerando que a média e o tempo máximo de trânsito no TGI são 3 e 12 h, respectivamente (Araújo *et al.*, 2014), neste estudo o potencial de citotoxicidade foi avaliado durante 4 h. Como descrito na Figura 7, tanto a insulina livre quanto as formulações de nanopartículas lipídico-poliméricas vazias e contendo a insulina encapsulada mostraram-se seguros para as células epiteliais intestinais. Existem algumas pequenas variações quando aumentam-se as concentrações da insulina livre ou das formulações, todavia sem diferenças estatísticas significativas. Além disso, isto era esperado uma vez que se mantém o mesmo número de células para concentrações cada vez mais elevadas de insulina livre e das nanopartículas lipídico-poliméricas vazias e carregas com insulina.

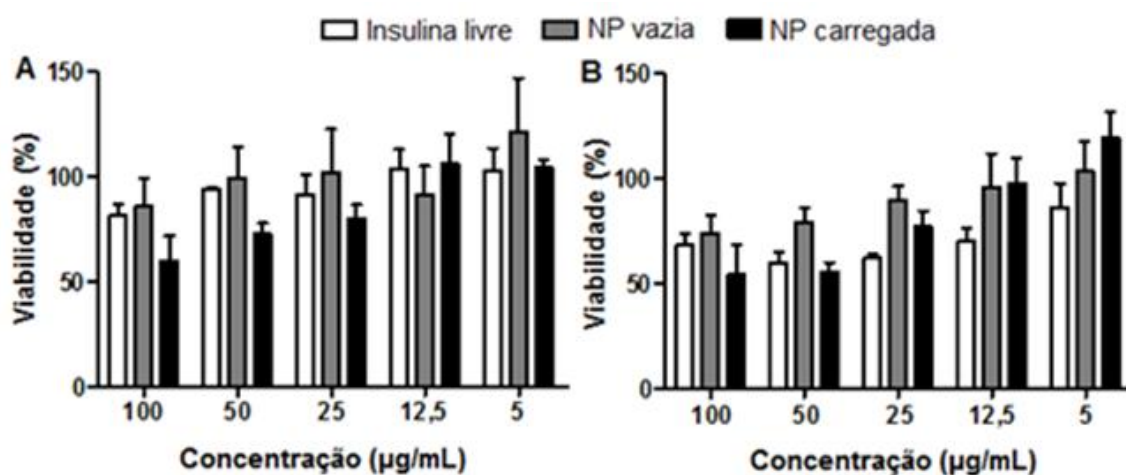


Figura 7 Viabilidade celular da insulina livre e nanopartículas lipídico-poliméricas vazias e contendo insulina encapsulada contra linhagens celulares Caco-2 (A) e HT29-MTX (B), respectivamente, após incubação durante 4 h. Os valores são representados como médias \pm SD ($n = 6$).

3.5 Permeabilidade da insulina

A fim de investigar a permeabilidade *in vitro* da insulina, utilizou-se um modelo de co-cultura tripla, o qual abrange células Caco-2, HT29-MTX e Raji B, produzindo, desta maneira, um ambiente bastante próximo ao encontrado no epitélio intestinal humano. As células Caco-2 denotam a presença de enterócitos, HT29-MTX as células calciformes produtoras de muco, em proporções fisiológicas (90:10) e a células Raji B, que induzem a diferenciação de células Caco-2 em células M. As células M podem desempenhar um importante papel na absorção intestinal de fármacos, visto que são especializadas para a absorção de antígenos e microrganismos, proporcionando uma possível entrada para a absorção de proteínas, bem como para as nanopartículas (Araújo e Sarmento, 2013).

Os perfis de permeabilidade da insulina livre em solução e encapsulada nas nanopartículas lipídico-poliméricas podem ser observados na Figura 8. A permeação mais elevada da insulina em solução pode ser explicada devido a maior quantidade da proteína disponível durante o intervalo de tempo do teste, enquanto que a insulina encapsulada foi liberada muito lentamente, conforme descrito anteriormente. Além disso, uma vez que o estudo foi conduzido em tampão HBSS-HEPES para minimizar o dano das monocamadas celulares e o tampão não apresenta qualquer surfactante, a liberação da insulina a partir das nanopartículas lipídico-poliméricas pode ter apresentado um padrão ainda mais sustentado do que o previsto, justificando novamente a maior permeabilidade da insulina livre em solução.

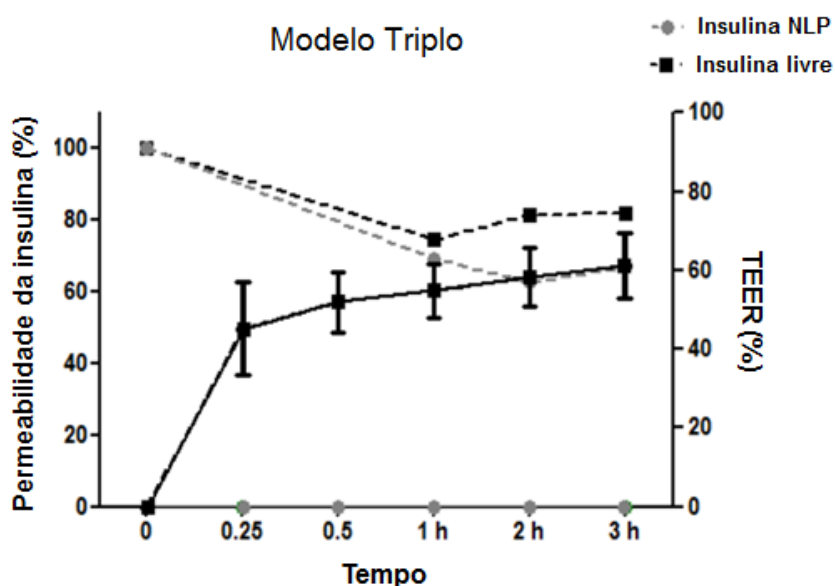


Figura 8 Perfil de permeabilidade cumulativa *in vitro* da insulina livre e encapsulada em nanopartículas lipídico-poliméricas, através de modelo tripla (co-cultura de

células Caco-2:HT29-TX:Raji B). Todo o experimento foi conduzido a partir do compartimento apical (pH 6,5) para o basolateral (pH 7,4) em HBSS-HEPES à 37°C. As barras de erro representam a média \pm DP (n = 3).

4. CONCLUSÃO

As nanopartículas lipídico-poliméricas, desenvolvidas a partir da associação de etilpalmitato e HPMC-ASLG na proporção de 75/25 (p.p⁻¹) demonstraram um bom potencial para encapsulação e administração oral de insulina. De maneira geral os resultados sugerem que as mesmas poderão proteger a insulina das condições hostis encontradas no TGI, garantindo ainda a segurança da mucosa intestinal, todavia um melhor perfil de liberação, e conseqüentemente, uma melhor captação da insulina podem ser alcançados por otimização da formulação proposta.

AGRADECIMENTOS

Débora Sgorla gostaria de agradecer a bolsa de mestrado financiada pelo Programa CAPES/FA (Chamada Pública 11/2014) e Bruno Sarmiento agradece o suporte financeiro do projeto do Programa Ciências Sem Fronteiras, Pesquisador Visitante (Chamada de Projetos MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs nº 09/2014) ambos ligados ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF-UNIOESTE/Paraná/ Brasil).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1 Revisão Bibliográfica

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, v. 39 (Suppl.1), p. S13-22, 2016a.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, v. 39 (Suppl.1), p. S47-51, 2016b.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Approaches to Glycemic Treatment. *Diabetes Care*, v. 39 (Suppl.1), p. S52-9, 2016c.

AMMAR, T. Y.; PEREIRA, T. A. P.; MISTURA, S. L. L.; KUHN, A.; SAGGIN, J. I.; LOPES JUNIOR, O. V. Viscosuplementação no tratamento da osteoartrose do joelho: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 50, n. 5, p. 489-94, 2015.

ANSARI, M. J.; ANWER, K.; JAMIL, S.; AL-SHDEFAT, R.; ALI, B. E.; AHMAD, M. M.; ANSARI, M. N. Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats. *Drug Delivery*, v. 23, n. 6, p. 1972-9, 2016.

AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 677p.

AUTISSIER, A.; VISAGE, C. L.; POUZET, C. CHAUBET, F.; LETOURNEUR, D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomaterialia*, v. 6, p. 3640-48, 2010.

BI, X.; LIM, J.; HENRY, C. J. Spices in the management of diabetes mellitus. *Food Chemistry*, v. 217, p. 281-93, 2017.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, 5ª ed. / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010. 546p.

BUNHAK, E. J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; CAVALCANTI, O. A. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de etilcelulose. Avaliação das características de hidratação e permeabilidade. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 1, p. 89-95, 2007a.

BUNHAK, E. J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; CAVALCANTI, O. A. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de polimetacrilato: avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d'água. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 312-17, 2007b.

CHEN, L.; MAGLIANO, D. J.; ZIMMET, P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus – present and future perspectives. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, p. 228-236, 2012.

DONG, Z; CHOI, D. S. Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate: Potential Drug–Excipient Incompatibility. *AAPS PharmSciTech*, v. 9, n. 3, p. 991-97, 2004.

DULONG, V.; LACK, S.; LE CERF, D.; PICTON, L.; VANNIER, J. P.; MULLER, G. Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*, v.57, p.1–6, 2004.

EL-AASSAR, M. R.; EI-FAWAL, G. F.; KAMOUN, E. A.; FOUUDA, M. M. G. Controlled drug release from cross-linked k-carrageenan/hyaluronic acid membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 77, p. 322–29, 2015.

FANGUEIRO, J. F.; GONZALEZ-MIRA, E. MARTINS-LOPES, P.; EGEEA, M. A.; SOUTO, S. B.; SOUTO, E. B. A novel lipid nanocarrier for insulin delivery: production, characterization and toxicity testing. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 18, n. 3, p. 545-49, 2013.

FELTON, L. A. Mechanisms of polymeric film formation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 457, p. 423-27, 2013.

FONTE, P.; ARAÚJO, F.; SILVA, C.; PEREIRA, C.; REIS, S.; SANTOS, H. A.; SARMENTO, B. Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. *Biotechnology advances*, v. 33, p. 1342-54, 2015.

FRIESEN, D. T.; SHANKER, R.; CREW, M.; SMITHEY, D. T.; CURATOLO, W. J.; NIGHTINGALE, J. A. S. Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate-Based Spray-Dried Dispersions: An Overview. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 6, p 1003-19, 2008.

HAN, L.; ZHAO, Y.; YIN, L.; LI, R.; LIANG, Y.; HUANG, H. PAN, S.; WU, C.; FENG, M. Insulin-Loaded pH-Sensitive Hyaluronic Acid Nanoparticles Enhance Transcellular Delivery. *AAPS PharmSciTech*, v. 13, n. 3, p.836-45, 2012.

JAIN, A.; JAIN, S. K.; GANESH, N.; BARVE, J.; BEG, A. M. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 6, p. 179–90, 2010.

JIN, Y. J.; UBONVAN, T.; KIM, D. D. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 40, p. 33-43, 2010.

KAMAT, M.; EL-BOUBBOU, K.; ZHU, D. C.; LANSDELL, T.; LU, X.; LI, W.; HUANG, X. Hyaluronic Acid Immobilized Magnetic Nanoparticles for Active Targeting and Imaging of Macrophages. *Bioconjugate Chemistry*, v. 21, p. 2128–35, 2010.

KUMAR, C. S.; RAJA, M. D.; SUNDAR, D. S.; ANTONIRAJ, G. M.; RUCKMANI, K. Hyaluronic acid co-functionalized gold nanoparticle complex for the targeted delivery of metformin in the treatment of liver cancer (HepG2 cells). *Carbohydrate Polymer*, v. 128, n. 5, p. 63-74, 2015.

KWON, S. S.; KONG, B. J.; PARK, S. N. Physicochemical properties of pH-sensitive hydrogels based on hydroxyethyl cellulose–hyaluronic acid and for applications as transdermal delivery systems for skin lesions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 92, p. 146-54, 2015.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Vol. II. Lisboa: Fundação calouste Gulbenkian, 2001. 1517p.

LEE, G. Y.; KIM, J. H.; CHOI, K. Y. et. al. Hyaluronic acid nanoparticles for active targeting atherosclerosis. *Biomaterials*, v. 53, p. 341-48, 2015.

LI, L.; JIANG, G.; YU, W.; LIU, D.; CHEN, H.; LIU, Y.; HUANG, Q.; TONG, Z.; YAO, J. KONG, X. A composite hydrogel system containing glucose-responsive nanocarriers for oral delivery of insulin. *Materials Science and Engineering C*, v. 69, p. 37-45, 2016.

LIND, M.; SYENSSON, A. M.; KOSIBOROD, M.; GUDBJORNSDOTTIR, S.; PIVODIC, A.; WELDEL, H.; DAHLQVIST, S.; CLEMENTS, M.; ROSENGREN, A. Glycemic Control and Excess Mortality in Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, v. 371, p. 1972-82, 2014.

LOPES, M., SHRESTHA, N., CORREIA, A., SHAHBAZI, M. A., SARMENTO, B., HIRVONEN, J., VEIGA, F., SEIÇA, R., RIBEIRO, A., SANTOS, H. A. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. *J. Control. Release*. **232**, 2016, 29–41.

MANTOVANI, A. M.; FREGONESI, C. E. P. T.; PALME, M. R.; RIBEIRO, F. E.; FERNANDES, R. A.; CHRISTOFARO, D. G. D. 2016. Relationship between amputation and risk factors in individuals with diabetes mellitus: A study with Brazilian patients. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. In Press, Corrected Proof.

MERO, A.; CAMPESI, M. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules. *Polymers*, v. 6, n. 2, p. 346-69, 2014.

MISRA, S.; HELDIN, P.; HASCALL, V. C.; KARAMANOS, N. K.; SKANDALIS, S. S.; MARKWALD, R. R.; GHATAK, S. Hyaluronan–CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J.*, v. 278, n. 9, p. 1429–43, 2011.

OLIVEIRA, A. V.; MARCELO, A.; ROSA DA COSTA, A. M.; SILVA, G. A. Evaluation of cystamine-modified hyaluronic acid/chitosan polyplex as retinal gene vector. *Materials Science and Engineering C*, v. 58, p. 264–72, 2016.

OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A.; OLOKOBA, L. B. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal*, v. 27, n. 4, p. 269-73, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *World Health Day 2016: WHO calls for global action to halt rise in and improve care for people with diabetes*, 2016. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/world-health-day/en/>> acesso em 24/09/2016.

OYARZUN-AMPUERO, F. A.; RIVERA-RODRÍGUEZ, G. R.; ALONSO, M. J.; TORRES, D. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, p. 483–90, 2013.

PALUMBO, F. S.; PULEIO, R.; FIORICA, C.; PITARRESI, G.; LORIA, G. R.; CASSATA, G.; GIAMMONA, G. Matrices of a hydrophobically functionalized hyaluronic acid derivative for the locoregional tumour treatment. *Acta Biomaterialia*, v.25, p. 205-15, 2015.

PANDIT, A. P.; SHINDE, R. D. Development and in vitro evaluation of sustained release multiparticulate tablet of freely water soluble drug. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 46, n. 3, p. 463-71, 2010.

PAN, N. C.; VIGNOLI, J. A.; BALDO, C. Hyaluronic acid: characteristics, microbial production and industrial applications. *BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 2, n. 4, p. 42-58, 2013.

PEREIRA JUNIOR, A. P. P.; FASOLIN, R. P.; SOSSA, F. A. C.; LIRA NETO, O. A.; NAVARRO, M. S.; MILANI, A. Avaliação dos resultados do uso do hialuronato de sódio intra-articular no pós-operatório da artroscopia do joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 49, n. 1, p37–43, 2014.

PIERO, M. N.; NZARO, G. M.; NJAGI, J. M. Diabetes mellitus – a devastating metabolic disorder. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. 40, p. 1-7, 2014.

PREZOTTI, F. G.; MENEGUIN, A. B.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Preparation and characterization of free films of high amylose/ pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 38, n. 11, p. 1354-59, 2012.

RIBEIRO, A. M. C.; NOGUEIRA-SILVA, C.; MELO-ROCHA, G.; PEREIRA, M. L.; ROCHA, A. Diabetes gestacional: determinação de fatores de risco para diabetes mellitus. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, v. 10, n. 1, p. 8-13, 2015.

SAH, S. P.; SINGH, B.; CHOUDHARY, S.; KUMAR, A. Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacological Reports*, v. 68, p. 1165-77, 2016.

SARODE, A. L.; OBARA, S.; TANNO, F. K.; SANDHU, H.; IYER, R.; SHAH N. Stability assessment of hypromellose acetate succinate (HPMCAS) NF for application in hot melt extrusion (HME). *Carbohydrate Polymer*, v. 101, p. 146–53, 2014.

SCHIRALDI, C.; LA GATTA, A.; ROSA, M. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. In: ELNASHAR, M. (Ed.) *Biopolymers*. Sciyo:InTech, 2010. cap. 20, p. 387-412.

SGORLA, D.; BUNHAK, E.; CAVALCANTI, O. A.; FONTE, P.; SARMENTO, B. Exploitation of lipid-polymeric matrices at nanoscale for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 13, n. 9, p. 1301-9, 2016.

SHEN, B.; WEI, A.; BHARGAV, D.; KISHEN, T.; DIWAN, A. D. Hyaluronan: its potential application in intervertebral disc regeneration. *Orthopedic Research and Reviews*, v. 2, p. 17-26, 2010.

SHRESTHA, N.; SHAHBAZI, M. A.; ARAÚJO, F.; ZHANG, H.; MAKILA, E. M.; SARMENTO, B.; SALONEN, J. J.; HIRVONEN, J. T.; SANTOS, H. A. Chitosan-modified porous silicon microparticles for enhanced permeability of insulin across intestinal cell monolayers. *Biomaterials*, v. 35, p. 7172-79, 2014.

SERVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; MALMONGE, S. M.; SOUTO, E. B. Polímeros Usados como Sistemas de Transporte de Princípios Ativos. *Polímeros*, v. 21, n.5, p. 361-68, 2011.

SOCIAIDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *O que é Diabetes*, 2016(a). Disponível em <<http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/diabetes/o-que-e-diabetes>> acesso em 24/09/2016.

SOCIAIDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes* (2015-2016). São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016(b). 348p.

TANNO, F.; NISHIYAMA, Y.; KOKUBO, H.; OBARA, S. Evaluation of Hypromellose Acetate Succinate (HPMCAS) as a Carrier in Solid Dispersions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 30, n. 1, p. 9-17, 2004.

TANNO, F.; SAKUMA, S.; MASAOKA, Y.; KATAOKA, M.; KOZAKI, T.; KAMAGUCHI, R.; IKEDA, Y.; KOKUBO, H.; YAMASHITA, S. Site-Specific Drug Delivery to the Middle Region of the Small Intestine by Application of Enteric Coating with Hypromellose Acetate Succinate (HPMCAS). *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 97, n. 7, p. 2665-79, 2008.

TRAN, T. H.; CHOI, J. Y.; RAMASAMY, T.; TRUONG, D. H.; NGUYEN, C. N.; CHOI, H. G.; YONG, C. S.; KIM, J. O. Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for targeted delivery of vorinostat to CD44 overexpressing cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, v. 114, p. 407-15, 2014.

ZHANG, Z. H.; ZHANG, Y. L.; ZHOU, J. P.; LV, H. X. Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid–octaarginine for oral administration of insulin. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 3333-39, 2012.

ZHONG, Y.; ZHANG, J.; CHENG, R.; DENG, C.; MENG, F.; XIE, F.; ZHONG, Z. Reversibly crosslinked hyaluronic acid nanoparticles for active targeting and intelligent delivery of doxorubicin to drug resistant CD44 + human breast tumor xenografts. *Journal of Controlled Release*, v. 205, p. 144-54, 2015.

7.2 Capítulo 1

ALVES, B., REIS, A., HECHENLEITNER, A., PINEDA, E., JOB, A., CAVALCANTI, O. Aditivos de Formulação na Formação de Filmes Isolados de Etilcelulose. Estudos Físico-Químicos e Morfológicos. *Latim American Journal of Pharmaceutics*, v. 28, p. 885-91, 2009.

ANTUNES, F., ANDRADE, F., ARAÚJO, F., FERREIRA, D., SARMENTO, B. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83, p. 427-35, 2013.

ARAUJO, F., SHRESTHA, N., SHAHBAZI, M., FONTE, P., MAKILA, E., SALONEN, J., HIRVONEN, J., GRANJA, P., SANTOS, H., SARMENTO, B. The impact of nanoparticles on the mucosal translocation and transport of GLP-1 across the intestinal epithelium. *Biomaterials*, v. 35, p. 9199-207, 2014.

BUNHAK, E., MENDES, E., PEREIRA, N., PINEDA, E., HECHENLEITNER, A., CAVALCANTI, O. Análises físico-químicas de biofilmes de sulfato de condroitina modificado. *Química Nova*, v. 38, p. 316-20, 2009.

BUNHAK, E.J., MENDES, E.S., PEREIRA, N.C., CAVALCANTI, O.A. Influência do Sulfato de Condroitina na Formação de Filmes Isolados de Etilcelulose. Avaliação das Características de Hidratação e Permeabilidade. *Latim American Journal of Pharmaceutics*, v. 26, p. 89-95, 2007.

CODAGNONE, A., HECHENLEITNER, A., PINEDA, E., CAVALCANTI, O. Goma Guar Fosfatada: Potencial Excipiente no Desenvolvimento de Filmes Isolados de Etilcelulose. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 23, p. 448-52, 2004.

COLLINS, M., BIRKINSHAW, C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, p. 3335-43, 2008.

DULONG, V., LACK, S., LE CERF, D., PICTON, L., VANNIER, J., MULLER, G. Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 1-6, 2004.

EL-AASSAR, M., EL FAWAL, G., KAMOUN, E., FOU DA, M. Controlled drug release from cross-linked κ -carrageenan/hyaluronic acid membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 77, p. 322-29, 2015.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M., VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M., FLORES-CÉSPEDES, F., DAZA-FERNÁNDEZ, I. Ethylcellulose and lignin as bearer polymers in controlled release formulations of chloridazon. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1672-79, 2011.

GLIKO-KABIR, I., YAGEN, B., PENHASI, A., RUBINSTEIN, A. Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery: I. Preparation and physicochemical characterization. *Journal of Controlled Release*, v. 63, p. 121-7, 2000.

HAN, L., ZHAO, Y., YIN, L., LI, R., LIANG, Y., HUANG, H., PAN, S., WU, C., FENG, M. Insulin-Loaded pH-Sensitive Hyaluronic Acid Nanoparticles Enhance Transcellular Delivery. *AAPS Pharmaceutics ScienceTechnology*, v. 13, p. 836-45, 2012.

KUMAR, C., RAJA, M., SUNDAR, D., ANTONIRAJ, M., RUCKMANI, K. Hyaluronic acid co-functionalized gold nanoparticle complex for the targeted delivery of metformin in the treatment of liver cancer (HepG2 cells). *Carbohydrate Polymers*, v. 128, p. 63-74, 2015.

KWON, S., KONG, B., PARK, S. Physicochemical properties of pH-sensitive hydrogels based on hydroxyethyl cellulose–hyaluronic acid and for applications as transdermal delivery systems for skin lesions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 92, p. 146-54, 2015.

LÜRATI A., LARIA A., MAZZOCCHI D., RE K., MARRAZZA M. AND SCARPELLINI M. Effects of hyaluronic acid (HA) viscosupplementation on peripheral Th cells in knee and hip osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 23, p. 88–93, 2015.

LEE, G., KIM, J., CHOI, K., YOON, H., KIM, K., KWON, I., CHOI, K., LEE, B., PARK, J., KIM, I. Hyaluronic acid nanoparticles for active targeting atherosclerosis. *Biomaterials*. v. 53, p. 341-8, 2015.

LI, X., JIANG, F., NI, X., YAN, W., FANG, Y., CORKE, H., XIAO, M. Preparation and characterization of konjac glucomannan and ethyl cellulose blend films. *Food Hydrocolloids*, v. 44, p. 229-36, 2015.

LOMAKIN, S., ROGOVINA, S., GRACHEV, A., PRUT, E., ALEXANYAN, C. Thermal degradation of biodegradable blends of polyethylene with cellulose and ethylcellulose. *Thermochimica Acta*, v. 521, p. 66-73, 2011.

MAIOR, J., REIS, A., MUNIZ, E., CAVALCANTI, O. Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 184-94, 2008.

MERO, A., CAMPISI, M. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules. *Polymers*, v. 6, 346-69, 2014.

MISRA, S., HELDIN, P., HASCALL, V., KARAMANOS, N., SKANDALIS, S., MARKWALD, R., GHATAK, S. HA/CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS Journal*, v. 278, p. 1429-43, 2011.

OLIVEIRA, A., MARCELO, A., COSTA, A., SILVA, G. Evaluation of cystamine-modified hyaluronic acid/chitosan polyplex as retinal gene vector. *Materials Science and Engineering: C*, v. 58, p. 264-72, 2016.

OLIVEIRA, L., JESUS, L., HECHENLEITNER, A., CAVALCANTI, O. Free Films Containing Acrylic Polymer and β -Cyclodextrin as Potential Material for Colonic Delivery: Permeability, Swelling Property, and Physicochemical Analyses. *Latim American Journal of Pharmaceutics*, v. 30, p. 853-60, 2011.

PAN, N., VIGNOI, J., BALDO, C., CELLIGOI, M. Hyaluronic acid: characteristics, microbial production and industrial applications. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 2, p. 42-58, 2013.

PREZOTTI, F., MENEGUIN, A., EVANGELISTA, R., CURY, B. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 38, p. 1354-59, 2012.

RABITO, M., REIS, A., FREITAS, A., TAMBOURGI, E., CAVALCANTI, O. A pH/enzyme-responsive polymer film consisting of Eudragit FS 30 D and arabinoxylane as a potential material formulation for colon-specific drug delivery system. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 17, p. 429-36, 2012.

REDDY, K., KARUNAKARAN, K. Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, v. 2, p. 173-79, 2013.

ROSIAUX, Y., MUSCHERT, S., CHOKSHI, R., LECLERCQ, B., SIEPMANN, F., SIEPMANN, J. Ethanol-resistant polymeric film coatings for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 169, p. 1-9, 2013.

SANTOS, L., PINEDA, E., CELLIGOI, M., CAVALCANTI, O. Levan as a new additive for colon-specific films: a new approach in the use of exopolysaccharides in time-dependent free films (Aminoalkyl Methacrylate Copolymer RS). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 25, p. 943-8, 2013.

SARAVANAKUMAR, G., GOPAL, D., RANGASAMY, J., PARK, J. Hyaluronic acid-based conjugates for tumor-targeted drug delivery and imaging. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 9, p. 1-14, 2013.

SCHANTÉ, C., ZUBER, G., HERLIN, C., VANDAMME, T. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, p. 469-89, 2011.

SERVERINO, P., SANTANA, M., MALMONGE, S., SOUTO, E. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. *Polímeros*, v. 21, p. 361-8, 2011.

SHEN, B., WEI, A., BHARGAV, D., KISHEN, T., DIWAN, A. Hyaluronan: its potential application in intervertebral disc regeneration. *Orthopedic Research and Reviews*, v. 2, p. 17-26, 2010.

SIONKOWSKA, A., KACZMAREK, B., LEWANDOWSKA, K., GRABSKA, S., POKRYWCZYŃSKA, M., KLOSKOWSKI, T., DREWA, T. 3D composites based on the blends of chitosan and collagen with the addition of hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 89, p. 442-8, 2016.

SOUTO-MAIOR, J., REIS, A., PEDREIRO, L., CAVALCANTI, O. Avaliação da pectina fosfatada aplicada na formação de filmes isolados. Material candidato a novos sistemas para liberação modificada de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, p. 203-13, 2008.

SOUTO-MAIOR, J., REIS, A., PEDREIRO, L., CAVALCANTI, O. Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. *Polymer International*, v. 59, p. 127-35, 2010.

VAFAEI, S., ESMAEILI, M., AMINI, M., ATYABI, F., OSTAD, S., DINARVAND, R. Self assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential carrier for targeting the inflamed intestinal mucosa. *Carbohydrate Polymers*, v. 144, p. 371-81, 2016.

WEI, H., LI-FANG, F., YONG-ZHEN, C., BAI, X., QING, D., MIN, B., FENG, W., MIN, Q., DE-YING, C. Pectin/Kollicoat SR30D isolated films for colonic delivery [I]: a comparison of normal and colitis-induced models to assess the efficiency of microbially triggered drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, p. 167-76, 2009.

YANG, Q., FLAMENT, M., SIEPMANN, F., BUSIGNIES, V., LECLERC, B., HERRY, C., TCHORELOFF, P., SIEPMANN, J. Curing of aqueous polymeric film coatings: Importance of the coating level and type of plasticizer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 74, p. 362-70, 2010.

ZHONG, Y., ZHANG, J., CHENG, R., DENG, C., MENG, F., XIE, F., ZHONG, Z. Reversibly crosslinked hyaluronic acid nanoparticles for active targeting and

intelligent delivery of doxorubicin to drug resistant CD44 + human breast tumor xenografts. *Journal of Controlled Release*, v. 205, p. 144-54, 2015.

7.3 Capítulo 2

ABBASPOUR, M., MAKHMALZADEH, B. S., ARASTOO, Z., JAHANGIRI, A., SHIRALIPOUR, R. Effect of anionic polymers on drug loading and release from clindamycin phosphate solid lipid nanoparticles. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, p. 477-82, 2013.

ALMEIDA, A. J., SOUTO E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 478-90, 2007.

BATTAGLIA, L., GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 9, p. 497-508, 2012.

BONDI, M. L., CRAPARO, E. F. Solid lipid nanoparticles for applications in gene therapy: a review of the state of the art. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 7, p.7-18, 2010.

CHANG, H., LIN, V., WU, J., TSAI, G. J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 134, p. 74-81, 2015.

CHARCOSSET C, EL-HARATI A, FESSI H. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *Journal of Controlled Release*, v. 108, p. 112-20, 2005.

DIN, F. U., MUSTAPHA, O., KIM, D. W., RASHID, R., PARK, J. H., CHOI, J.Y., KU, S. K., YONG, C. S., KIM, J.O., CHOI, H.G. Novel dual-reverse thermosensitive solid lipid nanoparticle-loaded hydrogel for rectal administration of flurbiprofen with improved bioavailability and reduced initial burst effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 94, p. 64-72, 2015.

EKAMBARAM, P., ABDUL HASAN SATHALI, A. K. P. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. *Scientific Reviews & Chemical Communications*, v. 2, n. 1, p. 80-102, 2012.

GAN, L., GAO, Y., ZHU, C. L., ZHANG, X. X., GAN, Y. Novel pH-sensitive lipid-polymer composite microspheres of 10-hydroxycamptothecin exhibiting colon-specific biodistribution and reduced systemic absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 102, p. 1752-9, 2013.

GAO, Y., ZHU, C. L., ZHANG, X., GAN, L., GAN, Y. Lipid-polymer composite microspheres for colon-specific drug delivery prepared using an ultrasonic spray freeze-drying technique. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, p. 549-56, 2011.

HAN, L., ZHAO, Y., YIN, L., LI, R., LIANG, Y., HUANG, H., PAN, S., WU, C., FENG, M. Insulin-Loaded pH-Sensitive Hyaluronic Acid Nanoparticles Enhance Transcellular Delivery. *AAPS PharmSciTech*, v. 13, p. 836-45, 2012.

HOU, D., XIE, C., HUANG, K., ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, v. 24, p. 1781-5, 2003.

JIN, Y.J., UBONVAN, T., KIM, D.D. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation* v. 40, p. 33-43, 2010.

JOSHI, M. D., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 161-72, 2009.

KUMAR, D., MAHESH, A., MAHADEVAN, S., MANDAL, A. B. Synthesis and characterization of curcumin loaded polymer/lipid based nanoparticles and evaluation of their antitumor effects on MCF-7 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1840, p. 1913-22, 2014.

KUMBHAR, D., POKHARKAR, B. Physicochemical investigations on an engineered lipid-polymer hybrid nanoparticle containing a model hydrophilic active, zidovudine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 436, p. 714-25, 2013.

LI, Y., WONG, H. L., SHUHENDLER, A. J., ANDREW, M. R., XIAO, Y. W. Molecular interactions, internal structure and drug release kinetics of rationally developed polymer-lipid hybrid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 60-70, 2008.

LUO, Y., TENG, Z., LI, Y., WANG, Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydrate Polymers*, v. 122, p. 221-9, 2015.

MANDAL, B., MITTAL, N. K., BALABATHULA, P., THOMA, L. A., WOOD, G. C. Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 81, p. 162-71, 2016.

MEHNERT, W., MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-96, 2001.

MUCHOW, M., MAINCENT, P., MULLER, R.H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 34, p. 1394–405, 2008.

MUKHOPADHYAY, P., CHAKRABORTY, S., BHATTACHARYA, S., MISHRA, R., KUNDU, P. P. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 640-48, 2015.

MÜLLER, R. H., MÄDER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, p. 161-77, 2000.

MÜLLER, R. H., RADTKE, M., WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. S131-S55, 2002.

NAGARWAL, C., KUMAR, R., PANDIT, K. Chitosan coated sodium alginate–chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, p. 678-85, 2012.

PALANGE, L., DI MASCOLO, D., CARALLO, C., GNASSO, A., DECUZZI, P. Lipid–polymer nanoparticles encapsulating curcumin for modulating the vascular deposition of breast cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 10, p. e991-e1002, 2014.

PARDEIKE, J., HOMMOSS, A., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 366, p. 170-84, 2009.

POKHARKAR, B., JOLLY, R., KUMBHAR, D. Engineering of a hybrid polymer–lipid nanocarrier for the nasal delivery of tenofovir disoproxil fumarate: Physicochemical, molecular, microstructural, and stability evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 71, p.99-111, 2015.

QU C-Y, ZHOU M, CHEN Y-W, SHEN, F., XU, L. M. Engineering of lipid prodrug-based, hyaluronic acid-decorated nanostructured lipid carriers platform for 5-fluorouracil and cisplatin combination gastric cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 3911–20, 2015.

RAMASAMY, T., TRAN, T. H., CHOI, J. Y., CHO, H. J., KIM, J. H., YONG, C. S., CHOI, H. G., KIM, J. O. Layer-by-layer coated lipid-polymer hybrid nanoparticles designed for use in anticancer drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, p. 653-61, 2014.

RIDOLFI, M., MARCATO, D., JUSTO, Z., CORDI, L., MACHADO, D., DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 93, p. 36-40, 2012.

SARMENTO B, MARTINS S, FERREIRA D, SOUTO, E. B. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 2, p. 743-9, 2007.

SAUPE, A., RADES, T. Solid Lipid Nanoparticles. In: Mozafari MR, ed. *Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy*. Springer p. 41-50, 2006.

SEVERINO P., CHAUD, M. V., SHIMOJO, A., ANTONINI, D., LANCELLOTTI, M., SANTANA, M. H., SOUTO, E. B. Sodium alginate-cross-linked polymyxin B sulphate-loaded solid lipid nanoparticles: Antibiotic resistance tests and HaCat and NIH/3T3 cell viability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 129, p. 191-7, 2015.

SEYFODDIN, A., SHAW, J., AL-KASSAS, R. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug Delivery*, v. 17, p. 467-89, 2010.

TSAI, Y., WOUNG, C., YEN, C., TSENG, P. C., CHIOU, S. H., SUNG, Y. J., LIU, K. T., CHENG, Y. H. Thermosensitive chitosan-based hydrogels for sustained release of ferulic acid on corneal wound healing. *Carbohydrate Polymers*, v. 135, p. 308-15, 2016.

UNER, M., YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, v. 2, p. 289-300, 2007.

WAN, F., YOU, J., SUN, Y., ZHANG, X. Z., CUI, F. B., DU, Y. Z., YUAN, H., HU, F. Q. Studies on PEG-modified SLNs loading vinorelbine bitartrate (I): Preparation and evaluation in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 359, p. 104-10, 2008.

WANG, L., XIE, S., ZHU, Y., WANG, F. H., ZHOU, W. Z. Effects of poly (lactic-co-glycolic acid) as a co-emulsifier on the preparation and hypoglycaemic activity of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. *IET Nanobiotechnology*, v. 3, p. 103-08, 2009.

WEBER, S., ZIMMER, A., PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 86, p. 7-22, 2014.

WISSING, S. A., KAYSER, O., MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1257-72, 2004.

WONG, H. L., BENDAYAN, R., RAUTH, A. M., LI, Y., WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 491-504, 2007.

WONG, H. L., BENDAYAN, R., RAUTH, A. M., WU, X. Y. Development of solid lipid nanoparticles containing ionically complexed chemotherapeutic drugs and chemosensitizers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, p. 1993-2008, 2004.

WONG, L., RAUTH, A., BENDAYAN, R., MANIAS, J. L., RAMASWAMY, M., LIU, Z., ERHAN, S. Z., WU, X. Y. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p. 1574-85, 2006.

XIE, S., WANG, S., ZHAO, B., HAN, C., WANG, M., ZHOU, W. Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 67, p. 199-204, 2008.

YING Y, CUI D, YU L, DU, Y. Z. Solid lipid nanoparticles modified with chitosan oligosaccharides for the controlled release of doxorubicin. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 1357-64, 2011.

YUAN H, MIAO J, DU Y. Z., YOU, J., HU, F. Q., ZENG, S. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 348, p. 137-45, 2008.

ZHANG, N., PING, Q., HUANG, G., XU, W., CHENG, Y., HAN, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 327, p. 153-9, 2006.

ZHANG Z-H, ZHANG Y-L, ZHOU J-P, LV, H. X. Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid–octaarginine for oral administration of insulin. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 3333-9, 2012.

ZHAO, P., ZHENG, M., YUE, C., LUO, Z., GONG, P., GAO, G., SHENG, Z., ZHENG, C., CAI, L. Improving drug accumulation and photothermal efficacy in tumor depending on size of ICG loaded lipid-polymer nanoparticles. *Biomaterials*, v. 35, p 6037-46, 2014.

ZHU, L., XIE, S., DONG, Z., WANG, X., WANG, Y., ZHOU, W. Effects of poly(lactic-co-glycolic acid) on preparation and characteristics of plasmid DNA-loaded solid lipid nanoparticles. *IET Nanobiotechnology*, v. 5, p. 79-85, 2011.

7.4 Capítulo 3

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, v. 39 (Suppl.1), p. S13-22, 2016a.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Approaches to Glycemic Treatment. *Diabetes Care*, v. 39, (Suppl. 1), p. S52-9, 2016b.

ANDREANI, T., KIILL, C. P., SOUZA, A. N. R., FANGUEIRO, J. F., FERNANDES, L., DOKTOROVÁ, S., SANTOS, D. L., GARCIA, M. L., GREMIÃO, M. P. D., SOUTO, E. B., SILVA, A. M. Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: Characterization and cell toxicity studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 123, p. 916-23, 2014.

ANSARI, M. J., ANWER, K., JAMIL, S., AL-SHDEFAT, R., ALI, B. E., AHMAD, M. M., ANSARI, M. N. Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats. *Drug Delivery*, v. 23, p. 1972-9, 2016.

ARAÚJO, F., SARMENTO, B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 458, p. 128-34, 2013.

ARAÚJO, F., SHRESTHA, N., SHAHBAZI, M. A., FONTE, P., MAKILA, E. M., SALONEN, J. J., HIRVONEN, J. T., GANJA, P. L., SANTOS, H. A., SARMENTO, B. The impact of nanoparticles on the mucosal translocation and transport of GLP-1 across the intestinal epithelium. *Biomaterials*, v. 35, p. 9199-207, 2014.

BIANCHI, S. E., ANGELI, V. W., SOUZA, K. C. B., MIRON, D. S., CARVALHO, G. A., SANTOS, V., BRADALISE, R. N. Evaluation of the Solubility of the HPMC/PVA Blends in Biological Fluids in vitro. *Materials Research*, v. 14, p. 166-71, 2011.

BI, X., LIM, J., HENRY, C. J. Spices in the management of diabetes mellitus. *Food Chemistry*, v. 217, p. 281-93, 2017.

CHOPRA, D., SINHA, V. R., SINGH, M. Thermal and Isothermal Methods in Development of Sustained Release Dosage Forms of Ketorolac Tromethamine. *European Journal of Chemistry*, v. 5, p. 316-22, 2008.

FANGUEIRO, J. F., GONZALEZ-MIRA, E., MARTINS-LOPES, P., EGEEA, M. A., SOUTO, S. B., SOUTO, E. B. A novel lipid nanocarrier for insulin delivery: production, characterization and toxicity testing. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 18, p. 545-9, 2013.

FANG, R., GROBELNY, P. J., BOGNER, R. H., PIKAL, M. K. Protein Internal Dynamics Associated With PreeSystem Glass Transition Temperature Endothermic Events: Investigation of Insulin and Human Growth Hormone by Solid State Hydrogen/Deuterium Exchange. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 105, p. 3290-5, 2016.

FONTE, P., ANDRADE, F., ARAÚJO, F., ANDRADE, C., NEVES, J., SARMENTO, B. Chitosan-Coated Solid Lipid Nanoparticles for Insulin Delivery. *Methods in Enzymology*, v. 508, chapter fifteen, p. 296-312, 2012.

FONTE, P., ARAÚJO, F., SILVA, C., PEREIRA, C., REIS, S., SANTOS, H. A., SARMENTO, B. Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. *Biotechnology advances*, v. 33, p. 1342-54, 2015.

HAN, L., ZHAO, Y., YIN, L., LI, R., LIANG, Y., HUANG, H., PAN, S., WU, C., FENG, M. Insulin-Loaded pH-Sensitive Hyaluronic Acid Nanoparticles Enhance Transcellular Delivery. *AAPS PharmSciTech*, v. 13, p. 836-45, 2012.

JENKINS, R., SNYDER, R. L. *Introduction to X-ray powder diffractometry*. New York: John Wiley & Sons, 389p, 2012.

LI, L., JIANG, G., YU, W., LIU, D., CHEN, H., LIU, Y., HUANG, Q., TONG, Z., YAO, J., KONG, X. A composite hydrogel system containing glucose-responsive nanocarriers for oral delivery of insulin. *Materials Science and Engineering*, v. 69, p. 37-45, 2016.

LI, P., NIELSEN, H. M., FANO, M., MULLERTZ, A. Preparation and Characterization of Insulin–Surfactant Complexes for Loading into Lipid-Based Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 102, p. 2689-98, 2013.

LOPES, M., SHRESTHA, N., CORREIA, A., SHAHBAZI, M. A., SARMENTO, B., HIRVONEN, J., VEIGA, F., SEIÇA, R., RIBEIRO, A., SANTOS, H. A. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. *Journal of Controlled Release*, v. 232, p. 29–41, 2016.

LOREVICE, M. V., MOURA, M. R., MATTOSO, L. H. Noncompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens. *Química Nova*, v. 37, p. 931-6, 2014.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletrofotéticos. *Química Nova*, v. 27, 771-80, 2004.

RIBEIRO, A. M. C., NOGUEIRA-SILVA, C., MELO-ROCHA, G., PEREIRA, M. L., ROCHA, A. Diabetes gestacional: determinação de fatores de risco para diabetes mellitus. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, v. 10, p. 8-13, 2015.

SAH, S. P., SINGH, B., CHOUDHARY, S., KUMAR, A. Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmaceutical Reports*, v. 68, p. 1165-77, 2016.

SAKATA, Y., SHIRAISHI, S., OTSUKA, M. A novel white film for pharmaceutical coating formed by interaction of calcium lactate pentahydrate with hydroxypropyl methylcellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 317, 120-26, 2006.

SARMENTO, B.; MAZZAGLIA, D.; BONFERONI, M. C.; NETO, A. P.; MONTEIRO, M. C.; SEABRA, V. Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 919–25, 2011.

SARMENTO, B., RIBEIRO, A., VEIGA, F., FERREIRA, D. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. *Biomedical Chromatography*, v. 20, p. 898–903, 2006.

SGORLA, D., BUNHAK, E., CAVALCANTI, O. A., FONTE, P., SARMENTO, B. Exploitation of lipid-polymeric matrices at nanoscale for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 13, p. 1301-9, 2016.

SHARMA, G., SHARMA, A. R., NAM, J. S., DOSS, G. P. C., LEE, S. S., CHARKRABORTY, C. Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 13, p. 74-86, 2015.

SHRESTHA, N., SHAHBAZI, M. A., ARAÚJO, F.; ZHANG, H., MAKILA, E. M., SARMENTO, B., SALONEN, J. J., HIRVONEN, J. T., SANTOS, H. A. Chitosan-modified porous silicon microparticles for enhanced permeability of insulin across intestinal cell monolayers. *Biomaterials*, v. 35, p. 7172-9, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)*. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 348p, 2016.

YIN, J., LUO, K., CHEN, X., KHUTORYANSKIY, V. V. Miscibility studies of the blends of chitosan with some cellulose ethers. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 238–44, 2006.

ZHANG, N., PING, Q., HUANG, G., XU, W., CHENG, Y., HAN, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 327, p. 153-9, 2006.

ZHANG, Z. H., ZHANG, Y. L., ZHOU, J. P., LV, H. X. Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid–octaarginine for oral administration of insulin. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 3333-9, 2012.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Em geral, os resultados deste estudo sugerem os novos materiais propostos, destinados à liberação modificação de ativos farmacoterapêuticos, apresentam um bom potencial. Os filmes baseados em ácido hialurônico, quando aplicados como material de revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais, poderão prevenir a liberação prematura de fármacos nas condições hostis do estômago, mas controlar a liberação nas porções mais distais do trato gastrointestinal, garantindo a segurança da mucosa intestinal. Já em relação às nanopartículas lipídico-poliméricas, evidências demonstraram que as mesmas poderão proteger a insulina, após administração oral, das condições hostis encontradas no TGI, garantindo a segurança da mucosa intestinal, todavia um melhor perfil de liberação, e conseqüentemente, uma melhor captação da insulina podem ser alcançados por otimização da formulação escolhida.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira complementar aos resultados encontrados neste trabalho, faz-se necessário a realização de estudos adicionais para confirmar a aplicabilidade dos novos materiais desenvolvidos. As características dos filmes poliméricos baseados em ácido hialurônico podem favorecer a aplicação deste novo material para obtenção de promissores sistemas de liberação controlada de fármacos, para administração por via oral. Entretanto, estudos de dissolução e funcionalidade ainda podem contribuir para avaliar o papel positivo deste novo material de revestimento. Em relação às nanopartículas lipídico-poliméricas, conforme mencionado anteriormente, um melhor perfil de liberação, e conseqüentemente, uma melhor captação da insulina podem ser alcançados por otimização da formulação escolhida.

ANEXO A – Artigo publicado “Development and characterization of crosslinked hyaluronic acid polymeric films for use in coating processes”

ANEXO B – Artigo publicado “Exploitation of lipid-polymeric matrices at nanoscale for drug delivery applications”