

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

GABRIELLE RACOSKI CUSTÓDIO

CASCAVEL, PR
2018

GABRIELLE RACOSKI CUSTÓDIO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS
SÓLIDAS MODIFICADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO PARA ADMINISTRAÇÃO
ORAL DE INSULINA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas, na Linha de Pesquisa Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Oliveira de Fariña

Co-orientadores: Prof.^a Dr.^a Rubiana Mara Mainardes e Prof. Dr. Bruno Sarmiento

CASCADEL, PR
2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Custódio, Gabrielle Racoski
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas modificadas com ácido hialurônico para administração oral de insulina / Gabrielle Racoski Custódio; orientador(a), Luciana Oliveira de Fariña; coorientador(a), Rubiana Mara Mainardes , coorientador(a)II, Bruno Sarmento, 2018.
94 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. Nanotecnologia. 2. Administração oral. 3. Diabetes mellitus. 4. Insulina. I. Fariña, Luciana Oliveira de . II. Mainardes , Rubiana Mara . III. Sarmento, Bruno . IV. Título.

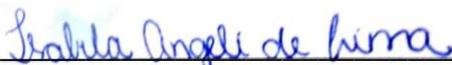
GABRIELLE RACOSKI CUSTÓDIO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS
SÓLIDAS MODIFICADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO PARA ADMINISTRAÇÃO
ORAL DE INSULINA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas, na Linha de Pesquisa Fármacos e Medicamentos.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Oliveira de Fariña
Co-orientadores: Prof.^a Dr.^a Rubiana Mara Mainardes e Prof. Dr. Bruno Sarmento

Aprovado em 13/07/2018.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Isabela Angeli de Lima - Banca
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo - Banca
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Dr. Arthur da Silveira Prudente - Banca
Prati Donaduzzi Ltda.



Prof.^a Dr.^a Luciana Oliveira de Fariña – Orientadora
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

BIOGRAFIA

Gabrielle Racoski Custódio, natural de Guaraniaçu, Paraná, Brasil, nascida em 19 de Março de 1992.

Iniciou a graduação em Farmácia na Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, Paraná, no ano de 2009, no terceiro ano do curso, no ano de 2011 passou no Programa de Ocupação das Vagas Ociosas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – PROVOU, *campus* de Cascavel e iniciou seus estudos na instituição, com término da graduação no ano de 2013.

Em 2014, tornou-se sócia proprietária da Farmácia Farmacenter da cidade de Guaraniaçu, Paraná, juntamente com sua irmã Ana Caroline Racoski Custódio Zamarchi, também Farmacêutica, assumindo a responsabilidade técnica do estabelecimento.

Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2016. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Fármacos e Medicamentos, orientada pela Profa. Luciana Oliveira de Fariña e co-orientada pelos professores Dr. Bruno Sarmiento e Prof. Dra. Rubiana Mara Mainardes.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, meus maiores exemplos, José e Glaucia e as minhas irmãs Danieli e Ana Caroline por serem minhas principais motivadoras de seguir em frente.

Ao meu noivo Vagner, por todo o apoio e amor.

Sem vocês não seria possível realizar este sonho...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pelo dom da vida e por ser meu guia. Obrigada por me proporcionar força e sabedoria durante esta caminhada.

Aos meus pais, José e Glaucia que agradeço todos os ensinamentos, apoio, incentivo e principalmente ao amor. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por tudo o que enfrentaram para garantir minhas vitórias, com certeza, elas são também conquistas de vocês. Amo-vos incondicionalmente.

Às minhas irmãs Danieli e Ana Caroline que me presentearam com três lindos sobrinhos. Obrigada por sempre acreditarem em mim. Obrigada pelo apoio, vocês foram fundamentais e me deram forças para prosseguir. Amo vocês.

Ao meu amor, Vagner, por ter me apoiado desde o início desta caminhada. Pela confiança, paciência, amor e por estar sempre ao meu lado e nunca me deixar desanimar. Eu te amo.

Aos meus avós, tios, primos, cunhada e cunhados, sogro e sogra e demais familiares, obrigada pelo apoio e incentivo sempre.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Luciana Fariña, agradeço por ter me acolhido mais uma vez, nossa caminhada juntas iniciou-se na graduação e desde lá foram muitos ensinamentos e descobertas. Obrigada por ter confiado em mim e pelo apoio, sempre.

Aos Professores Dr^a Rubiana Mara Mainardes e Dr. Najeh Maissar Khalil obrigada por me receberem no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, na UNICENTRO, onde foi possível realizar a maior parte da pesquisa. Obrigada por todos os ensinamentos, disponibilidade e auxílio.

Ao Prof. Dr. Bruno Sarmento, obrigada pela colaboração, disponibilidade e parceria para realização dos ensaios de viabilidade celular e permeabilidade intestinal *in vitro*, juntamente com a Graciela Heep e Andreia Almeida.

Aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, obrigada pela receptividade, auxílio e cooperação. Em especial à Rossana, por não medir esforços em ajudar quando solicitada, obrigada por toda a disponibilidade, principalmente com a cromatografia líquida de alta eficiência e análises estatísticas e a tudo o que me ensinou. Não tenho palavras para agradecer a sua colaboração. Às colegas Larissa, Katriane, Daniele, Camila e Graciela, obrigada pela amizade, apoio, ensinamentos e colaboração.

Ao Prof. Edison, da UNIOESTE, e ao Prof. Roberto Pontarollo, da UFPR pela colaboração e auxílio na liofilização das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de recursos por meio do Projeto Programa Pesquisador Visitante Especial nº 09/2014 - Processo nº 88881.068073/2014-01.

À Fundação Araucária, pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE, pela oportunidade.

E a todos que, direta ou indiretamente, participaram na execução deste trabalho.

Expresso aqui meus sinceros agradecimentos.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MODIFICADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA

RESUMO

A administração oral da insulina destaca-se como o modo mais conveniente, simples e compatível com o paciente, pois proporciona conforto e é capaz de controlar a homeostase glicídica. Neste estudo foi produzido e avaliado um nanotransportador lipídico polimérico para a entrega oral da insulina por meio de dupla emulsão e emulsificação/evaporação do solvente utilizando etilpalmitato e ácido hialurônico (HA) de 13 e 55 kDa. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio em torno de 300nm, carga superficial negativa, eficiência de encapsulação de 35% e apresentaram-se estáveis termicamente quando analisadas pela calorimetria diferencial de varredura. A liberação *in vitro* com fluidos gastrointestinais simulados demonstrou a capacidade de proteção à insulina encapsulada. As nanopartículas mostraram-se seguras em potenciais concentrações terapêuticas, uma vez que não originaram citotoxicidade para as células epiteliais intestinais. Por último, a permeabilidade da insulina nanoencapsulada através de monocamadas Caco-2 e modelo Caco-2:HT29-MTX correlacionaram-se com as taxas de liberação lenta e não apresentam diferenças entre si. Esses resultados indicaram que o peso molar do HA não apresentou diferenças tanto na caracterização quanto na resposta terapêutica das nanopartículas preparadas, podendo estas serem consideradas como um bom transportador para administração oral de insulina.

PALAVRAS CHAVES: Etilpalmitato. Nanopartículas lipídicas poliméricas. Administração oral. Permeabilidade intestinal. Diabetes mellitus.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES WITH HYALURONIC ACID FOR ORAL ADMINISTRATION OF INSULIN

ABSTRACT

The oral administration of insulin stands out as the most convenient, simple and compatible way for patients, since it provides comfort and it can control the glucose homeostasis. This study produced and evaluated a polymer-lipid nanotransporter for the oral delivery of insulin by double emulsion and solvent emulsification/evaporation using ethyl palmitate and hyaluronic acid (HA) of 13 and 55 kDa. The nanoparticles showed an average diameter of 300 nm, negative surface charge, encapsulation efficiency of 35% and they were thermally stable when analyzed by differential scanning calorimetry. The *in vitro* release with simulated gastrointestinal fluids demonstrated the protection ability to encapsulated insulin. The nanoparticles have shown to be safe at potential therapeutic concentrations, since they did not cause cytotoxicity to intestinal epithelial cells. Finally, the permeability of nanoencapsulated insulin through Caco-2 monolayers and Caco-2/HT29-MTX model correlated with the slow release rates and did not show differences between them. These results indicated that the molar weight of HA did not show differences in both the characterization and the therapeutic response of the prepared nanoparticles, which could be considered as a good carrier for the oral administration of insulin.

KEYWORDS: Ethyl palmitate. Polymeric lipid nanoparticles. Oral administration. Intestinal permeability. Diabetes mellitus.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 Geral.....	7
2.2 Específicos	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 Diabetes <i>mellitus</i>	8
3.1.1 Definição e prevalência	8
3.1.2 Classificação	9
3.1.3 Tratamento.....	11
3.2 Insulina	13
3.3 Nanotecnologia	17
3.4 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN).....	19
3.5 Nanopartículas lipídicas poliméricas (NLP).....	20
3.5.1 Métodos de obtenção de NLP	21
3.5.1.1 Processos de etapa única para a obtenção de NLP	21
3.5.1.2 Processos de várias etapas para a obtenção de NLP	23
3.6 Ácido hialurônico (HA).....	23
3.7 Sistemas de entrega oral de insulina	27
4. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MODIFICADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA	28
RESUMO	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1 Materiais.....	31
2.2 Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas modificadas com HA.....	32
2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas poliméricas	33
2.3.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	33
2.3.2 Quantificação de insulina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
2.3.3 Eficiência de Encapsulação	35

2.3.4	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	36
2.3.5	Análise microscópica.....	36
2.4	Avaliação da estabilidade em suspensão das nanopartículas lipídicas poliméricas	37
2.5	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> em fluidos gastrointestinais simulados	37
2.6	Análise de viabilidade celular	38
2.7	Estudo de permeabilidade.....	39
2.8	Análise estatística	40
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1	Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas poliméricas	41
3.1.1	Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	41
3.1.2	Curva de Calibração	44
3.1.3	Eficiência de Encapsulação	44
3.1.4	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	48
3.1.5	Análise microscópica.....	51
3.2	Avaliação da estabilidade em suspensão das nanopartículas lipídicas poliméricas	52
3.3	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> em fluidos gastrointestinais simulados	56
3.4	Análise de viabilidade celular	61
3.5	Avaliação da permeabilidade da insulina presente nas nanopartículas	63
	CONCLUSÃO	66
	AGRADECIMENTOS.....	67
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	69
	CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MODIFICADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA.....	73
7.	ANEXOS.....	78
	Anexo 1 – Material Suplementar	78
	Anexo 2 – Normas Revista Expert Opinion on Drug Delivery.....	79

LISTA DE TABELAS

Capítulo I – Artigo: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas modificadas com ácido hialurônico para administração oral de insulina

Tabela 1 Diâmetro médio, índice polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas preparadas com HA de 13 kDa brancas (HA13-B) e carregadas com insulina (HA13-I) e as preparadas com HA de 55 kDa, brancas (HA55-B) e carregadas com insulina (HA55-I). Os resultados foram expressados como média \pm DP (n=3)42

Tabela 2 Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) (média \pm DP) das nanopartículas durante o ensaio de liberação em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal58

Tabela 3 Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) (média \pm Dp) das nanopartículas durante o ensaio de liberação em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS) com as enzimas pepsina e pancreatina, respectivamente. (n=3)59

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 Diferentes tipos celulares da camada epitelial saudável do intestino delgado. a. enterócitos, b. células calciformes, c. células de Paneth, d. células M, e. transporte paracelular, f. transporte transcelular, g. transporte mediado por transportador 16

Figura 2 Estrutura do HA24

Figura 3 Principais características do HA como transportados de fármacos26

Capítulo I – Artigo: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas modificadas com ácido hialurônico para administração oral de insulina

Figura 1. Distribuição de tamanho de a) amostra representativa de nanopartículas HA13-I (diâmetro médio de 261,3nm e IPD 0,031); b) amostra representativa de nanopartículas HA55-I (diâmetro médio de 293,4nm e IPD 0,004)..... 43

Figura 2. Curva analítica da insulina solubilizada em água ultrapura (área do pico versus concentração). Fase móvel: acetonitrila: ácido trifluoroacético 0,1% (30:70, v/v; após 5 min substituição por 40:60, v/v) em 214 nm (n=3)..... 44

Figura 3. Cromatograma da solução padrão de insulina 50 µg/mL..... 45

Figura 4. Cromatogramas de amostras de sobrenadantes de nanopartículas lipídicas poliméricas a) carregadas com insulina (HA13-I e HA55-I) b) brancas (HA13-B e HA55-B) e padrão de insulina de 50µg/mL..... 46

Figura 5. Curvas de DSC. (a) HA de pesos molares 13 e 55kDa, (b) Etilpalmitato, (c) Nanopartículas com HA de 13 kDa, brancas (B) e carregadas com insulina (I), (d) Nanopartículas com HA de 55 kDa, brancas (B) e carregadas com insulina (I) 50

Figura 6. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV) a) Nanopartículas HA13-I; b) Nanopartículas HA13-I com medidas em μm ; c) Nanopartículas HA55-I; e d) Nanopartículas HA55-I com medidas em μm . Magnificação de 20.0 kx51

Figura 7. Diâmetro médio das nanopartículas HA13-I e HA55-I \pm DP em função do tempo, sob refrigeração (8°C), $n=3$. *Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para uma valor de $p<0,05$ (*two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey).....53

Figura 8. Índice de Polidispersão (IPD) das nanopartículas HA13-I e HA55-I \pm DP em função do tempo, sob refrigeração (8°C), $n=3$. *Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para uma valor de $p<0,05$ (*two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey)54

Figura 9. Potencial zeta (PZ) das nanopartículas HA13-I e HA55-I \pm DP em função do tempo, sob refrigeração (8°C), $n=3$. *Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para uma valor de $p<0,05$ (*two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey)55

Figura 10. Teor de insulina das nanopartículas HA13-I e HA55-I \pm DP em função do tempo, sob refrigeração (8°C), $n=3$. *Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para uma valor de $p<0,05$ (*T-test*)56

Figura 11. Porcentagem de liberação *in vitro* da insulina a partir de nanopartículas HA13-I e HA55-I em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS).....57

Figura 12. Porcentagem de liberação *in vitro* da insulina a partir de nanopartículas HA13-I e HA55-I em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS), contendo pepsina e pancreatina, respectivamente. *Letras iguais não apresentam diferenças significativas $p>0,05$ (*T-test*)60

Figura 13. Viabilidade celular das nanopartículas HA13-B, HA13-I, HA55-B, HA55-I e Insulina livre em a) Caco-2 após 4h de incubação e b) após 24h de incubação; e em c) HT29-MTX após 4h de incubação e d) após 24h de incubação. Barras de erro representam a média \pm DP (n=3). *Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para uma valor de $p < 0,05$ (*two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey)62

Figura 14. Perfil de permeabilidade cumulativa *in vitro* de insulina livre e nanopartículas HA13 e HA55 carregadas com insulina (linhas inferiores) e seus respectivos valores de TEER (linhas superiores) em modelo de monocamadas de células Caco-2. O experimento foi conduzido do compartimento apical (pH 6.5) para o basolateral (pH 7.4) em HBSS a 37°C. Barras de erro representam a média \pm DP (n=3).....64

Figura 15. Perfil de permeabilidade cumulativa *in vitro* de insulina livre e nanopartículas HA13 e HA55 carregadas com insulina (linhas inferiores) e seus respectivos valores de TEER (linhas superiores) em modelo co-cultura Caco-2:HT29-MTX. O experimento foi conduzido do compartimento apical (pH 6.5) para o basolateral (pH 7.4) em HBSS a 37°C. Barras de erro representam a média \pm DP (n=3).....65

1. INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença caracterizada pela presença de hiperglicemia sanguínea, causada devido à falta de produção ou a resistência da insulina pelos tecidos-alvo. A insulina é uma proteína responsável pela manutenção da homeostase glicídica do organismo. No diabetes tipo 1 ocorre a destruição das células beta das ilhotas pancreáticas, as quais são responsáveis pela produção de insulina, tornando os pacientes dependentes da administração exógena para a sobrevivência.

A administração exógena de insulina dá-se pela via subcutânea, tornando-se um tratamento de difícil adesão, pois as aplicações geralmente são realizadas mais de uma vez ao dia, o processo é doloroso, e se não houver um rígido controle pode desencadear em crises hipoglicêmicas.

A fim de minimizar esses efeitos, desde a sua descoberta, em 1921, vem-se tentando produzir um sistema de liberação oral da insulina, porém ainda não existe nenhuma formulação comercial que possibilite a sua administração por esta via.

Isto ocorre principalmente, devido às limitações que a mesma apresenta, relacionadas ao trato gastrointestinal, quando administrada oralmente, tais como a degradação por enzimas proteolíticas; destruição devido ao baixo pH do meio; e baixa permeabilidade biológica através do epitélio intestinal. Assim, a biodisponibilidade da insulina apresenta-se ineficaz para controlar os níveis hiperglicêmicos do paciente com DM.

A nanomedicina tem sido bastante utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos, pois esta tecnologia ajuda a solucionar problemas relacionados à solubilidade, instabilidade e baixa biodisponibilidade dos compostos. Neste contexto, nanopartículas lipídicas poliméricas (NLP) são alvo de estudos para a entrega oral de proteínas. Destacam-se como boa alternativa terapêutica, pois: combinam benefícios dos lipídeos e polímeros que são utilizados na preparação; podem carregar diferentes tipos de fármacos, hidrofóbicos ou hidrofílicos; conferem proteção ao fármaco contra a degradação; permitem a liberação controlada; e promovem a absorção e o transporte intracelular.

O ácido hialurônico (HA) é um biopolímero polianiónico, que vem sendo utilizado associado aos nanotransportadores de fármacos devido à suas características de biocompatibilidade, mucoadesividade, viscoelasticidade e imunogenicidade limitada. Também, devido aos benefícios que o mesmo confere aos nanosistemas, tais como,

proteção à sua "carga", melhora da solubilidade e da vida plasmática de fármacos, auxiliando no retardo do mecanismo de depuração.

Portanto, considerando a administração oral da insulina como o modo mais conveniente e compatível com o paciente, capaz de proporcionar homeostase glicídica, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas poliméricas compostas por etilpalmitato e HA visando a entrega oral da insulina.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Elaboração de nanopartículas lipídicas poliméricas compostas por etilpalmitato e HA, visando o desenvolvimento de um sistema de liberação oral de insulina, para o aprimoramento do tratamento do DM tipo 1.

2.2 Específicos

- Preparação das nanopartículas lipídicas poliméricas utilizando dois pesos molares de HA, 13 e 55kDa, através metodologia de emulsificação/evaporação do solvente, a fim de encapsular a insulina;
- Caracterizar as nanopartículas lipídicas poliméricas;
- Avaliar a eficiência de encapsulação e realizar estudo de liberação *in vitro* em fluidos gastrointestinais simulados;
- Determinar a viabilidade celular frente às nanopartículas produzidas e testar sua captação em sistema que mimetiza a absorção intestinal.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Diabetes *mellitus*

3.1.1 Definição e prevalência

O DM é uma síndrome do metabolismo defeituoso de carboidratos, lipídios e proteínas, causado pela ausência de secreção de insulina ou pela diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina (GUYTON; HALL, 2006).

Os diabéticos apresentam maior risco de morbidade e mortalidade do que a população em geral, e a prevalência global da doença em adultos tem aumentado ao longo das últimas décadas. Estimou-se uma prevalência global de DM em 2015 de 415 milhões de adultos entre 20 a 79 anos, e previu um aumento para 642 milhões em 2040 (OGURTSOVA et al., 2017).

No Brasil especificadamente, em 2014 estimou-se 11,9 milhões de diabéticos, podendo alcançar até 19,2 milhões em 2035 (MILECH et al., 2016). O número de diabéticos vem aumentando significativamente em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como o aumento da sobrevida dos pacientes com DM (MILECH et al., 2016).

A hiperglicemia, quando não controlada, pode causar danos a longo prazo em vários órgãos, levando ao desenvolvimento de complicações de saúde incapacitantes e com risco de vida, como as doenças cardiovasculares, neuropatia, nefropatia e doença ocular, que pode evoluir para retinopatia e cegueira. Por outro lado, se o gerenciamento apropriado do DM for alcançado, essas complicações graves podem ser adiadas ou evitadas (KARURANGA et al., 2017).

Os cuidados de saúde para pacientes com DM são bem expressivos. Estima-se que o total de despesas globais em saúde devido ao DM em 2015 foi de 673 bilhões de dólares, podendo chegar até 802 bilhões de dólares em 2040. Aproximadamente 12% das despesas globais de saúde, em 2015, foram dedicadas ao DM e a despesa média de saúde por pessoa com diabetes foi de 1.917 dólares internacionais (OGURTSOVA et al., 2017). Estas despesas estão relacionadas aos cuidados de saúde em pacientes diabéticos, incluindo medicamentos, suprimentos, assistências hospitalar e tratamento de complicações (DA ROCHA FERNANDES et al., 2016).

3.1.2 Classificação

Existem quatro grandes categorias de DM: tipo 1; tipo 2; gestacional; e outros tipos específicos de diabetes. Apesar de a hiperglicemia ser comum a todas as formas, os mecanismos patogênicos são bem distintos. Entretanto, os mais pesquisados são o DM tipo 1 e tipo 2 (HARDMAN, JOEL; LIMBIRD; GILMAN, 2005; KERNER; BRUCKEL, 2014).

O DM tipo 1 é caracterizado pela destruição das células beta que levam a deficiência de insulina, sendo subdividido em tipos 1A e 1B.

O DM tipo 1A, também chamada de autoimune é responsável por 5-10% do diabetes. Anteriormente chamada de “diabetes insulino-dependente” ou “diabetes de início juvenil”, ocorre devido uma reação autoimune, onde o sistema imunológico ataca as células beta produtoras de insulina nas ilhotas da glândula pancreática, e como resultado, o organismo não produz insulina causando deficiência relativa ou absoluta de insulina (ADA, 2015; MILECH et al., 2016; KARURANGA et al., 2017).

As causas deste processo destrutivo não são totalmente elucidadas, embora a hereditariedade desempenhe um papel importante, uma combinação de susceptibilidade genética e desencadeadores ambientais, como infecção viral, toxinas, distúrbios autoimunes ou alguns fatores alimentares foram implicados (GUYTON; HALL, 2006; KARURANGA et al., 2017). As taxas de destruição das células beta são bastante variáveis, sendo rápida em alguns indivíduos (principalmente crianças) e lenta em outros (principalmente adultos) (ADA, 2015).

DM tipo 1B, também chamado de idiopático, como o nome já diz, não há uma etiologia conhecida para essa forma. Corresponde à minoria dos casos de DM tipo 1 e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta e não associação a haplótipos do sistema HLA. Os indivíduos com esse tipo podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina (ADA, 2015; MILECH et al., 2016).

Devido à avaliação dos auto anticorpos não se encontrar disponível em todos os centros, a classificação etiológica do DM1 nas subcategorias autoimune e idiopática pode não ser sempre possível (MILECH et al., 2016)

Embora tradicionalmente considerado como uma doença que acomete crianças e adolescentes, o DM tipo 1 causado pela destruição autoimune das células beta pode ocorrer em qualquer idade (HARDMAN, JOEL; LIMBIRD; GILMAN, 2005). Normalmente se desenvolve repentinamente e pode produzir sintomas como sede anormal e boca seca,

micção frequente, falta de energia e cansaço extremo, fome constante, perda de peso repentina e visão embaçada. O diagnóstico é realizado pela detecção de níveis elevados de glicose sanguínea (KARURANGA et al., 2017).

O DM tipo 2 é mais comum do que o tipo 1, e corresponde a cerca de 90 a 95% do total dos casos da doença (ADA, 2015). Caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose. A resistência à insulina e o defeito na função das células beta estão presentes precocemente, na fase pré-clínica da doença (MILECH et al., 2016).

Este tipo é mais comum em adultos, com mais de 30 anos, porém está cada vez mais sendo visto em crianças, adolescentes e adultos com menos de 30 anos, devido ao aumento dos níveis de obesidade, sedentarismo e maus hábitos alimentares (KARURANGA et al., 2017).

Neste caso, os principais sintomas incluem: micção frequente, sede excessiva, perda de peso e visão embaçada (KARURANGA et al., 2017). Esta forma normalmente não é diagnosticada por muitos anos porque a hiperglicemia desenvolve-se gradualmente e muitas vezes não é grave o suficiente para que o paciente note qualquer um dos sintomas. No entanto, esses pacientes correm maior risco de desenvolver complicações macrovasculares e microvasculares (ADA, 2015).

As causas não estão completamente elucidadas, mas existe um forte vínculo com sobrepeso e obesidade, aumento da idade, bem como com a etnia e histórico familiar. Alguns fatores de risco modificáveis importantes incluem: excesso de peso, maus hábitos alimentares, alto consumo de bebidas açucaradas, sedentarismo, pré-diabetes ou tolerância à glicose diminuída, tabagismo e história passada de DM gestacional (KARURANGA et al., 2017).

O DM gestacional trata-se de qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Entretanto, aquelas pacientes de alto risco e que na consulta inicial de pré-natal, no primeiro trimestre de gestação, já preenchem os critérios para diabetes fora da gestação serão classificadas não como diabetes gestacional, mas como DM tipo 2 (MILECH et al., 2016).

Similar ao DM tipo 2, o DM gestacional associa-se tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células beta. Ocorre em 1 a 14% de todas as gestações, dependendo da população estudada, e relaciona-se com aumento de morbidade e mortalidade perinatais (MILECH et al., 2016).

Os sintomas manifestos de hiperglicemia nestes casos são raros e podem ser difíceis de distinguir dos sintomas normais da gravidez, portanto, recomenda-se um teste de tolerância oral à glicose para o rastreamento da doença, entre a 24^a e 28^a semanas de gestação (KARURANGA et al., 2017).

Os fatores de risco mais comuns nestes casos incluem: gravidez após os 35 anos, obesidade prévia e durante a gravidez, pré-diabetes, etnia (aborígenes, hispânicos, sul asiáticos e africanos), histórico de DM gestacional, ganho de peso gestacional excessivo, aumento da deposição de gordura corporal central e história de DM na família (BRAWERMAN; DOLINSKY, 2018).

Na maioria dos casos, há reversão para a tolerância normal após o parto, porém há risco de 10 a 63% de desenvolvimento de DM tipo 2 dentro de 5 a 16 anos após a gestação, por isso, as pacientes devem ser reavaliadas 4 a 6 semanas após o parto e reclassificadas como apresentando DM, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída ou normoglicêmica (MILECH et al., 2016).

Pertencem a classificação de outros tipos específicos de DM as formas menos comuns, cujos processos causadores podem ser identificados. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, e casos de diabetes induzido por medicamentos ou agentes químicos (MILECH et al., 2016). Representam uma pequena fração dos pacientes com diabetes (< 5%) e são frequentemente caracterizadas pelo início da hiperglicemia em idade precoce (geralmente antes dos 25 anos) (ADA, 2015).

Todas as formas da doença podem causar complicações crônicas. Estas, por sua vez, podem ser a nível microvascular ou macrovascular. As complicações microvasculares mais comuns consistem em retinopatia, nefropatia e neuropatia. As complicações macrovasculares referem-se a um aumento dos eventos relacionados à aterosclerose, como infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico (HARDMAN, JOEL; LIMBIRD; GILMAN, 2005).

3.1.3 Tratamento

O estilo de vida é um importante determinante do controle glicêmico em pacientes com os tipos de DM, 1 e 2, e na maioria dos casos surge a necessidade de grandes mudanças, relacionadas à alimentação e prática de exercícios físicos (SALES-PERES et

al., 2016). Os objetivos da terapia de nutrição para adultos com diabetes incluem a promoção de padrões saudáveis de alimentação, como o aumento do consumo de vegetais e leguminosas e a diminuição da ingestão de açúcares, suprindo as necessidades nutricionais e também o aconselhamento sobre estes padrões (LEVESQUE, 2017).

A atividade física regular, moderada a vigorosa ajuda a reduzir o risco de progressão da doença para os pacientes pré-diabéticos, e em pacientes com DM tipo 2 reduz o risco de doença cardiovascular, melhora a glicemia e reduz a mortalidade por todas as causas. No DM tipo 1, a atividade física não melhora o controle glicêmico, porém, os mesmos devem se exercitar para obter os mesmos benefícios que os pacientes sem a doença (LEVESQUE, 2017).

O uso de insulina é imprescindível no tratamento do DM tipo 1 e deve ser instituído assim que o diagnóstico for realizado, pois tem como objetivo a manutenção da glicemia ao longo do dia entre os limites da normalidade, evitando ao máximo a ampla variabilidade glicêmica (MILECH et al., 2016). O tratamento interfere no estilo de vida, é complicado, doloroso, depende de autodisciplina e é essencial à sobrevivência do paciente (SALES-PERES et al., 2016).

A abordagem terapêutica envolve vários níveis de atuação, como a insulinoterapia, a orientação alimentar, a aquisição de conhecimentos sobre a doença, a habilidade de autoaplicação da insulina e a automonitorização da glicemia, a manutenção da atividade física regular e o apoio psicossocial (SALES-PERES et al., 2016).

Em pacientes com DM tipo 2, a primeira opção é a adequação dos mesmos a um estilo de vida saudável (educação em saúde, alimentação e atividade física), caso estas medidas não sejam efetivas para controlar os níveis de glicose no sangue, a medicação com antidiabético oral é iniciada (MILECH et al., 2016).

Quando necessário o tratamento medicamentoso, a metformina é a opção de escolha. Caso o controle glicêmico não seja efetivo, faz-se a associação com outros fármacos, dentre as opções destacam-se: sulfonilureias; hiazolidinedionas; inibidores da dipeptidil peptidase (DPP-4); inibidores de co-transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2); agonistas de peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1); e a acarbose. Porém, quando estes medicamentos orais são incapazes de controlar a hiperglicemia, a insulina pode ser prescrita (KARURANGA et al., 2017).

As gestantes com hiperglicemia podem controlar seus níveis de glicose no sangue através de uma dieta saudável, exercício físico leve e monitoramento da glicemia. Em alguns casos, a insulina ou hipoglicemiantes orais também podem ser prescritos (KARURANGA et al., 2017; BRAWERMAN; DOLINSKY, 2018).

3.2 Insulina

A molécula de insulina consiste em 51 aminoácidos com peso molar de 5.8kDa, e duas cadeias polipeptídicas individuais, compostas por 21 e 30 aminoácidos respectivamente. (GUYTON; HALL, 2006; WONG; AL-SALAMI; DASS, 2018).

No organismo humano, é sintetizada pelas células beta das ilhotas de Langherans no pâncreas e atua controlando os níveis de glicose sanguínea. Depois de secretada na corrente sanguínea, a insulina humana apresenta uma meia-vida plasmática de aproximadamente 6 min, sendo que sua maior parte é eliminada da circulação dentro de 10 a 15 min (GUYTON; HALL, 2006; SUN et al., 2015; HE et al., 2017).

Em 1922, a descoberta da insulina do pâncreas de cachorro foi um marco na história da terapia do DM, sendo vencedor do Prêmio Nobel, que teve grande importância na pesquisa biomédica. A partir deste advento, tornou-se base do tratamento dos pacientes portadores de DM tipo 1 e de muitos portadores do tipo 2, sendo de fato o fármaco mais utilizado e efetivo para controlar o DM. Ela pode ser administrada pelas vias intravenosa, intramuscular ou subcutânea. O tratamento em longo prazo caracteriza-se na injeção subcutânea do hormônio (HARDMAN, JOEL; LIMBIRD; GILMAN, 2005; FONTE et al., 2014).

A sua administração pela via subcutânea faz com que a mesma seja introduzida na circulação periférica, evitando assim a sua passagem pela circulação portal e, conseqüentemente, sua destruição metabólica (KAKLOTAR et al., 2016). Esta terapia apresenta vantagens, como o monitoramento rápido e preciso dos níveis de glicose no sangue, reduz o risco de complicações a longo prazo nos pacientes com DM e é capaz de controlar a glicemia de maneira rápida e sustentada, desde que haja a adesão ao tratamento (ANSARI, 2015).

Porém existem fatores inconvenientes relacionados a essa via de administração, que levam a falta de adesão de aproximadamente 60% dos pacientes. Os maiores problemas estão relacionados à necessidade da aplicação de injeções diárias, que geram medo e fobias, ambos associados ao baixo índice de controle glicêmico, co-morbidades

psicológicas, complicações clínicas, dor, protuberâncias na pele, reações alérgicas, hiperinsulinemia, estresse e aumento do risco de mortalidade (FONTE et al., 2013; ANSARI et al., 2016; KAKLOTAR et al., 2016). Além disso, foi relatado que a insulina quando administrada pela via subcutânea não é capaz de imitar a homeostase da glicose observada em indivíduos normais, pois é entregue à circulação periférica (SUN et al., 2015).

A fim de prevenir os problemas e efeitos colaterais associados à administração subcutânea da insulina, novas formulações foram investigadas, como emplastos, bombas e rotas não invasivas, como a pulmonar, nasal, transdérmica e oral (KAKLOTAR et al., 2016).

A administração oral parece ser o modo mais conveniente, simples e compatível com o paciente, pois proporciona conforto (sem necessidade de injeção ou dispositivo) e é capaz de controlar a homeostase glicídica (CZUBA et al., 2018).

No entanto, o caminho não é direto e a obtenção de uma formulação oral eficaz para a entrega de insulina ainda é um desafio. Ao longo do trato gastrointestinal existem várias barreiras (físicas, químicas e biológicas) que devem ser superadas para aumentar a biodisponibilidade da insulina, como a degradação enzimática e ácida rápida no estômago, inativação e digestão por enzimas proteolíticas no lúmen intestinal e baixa permeabilidade através do epitélio intestinal devido ao seu alto peso molecular, hidrofobicidade e carga superficial (FONTE et al., 2014; ANSARI, 2015; SUN et al., 2015; CZUBA et al., 2018).

A degradação enzimática depende de vários mecanismos adotados pelas enzimas proteolíticas (pepsina) presente no estômago, e algumas degradativas (tripsina, quimiotripsina e lipases) e peptidases no intestino delgado (PAWAR et al., 2014).

Estas enzimas são necessárias para quebrar as proteínas da dieta em seus constituintes de aminoácidos para absorção. No entanto, a insulina é degradada principalmente pela tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidases no lúmen intestinal e na camada de muco. Finalmente, após o transporte através do epitélio intestinal, a insulina sofre um primeiro metabolismo pelos microssomas hepáticos. Portanto, mesmo que a mesma sobrevivesse ao ataque enzimático durante a absorção no trato gastrointestinal, a fração de dose que atingiria a circulação sistêmica seria baixa (LOPES et al., 2014).

A camada de muco, outra barreira para a absorção oral desta proteína, consiste em uma rede altamente viscosa de moléculas de mucina reticuladas e outras substâncias

(por exemplo, enzimas, lipídeos e íons minerais) que cobrem o trato gastrointestinal e protegem-no contra danos. As proteínas bioativas, como por exemplo, a insulina, podem ser incapazes de entrar na camada de muco, ou podem ser presas dentro da camada de muco e hidrolisadas por enzimas digestivas antes de atingirem as células do epitélio. Uma vez que encontram as células do epitélio, elas devem ser absorvidas, o que muitas vezes é um desafio devido ao seu grande tamanho e polaridade (MCCLEMENTS, 2018).

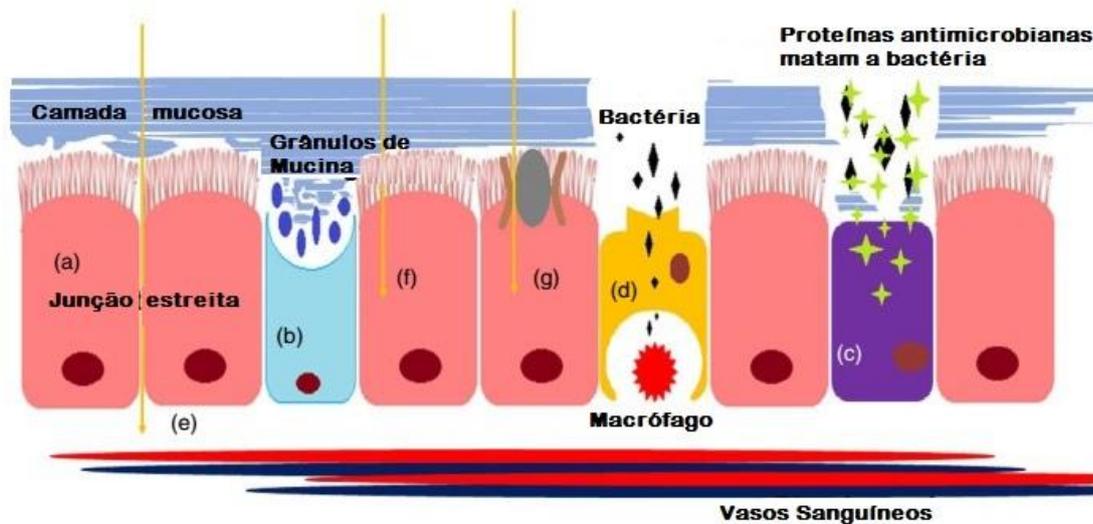
Além da degradação enzimática e da presença do muco, existe ainda a grande variação de pH (1-7) ao longo do trato gastrointestinal, sendo entre 1 e 3 no estômago, 6 e 6,5 no duodeno e entre 5,5 e 7 no colón, o que afeta a estabilidade da insulina (LOPES et al., 2014; PAWAR et al., 2014).

Em pH baixo, as interações eletrostáticas resultam no aumento da carga positiva da proteína, enquanto que o pH mais alto leva à repulsão das cargas negativas. Essas forças repulsivas criam incongruências estruturais que danificam a parte funcional, responsável pelo efeito terapêutico (PAWAR et al., 2014).

O epitélio do intestino delgado é composto por diferentes tipos celulares, conforme ilustrado na Figura 1. Cerca de 90% corresponde aos enterócitos (a), que possuem a função de absorção de nutrientes, e 10% às células caliciformes (b), que atuam como um reservatório secretor de muco. Estes são unidos em sua borda luminal por junções estreitas, que por sua vez, são responsáveis por manter a estrutura do epitélio intestinal intacto, visto que são compostos de várias proteínas transmembranares, como as claudinas e ocludinas. Já as células de Paneth (c) são responsáveis em eliminar bactérias e proteínas antimicrobianas (MCGINN; MORRISON, 2016; GEDAWY et al., 2018).

No íleo também existem as células M (células epiteliais membranosas) que sobrepõem as placas de Peyer e são conhecidas por serem capazes de absorverem antígenos e microrganismos no lúmen (MCGINN; MORRISON, 2016).

Basicamente, existem três vias de absorção pelo intestino delgado: o transporte paracelular, que está ligado principalmente às pequenas moléculas hidrofílicas; transporte transcelular, que é limitado para a difusão passiva de substratos lipofílicos; e ainda pode ocorrer absorção transcelular mediada por transportador (GEDAWY et al., 2018).



Traduzido e adaptado de GEDAWY et al., 2017.

Figura 1 Diferentes tipos celulares da camada epitelial saudável do intestino delgado. a. enterócitos, b. células calciformes, c. células de Paneth, d. células M, e. transporte paracelular, f. transporte transcelular, g. transporte mediado por transportador.

As membranas celulares do epitélio consistem predominantemente de bicamadas de fosfolípidios, elas impedem a absorção por difusão passiva de fármacos lipofílicos com um peso molecular superior a 700Da. Já a via paracelular é restrita a pequenos fármacos hidrofílicos com peso molecular inferior a 200Da, devido a presença de junções estreitas. Portanto, uma vez que a insulina é hidrofílica e tem um peso molecular de 5.8 kDa, não passa por difusão passiva através de células epiteliais (LOPES et al., 2014; GEDAWY et al., 2018).

Ao desenvolver-se uma formulação oral para a insulina, deve-se ter como objetivo a resolução dos problemas de degradação enzimática e baixa permeabilidade (LOPES et al., 2014). Muitas estratégias foram desenvolvidas para aumentar a administração de insulina na corrente sanguínea após a administração oral, como por exemplo, modificação da estrutura química, inibição enzimática, intensificadores de permeação e sistemas de encapsulação (KAKLOTAR et al., 2016; CZUBA et al., 2018).

A preparação de nanopartículas destaca-se como um sistema de encapsulação da insulina, pois apresenta vantagens relacionadas à proteção contra o baixo pH e a degradação enzimática no trato gastrointestinal. Isso melhora o aproveitamento do fármaco nos locais de absorção, pois podem apresentar revestimento mucoadesivo, proporcionando assim um maior tempo de residência no epitélio intestinal e conseqüentemente, o desencadeamento de uma liberação gradual da insulina presente

dentro das nanopartículas. E ainda, podem melhorar o transporte através da mucosa gastrointestinal por meio da permeação através do mesmo (KAKLOTAR et al., 2016).

As formulações orais de insulina podem ser absorvidas pelas células do epitélio intestinal por meio de diferentes mecanismos, tais como: transporte transcelular ou paracelular. Na rota transcelular são absorvidas principalmente por processos dependentes de energia, tais como fagocitose, pinocitose e endocitose mediada por receptor. Já na rota paracelular são principalmente absorvidos por enterócitos (tamanhos inferiores a 200 nm) ou pelas células M de placas de Peyer (tamanhos inferior a 10 μm) (KAKLOTAR et al., 2016).

3.3 Nanotecnologia

O termo “nanotecnologia” foi utilizado pela primeira vez em 1974, por Norio Taniguchi, cientista da Universidade de Tóquio, Japão, quando referiu-se a materiais em nanômetros, sendo um nanômetro (nm) igual a um bilionésimo de um metro, ou seja, 10^{-9}m . (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

A nanotecnologia oferece novas possibilidades para a criação de novos materiais e para o desenvolvimento de formas únicas de dosagem farmacêutica e sistemas de liberação de medicamentos. Os sistemas de nanopartículas são geralmente classificados como partículas de fármaco ativo de tamanho nano ou substratos nanoparticulados que podem encapsular ingredientes farmacêuticos ativos dentro, complexados ou conjugados, ou sintetizados na nano-dimensão (TYAGI; SUBRAMONY, 2018).

A pesquisa em nanotecnologia pode ser desenvolvida para avanços nas comunicações, engenharia, química, física, robótica, biologia e medicina. Tem sido utilizada na medicina para a administração terapêutica de fármacos e o desenvolvimento de tratamentos para uma diversidade de doenças e distúrbios (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Os carreadores terapêuticos em escala nanométrica têm sido cada vez mais utilizados como veículos de entrega de medicamentos devido às inúmeras vantagens que oferecem, em virtude de seu pequeno tamanho e versatilidade. Dentre elas, incluem a maior taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis ou hidrofóbicos; a funcionalização da superfície, permitindo a liberação direcionada e evasão do sistema imunológico, ampliando assim a meia vida terapêutica *in vivo*; bem como o controle e liberação

prolongada do fármaco, que quando associados, conferem uma frequência de dosagem reduzida e eficiência terapêutica melhorada (CHEOW; HADINOTO, 2011).

As estratégias de administração de fármacos incorporam os agentes no microambiente do nanotransportador, com o objetivo de melhorar a eficácia e segurança do tratamento medicamentoso. A síntese destes nanotransportadores é uma arte desafiadora, para obter-se produtos reproduzíveis do ponto de vista tecnológico e também na permanência de suas características, a fim de que os resultados nas experiências *in vitro* e *in vivo* devem ser reproduzíveis (KESHARWANI et al., 2018).

Os nanotransportadores utilizados para aplicações médicas devem ser biocompatíveis, ou seja, serem capazes de interagir com o sistema biológico sem provocar resposta imune ou quaisquer efeitos negativos. Também não podem ser tóxicos, ou seja, devem ser inofensivos ao sistema biológico. Os efeitos indesejáveis das nanopartículas dependem fortemente do seu tamanho, forma, quantidade, química da superfície, via de administração, reação do sistema imunológico e tempo de permanência na corrente sanguínea. Devido a uma série de fatores que podem afetar a toxicidade das nanopartículas, sua estimativa é bastante difícil e, portanto, os estudos toxicológicos das novas formulações de sistemas de entrega de fármacos são necessários (WILCZEWSKA et al., 2012).

Em relação à utilização de nanopartículas para administração oral de fármacos, as principais vantagens estão relacionadas à: capacidade de entrega de fármacos pouco solúveis em água; possibilidade de direcionamento a partes específicas do trato gastrointestinal; proteção das drogas, peptídeos ou ácidos nucleicos de enzimas digestivas; aumento da mucoadesão; aumento da retenção no trato gastrointestinal, auxiliando na absorção de fármacos através da mucosa intestinal; e entrega intracelular e transcelular de grandes macromoléculas (GAMBOA; LEONG, 2013; AGRAWAL et al., 2014).

Diversos nanosistemas estão sendo estudados e testados como sistemas de administração de fármacos. Dentre eles destacam-se os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, dendrímeros, polímeros, materiais de silício ou carbono e nanopartículas magnéticas (WILCZEWSKA et al., 2012). Para a administração de proteínas e peptídeos, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e as poliméricas foram, até agora, as mais comumente exploradas. Por exemplo, as SLN atraíram crescente atenção científica e comercial como transportadores de proteínas/peptídeos terapêuticos durante os últimos

anos, devido à sua grande diversidade e biocompatibilidade favoráveis e funcionalidade específica (NIU et al., 2016; BATISTA et al., 2018).

3.4 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

São nanopartículas constituídas por lipídeos naturais, semissintéticos ou sintéticos que apresentam-se em estado sólido à temperatura ambiente. Adicionalmente, incorpora-se uma camada emulsionante, que lhes proporciona a estabilidade adequada para dispersão em água. Estes lipídeos são fisiologicamente compatíveis. Os mais utilizados são os ácidos graxos (por exemplo, ácido esteárico), ésteres de ácidos graxos (por exemplo, monoestearato de glicerila, behenato de glicerila), triglicéridos (por exemplo, tristearina, trilaurina), esteroides (por exemplo, colesterol) e ceras (por exemplo, palmitato de cetila) (AGRAWAL et al., 2014; NIU et al., 2016; SANTALICES et al., 2017).

Estruturalmente, estes lipídeos são moléculas anfifílicas, que possuem uma região hidrofóbica, composta por uma, duas ou três cadeias de hidrocarbonetos de diferentes comprimentos, e uma cabeça polar diferenciada. O número, comprimento da cadeia hidrocarbonada e o grau de insaturação (ligações duplas) determinam a hidrofobicidade da molécula (NIU et al., 2016).

As SLN foram introduzidas na década de 90, com o objetivo de superar as vantagens e desvantagens de outros transportadores sólidos, apresentando-se como uma alternativa segura e eficaz para a entrega de fármacos (AGRAWAL et al., 2014; SGORLA et al., 2016). Sua natureza lipídica intrínseca confere a esses sistemas propriedades interessantes, como a proteção do fármaco da degradação; capacidade de controlar a liberação do fármaco aprisionado; biocompatibilidade favorável, possibilitando a utilização de uma variada quantidade e tipo de lipídeo; além da facilidade de produção em larga escala (NIU et al., 2016; SANTALICES et al., 2017). Quando se trata de proteínas, além destas, apresentam as vantagens de liberação controlada e capacidade de funcionalização para direcionamento aos órgãos específicos (BATISTA et al., 2018).

A produção destas nanopartículas é baseada na incorporação do fármaco no lipídeo fundido e depois misturada com a solução aquosa de surfactante (NIU et al., 2016). Diferentes técnicas podem ser exploradas para a produção, algumas com alta energia, sendo elas, a homogeneização por alta pressão (HPH), técnicas de ultrassom e tecnologias de fluido supercrítico; ou procedimentos de baixa energia, como a emulsificação/evaporação de solvente, coacervação, técnica de microemulsão, contator

de membrana, microcanais, microtubos e método de temperatura por inversão de fases, seguido por resfriamento imediato, levando à recristalização lipídica e à formação de nanopartículas (LI et al., 2017; TEIXEIRA; CARBONE; SOUTO, 2017).

Entre essas técnicas, apenas as que evitam o uso de temperatura elevada são em princípio, apropriadas para a encapsulação de proteína/peptídeo. Estas técnicas envolvem a dissolução dos lipídeos em solventes orgânicos, seguida da sua difusão e evaporação dos solventes. A formação de emulsões duplas (água/óleo/água) tem sido a técnica mais frequentemente relatada para a obtenção de quantidades significativas de peptídeos e proteínas dentro das SLN (NIU et al., 2016).

Os critérios para a seleção de lipídeos a serem utilizados em formulações nanoestruturadas que visam à entrega oral de peptídeos incluem: pureza e estabilidade química; capacidade de dissolução; miscibilidade em água; digestibilidade e destino dos produtos digeridos; perfil de segurança; e regulamentação (NIU et al., 2016).

Embora apresentem muitas vantagens, algumas limitações também foram relatadas, como baixa capacidade de carga de fármaco, alto teor de água das dispersões que podem expelir os compostos ativos durante o armazenamento, transições polimórficas e cristalinidade lipídica. Para superar essas desvantagens, uma nova geração de nanopartículas lipídicas composta por transportadores lipídicos nanoestruturados e conjugados lipídicos-fármacos foram desenvolvidos pela introdução de modificações nos SLNs. Dentre essas modificações, destacam-se a utilização de polímeros, criando uma matriz lipídica polimérica para aprisionamento de drogas (SGORLA et al., 2016).

3.5 Nanopartículas lipídicas poliméricas (NLP)

As nanopartículas lipídicas poliméricas combinam os benefícios da nanopartículas à base de lipídeos, tais como a maior capacidade de carga, juntamente aos benefícios arquitetônicos de transportadores poliméricos, em termos de liberação controlada e direcionamento na entrega do fármaco carregado, exibindo assim características complementares, em termos de estabilidade física e biocompatibilidade (HADINOTO; SUNDARESAN; CHEOW, 2013; DATE et al., 2018).

A coexistência de polímero e lipídeo, que possuem diferentes propriedades, como hidrofobicidade e solubilidade em água, conferem às NLP, a versatilidade de carregar diferentes tipos de fármacos. Em comparação com outros tipos de nanocarreadores,

exibem uma série de vantagens únicas, incluindo a possibilidade de seleções de ampla gama de polímeros e lipídeos biocompatíveis com numerosas combinações entre si, a fácil fabricação por um método de único passo, capacidade de co-encapsular agentes terapêuticos com diferentes propriedades (WU, 2016; BOSE et al., 2017).

Além das vantagens citadas, demonstrou-se que as formulações de NLP aumentam a eficiência de encapsulação e capacidade de carga de fármacos, permitem a liberação controlada, melhoram a absorção e o transporte de fármaco intracelular. Assim, destacam-se como uma boa alternativa terapêutica, pois auxiliam na redução dos efeitos colaterais dos tratamentos medicamentosos, uma vez que, diminuem a toxicidade do fármaco e reduzem as administrações, melhorando assim a adesão ao tratamento pelos pacientes (SGORLA et al., 2016; WU, 2016).

Os polímeros podem estar presentes nestas nanopartículas de quatro diferentes formas, basicamente: (i) circundando o núcleo composto por um lipídeo sólido; (ii) complexadas ao fármaco; (iii) dispersas na matriz lipídica sólida; ou (iv) em um núcleo polimérico na qual a substância terapêutica é encapsulada (SGORLA et al., 2016; DATE et al., 2018).

Para a produção de NLP tem sido usado polímeros biocompatíveis, como por exemplo o poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), sulfato de dextrano e polietilenimina (PEI), e lipídeos comumente utilizados em formulações farmacêuticas, tais como fosfolípidos, polietilenoglicol (PEG), extratos de produtos alimentares (por exemplo, lecitina) ou encontrados no corpo (por exemplo, ácidos graxos endógenos) (WU, 2016).

3.5.1 Métodos de obtenção de NLP

Diferentes métodos podem ser utilizados para preparar esses sistemas, sendo categorizados basicamente como: processo de etapa única, processo de várias etapas e processos não convencionais (DATE et al., 2018).

3.5.1.1 Processos de etapa única para a obtenção de NLP

Esta técnica de preparação elimina a necessidade de pré-formação de nanopartículas separadas e vesículas lipídicas, ajudando a reduzir o tempo e o trabalho para a preparação, tornando-a mais conveniente (LI et al., 2017; DATE et al., 2018). O fármaco, os lipídeos e polímeros são misturados, formando as nanopartículas por automontagem (BOSE et al., 2017).

Como exemplo deste processo, destacam-se os métodos de nanoprecipitação modificada, emulsificação/evaporação de solvente, dispersão ultrassônica, homogeneização de alta pressão e hidratação por filme fino (LI et al., 2017).

O método de nanoprecipitação envolve a adição de uma fase orgânica contendo um polímero em uma fase aquosa aquecida contendo um lipídeo, seguido por vórtice mecânico para completar a automontagem e evaporação para remover o excesso de solvente orgânico (BOSE et al., 2017).

Este método é amplamente relatado para a preparação de NLP, juntamente com pequenas variações, como o uso simultâneo de sonicação de alta energia, nanoprecipitação em microcanal para controlar a uniformidade de distribuição de tamanho e nanoprecipitação microfluídica. Neste método, o polímero é adicionado ao solvente orgânico miscível em água como acetona ou acetonitrila, juntamente com o fármaco. Porém, apresenta limitação quando a substância a ser encapsulada é hidrossolúvel, pois pode permanecer na fase aquosa levando a uma baixa eficiência de encapsulação (DATE et al., 2018).

O preparo por emulsificação/evaporação de solvente utiliza solventes imiscíveis em água, tais como diclorometano, acetato de etilo e clorofórmio, e também uma fase aquosa, podendo assim capturar com sucesso ambas as substâncias, hidrofóbicas e hidrofílicas e, proporcionar um melhor grau de diversidade em termos de grau de solubilidade das substâncias a serem encapsuladas dentro do sistema (DATE et al., 2018).

Este método envolve duas variantes, isto é, o tipo da emulsão, podendo ser simples ou dupla. No modo de emulsão simples, o fármaco e o polímero são dissolvidos em solvente imiscível em água e adicionados à dispersão aquosa de lipídeo sob agitação ou sonicação para formar uma emulsão óleo em água (O/A). À medida que o tempo passa, o solvente orgânico é evaporado levando à precipitação do núcleo polimérico encapsulado que é simultaneamente revestido com lipídeos devido às interações hidrofóbicas. Alternativamente, o lipídeo também pode ser dissolvido na fase oleosa juntamente com o polímero (HADINOTO; SUNDARESAN; CHEOW, 2013; LI et al., 2017; DATE et al., 2018).

3.5.1.2 Processos de várias etapas para a obtenção de NLP

Os dois passos deste método referem-se a processos independentes para preparar o núcleo polimérico e o invólucro lipídico. Várias técnicas de mistura, como hidratação direta, sonicação ou extrusão têm sido usadas para fundir os núcleos poliméricos com as vesículas lipídicas para formar as NLP (BOSE et al., 2017; LI et al., 2017).

A obtenção de uma distribuição de tamanho uniforme é um dos desafios deste método e, para obter uma distribuição de tamanho, homogeneização e extrusão uniformes faz-se necessário utilizar a técnica de extrusão, em que usa-se uma membrana tipo malha, através da qual a formulação é passada repetidamente para reduzir o tamanho (DATE et al., 2018).

O método de dupla emulsão com evaporação de solvente é também um método de dois passos utilizado para preparar NLP. É a melhor escolha para drogas solúveis em água, que são insolúveis em solvente orgânico e não podem ser dissolvidas junto com o polímero.

Para tais substâncias são dissolvidas na fase aquosa e emulsionadas em uma fase oleosa contendo o polímero e o lipídeo, ou apenas o lipídeo, para formar uma emulsão A/O. Posteriormente, esta primeira emulsão é novamente emulsionada em outra fase aquosa, normalmente contendo um tensoativo, ou até mesmo o polímero, formando assim, uma emulsão dupla, que com a evaporação do solvente, as NLP são formadas, compostas por um fármaco contendo núcleo aquoso seguido por camada concêntrica de lipídeo e polímero, e camada externa aquosa (HADINOTO; SUNDARESAN; CHEOW, 2013; DATE et al., 2018).

Várias outras técnicas não convencionais, como a secagem por atomização e a técnica de replicação de partículas em modelos não hidratados (PRINT) foram relatadas para a preparação de NLP (DATE et al., 2018).

3.6 Ácido hialurônico (HA)

O HA, também conhecido como hialuronano ou hialuronato é um glicosaminoglicano aniônico não sulfatado, presente em todos os tecidos do corpo humano, porém de forma abundante no vítreo do olho, cordão umbilical, líquido sinovial, nas válvulas cardíacas, pele e nos tecidos esqueléticos (LIANG; JIANG; NOBLE, 2016; MANSURI et al., 2016). Foi primeiramente isolado do vítreo do olho como um polissacarídeo contendo ácido D-glucurônico e D-N-acetilglucosamina e foi denominado

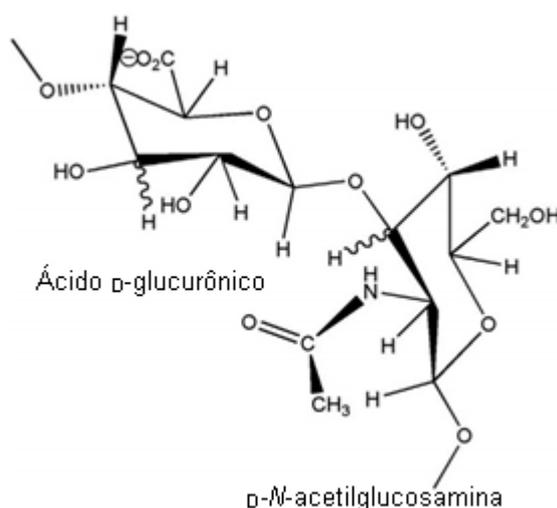
HA em um artigo publicado em 1934 por Karl Meyer (GARG; HALES, 2004).

Como componente chave do fluido sinovial, é responsável pelo aumento de sua viscosidade, e na pele, está envolvido na reparação tecidual. Pode ser produzido por diversas células, embora acredita-se que as células mesenquimais sejam sua fonte predominante (LIANG; JIANG; NOBLE, 2016; MANSURI et al., 2016).

Quimicamente, é composto por dissacarídeos poliméricos repetidos, ácido *D*-glucurônico e *D*-*N*-acetilglucosamina, ligados por uma ligação glucurônica β (1 \rightarrow 3) (Figura 2) (LIANG; JIANG; NOBLE, 2016). Seus grupos de ácidos carboxílicos apresentam valor de pKa entre 3 e 4, conseqüentemente, o polissacarídeo apresenta carga superficial negativa em pH fisiológico (GUTER; BREUNIG, 2017).

O grande número de grupos carboxila e hidroxila presentes em sua estrutura permitem a modificação química dessas funcionalidades com alta carga química. Além desses dois grupos funcionais, sua extremidade redutora pode servir como um aldeído mascarado, podendo ser usado para conjugar fármacos no terminal da cadeia (CHEN; MILLER; DHAL, 2014).

Em mamíferos, o HA está presente como um polímero linear de elevado peso molecular (10^6 - 10^7 Da), e esta grande massa molar confere-lhe as suas propriedades físico-químicas únicas e explica os importantes papéis que desempenha nos organismos vivos. É altamente hidrofílico, pode absorver água e expandir seu volume sólido em até mil vezes, formando um gel muito viscoso e elástico com um grande volume hidrodinâmico (DOSIO et al., 2016).



Fonte: Adaptado de SUDHA; ROSE, 2014.

Figura 2 Estrutura do HA.

É sintetizado por três sintases de hialurano transmembranar (HAS1, HAS2 e HAS3) na superfície interna da membrana celular e secretada na matriz extracelular. A sua degradação é devido às hialuronidases, uma família de enzimas que catalisam a degradação das ligações β -N-acetil-D-glucosaminídicas no polímero, sendo que a principal captação no sangue ocorre nas células endoteliais do fígado, apresentando uma meia-vida de cerca de 2-5 min na corrente sanguínea, menos de 1 dia na pele e 2-3 semanas na cartilagem (DOSIO et al., 2016).

Este composto está envolvido em vários processos que ocorrem no organismo, incluindo proliferação, diferenciação e motilidade celular, adesão e expressão gênica. Além de suas propriedades reológicas, devido à sua viscoelasticidade também desempenha um papel importante na cicatrização de feridas, na ovulação, na fertilização, na transdução de sinais, na eliminação de radicais livres e na fisiologia de tumores (CHEN; MILLER; DHAL, 2014; SALWOWSKA et al., 2016).

A viscoelasticidade única e a imunogenicidade limitada do HA levaram à sua utilização em várias aplicações biomédicas, como a viscosuplementação no tratamento da osteoartrite, auxílio na cirurgia ocular e na regeneração de feridas. Além disso, foi recentemente explorado como um agente de administração de fármacos para diferentes vias, tais como nasal, oral, pulmonar, oftálmica, tópica e parenteral (SUDHA; ROSE, 2014; LIANG; JIANG; NOBLE, 2016).

Os benefícios do uso de HA como veículo de entrega de medicamentos estão relacionados às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, por não ser tóxico nem imunogênico, sendo prontamente catabolizado e removido *in vivo* (Figura 3) (CHEN; MILLER; DHAL, 2014; TRIPODO et al., 2015). Proporciona proteção à sua "carga", confere solubilidade às drogas hidrofóbicas e melhora a meia vida plasmática do fármaco, retardando o mecanismo de depuração (SUDHA; ROSE, 2014; DOSIO et al., 2016).



Fonte: Traduzido e adaptado de CHEN; MILLER; DHAL, 2014.

Figura 3 Principais características do HA como transportados de fármacos.

Seu diferencial está na propriedade de ser um ligante natural de vários receptores da superfície celular, como o CD44, uma família de glicoproteínas originalmente associadas à ativação linfocitária e ao RHAMM (receptor para motilidade mediada por hialuronato). Esses receptores mostraram-se super expressos na maioria dos tipos de células tumorais. Essa propriedade leva a um comportamento de internalização mediado por receptor de HA, que tem sido utilizado como um "dispositivo de localização" para os conjugados de HA com quimioterápicos (CHEN; MILLER; DHAL, 2014; SUDHA; ROSE, 2014).

Durante a degradação enzimática dos sistemas de distribuição de fármacos com HA, os receptores CD44 favorecem a sua internalização pelas células, permitindo a entrega intracelular de fármacos. Já foi demonstrado que o HA é naturalmente degradado no organismo por um mecanismo complexo enzimático envolvendo enzimas

hialuronidases, e a sua internalização com as células é facilitada pelos receptores de superfície celular CD44 ou por espécies reativas de oxigênio (ROS). Nesse contexto, o HA tornou-se um sistema de transporte extensamente explorado para o fornecimento de ação prolongada e sistema de depósito para medicamentos (VASI et al., 2014).

3.7 Sistemas de entrega oral de insulina

O sucesso da administração oral da insulina requer considerar sua estabilidade fisiológica e biológica nas formulações, no trato gastrointestinal e no citosol dos enterócitos. As barreiras que ocorrem na sua administração oral podem ser superadas através da incorporação de excipientes funcionais que podem atuar como estabilizadores, inibidores de protease, agente mucoadesivo e/ou um intensificador de permeação para manter a estabilidade da insulina e aumentar o seu transporte paracelular e/ou transcelular, a fim de aumentar a sua biodisponibilidade oral (ALAI; LIN; PINGALE, 2015).

Diversos sistemas já foram estudados, dentre eles, ZHANG et al., 2006 prepararam nanopartículas lipídicas sólidas modificadas com lectina para administração oral da insulina e evidenciaram a melhora da absorção intestinal da insulina encapsulada em relação ao fármaco livre.

Como exemplo de polímeros naturais, FONTE et al., 2012 produziram nanopartículas lipídicas sólidas revestidas com o polímero quitosana destinadas à absorção intestinal de insulina. As nanopartículas foram capazes de proteger a insulina contra a degradação no trato gastrointestinal e aumentaram sua absorção no epitélio intestinal. Além disso, o revestimento de quitosana aumentou ainda mais as propriedades de absorção intestinal.

HAN et al., 2012 produziram nanopartículas de HA carregadas de insulina. Seus resultados da permeabilidade através do intestino delgado de rato confirmaram que as nanopartículas de HA melhoraram significativamente o transporte de insulina através do duodeno e do íleo.

SGORLA et al., 2018 utilizaram etilpalmitato e acetato de hidroxipropilmetilcelulose succinato como matriz de nanopartículas para a entrega oral de insulina. As nanopartículas demonstraram capacidade em proteger a insulina contra a degradação no trato gastrointestinal e apresentaram taxas lentas de permeabilidade através de monocamadas de Caco-2 e em modelo triplo de células Caco-2/HT29-MTX/Raji B.

4. CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MODIFICADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA

Gabrielle R. Custódio^{a*}, Rossana Marcano^b, Graciela Leila Heep^b, Rubiana Mara Mainardes^b, Najeh Maissar Khalil^b, Bruno Sarmiento^{ac} e Luciana Oliveira de Fariña^a.

^aCentro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brasil; ^bLaboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Brasil; ^cInstituto Universitário de Ciências da Saúde, Gandra, Portugal.

* luciana.farina@unioeste.br

Tel. +55 (45) 3220-7290

RESUMO

A administração oral da insulina destaca-se como o modo mais conveniente, simples e compatível com o paciente, pois proporciona conforto e é capaz de controlar a homeostase glicídica. Neste estudo foi produzido e avaliado um nanotransportador lipídico polimérico para a entrega oral da insulina por meio de dupla emulsão e emulsificação/evaporação do solvente utilizando etilpalmitato e ácido hialurônico (HA) de 13 e 55 kDa. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio em torno de 300nm, carga superficial negativa, eficiência de encapsulação de 35% e apresentaram-se estáveis termicamente quando analisadas pela calorimetria diferencial de varredura. A liberação *in vitro* com fluidos gastrointestinais simulados demonstrou a capacidade de proteção à insulina encapsulada. As nanopartículas mostraram-se seguras em potenciais concentrações terapêuticas, uma vez que não originaram citotoxicidade para as células epiteliais intestinais. Por último, a permeabilidade da insulina nanoencapsulada através de monocamadas Caco-2 e modelo Caco-2:HT29-MTX correlacionaram-se com as taxas de liberação lenta e não apresentam diferenças entre si. Esses resultados indicaram que o peso molar do HA não apresentou diferenças tanto na caracterização quanto na resposta terapêutica das nanopartículas preparadas, podendo estas serem consideradas como um bom transportador para administração oral de insulina.

PALAVRAS CHAVES: Etilpalmitato. Nanopartículas lipídicas poliméricas. Administração oral. Permeabilidade intestinal. Diabetes mellitus.

1. INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico em que o organismo é incapaz de produzir insulina ou de utilizá-la, caracterizada pela hiperglicemia. A insulina é um hormônio peptídico sintetizado e secretado pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, que desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase da glicose no organismo através de um mecanismo de feedback [1].

A insulina, usualmente, é injetada por via subcutânea, e isso geralmente está associado à dor, trauma, sofrimento, levando à baixa adesão do paciente, que por sua vez, se transforma em uma cadeia de efeitos indesejáveis [2]. A fim de aliviar esses efeitos, vários sistemas de administração baseados em nanopartículas surgiram para elevar a absorção oral de insulina [3–6]. Porém, a degradação por enzimas no lúmen gastrointestinal e a penetração deficiente através dos epitélios intestinais que cobrem o muco são as principais barreiras à absorção oral da insulina [7]. Os nanotransportadores, então, visam superar esses obstáculos ao facilitar a permeabilidade dos fármacos através da mucosa intestinal, bem como diminuir a degradação enzimática no estômago e melhorar a permeação através do trato gastrointestinal [8].

As nanopartículas lipídicas poliméricas (NLP) são preparadas com lipídeos e polímeros e, portanto, combinam os benefícios de ambas as substâncias. Apresentam um grande interesse, pois podem carregar diferentes tipos de fármacos, hidrofóbicos ou hidrofílicos, com a possibilidade de seleção de uma ampla gama de polímeros e lipídeos biocompatíveis e numerosas combinações entre si [9–12]. Além disso, demonstrou-se que as formulações de NLP aumentam a eficiência de encapsulação e a capacidade de carregamento dos fármacos, permitem a liberação controlada, melhoram a absorção e o transporte de fármaco intracelular, destacando-se como uma boa alternativa terapêutica [12,13].

O HA é um polímero polianiônico de ocorrência natural, composto por ácido D-glucurônico e N-acetil-Dglucosamina, ligados por uma ligação glicosídica β (1 \rightarrow 3) [6,14]. A sua viscoelasticidade única e a imunogenicidade limitada o levaram a ser utilizado em várias aplicações biomédicas. Recentemente vem sendo explorado como um agente de administração de fármacos para diferentes vias, tais como nasal, oral, pulmonar, oftálmica, tópica e parentérica [14,15]. Proporciona proteção à sua "carga", confere solubilidade às drogas hidrofóbicas e melhora a meia vida plasmática do fármaco, retardando o mecanismo de depuração [15,16], sendo seus benefícios relacionados às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e pronta catabolização e remoção *in vivo* [17,18].

Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas poliméricas compostas por etilpalmitato e HA de 13 e 55 kDa a fim de fornecer um transportador adequado para futura administração oral da insulina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Etilpalmitato, álcool polivinílico (PVA), acetonitrila e ácido trifluoroacético foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Brasil), os HA de pesos molares 13 e 55kDa foram adquiridos da Contipro® (República Checa) e a Insulina, foi utilizada a Levemir® FlexPen® (insulina detemir, produzida por tecnologia de DNA recombinante em *Saccharomyces cerevisiae*), adquirida em farmácia comercial na cidade de Guarapuava/PR – Brasil. Todos os outros reagentes ou materiais utilizados foram de grau analítico ou equivalente. O preparo das nanopartículas, a caracterização físico-química e os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados em cooperação com o Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Estadual do Centro-Oeste/UNICENTRO, em

Guarapuava/PR – Brasil; os ensaios de viabilidade celular e permeabilidade foram realizados no Instituto Universitário de Ciências da Saúde, Gandra, Portugal.

2.1.1 Linhagem e cultura celular

Foram utilizadas duas linhagens celulares de câncer colorretal, Caco-2 (clone) e HT29-MTX obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA). Ambas as linhagens celulares foram cultivadas com meio de *Eagle* modificado por *Dulbecco's* (DMEM, Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS), 1% (v/v) de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Todos os suplementos foram adquiridos da Merck Millipore (Billerica, MA, EUA). O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e Triton X-100 1% de Spi-Chem (West Chester, PA, EUA), e os frascos de cultura, placas de cultura de tecidos de 96 poços e placas de 12 poços Transwell® foram adquiridos da Corning Inc., (Condado de Steuben, NY, EUA). As células foram mantidas numa incubadora (Incubadora de CO₂ ESCO Celculture®, Singapura) a uma temperatura de 37°C em atmosfera saturada com água com 5% de CO₂ [19,20].

2.2 Preparo das nanopartículas lipídicas sólidas modificadas com HA

O preparo das nanopartículas seguiu a metodologia de Fonte et al. [3], utilizando a técnica de dupla emulsão água/óleo/água (A/O/A) por meio da emulsificação/evaporação do solvente.

Para a fase oleosa, 100mg de etilpalmitato foram diluídos em 1 mL de diclorometano, em um tubo de vidro. A fase aquosa interna foi composta por 1,42 mg de insulina comercial (10 UI da caneta Levemir® FlexPen®, equivalente a 100 µL) e 100 µL de

solução de álcool polivinílico (PVA) a 1%. A fase aquosa externa foi composta de uma mistura de 10 mL de PVA 1% e HA, de pesos molares 13 ou 55 kDa a 0,1% (10 mg).

Em temperatura ambiente, a fase aquosa interna foi vertida sobre a fase oleosa e misturada durante 1 min utilizando disruptor de células ultrasônico (QR1000, Eco-Sonic®, Brasil) em potência de 50 Hertz, resultando em uma emulsão A/O. A emulsão resultante foi vertida sobre 10 mL de fase aquosa externa, em um recipiente de vidro, e sonicada por 2 min em potência de 70 Hertz, formando assim a emulsão A/O/A. Utilizou-se banho de gelo durante as etapas de sonicação, a fim de evitar o aquecimento do meio.

Utilizou-se chapa magnética para agitação da emulsão, e lentamente, adicionou-se 20 mL de água ultrapura gelada. Após 1 h de agitação, para evaporação do solvente orgânico, transferiu-se para um banho de gelo, onde permaneceu por 30 min. Finalmente, as nanopartículas foram ultracentrifugadas (Ultracentrífuga refrigerada Z 36HK1 - Hermle®) a 32.180 G durante 30 min, à 10°C, então, ressuspensas em água ultrapura e armazenadas a 8°C.

Para alguns ensaios, calorimetria diferencial de varredura, estudo de viabilidade celular e permeabilidade, o armazenamento foi realizado na forma de pó, e para isso o precipitado foi ressuspenso em aproximadamente 500 µL de água ultrapura e em seguida congelado para posterior liofilização (Liofilizador Enterprise II - Terroni®).

Preparou-se também nanopartículas brancas utilizando a mesma metodologia, porém, a fase aquosa interna foi composta apenas pela solução de PVA 1%.

2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas poliméricas

2.3.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

As nanopartículas foram analisadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (*Dynamic Light Scattering* – DLS), utilizando *equipamento Particle Size*

Analyser- 90 Plus (Brookhaven®), com ângulo de espalhamento de 90°, a 25°C e comprimento de onda do laser de 659 nm.

Antes da avaliação, uma alíquota da suspensão das nanopartículas foi diluída em água ultrapura (1:200, v/v) e acondicionada em cubeta. As leituras foram realizadas em triplicata, utilizando corridas de 3 min. Os resultados fornecidos foram de diâmetro médio de partícula (nm) e índice de polidispersão (IPD).

O potencial zeta (PZ) foi determinado a partir da mobilidade eletroforética das nanopartículas em suspensão, através do *Zetasizer – Nano series* (ZS90). As amostras foram diluídas (1:200, v/v) em solução de KCl 1 mmol/L, a fim de manter a força iônica do meio, e então acondicionadas em célula eletroforética à 25°C sob potencial de ± 150 milivolt (mV), sendo as medidas realizadas em triplicata.

2.3.2 Quantificação de insulina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A concentração de insulina foi determinada por CLAE seguindo a metodologia validada por Sarmiento et al. [21] com algumas modificações.

Foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters® 2695 acoplado a um detector de arranjo de diodo Waters® 2998, equipado com uma coluna XTerra RP 18, tamanho de partícula de 5 μ m, diâmetro interno de 4,6 mm por 250 mm de comprimento (Waters®, USA) e uma coluna graduada de tamanho de partícula 5 μ m LiChrospher® 100 RP-18 (Merck, Germany).

A fase móvel inicial foi composta por uma solução aquosa 30:70 (v/v) de acetonitrila e solução de ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA), sendo substituída após 5 min por uma solução 40:60 (v/v), eluída a um fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μ L e as análises foram realizadas a 214 nm e $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Uma solução estoque de insulina Levemir® FlexPen® (284 µg/mL) foi preparada em água ultrapura. Após, diluições subsequentes em água ultrapura foram realizadas a fim de se obter seis soluções padrões (10, 15, 25, 30, 40 e 50 µg/mL), em triplicata. As soluções amostra foram caracterizadas como o sobrenadante obtido após a ultracentrifugação das nanopartículas contendo insulina, conforme descrito posteriormente, diluídas em água ultrapura. Anteriormente às injeções, as soluções padrão e amostras foram filtradas em filtro de 0,22 µm de porosidade.

A linearidade do método foi verificada pela construção de uma única curva de calibração (área do pico x concentração do fármaco) utilizando-se seis soluções padrão de insulina (10, 15, 25, 30, 40 e 50 µg/mL). Determinou-se o coeficiente de correlação linear (r), que segundo ANVISA, 2003 [22] deve ser $(r) \geq 0,99$, para que a curva analítica seja considerada satisfatória.

A especificidade foi avaliada comparando-se cromatogramas obtidos pelo sobrenadante das nanopartículas brancas, com cromatogramas de solução padrão de insulina.

2.3.3 Eficiência de Encapsulação

A determinação da quantidade de insulina encapsulada nas nanopartículas foi realizada indiretamente. O sobrenadante obtido após ultracentrifugação da dispersão de nanopartículas, o qual continha o fármaco livre, foi diluído em água ultrapura (1:5, v/v), filtrado em membrana de poro 0,22 µm e analisado por CLAE, conforme o item 2.3.2. A eficiência de encapsulação (EE) foi obtida em triplicata a partir da seguinte equação:

$$EE\%: \frac{QTIU - QILS}{QTIU} \times 100$$

Onde: QTIU – Quantidade de Insulina Utilizada no preparo das nanopartículas.

QILS – Quantidade de Insulina Livre no Sobrenadante.

A EE foi expressa na forma de porcentagem, como média e desvio padrão (DP) de no mínimo três amostras.

2.3.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Utilizou-se equipamento *SDT Q600 – TA Instruments*, sendo que a célula de DSC foi previamente calibrada no eixo de temperatura. Para este ensaio, aproximadamente 10 mg de amostras de etilpalmitato, HA de 13 e 55 kDa, nanopartículas brancas e carregadas foram colocadas em cadinho de alumina sob atmosfera de N₂, com vazão de 100 mL/min em uma rampa de aquecimento controlado de 20 até 500°C a uma velocidade de 20°C/min.

2.3.5 Análise microscópica

As características morfológicas das nanopartículas lipídicas poliméricas foram avaliadas em um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (MEV) (Vega 3 LMU - Tescan). Para isto, as amostras foram diluídas em água ultrapura, e uma gota foi depositada sobre o suporte metálico (*stubs*), e após a secagem, foram metalizadas com ouro coloidal sob vácuo e analisadas em uma tensão de aceleração de 30 kV. As micrografias foram obtidas com magnificação de 20.000 vezes.

2.4 Avaliação da estabilidade em suspensão das nanopartículas lipídicas poliméricas

Para a avaliação da estabilidade em suspensão das nanopartículas contendo insulina, as mesmas foram armazenadas sob refrigeração (8°C), durante 3 meses, e em tempos pré-determinados (7, 14, 21, 28, 42, 63, 77 e 91 dias) avaliou-se o diâmetro médio, IPD e PZ. O teor de fármaco presente nas nanopartículas foi avaliado mensalmente pelo método de CLAE, conforme descrito no item 2.3.2, a partir da leitura do sobrenadante, após ultracentrifugação.

2.5 Ensaio de liberação *in vitro* em fluidos gastrointestinais simulados

O ensaio de liberação *in vitro* em fluidos gastrointestinais foi realizado em triplicata pelo método de agitação em *shaker* com subsequente ultracentrifugação, conforme Chang et al. [23] e Jain et al. [24].

Realizou-se o ensaio com fluido gástrico simulado (FGS) (pH 1.2) e fluido intestinal simulado (FIS) (pH 6,8) com a presença e a ausência das enzimas pepsina no FGS e pancreatina no FIS preparados de acordo com a metodologia proposta na USP [25].

Inicialmente, 1 mL de FGS foi incubado com a suspensão de nanopartículas carregadas com insulina (quantidade equivalente a 400 µg de insulina) por 2 h, sob agitação magnética em *shaker*, 100 rpm, a 37°C. Para o ensaio sem enzimas, conduziu-se também utilizando insulina livre, em concentração de 30 µg/mL.

Após separação por ultracentrifugação, as nanopartículas foram incubadas em 1 mL de FIS por mais 4 h, sob agitação magnética em *shaker*, 100 rpm, a 37°C. Em intervalos pré-determinados (30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) as amostras foram ultracentrifugadas a 27.580 G, por 20 min à 15°C. O sobrenadante foi recolhido para posterior quantificação da insulina por CLAE (conforme item 2.3.2) e o volume substituído por fluido fresco.

No início do experimento e nos tempos de 2 e 6 h, as amostras foram também analisadas quanto ao diâmetro médio, IPD e PZ, conforme descrito no item 2.3.1.

2.6 Análise de viabilidade celular

O potencial de citotoxicidade das nanopartículas poliméricas preparadas com HA de 13 e 55 kDa, brancas e carregadas com insulina e droga livre foram testadas contra células colorretais Caco-2 (clone, passagem 75 a 81) e para as HT29-MTX (passagem 56 a 67) utilizando o reagente MTT. As células cresceram em frascos de cultura com meio completo, como descrito anteriormente. Após o descolamento, as células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade de 2×10^4 células/poço para Caco-2 e 1×10^4 células/poço para linhagens celulares HT29-MTX e foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h, para haver a adesão das células nas placa.

Subsequentemente, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). As células foram incubadas com soluções de nanopartículas preparadas em DMEM em diferentes concentrações (100 e 300 µg/mL). Um controle negativo (1% Triton X-100) e controle positivo (DMEM com incubação de células) também foram incluídos.

Após 4 e 24 h de incubação, o meio foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. A solução de MTT com concentração final de 0,5 mg/mL foi adicionada e incubada por 4 h no escuro. Finalmente, a solução de MTT foi removida e 200 µl de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais formados. As placas foram vigorosamente agitadas durante 10 min e a intensidade da cor relativa foi medida a 570 nm, tomando como referência a absorbância de 630 nm, utilizando um leitor de microplacas (Synergy 2, Biotek Instruments Ltda, EUA) [19,20].

Os resultados foram analisados de acordo com a seguinte equação:

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

2.7 Estudo de permeabilidade

Utilizou-se modelo monocultura de células Caco-2 e modelo co-cultura Caco-2:HT29-MTX, seguindo a metodologia de Almeida et al. [19] e Silva et al. [20], na proporção de 90:10. Foram semeados nas placas Transwell® Falcon de 24 poços (*inserts* com membrana PET transparente, poro de 3 µm e diâmetro de 0,3 cm²). As células foram semeadas no compartimento apical com uma densidade final de 1x10⁵ células/cm² em cada *insert* e cultivadas até formar uma monocamada por 21 dias com a substituição do meio a cada dois dias.

Então, o meio foi removido de ambos os lados da Transwell® e as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada de Hank pré-aquecida (HBSS, Gibco, Grand Island, NY, EUA), depois foi substituído por novo HBSS e deixado equilibrar durante 30 min a 37°C.

Os estudos de permeabilidade foram realizados durante 4 h e um volume de 300 µL de nanopartículas lipídicas poliméricas carregadas com insulina e a droga livre na concentração de 100 µg/mL preparadas em HBSS, foram adicionadas ao lado apical da Transwell®, e um volume de 0,8 mL de HBSS foi adicionado ao lado basolateral. Em intervalos de tempo (15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min), 200 µL de cada amostra foram coletadas do lado basolateral da Transwell® e o mesmo volume de HBSS fresco aquecido foi adicionado para substituir o volume removido. No final do experimento foi removido 0,2 mL do volume do compartimento apical para posterior análise. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a insulina foi quantificada por CLAE, como descrito no item 2.3.2.

A integridade das monocamadas celulares foi verificada antes e depois do experimento de permeabilidade medindo-se a resistência elétrica transepitelial (TEER) usando um instrumento *Epithelial Voltohmmeter Instrument* – EVOM, com eletrodos de *chopstick* (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA). Os resultados de permeabilidade foram expressos em porcentagem de permeabilidade e os valores de TEER foram normalizados subtraindo-se o valor de resistência do insert, contendo apenas meio de cultura e expresso em porcentagem.

2.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm DP, calculados a partir de triplicata (n=3). As comparações estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism® (versão 5.03).

Utilizou-se a análise *two-way* ANOVA para os parâmetros de diâmetro médio, IPD e PZ nas formulações preparadas, estudos de liberação *in vitro*, estabilidade e ensaio de viabilidade celular; e a análise *one way* ANOVA para o estudo de permeabilidade das nanopartículas, ambos com o pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

O *T-test* foi utilizado para EE, teor de fármaco e comparação das porcentagens de liberação da insulina nos estudos de liberação *in vitro*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas poliméricas

3.1.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

A encapsulação de fármacos em nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas pode melhorar a estabilidade e prevenir a rápida liberação do fármaco, prolongando assim seu efeito terapêutico e minimizando sua toxicidade [11].

As nanopartículas lipídicas poliméricas com insulina foram preparadas utilizando etilpalmitato. Este excipiente lipídico, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) é empregado em formas farmacêuticas sólidas e semi-sólidas [26]. Já o HA foi utilizado como polímero devido à sua capacidade de proteger as nanopartículas contra a degradação de enzimas e destruição no ambiente gástrico, e também devido a sua propriedade natural de mucoadesão, que auxilia na melhora da biodisponibilidade dos compostos carregados [27,28].

As nanopartículas foram preparadas com etilpalmitato associado a dois pesos molares de HA, 13 e 55 kDa (HA13 e HA55), sendo elas, nanopartículas brancas (B) e carregadas com insulina (I). As nanopartículas foram então caracterizadas quanto ao diâmetro médio, índice de IPD e PZ (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro médio, índice polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas preparadas com HA de 13 kDa brancas (HA13-B) e carregadas com insulina (HA13-I) e as preparadas com HA de 55 kDa, brancas (HA55-B) e carregadas com insulina (HA55-I). Os resultados foram expressados como média \pm DP (n=3).

Formulação	Diâmetro médio (nm)	IPD	PZ (mV)	EE (%)
HA13-B	286,8 ^a (\pm 15,4)	0,039 ^a (\pm 0,010)	-7 ^a (\pm 1,0)	-
HA13-I	263,3 ^a (\pm 6,3)	0,057 ^a (\pm 0,023)	-9 ^{ab} (\pm 0,1)	32,9 ^a (\pm 2,3)
HA55-B	321,3 ^b (\pm 2,5)	0,057 ^a (\pm 0,013)	-10 ^b (\pm 1,1)	-
HA55-I	314,5 ^b (\pm 18,9)	0,047 ^a (\pm 0,043)	-11 ^b (\pm 1,2)	34,3 ^a (\pm 0,93)

(-) não se aplica.

*Letras iguais em uma mesma coluna não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para um valor de $p < 0,05$ (*two-way ANOVA* e pós-teste de Tukey para diâmetro médio, IPD e PZ; *T-test* para EE).

As nanopartículas HA13-B, HA13-I, HA55-B e HA55-I apresentaram diâmetros médios de 286,8, 263,3, 321,3 e 314,5 nm e IPD de 0,039, 0,057, 0,057 e 0,047, respectivamente. Em relação ao diâmetro médio, as nanopartículas HA13-B e HA13-I foram significativamente iguais ($p > 0,05$) quando comparados entre si. Da mesma forma ocorreu para as nanopartículas HA55-B e HA55-I.

O IPD avalia a dispersão das partículas em torno do diâmetro médio. Sua escala varia de 0 a 1, sendo 0 formulações monodispersas e 1 polidispersas [29]. Os valores encontrados abaixo de 0,2 demonstraram a homogeneidade na distribuição do tamanho das nanopartículas, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as formulações, o que pode ser confirmado nos gráficos de distribuição de tamanho (Figura 1a e 1b), onde observa-se uma distribuição unimodal.

Em relação ao PZ, as nanopartículas HA13-B, HA13-I, HA55-B e HA55-I apresentaram carga negativa de -7, -9, -10 e -11 mV, respectivamente. As nanopartículas HA13-B e HA55-B foram significativamente iguais ($p > 0,05$) quando comparadas com suas respectivas nanopartículas HA13-I e HA55-I. Além disso, a HA13-I apresentou-se estatisticamente igual às formulações preparadas com HA de 55 kDa ($p > 0,05$).

Estes resultados foram semelhantes ao reportado por Severino et al. [30], que produziram nanopartículas lipídicas sólidas com tamanho em torno de 300 nm, com um IPD de 0,5 e PZ de -3. Evidencia-se que o aumento peso molar do HA utilizado desencadeou um aumento no diâmetro médio das nanopartículas, porém não influenciou nos valores de IPD e de PZ das nanopartículas preparadas.

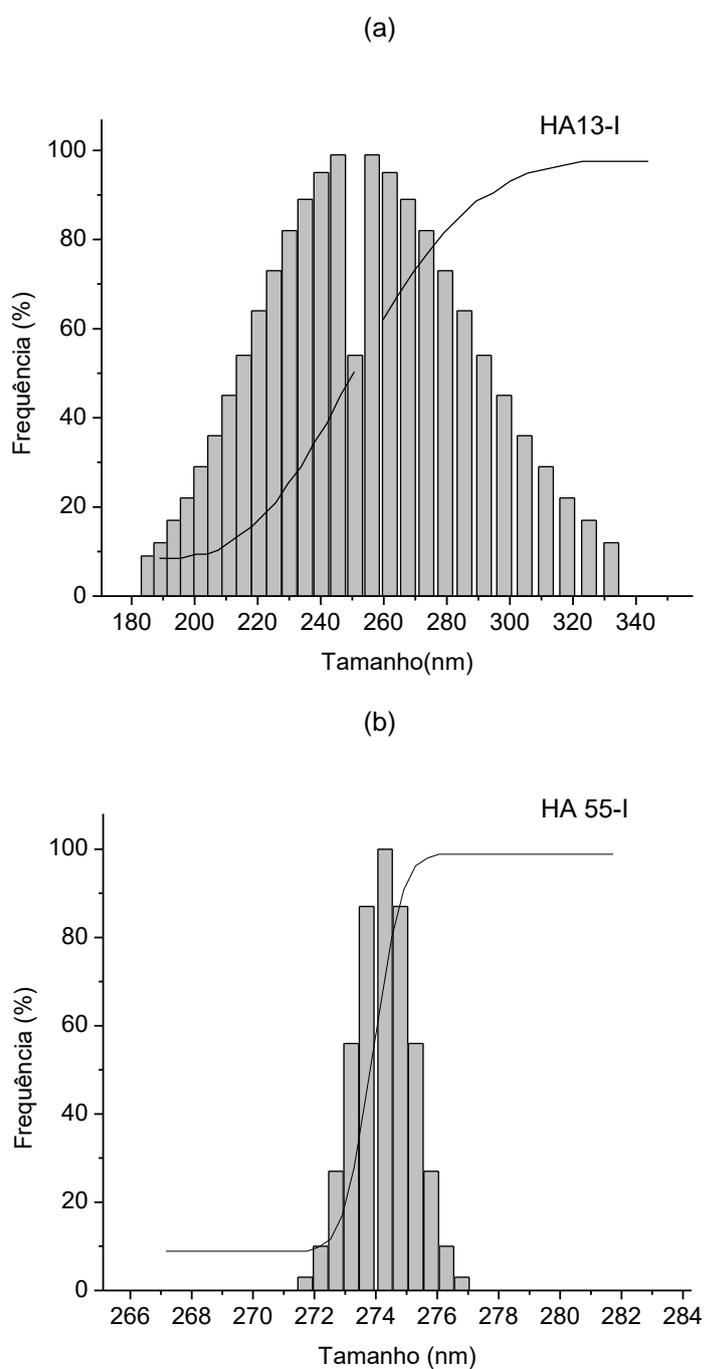


Figura 1. Distribuição de tamanho de a) amostra representativa de nanopartículas HA13-I (diâmetro médio de 261,3nm e IPD 0,031); b) amostra representativa de nanopartículas HA55-I (diâmetro médio de 293,4nm e IPD 0,004).

3.1.2 Curva de Calibração

A curva analítica da insulina foi obtida a partir de seis níveis de concentração de insulina, entre 10 e 50 µg/mL (Figura 2).

A partir da análise do coeficiente de correlação linear, encontrou-se um valor de (r) de 0,9994, demonstrando uma possível relação linear entre a absorbância e a concentração [22]. Adicionalmente, a equação da reta calculada, $y=9,76.10^3x - 2,46.10^4$ foi utilizada nos ensaios subseqüentes para quantificação das soluções amostra e padrão.

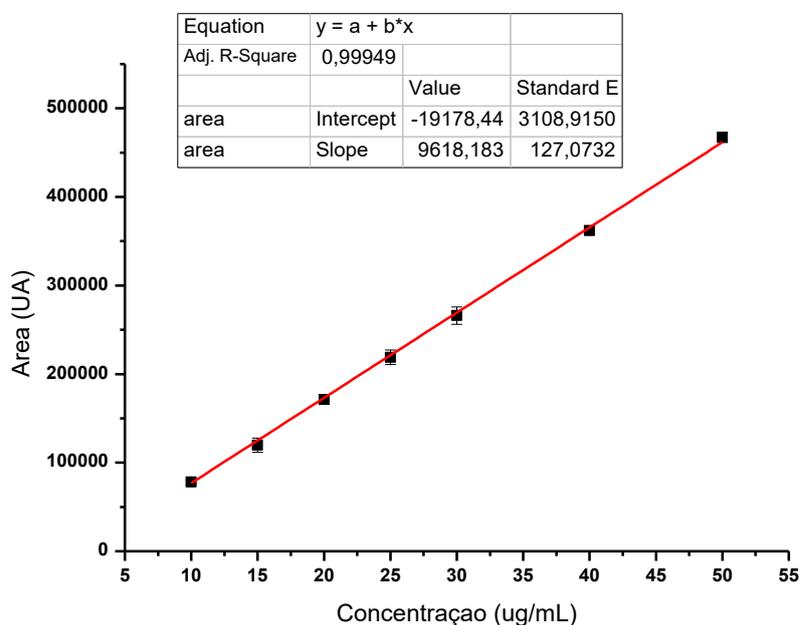


Figura 2. Curva analítica da insulina solubilizada em água ultrapura (área do pico versus concentração). Fase móvel: acetonitrila: ácido trifluoroacético 0,1% (30:70, v/v; após 5 min substituição por 40:60, v/v) em 214 nm (n=3).

3.1.3 Eficiência de Encapsulação

A Figura 3 demonstra o cromatograma de uma solução padrão de insulina de 50 µg/mL, evidenciando um pico relativamente simétrico em um tempo de retenção de 6,5 minutos.

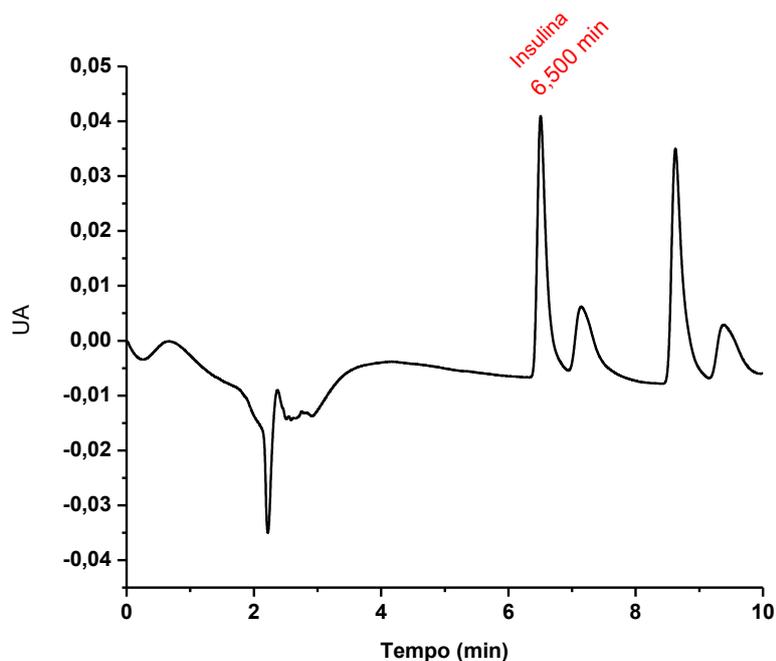


Figura 3. Cromatograma da solução padrão de insulina 50 µg/mL.

A metodologia utilizada foi baseada no estudo de Sarmento et al. [21], que desenvolveram e validaram o método de CLAE de fase reversa para a determinação de insulina a partir de sistemas nanoparticulados, sendo o pico de insulina apresentado em um tempo de retenção de 5,614 min.

Houve uma pequena diferença no tempo de retenção encontrado no presente estudo quando comparado com Sarmento et al. [21]. Isto pode ter ocorrido devido a utilização da insulina da caneta Levemir® FlexPen® para o preparo da solução padrão, visto que a mesma é produzida pela tecnologia de DNA recombinante em *Saccharomyces cerevisiae* e apresenta excipientes em sua composição, tais como conservantes e estabilizantes, diferente do padrão de referência de insulina humana, utilizado por Sarmento et al. [21].

A especificidade do método foi avaliada pela comparação de cromatografias dos sobrenadantes das nanopartículas HA13-B e HA55-B. Pode-se observar na Figura 4, o tempo de retenção em 6,5 min (Figura 4a), já nos cromatogramas obtidos do

sobrenadante das nanopartículas HA13-B e HA55-B, não foram encontrados picos neste mesmo tempo de retenção (Figura 4b). Os resultados mostram que não houve interferência no tempo de retenção da insulina por outros componentes da formulação, portanto, o método analítico não apresenta interferentes, sendo assim específico para a determinação da insulina.

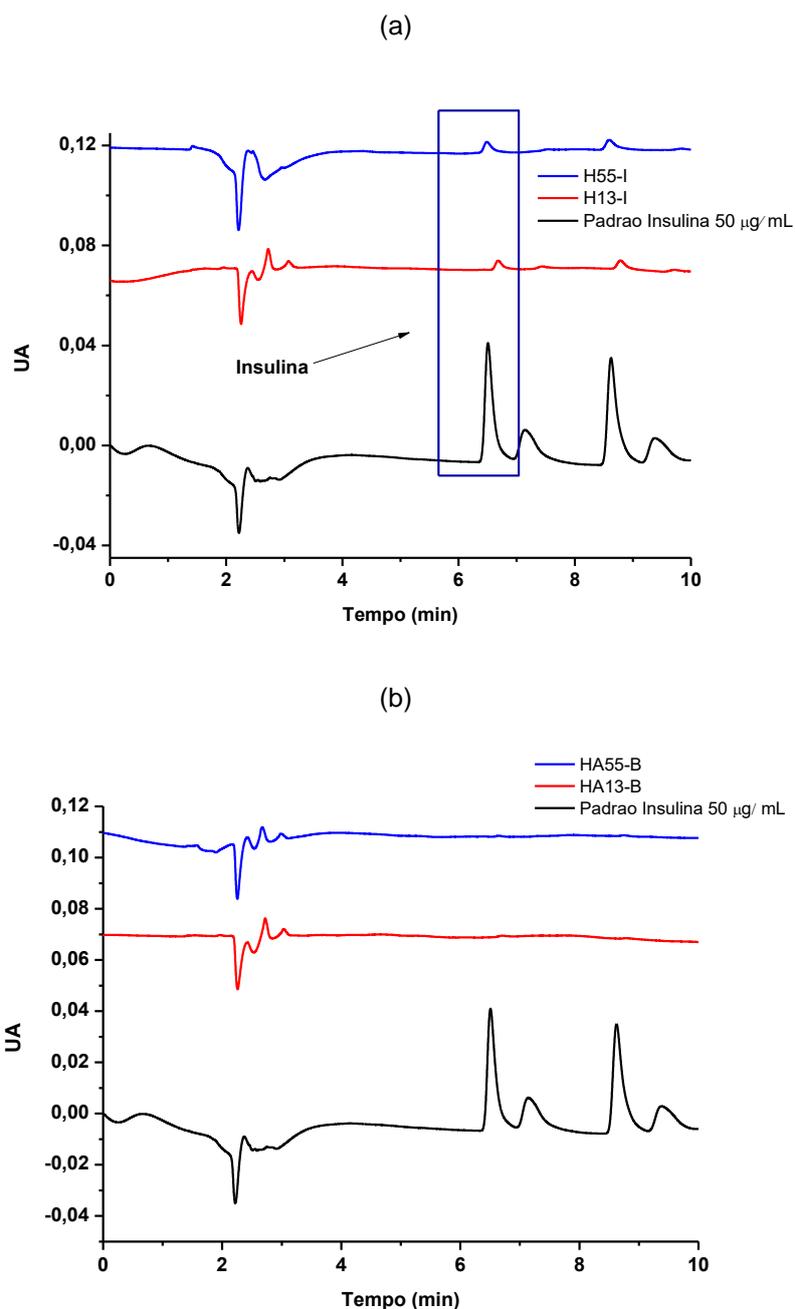


Figura 4. Cromatogramas de amostras de sobrenadantes de nanopartículas lipídicas poliméricas a) carregadas com insulina (HA13-I e HA55-I) b) brancas (HA13-B e HA55-B) e padrão de insulina de 50µg/mL.

Para uma entrega oral de insulina bem sucedida, as nanopartículas devem ter uma eficiência significativa de encapsulação, para exercer as funções desejadas dentro do sistema animal [31]. A quantidade de insulina presente nas nanopartículas foi calculada conforme equação exposta na seção 2.3.3, a partir da quantidade de insulina não encapsulada presente no sobrenadante após a ultracentrifugação das nanopartículas. Encontrou-se EE de 32,9% para HA13-I e 34,3% para HA55-I, sem diferenças significativas para os diferentes pesos molares ($p > 0,05$).

Comparado ao estudo de Zhang et al. [32], que prepararam nanopartículas lipídicas sólidas modificadas com ácido esteárico-octaarginina como veículos para administração oral de insulina, utilizando a emulsificação por difusão de solvente, no qual obtiveram uma EE de 76,54%, evidencia-se uma menor EE das nanopartículas preparadas pelo presente estudo.

Considerando a variabilidade dos componentes das formulações das nanopartículas, Severino et al. [30] utilizaram a insulina como proteína modelo para desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas inovadoras (SLNs) através de um planejamento fatorial e encontraram uma grande variabilidade nas EE, de 38,39% a 81,20%.

Com isso, é possível evidenciar que os componentes utilizados nas formulações das nanopartículas influenciam nos valores de EE, justificando a grande diferença encontrada pelo presente estudo quando comparado com a literatura.

García-Díaz et al. [33] exploraram o uso de complexos insulino-lipídicos para melhorar a EE de nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) preparadas pela técnica de dupla emulsão/evaporação de solvente. Dois diferentes lipídeos foram utilizados para a complexação da insulina, a fosfatidilcolina de soja (SPC) e o caprato de sódio (NaC10). Esta complexação resultou em um aumento significativo da EE, de 24%,

quando uma solução de 1% de insulina foi utilizada, para 90% e 91%, quando incorporados como complexos SPC ou NaC10, respectivamente.

A fim de investigar o mecanismo responsável pelo aumento da EE quando a insulina foi pré-complexada com os lipídeos, avaliaram a sua localização espacial na emulsão primária (A/O), através da utilização de microscopia confocal com insulina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Foi possível evidenciar que, na ausência de lipídeo, a insulina permaneceu nas gotículas da fase aquosa da emulsão primária. A complexação com SPC resultou numa translocação da insulina da fase aquosa interna para a fase orgânica, o que provavelmente resultou na diminuição da perda de insulina durante o processo de formação de partículas e desencadeou uma maior EE [33].

Uma translocação semelhante foi previamente observada por Jensen et al. [34] para nanopartículas de PLGA carregadas com siRNA contendo o lipídeo catiônico dioleoil trimetilamônio propano (DOTAP) na matriz polimérica.

Considerando que as EE encontradas pelo presente trabalho foram menores quando comparadas com outras formulações de nanopartículas para entrega oral de insulina, tornando-as pouco viáveis para a produção em grande escala, sugere-se o estudo da complexação da insulina com lipídeos, tais como SPC, NaC10, e DOTAP, devido às suas capacidades de translocação da insulina da fase aquosa interna para a fase orgânica, durante o preparo da emulsão, favorecendo na manutenção das moléculas de insulina dentro das nanopartículas durante o preparo, resultando no aumento da EE.

3.1.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A técnica de DSC fornece informações sobre os pontos de fusão dinâmicos e entalpias de fusão associadas a diferentes composições lipídicas [35]. Desta forma,

realizou-se esta análise com o objetivo de investigar a estabilidade térmica dos materiais utilizados e das nanopartículas produzidas (Figura 5).

No presente trabalho, não foi realizada a análise de DSC para a insulina livre, pois a mesma encontrava-se em solução, oriunda da caneta Levemir® FlexPen®, o que inviabilizou a realização do ensaio. Porém, sabe-se que a insulina apresenta um pico endotérmico em torno de 30°C, atribuído à umidade residual e um segundo evento endotérmico em aproximadamente 220°C que correlaciona-se ao ponto de ebulição da proteína, representando o início de sua decomposição [6,26,36].

Quanto ao HA (Figura 5a), ambos os pesos molares estudados, 13 e 55 kDa, apresentaram um amplo pico endotérmico entre 100 e 150°C. Além disso, foi observado um pico exotérmico em aproximadamente 250°C, mais significativo para o HA55, indicando a natureza cristalina do polímero [24,37,38]. Os picos que ocorreram a temperaturas acima de 300°C representam a decomposição do material testado [37,38].

Em relação ao etilpalmitato (Figura 5b) detectou-se um evento endotérmico em aproximadamente 260°C, atribuído à sua temperatura de degradação [26].

Ao comparar os perfis térmicos das nanopartículas HA13-B, HA13-I, HA55-B e HA55-I (Figura 5c e 5d) com os materiais puros, evidenciou-se que a insulina estava totalmente dissolvida na matriz das nanopartículas, devido à ausência picos exotérmicos ou endotérmicos na faixa de temperatura pesquisada para as nanopartículas HA13-I e HA55-I. Esta ausência de picos sugere também a maior estabilidade térmica das nanopartículas carregadas em relação aos compostos livres e às nanopartículas brancas, uma vez que estas apresentaram um pico endotérmico próximo a 320°C, relacionado ao HA [24,26,36,39].

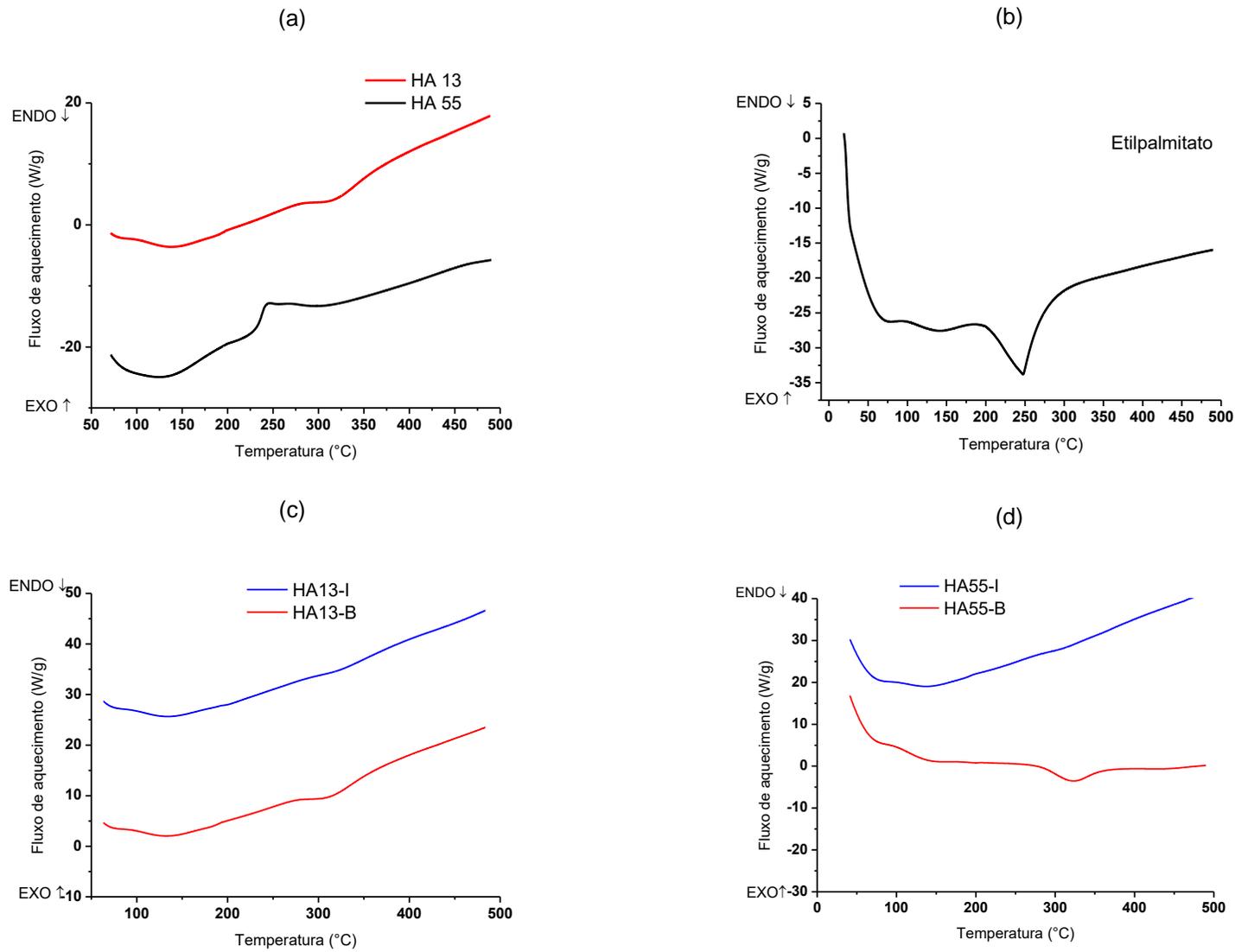


Figura 5. Curvas de DSC. (a) HA de pesos molares 13 e 55kDa, (b) Etilpalmitato, (c) Nanopartículas com HA de 13 kDa, brancas (B) e carregadas com insulina (I), (d) Nanopartículas com HA de 55 kDa, brancas (B) e carregadas com insulina (I).

3.1.5 Análise microscópica

As micrografias de MEV (Figura 6) mostraram tamanhos das nanopartículas HA13-I e HA55-I semelhantes ao obtido pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, em torno de 300 nm, com formato esférico, bordas lineares e sem indícios de agregação das mesmas, indicando a estabilidade do sistema. Morfologias similares foram encontradas por Han et al. [6] e Al-Qadi et al. [40] os quais utilizaram HA para preparo de nanopartículas para encapsulação de insulina.

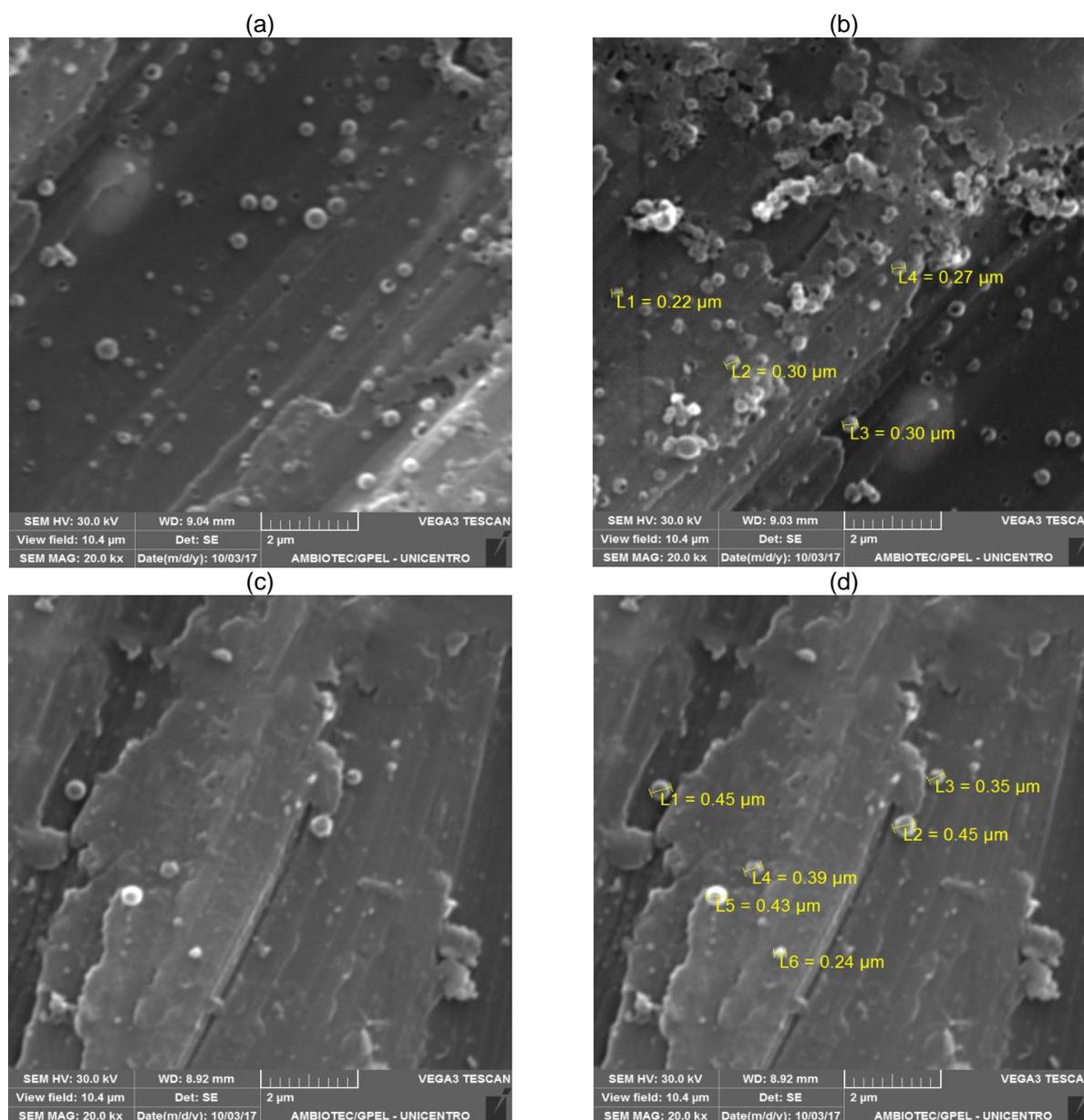


Figura 6. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV) a) Nanopartículas HA13-I; b) Nanopartículas HA13-I com medidas em µm; c) Nanopartículas HA55-I; e d) Nanopartículas HA55-I com medidas em µm. Magnificação de 20.0 kx.

3.2 Avaliação da estabilidade em suspensão das nanopartículas lipídicas poliméricas

As nanopartículas constituem um sistema físico relativamente estável devido à sua natureza coloidal, porém muitas variáveis podem afetar a estabilidade das mesmas. Geralmente uma suspensão coloidal é estável e não tende a se separar, isto é resultado da lenta deposição devido às tendências de mistura de difusão e convecção. No entanto, algumas aglomerações podem ocorrer [41]. Portanto, é de extrema importância que as nanopartículas apresentem estabilidade física quando dispersas em água, para garantir que a formulação possa manter suas propriedades até seu emprego clínico [42].

Alguns parâmetros são cruciais para a estabilidade, como o tempo de contato com o meio aquoso quando o fármaco é solúvel em água; o pH do meio, quando a degradação do fármaco é dependente do pH; e a exposição à luz quando a droga é fotossensível [41]. Desta forma, é de suma importância o monitoramento das modificações de tamanho e a perda de fármaco que ocorre após o armazenamento a longo prazo das nanopartículas [42].

Para avaliar a estabilidade físico-química em curto período, as nanopartículas HA13-I e HA55-I em suspensão foram armazenadas por 3 (três) meses, 91 (noventa e um) dias sob refrigeração a 8°C. E durante este período foram avaliados os parâmetros macroscópicos, diâmetro médio, IP, PZ e o teor de insulina.

Macroscopicamente, as amostras apresentaram-se com aspecto leitoso e coloração esbranquiçada, sem a formação de precipitados ou aglomerações. Durante todo o ensaio essas características foram mantidas.

A Figura 7 reflete o comportamento das nanopartículas quanto ao diâmetro médio, sendo possível observar que as nanopartículas HA55-I apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas em 7 (sete) e 91 (noventa e um) dias de armazenamento em relação ao diâmetro médio inicial, que corresponde ao tempo zero.

As nanopartículas HA13-I não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) ao longo do período analisado quando comparadas ao tempo zero. Além disso, nestes tempos, ao comparar com as HA55-I, ambas apresentaram-se significativamente iguais ($p>0,05$). Evidenciou-se então, a manutenção do diâmetro médio das partículas no decorrer dos 91 (noventa e um) dias analisados.

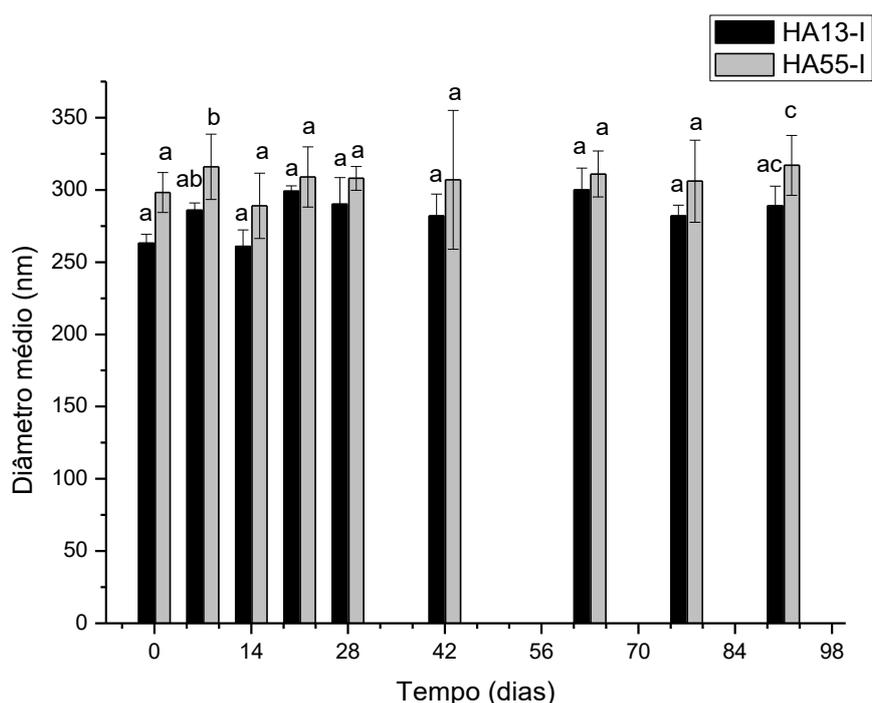


Figura 7. Diâmetro médio das nanopartículas HA13-I e HA55-I \pm DP em função do tempo, sob refrigeração (8°C), $n=3$.

*Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para um valor de $p<0,05$ (*two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey).

Em relação ao IPD (Figura 8), observou-se que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) em 14 (quatorze) dias de armazenamento para ambas as formulações quando comparado ao controle. E entre elas, HA13-I e HA55-I, no mesmo tempo, houve diferenças significativas ($p<0,05$). No entanto, os resultados posteriores não foram afetados, chegando aos 91 (noventa e um) dias de ensaio, com IPD constante, em torno de 0,060, indicando que não houve agregação significativa das nanopartículas.

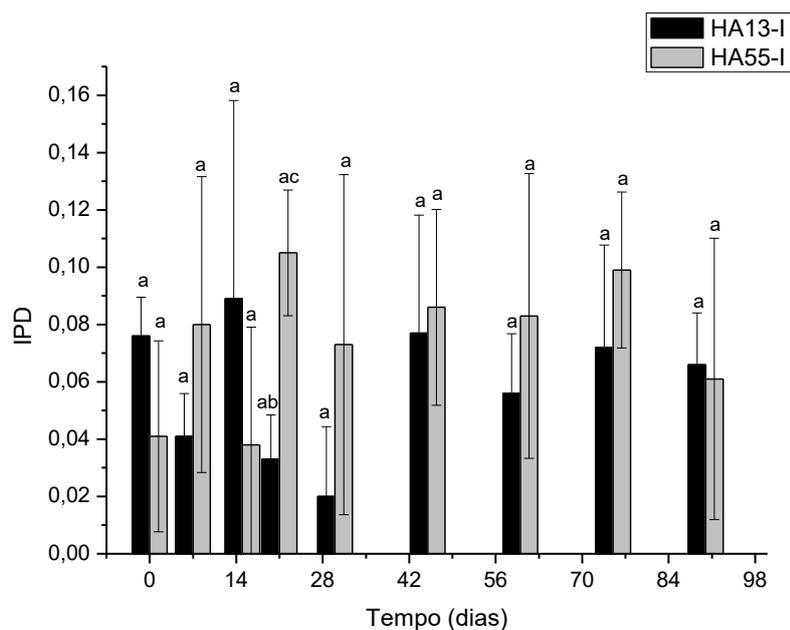


Figura 8. Índice de Polidispersão (IPD) das nanopartículas HA13-I e HA55-I \pm DP em função do tempo, sob refrigeração (8°C), n=3.

*Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para um valor de $p < 0,05$ (*two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey).

Quanto ao PZ (Figura 9), em 7 (sete) e 63 (sessenta e três) dias de ensaio, ambas as formulações foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando comparadas entre si. Porém, de modo geral, o mesmo apresentou-se regular, e ao final do ensaio não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparado ao controle. Além disso, o PZ manteve-se negativo.

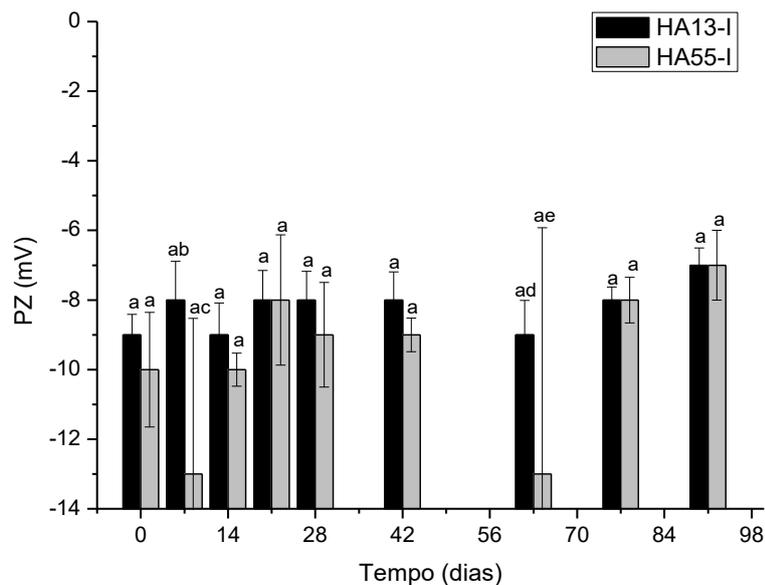


Figura 9. Potencial zeta (PZ) das nanopartículas HA13-I e HA55-I \pm DP em função do tempo, sob refrigeração (8°C), n=3.

*Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para uma valor de $p < 0,05$ (*two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey).

Finalmente, em referência à quantidade de insulina liberada em função do tempo (Figura 10), observou-se que no período avaliado as nanopartículas HA13-I e HA55-I liberaram 2,1 e 1,8% de insulina, respectivamente, em relação ao montante inicial, com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Porém, entre as formulações a perda de fármaco foi semelhante.

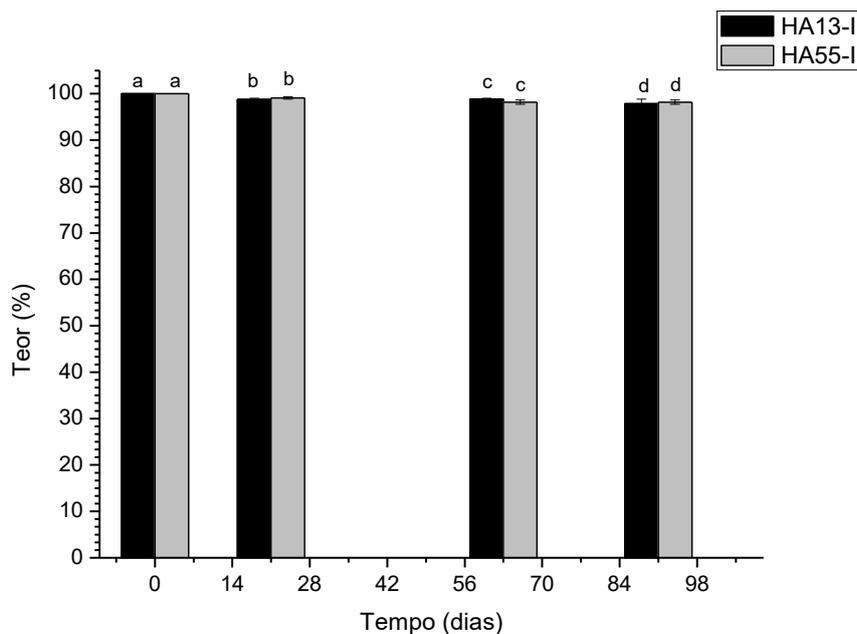


Figura 10. Teor de insulina das nanopartículas HA13-I e HA55-I \pm DP em função do tempo, sob refrigeração (8°C), n=3.

*Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para uma valor de $p < 0,05$ (*T-test*).

Considerando os resultados gerais de diâmetro médio, PZ, IPD e teor, em que ao final do ensaio, mantiveram-se com valores semelhantes aos do controle, evidenciou-se a integridade do sistema nanoestruturado, com manutenção das características de dispersão homogênea e a capacidade de proteger a insulina aprisionada durante o período de tempo avaliado.

3.3 Ensaio de liberação *in vitro* em fluidos gastrointestinais simulados

A administração oral eficaz de insulina ainda é um desafio significativo devido às barreiras fisiológicas, classificadas como físicas, químicas e enzimáticas, presentes no organismo humano. Essas limitações incluem instabilidade da insulina em pH ácido, suscetibilidade à degradação das enzimas digestivas e baixa biodisponibilidade devido à má difusão através da camada de muco e permeação inadequada através do epitélio do trato gastrointestinal [8].

Na maioria dos relatos prévios de nanopartículas carregadas com proteína, destinadas à entrega oral, os estudos de liberação *in vitro* foram realizados apenas em fluidos livres de enzimas [6,24,26,43].

Entretanto, como encontrado por Sheng et al. [7] e outros pesquisadores, a liberação em meios contendo enzimas foi muito mais rápida quando comparado à liberação em meios sem enzimas [44,45]. Portanto, os resultados da liberação *in vitro* em meio isento de enzimas não refletiram os perfis reais de liberação *in vivo* no trato gastrointestinal, onde reside uma quantidade abundante de enzimas.

Com isso, o ensaio de liberação *in vitro* em fluidos gastrointestinais simulados foi realizado na presença e ausência de enzimas digestivas, pepsina e pancreatina para o FGS e FIS, respectivamente.

Ao realizar o ensaio isento de enzimas, observou-se que as nanopartículas foram capazes de aprisionar a insulina de tal forma a não ocorrer liberação da mesma em ambos os fluidos simulados durante as 6h de ensaio (Figura 11).

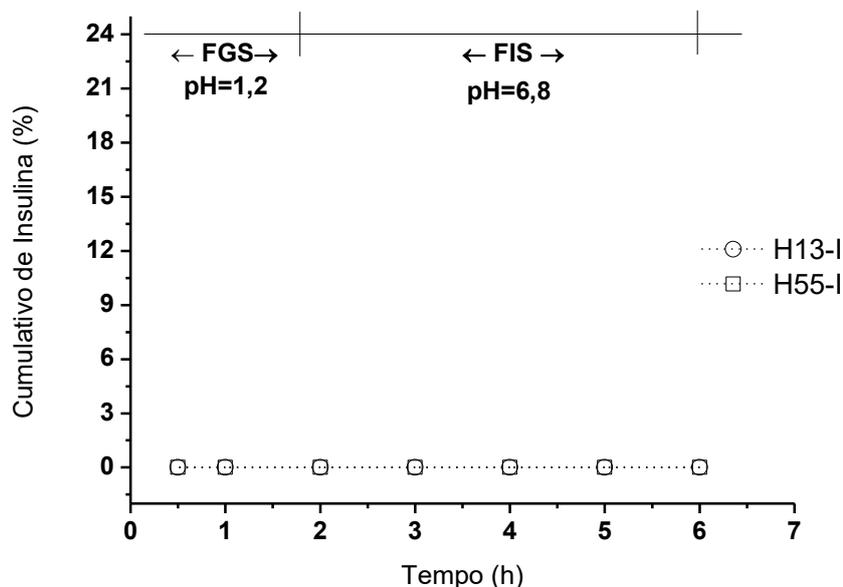


Figura 11. Porcentagem de liberação *in vitro* da insulina a partir de nanopartículas HA13-I e HA55-I em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS).

Tal fato pode ser confirmado, ao analisar os parâmetros de diâmetro médio, IPD e PZ (Tabela 2) do início do experimento, em 2h e ao final das 6h, não ocorrendo diferenças significativas ($p > 0,05$) nestes parâmetros. Assim, evidenciou-se a proteção que as nanopartículas conferiram à insulina encapsulada, contra o pH do meio, principalmente o pH ácido do FGS.

A insulina livre foi submetida às mesmas condições das nanopartículas no FGS, porém não foi possível quantificá-la devido à sua degradação. Quando analisada pela CLAE, conforme descrito no item 2.3.2, o cromatograma não apresentou o pico de retenção referente à insulina e sim diversos outros, em tempos distintos (Material Suplementar 1). Isto pode ser explicado pelo fato de que no organismo humano a presença de enzimas digestivas e pH extremo no trato gastrointestinal ocasionam a degradação da insulina, que ocorre pela quebra de ligações dissulfeto [8].

Resultados semelhantes foram encontrados por Sheng et al. [7], onde o diâmetro e o PZ das nanopartículas mucoadesivas carregadas com conjugado de insulina e protamina de baixo peso molar, permaneceram quase inalterados em FGS e FIS, ambos sem enzima, indicando que a maioria das nanopartículas mantiveram-se estáveis em meio isento de enzima.

Tabela 2. Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) (média \pm DP) das nanopartículas durante o ensaio de liberação em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS) isento de enzimas ($n=3$).

	Início do experimento			2 horas de ensaio (FGS)			6 horas de ensaio (FIS)		
	Diâmetro médio (nm)	IPD	PZ (mV)	Diâmetro médio (nm)	IPD	PZ (mV)	Diâmetro médio (nm)	IPD	PZ (mV)
HA 13-I	277 ^a ($\pm 4,1$)	0,068 ^b ($\pm 0,060$)	-7 ^c ($\pm 0,79$)	268 ^a ($\pm 13,2$)	0,082 ^b ($\pm 0,021$)	-4 ^c ($\pm 0,60$)	368 ^a ($\pm 92,6$)	0,277 ^b ($\pm 0,367$)	-8 ^c ($\pm 0,99$)
HA 55-I	278 ^a ($\pm 6,2$)	0,089 ^b ($\pm 0,055$)	-7 ^c ($\pm 0,55$)	275 ^a ($\pm 4,0$)	0,101 ^b ($\pm 0,045$)	-2 ^c ($\pm 1,8$)	295 ^a ($\pm 14,4$)	0,219 ^b ($\pm 0,081$)	-8 ^c ($\pm 1,5$)

*Letras iguais em uma mesma coluna não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para um valor de $p < 0,05$ (*two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey).

Em contraste, no FIS contendo enzimas, observaram-se grandes alterações no diâmetro médio e no IPD das nanopartículas HA13-I e HA55-I (Tabela 3), que ao ser analisado pelo DLS, ultrapassou o limite de quantificação. Em relação ao PZ, o mesmo manteve-se sem diferenças significativas ($p>0,05$) para ambas as formulações, em todas as etapas do ensaio. Portanto, evidenciou-se que a presença da pancreatina no FIS auxiliou na desintegração da nanoestrutura, expondo a insulina ao meio de liberação.

Tabela 3. Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) (média \pm Dp) das nanopartículas durante o ensaio de liberação em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS) com as enzimas pepsina e pancreatina, respectivamente. ($n=3$).

	Início do experimento			2 horas de ensaio (FGS)			6 horas de ensaio (FIS)		
	Diâmetro médio (nm)	IPD	PZ (mV)	Diâmetro médio (nm)	IPD	PZ (mV)	Diâmetro médio (nm)	IPD	PZ (mV)
HA 13-I	266 ^a ($\pm 7,1$)	0,066 ^b ($\pm 0,045$)	-14 ^c ($\pm 2,8$)	316 ^a ($\pm 33,0$)	0,138 ^b ($\pm 0,037$)	-14 ^c ($\pm 1,5$)	NQ	NQ	-18 ^c ($\pm 1,4$)
HA 55-I	329 ^a ($\pm 36,3$)	0,110 ^b ($\pm 0,070$)	-16 ^c ($\pm 1,0$)	418 ^a ($\pm 161,6$)	0,233 ^b ($\pm 0,234$)	-15 ^c ($\pm 2,6$)	NQ	NQ	-18 ^c ($\pm 3,5$)

NQ – não foi possível quantificar.

*Letras iguais em uma mesma coluna não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para uma valor de $p<0,05$ (*two-way ANOVA* e pós-teste de Tukey).

As porcentagens dos perfis de liberação das nanopartículas HA13-I e HA55-I em ambos os fluidos simulados com a presença das enzimas pepsina e pancreatina são apresentadas na Figura 12 e indicaram a ausência de liberação do fármaco até 2 h de ensaio em FGS. Considerando também que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) no diâmetro médio, IPD e PZ das mesmas neste meio (Tabela 3), quando comparado aos parâmetros iniciais, evidenciou-se que este meio não afetou a estrutura das nanopartículas, mantendo-as estáveis e intactas, sem a liberação da insulina aprisionada em seu interior.

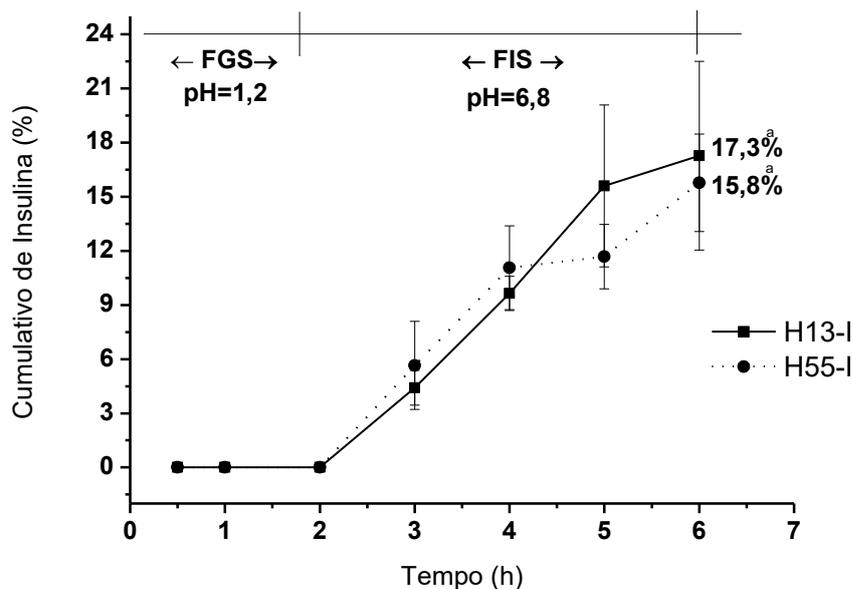


Figura 12. Porcentagem de liberação *in vitro* da insulina a partir de nanopartículas HA13-I e HA55-I em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS), contendo pepsina e pancreatina, respectivamente.

*Letras iguais não apresentam diferenças significativas $p > 0,05$ (*T-test*).

As nanopartículas HA13-I liberaram $17,3\% \pm 5,2\%$ de insulina no FIS ao final das 6h de ensaio, e as nanopartículas HA55-I, $15,8\% \pm 2,7\%$. As diferentes formulações não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas taxas de liberação *in vitro*, portanto, o peso molar do HA não influenciou no teor de liberação da insulina presente nas nanopartículas. Por outro lado, Han et al. [6] demonstraram uma liberação de insulina de suas nanopartículas de HA de 80% no FIS isento de enzima, dentro de 60min.

As taxas de liberação da insulina mais sustentadas, encontradas pelo presente estudo, podem estar relacionadas à maior integridade estrutural das nanopartículas, em que a presença do HA na fase externa da dupla emulsão pode ter formado um efeito de dupla barreira para a difusão do fármaco. Resultados semelhantes foram obtidos por Jain et al. [24] enquanto trabalharam com nanopartículas de quitosana com revestimento de HA e encontraram taxa de liberação de fármaco suprimida quando o HA estava presente.

A degradação da matriz lipídica dependente do tempo e a difusão lenta do meio de liberação pelos canais hidrofílicos da nanopartículas para posterior liberação da insulina são parâmetros que também podem estar envolvidos nas taxas de liberação sustentada encontradas [43].

3.4 Análise de viabilidade celular

A fim de avaliar a segurança intestinal e a biocompatibilidade das nanopartículas utilizou-se as formulações brancas (HA13-B e HA55-B), carregadas (HA13-I e HA55-I) e a droga livre para realizar os ensaios *in vitro* com duas linhagens celulares intestinais, Caco-2 e HT29-MTX, separadamente. Como as células Caco-2 se assemelham aos enterócitos, que representam aproximadamente 90% do total de células epiteliais do intestino, e as HT29-MTX mimetizam as células calciformes, que são aproximadamente 10% das células intestinais [2,46], estas são usadas como modelos *in vitro* adequados para mimetizar o epitélio intestinal [47].

A viabilidade celular nas células intestinais Caco-2 e HT29-MTX, com incubação de 4 e 24 h é mostrada na Figura 13. As nanopartículas HA13 e HA55 não exibiram impacto significativo na viabilidade celular em ambas as linhagens celulares, no período de tempo estudado.

Nos ensaios realizados com células intestinais Caco-2, ao final das 24 h (Figura 13b), observou-se que as formulações de nanopartículas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparadas entre si, nas diferentes concentrações estudadas.

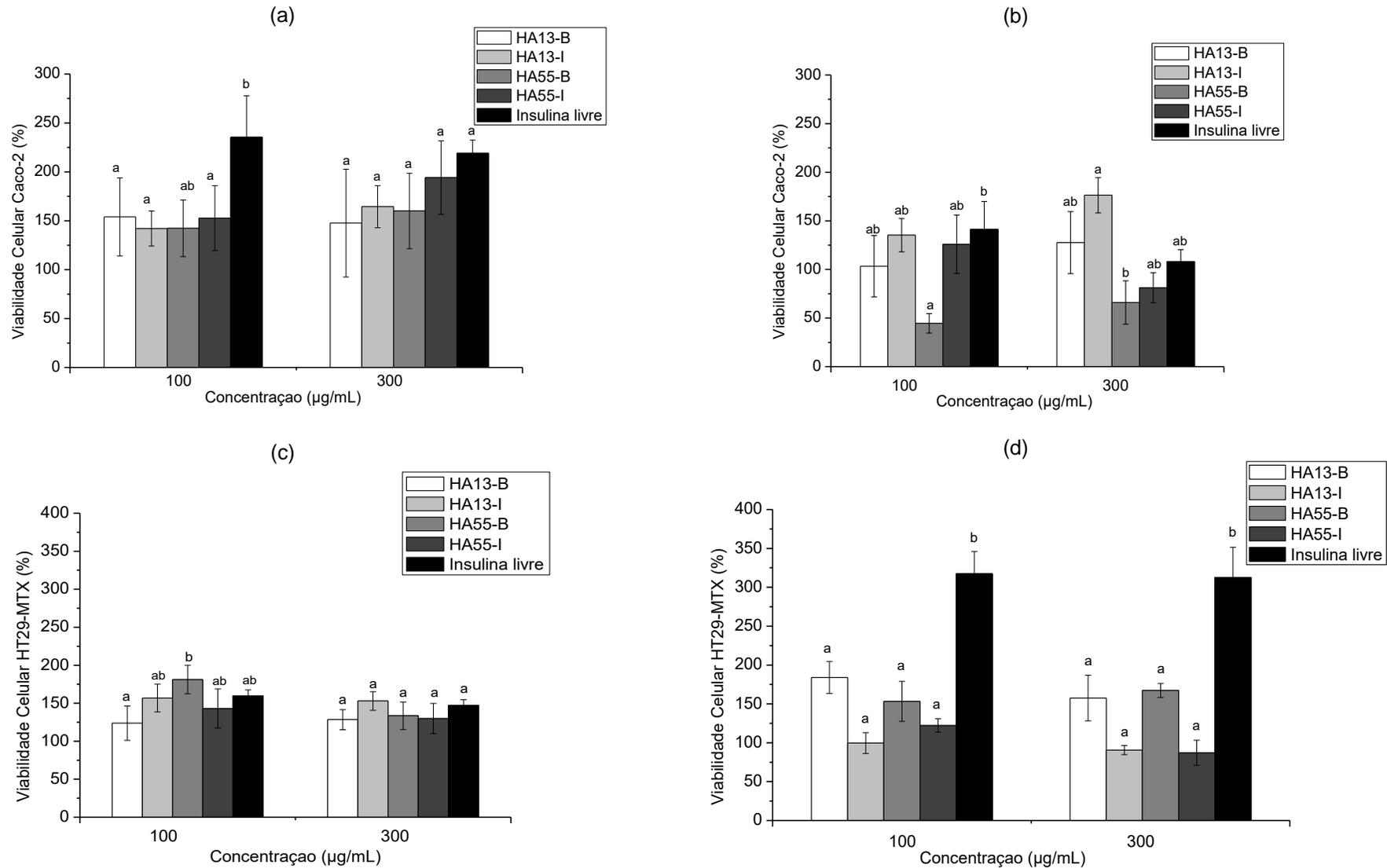


Figura 13. Viabilidade celular das nanopartículas HA13-B, HA13-I, HA55-B, HA55-I e Insulina livre em a) Caco-2 após 4h de incubação e b) após 24h de incubação; e em c) HT29-MTX após 4h de incubação e d) após 24h de incubação.

Barras de erro representam a média ± DP (n=3). *Letras iguais não apresentam diferenças significativas e letras diferentes apresentam diferenças significativas para um valor de $p < 0,05$ (*two-way ANOVA* e pós-teste de Tukey).

Quando testadas frente às células HT29-MTX, ao final das 24 h (Figura 13d), em ambas as concentrações, as formulações de nanopartículas apresentaram-se iguais entre si ($p > 0,05$), e com diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação à insulina livre.

Não foi observado efeito citotóxico para as nanopartículas até concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, visto que a maioria dos autores considera que a viabilidade acima de 70% é uma indicação de “ausência de toxicidade”, ou seja, o material pode ser considerado seguro, e substâncias que desencadeiam uma viabilidade celular abaixo de 70%, considera-se como tóxica [30].

Claramente, os resultados mostraram que as nanopartículas lipídicas poliméricas preparadas com HA exibem baixa toxicidade, o que foi consistente com outros relatos [7,30,47].

3.5 Avaliação da permeabilidade da insulina presente nas nanopartículas

A permeabilidade intestinal das nanopartículas preparadas com HA de 13 e 55 kDa, e da insulina livre foi investigada em monocultura Caco-2 e co-cultura Caco-2: HT29-MTX. Os ensaios em monocultura Caco-2, para os diferentes pesos molares, foram realizados em dias diferentes; portanto, para cada peso molar utilizou-se um padrão de droga livre.

Os perfis de permeabilidade no modelo de monocamada de células Caco-2 da insulina livre e das diferentes formulações de nanopartículas são mostrados na Figura 14. A permeabilidade da insulina a partir das nanopartículas HA13-I e HA55-I ocorreu de forma proporcional ao aumento do tempo de incubação. Ao final das 4h de ensaio, a permeação foi de $21\% \pm 1,3$ e $16\% \pm 0,7$, para as nanopartículas HA13-I e HA55-I, respectivamente. Quando comparado aos perfis da droga livre não houve diferenças significativas na permeação ($p > 0,05$).

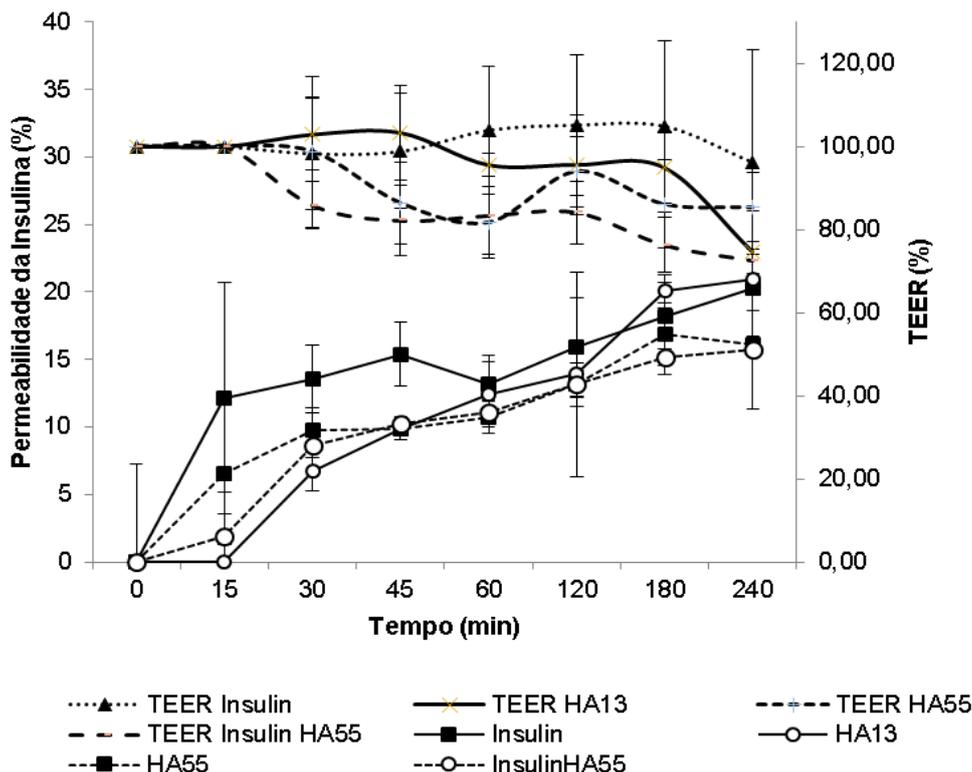


Figura 14. Perfil de permeabilidade cumulativa *in vitro* de insulina livre e nanopartículas HA13 e HA55 carregadas com insulina (linhas inferiores) e seus respectivos valores de TEER (linhas superiores) em modelo de monocamadas de células Caco-2. O experimento foi conduzido do compartimento apical (pH 6.5) para o basolateral (pH 7.4) em HBSS a 37°C. Barras de erro representam a média \pm DP (n=3).

O modelo intestinal de co-cultura Caco-2:HT29-MTX foi utilizado para avaliar efeito do muco na permeação da insulina no epitélio intestinal [20]. Os perfis de permeabilidade da insulina livre, nanopartículas HA13 e HA55 foram de $14,6 \pm 1,2$, $17\% \pm 2$ e $16\% \pm 1,4$, respectivamente (Figura 15). Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) para a insulina livre em relação às nanopartículas.

Os resultados obtidos para a insulina livre em ambos os ensaios, monocamada e co-cultura, apresentaram-se conforme descrito por estudos anteriores, visto que a insulina tem baixos níveis de permeabilidade [48,49].

Os perfis de permeabilidade da insulina presente nas nanopartículas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) ao se comparar os dois modelos celulares

estudados. Porém, foi consistente ao perfil de liberação *in vitro* (item 3.1.6) e semelhante ao perfil encontrado por Alibolandi et al. [49].

Considerando, que na presença de enzimas digestivas e pH extremo no trato gastrointestinal, a insulina é degradada pela quebra de ligações dissulfeto, e provavelmente não conseguiu chegar ao epitélio intestinal na sua forma ativa [6]. Sugere-se que a proteção que as nanopartículas lipídicas poliméricas conferiram à insulina encapsulada, evidenciada no ensaio de liberação *in vitro*, tenha sido favorável e possivelmente poderia auxiliar na manutenção da forma biologicamente ativa ao atravessar o estômago, chegando ao intestino, intacta, para permear através do epitélio intestinal.

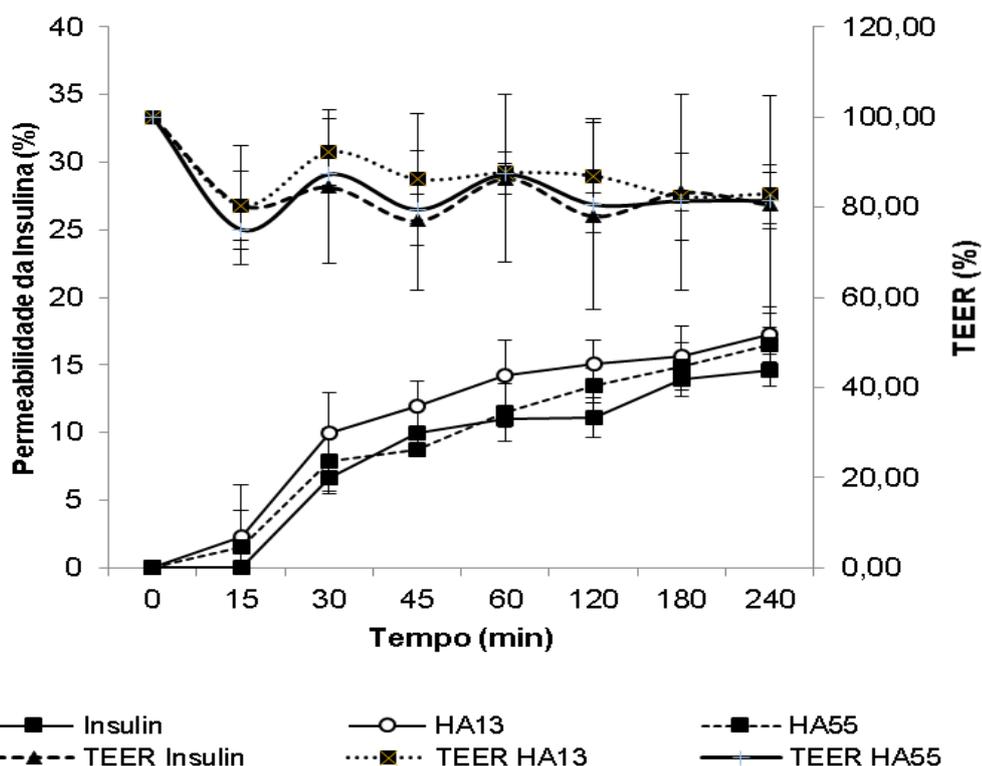


Figura 15. Perfil de permeabilidade cumulativa *in vitro* de insulina livre e nanopartículas HA13 e HA55 carregadas com insulina (linhas inferiores) e seus respectivos valores de TEER (linhas superiores) em modelo co-cultura Caco-2:HT29-MTX. O experimento foi conduzido do compartimento apical (pH 6.5) para o basolateral (pH 7.4) em HBSS a 37°C. Barras de erro representam a média \pm DP (n=3).

Os valores de TEER foram monitorados antes e após o experimento para avaliar a integridade da monocamada [20]. A diminuição de cerca de 20% nos perfis de TEER evidenciaram que houve a abertura das junções epiteliais estreitas, permitindo assim a permeação da insulina [44,50]. A via paracelular para abertura das junções epiteliais estreitas é considerada a maneira mais eficiente de permeação de peptídeos nanoencapsulados administrados oralmente [6].

CONCLUSÃO

Neste estudo, foram preparadas nanopartículas lipídicas poliméricas utilizando dois pesos molares de HA para a entrega oral de insulina, através da emulsificação-evaporação de solvente. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio em torno de 300 nm, com distribuição de tamanho homogêneo, formato esférico, sem formação de agregados, carga superficial negativa e eficiência de encapsulação de 35%. As formulações avaliadas apresentaram-se estáveis quando armazenadas sob refrigeração, a 8°C, por 3 meses. Em análise de DSC, evidenciou-se a incorporação da insulina nas nanopartículas durante o preparo e a estabilidade térmica do nanosistema formulado. Além disso, verificou-se a ausência de toxicidade das nanopartículas produzidas frente às células intestinais.

Constatou-se que as nanopartículas conferiram proteção à insulina encapsulada frente ao pH ácido e quando na presença das enzimas digestivas, proporcionou taxas de liberação *in vitro* sustentadas, podendo aumentar o tempo de permanência da insulina no organismo humano. Foram também condizentes com os perfis de permeação através de monocamada Caco-2 e co-cultura Caco-2:HT29-MTX.

Com base nestes fatos, é possível destacar que o peso molar do HA desencadeou aumento no diâmetro médio das nanopartículas, no entanto, em relação a resposta

terapêutica, ambos os pesos molares utilizados apresentaram as mesmas características. Ambas podem ser consideradas como nanotransportadores promissores para administração oral da insulina.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de recursos por meio do Projeto Programa Pesquisador Visitante Especial nº 09/2014 - Processo nº 88881.068073/2014-01.

Ao Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da UNICENTRO, Guarapuava/ PR – Brasil e ao Instituto Universitário de Ciências da Saúde, Gandra, Portugal pelas parcerias para a realização do estudo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, os resultados relacionados às nanopartículas lipídicas poliméricas desenvolvidas a partir da associação de etilpalmitato e HA sugerem a estabilidade do nanosistema com proteção da insulina frente às condições hostis presentes no trato gastrointestinal. Além de garantir a segurança da mucosa intestinal.

Todavia, uma melhor eficiência de encapsulação, um melhor perfil de liberação *in vitro*, e conseqüentemente, uma melhor permeação da insulina através do epitélio intestinal podem ser alcançados através do aprimoramento da formulação proposta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ADA. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. Supplement 1, p. S8–S16, 2015.

AGRAWAL, U.; SHARMA, R.; GUPTA, M.; VYAS, S. P. Is nanotechnology a boon for oral drug delivery? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 10, p. 1530–1546, 2014.

ALAI, M. S.; LIN, W. J.; PINGALE, S. S. Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 351–358, 2015.

ANSARI, M. J. Oral delivery of Insulin for treatment of Diabetes: Classical challenges and current opportunities. **Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 5, p. 209–220, 2015.

ANSARI, M. J.; ANWER, M. 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. 1972–1979, 2016.

BATISTA, P.; CASTRO, P. M.; MADUREIRA, A. R.; SARMENTO, B.; PINTADO, M. Recent insights in the use of nanocarriers for the oral delivery of bioactive proteins and peptides. **Peptides**, v. 101, p. 112–123, 2018.

BOSE, R. J. C.; RAVIKUMAR, R.; KARUPPAGOUNDER, V.; BENNET, D.; RANGASAMY, S.; THANDAVARAYAN, R. A. Lipid-polymer hybrid nanoparticle-mediated therapeutics delivery: Advances and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1258–1265, 2017.

BRAWERMAN, G. M.; DOLINSKY, V. W. Therapies for gestational Diabetes and their implications for maternal and offspring health: Evidence from human and animal studies. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 52–73, 2018.

CHEN, B.; MILLER, R. J.; DHAL, P. K. Hyaluronic acid-based drug conjugates: State-of-the-art and perspectives. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 4–16, 2014.

CHEOW, W. S.; HADINOTO, K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 214–220, 2011.

CZUBA, E.; DIOP, M.; MURA, C.; SCHASCHKOW, A.; LANGLOIS, A.; BIETIGER, W.; NEIDL, R.; VIRCIGLIO, A.; AUBERVAL, N.; JULIEN-DAVID, D.; MAILLARD, E.; FRERE, Y.; MARCHIONI, E.; PINGET, M.; SIGRIST, S. Oral insulin delivery, the challenge to increase insulin bioavailability: influence of surface charge in nanoparticle system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 542, p. 47–55, 2018.

DA ROCHA FERNANDES, J.; OGURTSOVA, K.; LINNENKAMP, U.; GUARIGUATA, L.;

SEURING, T.; ZHANG, P.; CAVAN, D.; MAKAROFF, L. E. IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 117, p. 48–54, 2016.

DATE, T.; NIMBALKAR, V.; KAMAT, J.; MITTAL, A.; MAHATO, R. I.; CHITKARA, D. Lipid-polymer hybrid nanocarriers for delivering cancer therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 271, p. 60–73, 2018.

DOSIO, F.; ARPICCO, S.; STELLA, B.; FATTAL, E. Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 204–236, 2016.

FONTE, P.; ANDRADE, F.; ARAÚJO, F.; ANDRADE, C.; NEVES, J. Das; SARMENTO, B. Chitosan-coated solid lipid nanoparticles for insulin delivery. **Methods in Enzymology**, v. 508, p. 295–314, 2012.

FONTE, P.; ARAÚJO, F.; REIS, S.; SARMENTO, B. Oral Insulin Delivery: How Far are We? **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 7, n. 2, p. 520–531, 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, n. 6, p. 1342–1354, 2014.

GAMBOA, J. M.; LEONG, K. W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 800–810, 2013.

GARG, H. G.; HALES, C. A. (ed.). **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. 1st. ed. Amsterdam: Elsevier B.V., 2004.

GEDAWY, A.; MARTINEZ, J.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Oral insulin delivery: existing barriers and current counter-strategies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, p. 197–213, 2018.

GUTER, M.; BREUNIG, M. Hyaluronan as a promising excipient for ocular drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 34–49, 2017.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Saunders, 2006.

HADINOTO, K.; SUNDARESAN, A.; CHEOW, W. S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 427–443, 2013.

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. 836–845, 2012.

HARDMAN, JOEL, G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (ed.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

HE, Z.; SANTOS, J. L.; TIAN, H.; HUANG, H.; HU, Y.; LIU, L.; LEONG, K. W.; CHEN, Y.;

MAO, H. Q. Scalable fabrication of size-controlled chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin. **Biomaterials**, v. 130, p. 28–41, 2017.

KAKLOTAR, D.; AGRAWAL, P.; ABDULLA, A.; SINGH, R. P.; MEHATA, A. K.; SINGH, S.; MISHRA, B.; PANDEY, B. L.; TRIGUNAYAT, A.; MUTHU, M. S. Transition from passive to active targeting of oral insulin nanomedicines: enhancement in bioavailability and glycemic control in diabetes. **Nanomedicine**, v. 11, n. 11, p. 1465–1486, 2016.

KARURANGA, S.; FERNANDES, J. da R.; HUANG, Y.; MALANDA, B. (ed.). **IDF Diabetes Atlas**. 8th. ed. [s.l.] International Diabetes Federation, 2017.

KERNER, W.; BRUCKEL, J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 122, p. 24–30, 2014.

KESHARWANI, P.; GORAIN, B.; LOW, S. Y.; TAN, S. A.; LING, E. C. S.; LIM, Y. K.; CHIN, C. M.; LEE, P. Y.; LEE, C. M.; OOI, C. H.; CHOUDHURY, H.; PANDEY, M. Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 136, p. 52–77, 2018.

LEVESQUE, C. Therapeutic lifestyle changes for Diabetes Mellitus. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, p. 679–692, 2017.

LI, Q.; CAI, T.; HUANG, Y.; XIA, X.; COLE, S.; CAI, Y. A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, v. 7, p. 122, 2017.

LIANG, J.; JIANG, D.; NOBLE, P. W. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 186–203, 2016.

LOPES, M. A.; ABRAHIM, B. A.; SEIÇA, R.; VEIGA, F.; RODRIGUES, C. R.; RIBEIRO, A. J. Intestinal uptake of insulin nanoparticles: facts or myths? **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 7, p. 629–638, 2014.

MANSURI, S.; KESHARWANI, P.; JAIN, K.; TEKADE, R. K.; JAIN, N. K. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 151–172, 2016.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 253, p. 1–22, 2018.

MCGINN, B. J.; MORRISON, J. D. Investigations into the absorption of insulin and insulin derivatives from the small intestine of the anaesthetised rat. **Journal of Controlled Release**, v. 232, p. 120–130, 2016.

MILECH, A.; ANGELUCCI, A. P.; GOLBERT, A.; MATHEUS, A.; CARRILHO, A. J. F.; RAMALHO, A. C.; AGUIAR, A. C. B.; CARDOSO, A. Ma. C. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

NIU, Z.; CONEJOS-SÁNCHEZ, I.; GRIFFIN, B. T.; O'DRISCOLL, C. M.; ALONSO, M. J.

Lipid-based nanocarriers for oral peptide delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 106, p. 337–354, 2016.

OGURTSOVA, K.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; HUANG, Y.; LINNENKAMP, U.; GUARIGUATA, L.; CHO, N. H.; CAVAN, D.; SHAW, J. E.; MAKAROFF, L. E. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 128, p. 40–50, 2017.

PAWAR, V. K.; MEHER, J. G.; SINGH, Y.; CHAURASIA, M.; SURENDAR REDDY, B.; CHOURASIA, M. K. Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide therapeutics: Strategies and industrial perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 196, p. 168–183, 2014.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 85–99, 2014.

SALES-PERES, S. H. de C.; PEREIRA; GUEDES, M. de F. S.; SÁ, L. M.; NEGRATO, C. A.; LAURIS, J. R. P. Estilo de vida em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 4, p. 1197–1206, 2016.

SALWOWSKA, N. M.; BEBENEK, K. A.; ŻĄDŁO, D. A.; WCISŁO-DZIADECKA, D. L. Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 520–526, 2016.

SANTALICES, I.; GONELLA, A.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Advances on the formulation of proteins using nanotechnologies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2017.

SGORLA, D.; BUNHAK, É. J.; 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.

SGORLA, D.; LECHANTEUR, A.; ALMEIDA, A.; SOUSA, F.; MELO, E.; BUNHAK, É.; MAINARDES, R.; KHALIL, N.; CAVALCANTI, O.; SARMENTO, B. Development and characterization of lipid-polymeric nanoparticles for oral insulin delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 3, p. 213–222, 2018.

SUDHA, P. N.; ROSE, M. H. Beneficial effects of hyaluronic acid. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 72, p. 137–176, 2014.

SUN, S.; LIANG, N.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y.; CUI, F.; YAN, P. pH-sensitive poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle composite microcapsules for oral delivery of insulin. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3489–3498, 2015.

TEIXEIRA, M. C.; CARBONE, C.; SOUTO, E. B. Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery. **Progress in Lipid Research**, v. 68, p. 1–11, 2017.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. **Nanoparticulate drug delivery systems**. New York: Informa Healthcare USA, Inc, 2007.

TRIPODO, G.; TRAPANI, A.; TORRE, M. L.; GIAMMONA, G.; TRAPANI, G.; MANDRACCHIA, D. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 400–416, 2015.

TYAGI, P.; SUBRAMONY, J. A. Nanotherapeutics in oral and parenteral drug delivery: Key learnings and future outlooks as we think small. **Journal of Controlled Release**, v. 272, p. 159–168, 2018.

VASI, A. M.; POPA, M. I.; BUTNARU, M.; DODI, G.; VERESTIUC, L. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 38, n. 1, p. 177–185, 2014.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 1020–1037, 2012.

WONG, C. Y.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Recent advancements in oral administration of insulin-loaded liposomal drug delivery systems for diabetes mellitus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 549, p. 201–217, 2018.

WU, X. Y. Strategies for optimizing polymer-lipid hybrid nanoparticle-mediated drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 5, p. 609–612, 2016.

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. 153–159, 2006.

CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MODIFICADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA

- [1] Chellappan DK, Yenese Y, Wei C, et al. Oral Insulin : Current Status, Challenges, and Future Perspectives. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2017;36:283–291.
- [2] Gedawy A, Martinez J, Al-Salami H, et al. Oral insulin delivery: existing barriers and current counter-strategies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2018;70:197–213.
- [3] Fonte P, Andrade F, Araújo F, et al. Chitosan-coated solid lipid nanoparticles for insulin delivery. *Methods Enzymol.* 2012;508:295–314.
- [4] Zhang N, Ping Q, Huang G, et al. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Int. J. Pharm.* 2006;327:153–159.
- [5] Fernandes VC, Denadai ÂML, Millán RDS, et al. Caracterização físico-química de complexos de insulina: dimetil-beta-ciclodextrina e insulina: hidroxipropil-beta-ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. *Rev. Bras. Ciências Farm.* 2007;43:543–553.

- [6] Han L, Zhao Y, Yin L, et al. Insulin-loaded pH-sensitive Hyaluronic Acid nanoparticles enhance transcellular delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13:836–845.
- [7] Sheng J, He H, Han L, et al. Enhancing insulin oral absorption by using mucoadhesive nanoparticles loaded with LMWP-linked insulin conjugates. *J. Control. Release*. 2016;233:181–190.
- [8] Wong CY, Al-Salami H, Dass CR. Potential of insulin nanoparticle formulations for oral delivery and diabetes treatment. *J. Control. Release*. 2017;264:247–275.
- [9] Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013;85:427–443.
- [10] Date T, Nimbalkar V, Kamat J, et al. Lipid-polymer hybrid nanocarriers for delivering cancer therapeutics. *J. Control. Release*. 2018;271:60–73.
- [11] Bose RJC, Ravikumar R, Karuppagounder V, et al. Lipid-polymer hybrid nanoparticle-mediated therapeutics delivery: Advances and challenges. *Drug Discov. Today*. 2017;22:1258–1265.
- [12] Wu XY. Strategies for optimizing polymer-lipid hybrid nanoparticle-mediated drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2016;13:609–612.
- [13] Sgorla D, Bunhak ÉJ, Cavalcanti OA, et al. Exploitation of lipid-polymeric matrices at nanoscale for drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2016;13:1301–1309.
- [14] Liang J, Jiang D, Noble PW. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2016;97:186–203.
- [15] Sudha PN, Rose MH. Beneficial effects of hyaluronic acid. *Adv. Food Nutr. Res*. 2014;72:137–176.
- [16] Dosio F, Arpicco S, Stella B, et al. Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2016;97:204–236.
- [17] Chen B, Miller RJ, Dhal PK. Hyaluronic acid-based drug conjugates: State-of-the-art and perspectives. *J. Biomed. Nanotechnol*. 2014;10:4–16.
- [18] Tripodo G, Trapani A, Torre ML, et al. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015;97:400–416.
- [19] Almeida A, Silva D, Gonçalves V, et al. Synthesis and characterization of chitosan-grafted-polycaprolactone micelles for modulate intestinal paclitaxel delivery. *Drug Deliv. Transl. Res*. 2018;8:387–397.
- [20] Silva DS, Almeida A, Prezotti F, et al. Synthesis and characterization of 3,6-O,O’-

acid-functionalized calcium phosphate nanoparticles for siRNA delivery. *Colloids Surfaces B*. 2017;152:220–228.

- [21] Sarmento B, Ribeiro A, Veiga F, et al. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. *Biomed. Chromatogr*. 2006;20:898–903.
- [22] ANVISA. RESOLUÇÃO – RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Of. da União Brasil*; 2003.
- [23] Chang C, Wang T, Hu Q, et al. Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: Formation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol*. 2017;104:117–124.
- [24] Jain A, Jain SK, Ganesh N, et al. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med*. 2010;6:179–190.
- [25] USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2014.
- [26] Sgorla D, Lechanteur A, Almeida A, et al. Development and characterization of lipid-polymeric nanoparticles for oral insulin delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2018;15:213–222.
- [27] Lim ST, Forbes B, Martin GP, et al. In vivo and in vitro characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS PharmSciTech*. 2001;2.
- [28] Gao X, Zhang J, Xu Q, et al. Hyaluronic acid-coated cationic nanostructured lipid carriers for oral vincristine sulfate delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 2017;43:661–667.
- [29] Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol. Sci*. 2008;101:239–253.
- [30] Severino P, Andreani T, Jager A, et al. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: Optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). *Eur. J. Med. Chem*. 2014;81:28–34.
- [31] Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Bhattacharya S, et al. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *Int. J. Biol. Macromol*. 2015;72:640–648.
- [32] Zhang ZH, Zhang YL, Zhou JP, et al. Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid-octaarginine for oral administration of insulin. *Int. J. Nanomedicine*. 2012;7:3333–3339.
- [33] García-díaz M, Foged C, Nielsen HM. Improved insulin loading in poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles upon self-assembly with lipids. *Int. J. Pharm*. 2015;482:84–91.

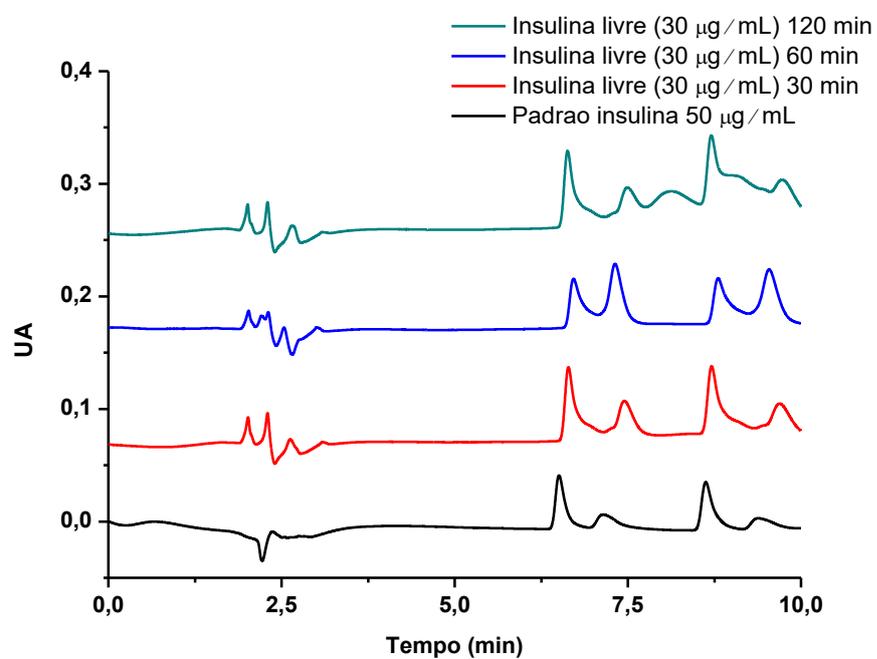
- [34] Jensen DK, Jensen LB, Koocheki S, et al. Design of an inhalable dry powder formulation of DOTAP-modified PLGA nanoparticles loaded with siRNA. *J. Control. Release.* 2012;157:141–148.
- [35] Manaia EB, Abuçafy MP, Chiari-Andréo BG, et al. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *Int. J. Nanomedicine.* 2017;12:4991–5011.
- [36] Andreani T, Kiill CP, Souza ALR d., et al. Surface engineering of silica nanoparticles for oral insulin delivery: Characterization and cell toxicity studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;123:916–923.
- [37] Luo Y, Kirker KR, Prestwich GD. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *J. Control. Release.* 2000;69:169–184.
- [38] Schanté CE, Zuber G, Herlin C, et al. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 2011;85:469–489.
- [39] Bayrami S, Esmaili Z, SeyedAlinaghi S, et al. Fabrication of long-acting insulin formulation based on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) nanoparticles: preparation, optimization, characterization, and in vitro evaluation. *Pharm. Dev. Technol.* 2018;26:1–13.
- [40] Al-Qadi S, Alatorre-Meda M, Martin-Pastor M, et al. The role of hyaluronic acid inclusion on the energetics of encapsulation and release of a protein molecule from chitosan-based nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2016;141:223–232.
- [41] Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2006;2:8–21.
- [42] Ruozi B, Belletti D, Sharma HS, et al. PLGA nanoparticles loaded cerebrolysin: Studies on their preparation and investigation of the effect of storage and serum stability with reference to traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* 2015;52:899–912.
- [43] Singh S, Kushwah V, Agrawal AK, et al. Insulin- and quercetin-loaded liquid crystalline nanoparticles: implications on oral bioavailability, antidiabetic and antioxidant efficacy. *Nanomedicine (Lond).* 2018;13:521–537.
- [44] Sheng J, Han L, Qin J, et al. N -Trimethyl Chitosan Chloride-Coated PLGA Nanoparticles Overcoming Multiple Barriers to Oral Insulin Absorption. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015;7:15430–15441.
- [45] Reix N, Parat A, Seyfritz E, et al. In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2012;437:213–220.
- [46] McGinn BJ, Morrison JD. Investigations into the absorption of insulin and insulin derivatives from the small intestine of the anaesthetised rat. *J. Control. Release.*

2016;232:120–130.

- [47] Araújo F, Shrestha N, Shahbazi M, et al. The impact of nanoparticles on the mucosal translocation and transport of GLP-1 across the intestinal epithelium. *Biomaterials*. 2014;9199–9207.
- [48] Shamsa E, Mahjub R, Mansoorpour M, et al. Nanoparticles Prepared From N, N-Dimethyl-N-Octyl Chitosan as the Novel Approach for Oral Delivery of Insulin: Preparation, Statistical Optimization and. *Iran. J. Pharm. Res*. 2018;17:442–459.
- [49] Alibolandi M, Alabdollah F, Sadeghi F, et al. Dextran-b-poly (lactide-co-glycolide) polymersome for oral delivery of insulin: In vitro and in vivo evaluation. *J. Control. Release*. 2016;227:58–70.
- [50] Sandri G, Rossi S, Ferrari F, et al. Mucoadhesive and penetration enhancement properties of three grades of hyaluronic acid using porcine buccal and vaginal tissue, Caco-2 cell lines, and rat jejunum. *J. Pharm. Pharmacol*. 2004;56:1083–1090.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Material Suplementar



Material Suplementar 1. Cromatogramas da solução padrão de insulina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em água ultrapura e da insulina livre (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no fluido gástrico simulado em 30, 60 e 120 min.

Anexo 2 – Normas Revista Expert Opinion on Drug Delivery

Original Research: Expert Opinion on Drug Delivery

Contributions are welcomed in the form of:

- Delivery technologies, vehicles, formulations and devices
- The delivery of specific drugs and therapeutic classes
- Modes of entry into the body and applications in certain diseases and disorders

Prior publication: Expert Opinion will only consider work that has not been previously published in full. Abstract, poster or oral presentations do not constitute prior publication, but should be mentioned in the covering letter and details included as a footnote on the manuscript title page. All manuscripts must be accompanied by a covering letter and an electronic version of the **Disclosure Form** signed by the principal author(s). The covering letter should include all of the following information:

- The name and contact details (telephone, fax, postal and email addresses) of the corresponding author who will deal with the comments from reviewers and approve final proofs.
- A statement that the contribution represents original work that has not been previously published or simultaneously submitted for publication elsewhere.
- A statement that the manuscript has been read and approved by all the authors, and that all the conditions as previously stated by the ICMJE have been met.
- The body providing explicit ethical approval of the work reported should also be stated.
- A statement of financial or other relationships of a declarable nature (i.e., commercial associations that might lead to a conflict of interest), including disclosure of sources of support in the form of sponsorship, grants, materials (drugs) or equipment, and editorial or manuscript support. In case there are no disclosures of a declarable nature, or acknowledgements for financial or editorial support, this should be clearly stated.

All complete submissions will be acknowledged by the Editorial Office upon receipt. Please note that manuscripts without a covering letter or a Disclosure Form will not be considered to be 'complete' submissions.

Manuscript content

General: Manuscripts submitted should be in English, using US spellings, and written for an international, general medicine readership. Where national or regional issues are discussed, the international context should also be considered. When a licensed drug or device is being discussed outside its licensed indication, this must be made clear to the reader.

Manuscripts should be double-spaced with numbered pages. Keep the layout as simple as possible – it will be set to house style during the production process.

Every article must contain:

Title page: All articles should have a concise, informative title that contains no brand names. In addition to the title itself, the title page should also have the name(s) and initials of all the authors and their institutional affiliation(s). The name of the corresponding author and their mailing address should be given in full, including email, telephone and fax numbers. Should any of the material contained in the paper have been previously presented at a meeting, the full name, location and inclusive dates of the meeting should also appear on the title page. Authors are to avoid using Trade names in their titles, and are encouraged to have non-promotional titles for their articles.

Abstract: The second page should contain a brief, structured abstract of the paper (no more than 200 words) summarizing the main facts, findings and principal conclusions. Suggested headings:

- **Background** (including the reason for the study);
- **Research design and methods** (including study population and setting, study blinding, comparators, dosage, treatment regimens and durations, efficacy and safety issues); Main outcome measures;
- **Results** (both efficacy results and adverse events should be given);
- **Conclusions** (qualified by any key limitations). No references are to be cited in the Abstract. Please bear in mind that the Abstract needs to accurately reflect the content of the article and that the aim of the Abstract is to draw in the interested reader.

- **Trial Registration (if a clinical trial):** e.g., The trial is registered at ClinicalTrials.gov (CT.gov identifier: NCT02263066).

Introduction: This should state the clinical relevance and background to the study, its rationale and purpose.

Keywords: 4–6 keywords, listed in alphabetical order, are required to assist indexers in cross-referencing. The keywords will encompass the therapeutic area, mechanism(s) of action, key compounds and so on.

Body of the article: This should include the following sections: introduction; patients and methods; results; discussion; conclusions:

- **Patients and methods:** This should contain details of the study population and setting, subject selection (inclusion/exclusion criteria), methods of randomization and blinding, and efficacy and safety measures. The study design and statistical methodology should be described, with justification for the choice of analysis and sample size given; **CONSORT guidelines** should be considered where appropriate. All materials should be identified precisely, with drugs referred to by their generic names (proprietary names, if required, should be given in parentheses along with the company name and country of the manufacturer), and with dose and routes of administration. The ethical approval procedure followed and the name of the ethics committee should be stated. Indicate how adverse events were determined (and by whom) and indicate if/how compliance was measured. (Authors are reminded to ensure that they follow the ICMJE requirements when dealing with privacy and informed consent from patients – see **Section II.E.1.of the ICMJE requirements document**). Trial registration numbers with full details should be included.
- **Results:** Use should be made of tables and figures to help with the clear presentation of results data. The sample size of each data point should be shown, with p-values and confidence intervals quoted for significant findings. Any data not included in the analysis (including patients withdrawn from the study) should be detailed. Details of data on efficacy and adverse events should be provided in a balanced fashion.

- **Discussion:** This will essentially be a discussion of the results and experimental data collected. The section should include implications of the findings and their limitations, with reference to all other relevant studies and the possibilities these suggest for future research. In addition, the discussion affords authors the opportunity to discuss the developments that are likely to be important in the future and the avenues of research likely to become exciting as further studies yield more detailed results.
- **Conclusions:** This section must summarize the paper, with a concise statement of the clinical implications of the study results. Ensure that extrapolations are reasonable and that conclusions are justified by the data presented. Indicate if the study design can be generalized to a broader patient population.

Acknowledgements: This must include any declaration of interest by the authors, including grants, fellowships or any commercial assistance or financial sponsorship received. It should also list any affiliation(s), organization(s) or entity(ies) that are relevant to the work reported. Some or all of this information may be published at the discretion of the Editor. Any contributions to the research, data analysis or assistance in manuscript preparation must also be acknowledged in this section. Finally, if any trial registration information and/or a trial registration number are available for the study, this should also be mentioned in the acknowledgements section.

Author contributions: Authors should briefly highlight which author(s) were involved in the conception and design, or analysis and interpretation of the data; the drafting of the paper or revising it critically for intellectual content; and the final approval of the version to be published; and that all authors agree to be accountable for all aspects of the work.

References: Full references to relevant material cited in the text should be provided. References should be comprehensive, accurate and up-to-date: wherever possible, please use primary references, and as far as possible, avoid the use of unpublished references (such as 'Data on file' or 'Poster'). Reference to unpublished data should be kept to a minimum and authors must obtain a signed letter of permission from cited persons to use unpublished results or personal communications in the manuscript.