



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Lipossomas funcionalizados com peptídeos de transdução de membrana para administração intranasal de insulina no tratamento do diabetes mellitus

Eliete de Souza Von Zuben

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

Araraquara-SP
2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Lipossomas funcionalizados com peptídeos de transdução de membrana para administração intranasal de insulina no tratamento do diabetes mellitus

Eliete de Souza Von Zuben

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli
Coorientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

Araraquara-SP
2019

V945I Von Zuben, Eliete de Souza.
Lipossomas funcionalizados com peptídeos de transdução de membrana para administração intranasal de insulina no tratamento do diabetes mellitus / Eliete de Souza Von Zuben. - Araraquara : [s.n.], 2019.
157 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Marlus Chorilli.
Coorientador: Josimar de Oliveira Eloy.

1. Diabetes mellitus. 2. Insulina. 3. Lipossomas. 4. Peptídeos de transdução de membrana. 5. Sistemas nanoestruturados. 6. Administração nasal I. Chorilli, Marlus, orient. II. Eloy, Josimar de Oliveira, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por estar presente na minha vida e nesta jornada, iluminando meus caminhos com coragem e perseverança.

Ao meu amado marido Everton Von Zuben por todo amor, amizade, suporte, carinho, momentos de desabafo e muita torcida para a realização deste trabalho.

À lindeza da minha vida, meu filho amado Davi, a minha maior riqueza, por todos os ensinamentos que tem me proporcionado como mãe e por todos os momentos que passamos juntos que me fizeram “recarregar as baterias” para enfrentar todas as etapas desta pesquisa.

Aos meus pais, Alice e Joel, às minhas irmãs Joziane e Evenize e a minha encantadora afilhada Isabela por torcerem por mim e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões.

Aos meus queridos sogros, Terezinha e Fabio Von Zuben pelo apoio e carinho.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pela orientação, paciência, convivência, amizade e a oportunidade de realizar um projeto tão especial e multidisciplinar. Muito obrigada por tudo nestes três anos que estive em Araraquara.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Josimar Oliveira Eloy pelo suporte, amizade, momentos de descontração e principalmente pela disponibilidade em colaborar ativamente na construção deste trabalho. Foi um prazer trabalhar com você Josi!

Aos professores do departamento de Fármacos e Medicamentos por toda ajuda e amizade. Agradeço em especial aos professores do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica Dr.^a Maria Palmira Daflon Gremião e Dr. Anselmo G. Oliveira por permitir a utilização dos equipamentos e pelo apoio.

À técnica do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Natália G. dos Santos, pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos.

A todos os alunos e colegas do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica que convivi diariamente, Andressa Maria Pironi, Lucas Noboru, Camila Roder, Mariza Aires Fernandes, Francesca Victorelli, Mariana Sato, Paula Scanavez, Renata Carolina Alves, Valéria Cardoso, Leda Robusti, Patrícia Rocha, Karen Santos, Aline Perissinato, Vivian Ruz, Franciele Garcia Baveloni, Bruno Fonseca, Fernanda Boni, Aline Martins, Natália Noronha e a aluna de iniciação científica Ornella Tiemi Osaka, agradeço muito pela amizade, conversas, troca de conhecimento e alegrias.

À Prof^a Dr^a Amanda Martins Baviera pelo apoio, momentos de descontração, pela parceria em todos os resultados dos ensaios *in vivo* e principalmente pelo carinho e amizade. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti e aos alunos do Laboratório de Enzimologia e Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas, Renata Pires de Assis, Tayra Ferreira Oliveira de Lima, Ingrid Delbone Figueiredo, Anderson Kiyoshi Kaga, Mariana de Campos da Costa, Bruno Pereira Mota e Juliana Oriel de Oliveira que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho. E em especial a aluna Maiara Destro Inácio, um verdadeiro anjo que cruzou meu caminho, muito obrigada por todo o apoio, amizade, comprometimento, dedicação e parceria no desenvolvimento dos três ensaios *in vivo* que foram realizados.

À Prof^a Dr^a Leila Aparecida Chiavacci Favorin por permitir a utilização do rotaevaporador, a Prof^a Dr^a Rosângela Gonçalves Peccinini, a Prof.^a Dr^a Herida Regina Nunes Salgado e a farmacêutica Kelly Pestana Biava pela utilização e auxílio no CLAE.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas do Instituto de Química (UNESP) por permitir a utilização do Espectropolarímetro de Dicroísmo Circular (JASCO) e pela assistência dos técnicos responsáveis Naira e Alberto.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP) por permitir a utilização do microscópio eletrônico de transmissão e pela assistência dos técnicos responsáveis Maria Dolores S Ferreira e José.

A Seção Técnica de Pós-Graduação, aos funcionários, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP) e a CAPES pelo suporte financeiro.

Aos funcionários da biblioteca da FCFar-UNESP, por toda ajuda.

Às funcionárias da limpeza, pela dedicação e por nos proporcionar um ambiente de trabalho confortável e agradável.

A todos aqueles que tenha esquecido de citar neste breve agradecimento, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho do qual tenho grande orgulho.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

*"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é
possível, e de repente você estará fazendo o
impossível."*

São Francisco de Assis

“Nunca saberemos o quão forte somos até que ser forte seja a única escolha”

Autor desconhecido

“A informação é cumulativa já o conhecimento é seletivo”

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada por deficiência na produção/secreção pancreática de insulina e/ou resistência à ação do hormônio nos tecidos alvo, resultando em hiperglicemia. Diversas pesquisas têm desencadeado o desenvolvimento de novos sistemas de administração de insulina que possibilitem a utilização de vias alternativas à parenteral, com destaque à administração de insulina por via nasal. Esta via tem-se mostrado promissora, pois pode promover uma rápida absorção do fármaco e aumentar a sua biodisponibilidade. Entretanto, existem mecanismos de depuração mucociliar que limitam a administração de fármacos, além da baixa permeabilidade do epitélio nasal, o qual dificulta a absorção de fármacos com alto massa molar. Uma estratégia para vencer tais barreiras é a utilização de sistemas nanoestruturados (lipossomas), pois são amplamente utilizados para o aperfeiçoamento da potencialização da ação terapêutica de fármacos. Além disso estes lipossomas foram funcionalizados com peptídeos de transdução de membrana (CPPs), tais como os peptídeos TAT e Penetratin (PNT), que atuam como promotores da penetração e absorção do fármaco, com posterior dispersão em hidrogel de hidroxietilcelulose. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar lipossomas contendo solução de insulina, funcionalizados com CPPs (TAT e PNT) e dispersos em hidrogel, avaliar o potencial pela via nasal, *in vivo*, para a melhora dos níveis séricos e efeito hipoglicemiante da insulina. Os resultados obtidos revelaram que as formulações apresentaram valores médios de diâmetro hidrodinâmico na escala nanométrica, índice de polidispersão e de potencial zeta estáveis, durante o período de armazenamento de 90 dias. A funcionalização realizada com os CPPs na concentração de 0,1mM e demonstraram que houve um decréscimo nos valores de potencial zeta de $-53,60 \pm 3,02$ mV para os lipossomas encapsulados com insulina para $-10,90 \pm 0,47$ mV quando funcionalizados com TAT e $-9,05 \pm 0,60$ mV quando funcionalizados com PNT, indicativo de interação eletrostática, devido à carga altamente positiva dos CPPs. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostraram que os lipossomas com e sem fármaco e funcionalizados com CPPs apresentam uma morfologia multilamelares e unilamelares pequenas e em escalas nanométricas (80 a 150 nm). Os espectros de dicroísmo circular realizados nas formulações recém-preparadas com e sem os CPPs e nas que foram submetidas ao ensaio de liberação *in vitro* demonstraram que a integridade e a estabilidade da insulina foram preservadas, quando comparada com a insulina em solução. O método analítico para quantificação da insulina foi validado e utilizado nos ensaios de eficiência de encapsulação (EE%), liberação *in vitro* e permeação em mucosa nasal suína. Optou-se pelo método de preparo de hidratação do filme lipídico por apresentar os resultados mais elevados em relação a EE%. O ensaio de força mucoadesiva nas duas membranas modelos foram muito similares e da ordem de 0.06 N e não apresentaram diferença significativa (valor de $p > 0,05$). O ensaio de seringabilidade mostrou-se favorável, no que diz respeito à facilidade de aplicação deste tipo de formulação pelo paciente na via nasal. As análises reológicas evidenciaram um comportamento do tipo pseudoplástico com caráter mais viscoso do que elástico ($G'' > G'$) para todas as formulações. Os ensaios de liberação *in vitro* demonstraram que as formulações estudadas apresentam cinética de liberação, conforme modelo matemático de Weibull, que relaciona a quantidade de fármaco acumulado em solução em função do tempo. Nos ensaios de permeação em mucosa nasal suína observou-se que o fluxo (J) da formulação Hidrogel+Lipossomas+Insulina (HLI) foi quase duas vezes maior em relação às formulações Hidrogel+Lipossomas+Insulina+TAT(HLI_{TAT}) e Hidrogel+Lipossomas+Insulina+PNT (HLI_{PNT}) e a mesma relação foi observada para os resultados de coeficiente de permeabilidade (Kp). Enquanto que o J da formulação Hidrogel +Insulina (HI) foi 1,5 vezes maior em relação à formulação HLI, sendo que a mesma relação foi observada para o resultado de Kp. Os ensaios *in vivo* evidenciaram que as formulações HLI_{TAT}, HLI_{PNT}, HI e HLI demonstraram resultados satisfatórios, entretanto, as formulações HLI_{TAT} e HLI_{PNT} possuem potencial para serem melhoradas quando comparadas as formulações HI e HLI.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Insulina. Lipossomas. Peptídeos de transdução de membrana. Sistemas nanoestruturados. Administração nasal.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic syndrome characterized by deficiency in pancreatic insulin production / secretion and / or resistance to hormone action in target tissues, resulting in hyperglycemia. Several researches have triggered the development of new insulin delivery systems that allow the use of alternative parenteral routes, especially the nasal administration of insulin. This route has been promising as it can promote rapid absorption of the drug and increase its bioavailability. However, there are mucociliary clearance mechanisms that limit drug administration, in addition to the low permeability of the nasal epithelium, which hinders the absorption of drugs with high molar mass. One strategy to overcome such barriers is the use of nanostructured systems (liposomes), as they are widely used to enhance the potentiation of therapeutic action of drugs. In addition, these liposomes were functionalized with membrane transduction peptides (CPPs), such as TAT and Penetratin (PNT) peptides, which act as penetration and absorption promoters of the drug, with later dispersion in hydroxyethylcellulose hydrogel. The objective of this work was to develop and characterize insulin-containing liposomes, functionalized with CPPs (TAT and PNT) and dispersed in hydrogel, to evaluate the nasal potential *in vivo* for the improvement of serum levels and hypoglycemic effect of insulin. The results showed that the formulations showed stable values of hydrodynamic diameter on the nanometer scale, stable polydispersion index and zeta potential during the storage period of 90 days. Functionalization performed with CPPs at a concentration of 0.1 mM and demonstrated that there was a decrease in zeta potential values from -53.60 ± 3.02 mV for insulin-encapsulated liposomes to -10.90 ± 0.47 mV when functionalized with TAT and -9.05 ± 0.60 mV when functionalized with PNT, indicative of electrostatic interaction, due to the highly positive charge of the CPPs. Transmission electron microscopy images showed that drug-based and drug-free liposomes with CPPs have small multilamellar and unilamellar morphology at nanometer scales (80 to 150 nm). Circular dichroism spectra performed on freshly prepared formulations with and without CPPs and those subjected to the *in vitro* release assay demonstrated that insulin integrity and stability were preserved as compared to insulin in solution. The analytical method for insulin quantification was validated and used in the encapsulation efficiency (EE%), *in vitro* release and permeation tests in porcine nasal mucosa. The method of preparation of hydration of the lipid film was chosen because it presents the highest results in relation to EE%. The mucoadhesive strength test in the two model membranes were very similar and of the order of 0.06 N and showed no significant difference (p value > 0.05). The syringability test proved to be favorable, regarding the ease of application of this type of formulation by the patient in the nasal route. The rheological analyzes showed a pseudoplastic type behavior with a more viscous than elastic character ($G' > G''$) for all formulations. *In vitro* release assays demonstrated that the formulations studied presented release kinetics, according to Weibull's mathematical model, which relates the amount of drug accumulated in solution as a function of time. In the porcine nasal mucosal permeation assays it was observed that the flow (J) of the formulation Hydrogel + Liposomes + Insulin (HLI) was almost twice higher than the formulations Hydrogel + Liposomes + Insulin + TAT (HLITAT) and Hydrogel + Liposomes + Insulin + PNT (HLIPNT) and the same relationship was observed for the permeability coefficient (Kp) results. While the J of the Hydrogel + Insulin (HI) formulation was 1.5 times higher than the HLI formulation, the same relationship was observed for the Kp result. *In vivo* tests showed that HLITAT, HLIPNT, HI and HLI formulations showed satisfactory results, however, HLITAT and HLIPNT formulations have potential to be improved when compared to HI and HLI formulations.

Key words: Diabetes mellitus. Insulin. Liposomes. Cell-penetrating peptides (CPPs) or protein transduction domain (PTDs). Nanostructured systems. Nasal administration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da pró-insulina humana, composta por 3 cadeias de aminoácidos interligadas através de pontes dissulfeto. Fonte: GENUTH, 2008.25
- Figura 2.** Secreção de insulina pelas células beta pancreáticas promovida pela glicose e sulfoniluréias. Fonte: KATZUNG; TREVOR, 201726
- Figura 3.** Mecanismo de transdução do sinal da insulina. Fonte: CARVALHEIRA *et al.*, 2002. ..28
- Figura 4.** Farmacocinética dos diferentes tipos de insulina. Fonte: CAMPOS, 2011.29
- Figura 5.** Anatomia da cavidade nasal humana. Adaptado de PIRES *et al.*, 2009.30
- Figura 6.** Tipos de transporte através das células epiteliais. Fonte: SILVA *et al.*, 2002.31
- Figura 7.** Representação de um lipossoma (esquerda) e uma bicamada lipídica (direita). Fonte: BOZZUTO; MOLINARI, 2015.33
- Figura 8.** Mecanismos de internalização celular de CPPs . Adaptado de GUIDOTTI *et al.*, 2017..42
- Figura 9.** (A) Rotaevaporador RV10 digital (IKA); (B) Homogeneizador a alta pressão, EmulsiFlex-C348
- Figura 10.** Reômetro, modelo RS-1 – Haake Rheostress56
- Figura 11.** Imagem dos discos de mucina aderidos horizontalmente em prova cilíndrica em contato com formulação.....57
- Figura 12.** Corte longitudinal de septo nasal suíno.....58
- Figura 13.** Fotografia do dispositivo adaptado utilizado para determinação da seringabilidade.....59
- Figura 14.** Célula de difusão utilizada para estudos de liberação *in vitro* e permeação em mucosa nasal suína. Disponível em: <<http://www.hansonresearch.com>>. Acesso em dezembro/18..... 60
- Figura 15.** Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e PZ. (A) Formulação A, obtida pelo método HFL; (B) Formulação B, obtida pelo método HFL; (C) Formulação C, obtida pelo método HFL; (D) Formulação D, obtida pelo método HFL. 68
- Figura 16.** Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e potencial zeta. (E) Formulação B, obtida pelo método REV; (F) Formulação C, obtida pelo método REV; (G) Formulação D, obtida pelo método REV 69
- Figura 17.** Cromatograma típico de insulina (50 µg/mL-1) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: Acetonitrila: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (60:40, v/v); Coluna C18-Luna® Phenomenex, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 µm; Vazão de 1,0 mL/min; λ: 214 nm; Injeção: 20µL; 25°C..... 72

Figura 18. Cromatograma da Acetonitrila (A); H ₂ O c/ 0,1% TFA (60:40, v/v) (B); tampão fosfato (PBS,pH 7,4) (C); lipossoma branco (D), obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: Acetonitrila: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (60:40, v/v); Coluna C18-Luna® Phenomenex, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 µm; Vazão de 1,0 mL/min; λ: 214 nm; Injeção: 20µL; 25°C.....	73
Figura 19. Cromatograma da mucosa nasal suína, obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: Acetonitrila: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (60:40, v/v); Coluna C18-Luna® Phenomenex, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 µm; Vazão de 1,0 mL/min; λ: 214 nm; Injeção: 20µL; 25°C.....	73
Figura 20. Curva de calibração de insulina obtida por CLAE.....	74
Figura 21 Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd dos lipossomas funcionalizados com CPPs. (A) Lipossoma sem Indutor + Insulina; (B) Lipossoma sem Indutor + Insulina +TAT; (C) Lipossoma sem Indutor + Insulina +PNT.	82
Figura 22. Estabilidade da EE% das formulações funcionalizadas com CPPs.....	83
Figura 23. Imagens de MET dos lipossomas funcionalizados com CPPs. (A) - Lipossoma sem a adição de Insulina (L); (B)- Lipossoma com a adição de Insulina – (LI); (C)- Lipossoma com a adição de Insulina e adição de TAT - (LI _{TAT}); (D)- Lipossoma com a adição de Insulina e adição de PNT - (LI _{PNT}). Aumento de 100x.....	84
Figura 24. Espectros de DC de estruturas do tipo α-hélices, folhas-β e estruturas irregulares. Fonte: Verli, 2014	86
Figura 25. Espectros de DC das amostras analisadas antes do ensaio de liberação <i>in vitro</i>	87
Figura 26. Espectros de DC das amostras analisadas depois do ensaio de liberação <i>in vitro</i>	87
Figura 27. Curvas de microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC) de IS; LI; HI; HLI; HLI _{TAT} ; HLI _{PNT} , aquecidas de 25 a 100 ° C.	90
Figura 28. Curvas de microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC) de IS; LB; HB e HL, aquecidas de 25 a 100 ° C.	91
Figura 29. Reogramas de fluxo das formulações a temperatura de 32 ± 0,5°C (A) e 37 ± 0,5°C (B). Curvas ascendentes (símbolos cheios) e as curvas descendentes (símbolos vazios) (n=3).....	93
Figura 30. Viscosidades das formulações a temperatura de 32 ± 0,5°C (A) e 37 ± 0,5°C (B) (n=3).	94
Figura 31. Reogramas de variação do módulo de armazenamento G' (símbolo cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência para todas as formulações (n=3).	95
Figura 32. Comparação entre as medidas da força mucoadesiva na temperatura de 32°C das formulações de Hidrogel, HI, HLI, HLI _{TAT} e HLI _{PNT} , utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como membrana modelo (n=5).	97

Figura 33. Comparação entre as medidas da força mucoadesiva na temperatura de 37°C das formulações de Hidrogel, HI, HLI, HLI _{TAT} e HLI _{PNT} , utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como membrana modelo (n=5).	97
Figura 34. Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações em 8 h. Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32°C.	102
Figura 35. Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações em 24 h. Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32°C.	102
Figura 36. Perfil de permeação cumulativa em porcentagem das formulações em 8 h.....	109
Figura 37. Perfil de permeação cumulativa em porcentagem das formulações em 24 h.....	109
Figura 38. Níveis plasmáticos de insulina (ng/mL) após administração nasal em ratos não diabéticos (n=5). Dose insulina administrada subcutaneamente: de 0,25U/animal. Dose insulina administrada intranasalmente: 2U insulina /formulação/animal. Volume máximo de instilação intranasal: 100µL divididos em aplicações de 25µL introduzidas alternadamente em cada narina.	113
Figura 39. Efeito do tratamento das formulações contendo insulina sobre a glicemia (mg/dL), após a administração nasal em ratos diabéticos (n=6). Dose Insulina administrada pela via subcutânea e intranasal: 2U insulina /formulação/animal. Volume máximo de instilação intranasal: 100µL divididos em aplicações de 25µL introduzidas alternadamente em cada narina.	117
Figura 40. Níveis de fosforilação de AKT (Ser-473) em músculos tibialis anterior de ratos diabéticos 360 minutos após a administração nasal de formulações de 1.HLB; 2.SSnasal; 3.Ins. nasal; 4.Ins. sub; 5.HI; 6.HLI; 7.HLI _{pnt} ; 8.HLI _{tat} contendo 2 U de insulina.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Característica epitélio nasal. Fonte: PIRES <i>et al.</i> , 2009.....	30
Tabela 2. Avanços tecnológicos para aplicação intranasal de insulina. Fonte: SONIA; SHARMA, 2014.....	33
Tabela 3. Produtos à base de lipossomas usados clinicamente. Adaptado de ZYLBERBERG;MATOSEVIC, 2016 ; BULBAKE <i>et al.</i> , 2017.	38
Tabela 4. Formulações lipossomais em ensaios clínicos. Adaptado de BULBAKE <i>et al.</i> , 2017.	39
Tabela 5 Razão molar dos componentes da formulação A, B, C e D.	49
Tabela 6. Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica.....	51
Tabela 7. Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica.....	71
Tabela 8. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise da insulina.....	72
Tabela 9. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de insulina por CLAE.....	75
Tabela 10. Determinação da precisão intracorrida (repetibilidade) de insulina por CLAE.....	75
Tabela 11. Determinação da precisão intermediária de insulina por CLAE.....	76
Tabela 12. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de insulina.	76
Tabela 13. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de insulina na mucosa nasal suína.....	77
Tabela 14. Determinação da robustez do método por CLAE.	78
Tabela 15. Porcentagem de Eficiência de encapsulação (EE%) das formulações quantificadas por BCA.	79
Tabela 16. Porcentagem de Eficiência de encapsulação (EE%) das formulações quantificadas por CLAE.	79
Tabela 17. Resultados das leituras de DHM, Ipd e PZ nas amostras funcionalizadas com concentrações de TAT de 0,1mM a 0,7 mM.....	81
Tabela 18. Resultados obtidos para as medidas de DHM, Ipd e PZ nas amostras preparadas com e sem a funcionalização.	81
Tabela 19. Parâmetros calorimétricos das amostras testadas. Temperaturas de pico (Tmax) e variações de entalpia (ΔH) nos termogramas de nano DSC coletados.	89
Tabela 20. Valores de índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) e regressão linear (R) a temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (n=3).	93

Tabela 21. Valores de G' e G'' da análise oscilatória para as formulações a temperatura de $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (n=3).	95
Tabela 22. Trabalho de seringabilidade das formulações à 25°C	99
Tabela 23. Liberação de insulina em solução (I); Formulação LI (II); Formulação LI _{TAT} (III); Formulação LI _{PNT} (IV); Formulação HI (V); Formulação HLI (VI); Formulação HLI _{TAT} (VII); Formulação HLI _{PNT} (VIII). Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32°C	101
Tabela 24. Coeficientes de determinação (R^2) da insulina liberada a partir das formulações obtidas através de diferentes modelos matemáticos.	105
Tabela 25. Permeação de insulina em solução (I); Formulação LI (II); Formulação LI _{TAT} (III); Formulação LI _{PNT} (IV); Formulação HI (V); Formulação HLI (VI); Formulação HLI _{TAT} (VII); Formulação HLI _{PNT} (VIII). Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32°C	108
Tabela 26. Fluxo de permeação (J) e coeficiente de permeabilidade (Kp) obtidos para 300 μL das formulações contendo insulina a $214\mu\text{g/mL}$, dispostas numa área de $1,77\text{cm}^2$ de mucosa nasal suína em contato com o meio receptor tampão fosfato (PBS,pH 7,4).	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN: Acetonitrila

ADA: Associação americana de diabetes

ANOVA: Análise de variância

AKT: Proteína quinase B

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPPs: Cell penetratin peptides

DHM: Diâmetro hidrodinâmico médio

DC: Dicroísmo circular

DM: Diabetes Mellitus

DPR: Desvio padrão relativo

DP: Dicetil fosfato

EE%: Eficiência de encapsulação em porcentagem

EPM: Erro padrão da média

FDA: Food and Drug Administration

FNS: Fluido nasal simulado

GAGs: Glicosaminoglicanos

G': Modulo elástico

G'': Modulo viscoso

GUV: Vesículas unilamelares gigantes

HA: Ácido hialurônico

HCl: Ácido clorídrico

HEC: Hidroxietilcelulose

HFL: Hidratação do filme lipídico

HI: Hidrogel de hidroxietilcelulose + insulina

HIV: Vírus da imunodeficiência adquirida

HLI: Hidrogel de hidroxietilcelulose+lipossoma + insulina

HLI_{PNT}: Hidrogel de hidroxietilcelulose+lipossoma+insulina+PNT

HLI_{TAT}: Hidrogel de hidroxietilcelulose+lipossoma+insulina+TAT

ICH: *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

IDF: Federação internacional de diabetes

Idp: Índice de polidispersão

J: Fluxo de fármaco no estado de equilíbrio ($\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{cm}$)

K: Índice de consistência
Kp: Coeficiente de permeabilidade aparente de difusão (cm/min)
kDa: Kilodalton
 η : Índice de escoamento
LD: Limite de detecção
LQ: Limite de quantificação
LUV: Vesículas unilamelares grandes
MLV: Vesículas multilamelares
O/A : Óleo : Água
OAM: Oleilamina
OMS: Organização Mundial da Saúde
Pa: Pascal
PNT: Penetratin
PTDs: Domínios de transdução de proteínas
PZ: Potencial zeta
r: Coeficiente de correlação
r²: Coeficiente de determinação
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
REV: Evaporação de fase reversa
SBD: Sociedade brasileira de diabetes
SNC: Sistema nervoso central
SUV: Vesículas unilamelares pequenas
STZ : Estreptozotocina
TAT: Proteína trans-ativadora da transcrição do HIV-1
TFA: Ácido trifluoroacético
T_m: temperatura de transição térmica
t_{1/2}: tempo de meia vida
ULV: Vesículas unilamelares
WHO: Organização mundial de saúde
 ΔH : entalpia

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 <i>Diabetes mellitus</i> (DM).....	21
2.1.1 Classificação	22
2.1.2 Tratamentos para o DM	23
2.2 Insulina.....	24
2.2.1 Secreção, ações e degradação da insulina.....	25
2.2.2 Sinalização da insulina e controle de eventos metabólicos.....	27
2.2.3 Tipos de insulina	28
2.3 Administração intranasal.....	29
2.3.1 Transporte paracelular e transcelular	31
2.4 Lipossomas.....	33
2.4.1 Classificação, métodos de preparo e caracterização de lipossomas.....	34
2.4.2 Mecanismos de interação entre lipossomas e célula-alvo.....	36
2.4.3 Formulações lipossomais comerciais, ensaios clínicos e estudos científicos	38
2.5 Peptídeos de transdução de membrana (CPPs).....	40
2.5.1 Mecanismos de internalização	42
2.5.2 Ensaios clínicos e pré-clínicos	44
3. OBJETIVOS	45
3.1. Objetivo Geral.....	45
3.2. Objetivos Específicos.....	45

4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 . Materiais, Solventes e Reagentes	46
4.2 . Equipamentos.....	47
4.3 . Métodos.....	47
4.3.1 Preparação dos lipossomas incorporados com insulina	47
4.3.2 Funcionalização dos lipossomas com CPPs.....	49
4.3.3 Preparação do Hidrogel	49
4.3.4 Caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos	49
4.3.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	49
4.3.4.2 Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e potencial zeta	50
4.3.4.3 Dicroísmo circular (DC).....	50
4.3.4.4 Microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC)	50
4.3.4.5 Estabilidade das formulações	51
4.3.5 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação da insulina utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	51
4.3.5.1 Parâmetros para validação de metodologia analítica	51
4.3.5.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico	51
4.3.5.3 Linearidade	52
4.3.5.4 Seletividade	52
4.3.5.5 Precisão	53
4.3.5.6 Exatidão.....	53
4.3.5.7 Limite de detecção.....	54
4.3.5.8 Limite de quantificação	54
4.3.5.9 Robustez	54
4.3.6 Avaliação da eficiência da encapsulação da insulina.....	55
4.3.6.1 Eficiência de encapsulação medida por BCA	55
4.3.6.2 Eficiência de encapsulação medida por CLAE	55
4.3.7 Análises reológicas.....	55
4.3.7.1 Ensaio reológico contínuo	55
4.3.7.2 Ensaio reológico oscilatório	56
4.3.8 Avaliação da força mucoadesiva.....	57
4.3.9 Determinação da seringabilidade	58
4.3.10 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	59
4.3.10.1 Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> da insulina.....	60
4.3.11 Ensaio de permeação em mucosa nasal suína.....	60

4.3.12	Ensaio biológico <i>in vivo</i>	61
4.3.12.1	Ensaio de análise temporal da presença de insulina na circulação sistêmica em ratos não diabéticos	62
4.3.12.1.1	Animais	62
4.3.12.1.2	Desenho experimental e tratamento	62
4.3.12.2	Ensaio das respostas anti-hiperglicêmicas em ratos diabéticos	63
4.3.12.2.1	Animais	63
4.3.12.2.2	Indução do diabetes mellitus experimental	64
4.3.12.2.3	Desenho experimental e tratamento	64
4.3.12.2.4	Alterações na ativação da sinalização da insulina na musculatura esquelética de ratos diabéticos	65
4.3.13	Análise estatística	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1.	Preparação dos lipossomas incorporados com insulina	67
5.2.	Caracterização físico-química e estudos de estabilidade dos sistemas desenvolvidos baseados nas medidas de diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e potencial zeta	67
5.3.	Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação da insulina utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	71
5.3.1	Adequabilidade do sistema cromatográfico	71
5.3.2	Seletividade	72
5.3.3	Linearidade	74
5.3.4	Precisão	75
5.3.5	Exatidão	76
5.3.6	Limites de detecção e de quantificação	77
5.3.7	Robustez	77
5.4	Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%)	78
5.5	Funcionalização dos lipossomas com CPPs	80
5.6	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	84
5.7	Preparação do Hidrogel	85

5.8 Dicroísmo circular (DC)	85
5.9 Microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC).....	88
5.10 Análises reológicas	92
5.10.1 Ensaio reológico contínuo.....	92
5.10.2 Ensaio reológico oscilatório.....	95
5.11 Avaliação da força mucoadesiva.....	96
5.12 Determinação da seringabilidade	98
5.13 Ensaio de liberação in vitro	99
5.14 Ensaio de permeação em mucosa nasal suína	107
5.15 Ensaio biológicos in vivo	111
5.15.1 Ensaio de análise temporal da presença de insulina na circulação sistêmica em ratos não diabéticos	111
5.15.2 Ensaio das respostas anti-hiperglicêmicas em ratos diabéticos.....	116
5.15.2.1 Alterações na ativação da sinalização da insulina na musculatura esquelética de ratos diabéticos	120
6. CONCLUSÕES.....	123
7. CONCLUSÃO FINAL	124
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
9. ANEXO	153

1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) configura-se hoje como uma epidemia mundial, afetando aproximadamente 8% da população, sendo que um terço dos indivíduos não sabem que possuem DM. Esta síndrome pode ser considerada um problema de saúde pública por estar associada a diversas complicações que comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevivência dos indivíduos, além de envolver altos custos no seu tratamento. O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis, tais como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade, são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do DM em todo o mundo (DANEMAN, 2006; SBD, 2016).

O DM é uma síndrome metabólica crônica caracterizada por deficiência na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e/ou da resistência dos tecidos alvo às ações desse hormônio, culminando em diversos prejuízos no controle do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Uma de suas principais manifestações é a hiperglicemia (PRABHAKAR *et al.*, 2014; SEN; CHAKRABORTY, 2016; GUTIERRES *et al.*, 2019). Além da hiperglicemia, outras alterações são observadas no DM, tais como: elevados níveis circulantes de triglicerídeos, colesterol e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), e diminuição dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL). Dentre as principais manifestações clínicas descritas, estão: glicosúria, poliúria, perda de peso, polidipsia, polifagia e visão turva (American Diabetes Association, 2014). Em longo prazo, a manutenção da hiperglicemia está associada ao desenvolvimento de complicações microvasculares do DM, dentre elas nefropatia, retinopatia e neuropatia diabéticas, bem como das complicações macrovasculares, incluindo as doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral. (MATTHEWS *et al.*, 2001; LANCET, 2005; DE CARVALHO PINCINATO, 2010; GERMINO *et al.*, 2011).

Os dois principais tipos de DM em relação à incidência, prevalência e importância clínica são os seguintes: (i) DM tipo 1, no qual a produção pancreática de insulina é insuficiente, como resultado da destruição autoimune das células β presentes no pâncreas; (ii) DM tipo 2, onde observa-se predominância de resistência insulínica com disfunção pancreática e deficiência relativa de insulina. Adicionalmente, existem também o DM gestacional e outros tipos específicos de DM (OLIVEIRA; MILECH, 2004; THOMAS *et al.*, 2016).

A manutenção da glicemia em níveis considerados normais depende principalmente da capacidade funcional das células beta pancreáticas em produzir e secretar insulina adequadamente e da sensibilidade tecidual à ação da insulina. Tanto no DM tipo 1 como também em algumas fases do DM tipo 2, a produção de insulina é ineficiente, sendo necessária a utilização de insulina exógena (KAHN *et al.*, 2001; FAUCI, 2008). Os antidiabéticos orais são utilizados no tratamento

do DM tipo 2, enquanto que a administração de insulina por via subcutânea é o principal tratamento para o DM tipo 1. No entanto, os indivíduos com DM tipo 2 também podem necessitar de insulina exógena, de acordo com a evolução da doença, para que sua glicemia seja controlada de forma adequada (ASCHE *et al.*, 2011).

Muitos indivíduos com DM dependem da administração subcutânea de insulina para o alcance do efetivo controle glicêmico, bem como para prevenir o desenvolvimento de diversas complicações desta síndrome, incluindo a cetoacidose diabética. Contudo, observa-se que esta forma de administração de insulina, por ser invasiva, torna-se restrita, além de estar associada a alguns desconfortos, tais como dor das aplicações diárias e infecção local, o que pode contribuir com a diminuição na adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, a procura por uma terapia alternativa originou o desenvolvimento de várias pesquisas e dentre estas, o desenvolvimento de novos sistemas de administração de insulina que possibilitem a utilização de vias alternativas à parenteral (GALAN, 2008; YADAV *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2010).

Neste sentido, pesquisas recentes demonstram que as vias de administração alternativas à parenteral mais estudadas para a administração de insulina são as vias oral, pulmonar e nasal. As vantagens da administração por via oral estão relacionadas à facilidade da administração e ausência de dor, levando a maior adesão e risco reduzido de infecção para o paciente. Entretanto, as condições extremas de pH no estômago, a presença de atividade enzimática (proteases) e de muco e a baixa permeabilidade através do epitélio intestinal são as principais desvantagens para o alcance da eficácia da insulina administrada por via oral (SOUZA *et al.*, 2000; FONTE *et al.*, 2015; MENEGUIN *et al.*, 2018).

Em relação à administração pela via pulmonar, as vantagens estão na grande superfície disponível para a absorção e a elevada vascularização, e ao fato de se evitar o metabolismo pré-sistêmico. As desvantagens de se utilizar esta via de administração estão no fato de existirem barreiras para a absorção, devido à depuração mucociliar, alterações na capacidade ventilatória e o aparecimento de tosse nos pacientes, o que pode diminuir a adesão ao tratamento. Em 2007, o uso do medicamento Exubera[®] (insulina inalável) foi interrompido mundialmente, bem como a sua comercialização pela empresa Pfizer (HENKIN, 2010; WADHER *et al.*, 2011).

A administração de insulina por via nasal tem se mostrado bastante promissora quando comparada a vias não parenterais, incluindo a oral e a pulmonar, uma vez que o epitélio nasal possui uma grande área de superfície que facilita a absorção de fármacos, a camada sub-epitelial é ricamente vascularizada e a membrana endotelial é altamente porosa e pode facilitar a permeação do fármaco, evitando-se o metabolismo pré-sistêmico e aumentando a sua biodisponibilidade (UGWOKE *et al.*, 2005; HEINEMANN, 2010; SHAH *et al.*, 2010).

A capacidade de absorção por unidade de área é relativamente elevado pela via nasal. Apesar do volume da cavidade nasal ser pequeno, entre 15 a 20 cm³, a sua área de absorção é relativamente grande, 150 cm², com uma camada epitelial coberta por numerosas microvilosidades. Além disso, a camada sub-epitelial é altamente vascularizada, o que permite que sejam atingidos níveis terapêuticos rapidamente, com um início de ação do fármaco mais rápido, pois o sangue venoso passa diretamente para a circulação sistêmica. Todos esses fatores podem favorecer a redução da dose, a diminuição de efeitos adversos e a adesão ao tratamento em pacientes que dependem do uso contínuo de insulina (OWENS *et al.*, 2003; LASSMANN-VAGUE; RACCAH, 2006; KHAFAGY *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2010; RITTHIDEJ, 2011).

Entretanto, apesar das diversas vantagens, existem algumas barreiras para a absorção de fármacos pela via nasal, principalmente um mecanismo de depuração mucociliar muito ativo, onde a taxa de depuração ocorre cerca de 4–6 mm / min e o tempo de reposição do muco entre 15-20 minutos, o qual elimina rapidamente o fármaco da cavidade nasal, além da presença de enzimas proteolíticas e a alta taxa de renovação do muco (produção diária em repouso, 75–150 mL), os quais podem não favorecer a biodisponibilidade (ILLUM, 2003; MAINARDES *et al.*, 2006; KARAVASILI; FATOUROS, 2016). Outros fatores que limitam a absorção de fármacos pela cavidade nasal são a baixa permeabilidade do epitélio nasal, dificultando a absorção de fármacos com elevado peso molecular. Além disso, o pH do sistema de veiculação deve ser compatível com o pH da cavidade nasal, e o baixo volume que pode ser administrado (KANG *et al.*, 2009; LOCHHEAD; THORNE, 2012).

Portanto, com a finalidade de se conseguir uma administração de insulina por via nasal mais eficiente, acredita-se que tais barreiras citadas podem ser superadas com a utilização de sistemas de liberação baseados em lipossomas e funcionalizados com peptídeos de transdução de membrana (CPPs), tais como TAT e PNT, os quais são capazes de penetrar membranas celulares e translocar diferentes cargas para células (TORCHILIN *et al.*, 2005; KOREN; TORCHILIN *et al.*, 2012).

Em 1995, os lipossomas foram o primeiro sistema de liberação de fármacos produzido em nanoescala a ser utilizado para uso clínico. Desde então, o número de trabalhos baseados neste tipo de sistemas de liberação cresceu consideravelmente e trouxe um enorme desenvolvimento com implicações clínicas significativas (ZYLBERBERG; MATOSEVIC, 2016).

Os lipossomas são vesículas lipídicas esféricas, que variam o seu tamanho entre a escala dos nanômetros até alguns micrômetros, nas quais uma fase aquosa interna é cercada por uma ou mais lamelas (bicamadas de fosfolípidios) que permitem a incorporação de fármacos hidrofílicos (tal como a insulina) e fármacos hidrofóbicos, constituindo assim sistemas importantes para encapsulação, transporte e liberação sustentada de fármacos (IWANAGA *et al.*, 1999; DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013; ELOY *et al.*, 2014).

Os lipossomas são capazes encapsular o fármaco e, por conseguinte, protegê-lo *in vivo* de uma eliminação ou degradação rápida. Suas propriedades de liberação lenta levam à redução da concentração do fármaco na forma livre, e à prolongação de sua presença no organismo. Esse aumento na biodisponibilidade do fármaco pode levar à potenciação da sua ação biológica, assim como à redução dos seus efeitos colaterais (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Por outro lado, os peptídeos de transdução de membrana (do inglês, *cell penetrating peptides*, CPPs), também referidos como domínios de transdução de proteínas (PTDs) são peptídeos curtos, tipicamente com 5-30 resíduos de aminoácidos, com a capacidade de obter acesso ao interior da célula, promovendo a entrega intracelular de forma covalente ou não covalente de várias moléculas incluindo plasmídeos, DNA, siRNAs, oligonucleotídeos, proteínas com tamanho acima de 100 kDa e sistemas nanocarreadores, incluindo lipossomas e nanopartículas. Endocitose e translocação direta através da membrana celular são os principais mecanismos utilizados pelas CPPs para entrar na célula (LANGEL, 2006; MILLETTI *et al.*, 2012; DISSANAYAKE *et al.*, 2017).

Os CPPs apresentam baixa citotoxicidade e imunogenicidade, significativa capacidade para facilitar o transporte independente do receptor através das membranas celulares quando ligados a proteínas ou oligonucleotídeos, capacidade de interagir eletrostaticamente com a superfície dos glicosaminoglicanos (GAGs) e entrar na célula através de processos endocíticos e acima de um limiar de concentração observa-se captação citosólica rápida, sugerindo translocação direta ou penetração direta (ZIEGLER *et al.*, 2008; RAUCHER; RYU, 2015).

O primeiro CPP identificado foi o TAT (GRKKRRQRRRPPQ), em 1988. O TAT é um peptídeo trans-ativador da transcrição do HIV-1, capaz de atravessar membranas celulares e ser internalizado de forma eficiente por células (KOREN; TORCHILIN *et al.*, 2012; GUIDOTTI *et al.*, 2017).

Alguns anos depois, em 1991, descobriu-se o peptídeo PNT (RQIKIWFQNRRMKWKK), contendo 16 resíduos de aminoácidos (pAntp), derivado da *Antennapedia Drosophila melanogaster*, o qual também é capaz de entrar em célula através de uma via independente aparentemente não endocitótica, mesmo quando conjugado a grandes moléculas hidrofílicas como os oligonucleotídeos (THORÉN *et al.*, 2000). Desde então, vários peptídeos que mostraram as mesmas capacidades penetrantes foram descobertos ou projetados racionalmente (FISCHER *et al.*, 2000).

Portanto, a finalidade deste trabalho foi desenvolver sistemas de liberação baseados em lipossomas funcionalizados com peptídeos de transdução de membrana (CPPs) TAT e PNT, com o objetivo de promover a absorção nasal de insulina com subsequente efeito sistêmico de queda da

glicemia. Esta estratégia até o momento não foi estudada para o transporte nasal de insulina lipossomal, podendo, portanto ser uma alternativa promissora para o tratamento do DM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Diabetes mellitus* (DM)

Mundialmente, o *Diabetes mellitus* (DM) tem sido considerado um dos problemas principais de saúde pública, por afetar indivíduos de todas as idades, incluindo crianças, jovens e adultos, além de mulheres grávidas (ALBERTI *et al.*, 1998; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010; SEN; CHAKRABORTY, 2016; IDF 2017).

Estima-se que em 2017 mais de 425 milhões de indivíduos em todo o mundo tinham DM, sendo que 327 milhões tinham idade entre 20 a 64 anos e 98 milhões tinham entre 65 a 74 anos. Estimativas apontam que estes números aumentem, alcançando 629 milhões de pessoas com DM até 2045. Contudo, foi previsto que quase metade deste número (49,7%) de indivíduos que vivem com DM não sejam diagnosticados; além disso, em 2017, aproximadamente 5 milhões de mortes ocorridas no mundo foram atribuídas ao DM, na faixa etária de 20 a 99 anos. Por outro lado, o gasto global com saúde pública para o tratamento de pessoas com DM foi estimado em US\$ 850 bilhões, em 2017 (CHO *et al.*, 2018; IDF, 2019).

A maioria dos casos de diabetes é referente ao DM tipo 2, o qual pode ser prevenido com mudanças no estilo de vida e que incluem realização de atividade física regular e a adoção de uma dieta saudável e balanceada. As famílias, por sua vez, têm um papel fundamental na abordagem e no cuidado dos fatores de risco modificáveis para o DM tipo 2, contribuindo para a adoção de um estilo de vida mais saudável. Outro ponto importante a ser considerado é o fato de que um em cada dois indivíduos que atualmente convivem com DM não é diagnosticado. Entretanto, o diagnóstico e o tratamento precoce do DM são fundamentais para prevenir as complicações em longo prazo desta síndrome. Todas as famílias são potencialmente afetadas pelo diabetes e, portanto, a conscientização dos sinais, sintomas e fatores de risco para todos os tipos de DM é vital para ajudar a detectá-lo precocemente (ADA, 2010; WHO, 2016; IDF, 2019).

A hiperglicemia decorrente do DM participa do estabelecimento e manutenção de diversas complicações; estas incluem as complicações microvasculares: retinopatias (possíveis danos ou perda da visão), nefropatias (insuficiência renal), neuropatias periféricas (risco de úlceras e amputação de membros) e periodontite (inflamação do tecido ao redor do dente); complicações macrovasculares: incluindo as doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (OLIVEIRA; MILECH, 2004; ADA, 2010; FORBES; COOPER, 2013).

2.1.1 Classificação

O DM pode ser classificado em 4 tipos: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM (ADA, 2010; DE CARVALHO PINCINATO, 2010; SEN; CHAKRABORTY, 2016).

O DM tipo 1 caracteriza-se pela deficiência absoluta na produção de insulina devido à destruição autoimune das células beta pancreáticas responsáveis pela produção e secreção de insulina, associada à suscetibilidade genética do indivíduo a esta síndrome. Geralmente a proporção de destruição das células beta pancreáticas pode variar, podendo ser acelerada em alguns indivíduos, principalmente em crianças e adolescentes, ou ocorrer de forma mais lenta em adultos. No momento do diagnóstico, a maioria dos indivíduos já tem cerca de 80-85% das células beta pancreáticas destruídas, o que explica a necessidade de aplicações subcutâneas de insulina para o efetivo controle da glicemia (OLIVEIRA; MILECH, 2004; DE CARVALHO PINCINATO, 2010; PORETSKY, 2010; THOMAS *et al.*, 2016).

O DM tipo 1 pode ser dividida em dois subtipos: o DM tipo 1 mediado por imunidade e o DM tipo 1 idiopático. O DM tipo 1 mediado por imunidade caracteriza-se pela destruição autoimune das células beta pancreáticas, o qual acomete cerca de 5-10% dos indivíduos diagnosticados com DM. Esses indivíduos também são propensos a outros distúrbios autoimunes, tais como doença de Addison, vitiligo, doença celíaca, hepatite autoimune, miastenia grave e anemia perniciosa. Já o DM tipo 1 idiopático não possui nenhuma etiologia conhecida, pois não apresenta indícios de autoimunidade; este tipo de DM é mais comum entre indivíduos de origem africana, ascendência caribenha e asiática (ALBERTI *et al.*, 1998; OLIVEIRA; MILECH, 2004; PORETSKY, 2010; ADA, 2010).

O DM tipo 2 caracteriza-se como um distúrbio metabólico decorrente da combinação de dois processos distintos: resistência à ação da insulina nos tecidos alvo e deficiência relativa na produção de insulina pelo pâncreas. Trata-se da forma mais comum de DM, atingindo cerca de 90% dos indivíduos diagnosticados com DM e encontra-se associado à interação de fatores genéticos e metabólicos. Histórico familiar combinado com excesso de peso corporal e/ou obesidade, hábitos nutricionais pouco saudáveis, sedentarismo, tabagismo e estresse são fatores para o desenvolvimento e progressão da doença. A hiperglicemia geralmente se desenvolve gradualmente e de forma assintomática, não sendo suficiente para culminar no aparecimento dos sintomas clássicos; logo, o indivíduo permanece por vários anos sem o diagnóstico correto (OLIVEIRA; MILECH, 2004; PORETSKY, 2010; REKHA *et al.*, 2013; WHO, 2016). Além disso, segundo estudo de LI (2012), o DM tipo 2 tem sido associado ao risco aumentado de desenvolvimento de

diversos tipos de câncer em humanos, tais como câncer de fígado, endométrio, bexiga, pâncreas, mama e colorretal (LI, 2012).

O DM gestacional é definido como um estado transitório no qual ocorre qualquer grau de intolerância à glicose, diagnosticado no início ou no decorrer da gravidez. Mulheres com DM gestacional possuem maior risco de determinadas complicações durante a gravidez e no parto, e que incluem pré-eclâmpsia, parto prematuro e necessidade de cesárea. Este tipo de DM é especialmente prejudicial ao lactente, devido as condições de hiperglicemia materna, e que pode acarretar nas seguintes complicações: macrossomia, síndrome de desconforto respiratório, cardiomiopatia, hipoglicemia, dentre outras. Em 2017, foi estimado que cerca de 21,3 milhões de nascidos vivos foram afetados por alguma forma de hiperglicemia na gestação, e que aproximadamente 18,4 milhões dos casos registrados foram devido ao DM gestacional (JONES, 2001; OLIVEIRA; MILECH, 2004; DE CARVALHO PINCINATO, 2010; WHO, 2016; CHO *et al.*, 2018).

O quarto tipo de DM, sendo este menos comum, está relacionado ao chamado outros tipos específicos de DM, e compreendem as seguintes causas: defeitos genéticos no funcionamento das células beta do pâncreas, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes induzido por drogas ou produtos químicos, infecções e formas incomuns de diabetes mediado por imunidade (ALBERTI *et al.*, 1998; OLIVEIRA; MILECH, 2004; DE CARVALHO PINCINATO, 2010; SEN; CHAKRABORTY, 2016).

2.1.2 Tratamentos para o DM

O principal tratamento para o DM tipo 1 é a insulinoterapia, ou seja, o uso de insulina exogêna, feito através de injeções subcutâneas diárias, e tem como principal objetivo a manutenção da glicemia o mais próximo possível aos valores recomendados, porém evitando episódios de hipoglicemia, principalmente relacionada ao tratamento contínuo (OLIVEIRA; MILECH, 2004; DE CARVALHO PINCINATO, 2010).

Em relação ao tratamento para o DM tipo 2, diversos agentes antidiabéticos orais podem contribuir para a redução da glicemia, e incluem sulfoniluréias, biguanidas, meglitinidas, tiazolidinedionas e os inibidores de α -glucosidase, podendo ou não ser administrado em associação com a insulinoterapia, de acordo com as necessidades do paciente (SHUKLA *et al.*, 2006 SEN; CHAKRABORTY, 2016).

Os agentes antidiabéticos orais desempenham seus efeitos promotores de redução de glicemia através de diversos mecanismos de ação que incluem: i) redução na produção hepática de glicose, neste caso as biguanidas (metformina); ii) aumento na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, incluindo os secretagogos de insulina, neste caso as sulfoniluréias; podem ser distribuídas em três classes: primeira geração (clorpropamida), segunda geração (glibenclamida,

glipizida, gliclazida) e terceira geração (glimepirida); iii) melhora da sensibilidade à insulina, aumentando a captação de glicose, neste caso as tiazolidinedionas (rosiglitazona e a pioglitazona); iv) inibição da enzima alfa-glicosidase, que participa da digestão de carboidratos, conseqüentemente ocorre uma diminuição da absorção intestinal de glicose, neste caso os inibidores de alfa-glicosidase (acarbose, miglitol e voglibose) (OLIVEIRA; MILECH, 2004; SEN; CHAKRABORTY, 2016; THOMAS *et al.*, 2016).

Os chamados tratamentos não farmacológicos para prevenção ou controle do DM tipo 2 compreendem realização de atividade física regular, adoção de dieta saudável e realização de *check-up* constante para o controle da glicemia, e deve ser prioridade global das políticas de saúde pública. A atividade física regular é muito importante para pacientes com DM tipo 2 para melhorar a sensibilidade à insulina, o controle da glicemia e o controle do peso corporal. Indivíduos com DM tipo 2 são frequentemente orientados a incluir em sua dieta diária alimentos saudáveis, com baixo índice glicêmico, tais como, cereais ricos em fibras, legumes, leguminosas, frutas e alimentos integrais, sendo que alimentos ricos em açúcares, alimentos processados e o álcool devem ser evitados (HU, 2011; KUMAR *et al.*, 2013; EVERT *et al.*, 2014; STANFORD; GOODYEAR, 2014; SEN; CHAKRABORTY, 2016).

2.2 Insulina

A insulina (Figura 1) é um polipeptídeo com peso molecular de 5.8 kDa, é sintetizada no pâncreas pelas células beta das ilhotas de Langerhans, a partir de uma molécula maior denominada pró-insulina. A pró-insulina é clivada enzimaticamente para gerar a insulina (que contém 51 resíduos de aminoácidos dispostos em duas cadeias interligadas por pontes dissulfeto, sendo α com 21 resíduos de aminoácidos e β com 30 resíduos de aminoácidos), e o peptídeo C. A insulina e o peptídeo C são secretados em quantidades equimolares quando as células beta pancreáticas são estimuladas (GENUTH, 2008; PRABHAKAR *et al.*, 2014; SEN; CHAKRABORTY, 2016; KATZUNG; TREVOR, 2017; BRUNTON *et al.*, 2018). A insulina possui um $t_{1/2}$ de 5 a 6 minutos devido a intensa depuração hepática, enquanto que o peptídeo C possui $t_{1/2}$ de aproximadamente 30 minutos, sendo bastante utilizado na avaliação da capacidade de produção e secreção de insulina pelas células beta pancreáticas (BRUNTON; KNOLLMANN, 2018).

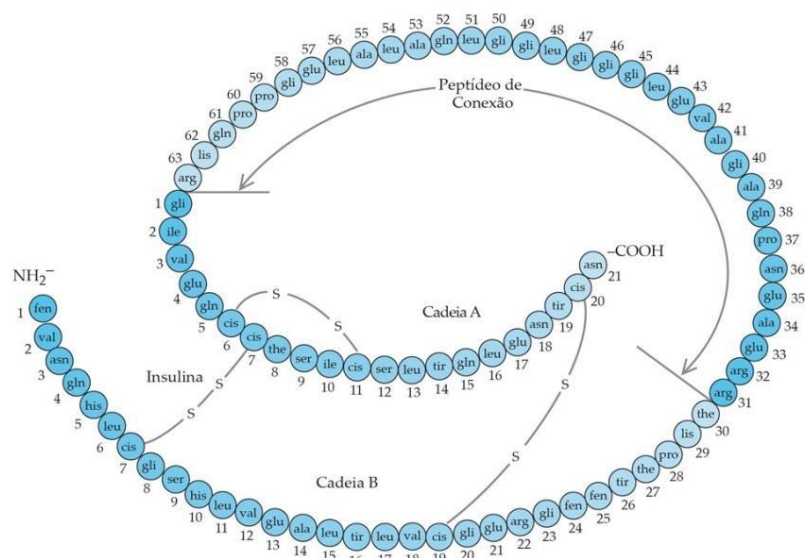


Figura 1. Estrutura da pró-insulina humana, composta por 3 cadeias de aminoácidos interligadas através de pontes dissulfeto. Fonte: GENUTH, 2008.

A insulina possui uma estrutura secundária do tipo α -hélice, sendo uma mistura de hexâmeros, dímeros e monômeros. Em ambiente ácido ($\text{pH} < 2$), a forma predominante é a insulina monomérica, assim como em pH neutro e em baixas concentrações de insulina ($< 0,1 \mu\text{M}$). Em pH neutro e na ausência de íons zinco, o dímero de insulina é a forma mais prevalente. O hexâmero de zinco e insulina é estável em uma faixa de pH entre 5 a 8, e exibe maior estabilidade em comparação à insulina monomérica. A maioria das preparações comerciais de insulina são formuladas em soluções de pH neutro, nas quais as moléculas de insulina existem principalmente na forma hexamérica; entretanto, esta forma não é biologicamente ativa, devendo se dissociar em monômeros com o objetivo de se ligar ao receptor e assim ter a ação biológica (BRANGE.; LANGKJER, 1993; AHMAD *et al.*, 2005; TANTIPOLPHAN *et al.*, 2010).

A solubilidade da insulina varia de acordo com a sua pureza, natureza e composição do solvente, pH, bem como com o teor de determinados íons metálicos divalentes, da força iônica e da temperatura. A carga geral da molécula de insulina é modificada conforme o pH do meio, e seu ponto isoelétrico está compreendido entre 5,3 e 5,4 (ZHANG *et al.*, 2011; BRANGE, 2012).

2.2.1 Secreção, ações e degradação da insulina

A insulina é o mais potente hormônio anabólico conhecido. Estimula a síntese e o armazenamento de carboidratos (polissacarídeos), lipídeos e proteínas, inibindo conseqüentemente sua degradação. Este hormônio estimula a captação de glicose, aminoácidos e ácidos graxos pelas células, bem como aumenta a expressão / atividade de enzimas que participam da síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas; a insulina também inibe a expressão / atividade de enzimas que participam da degradação destas macromoléculas (SALTIEL; KAHN, 2001; SEN;

CHAKRABORTY, 2016; THOMAS *et al.*, 2016; KATZUNG; TREVOR, 2017; BRUNTON *et al.*, 2018).

A glicose é um dos principais secretagogos da insulina (Figura 2). A glicose é captada pela célula beta pancreática via GLUT 2 e é oxidada pela via glicolítica. Isso resulta na produção de ATP, e conseqüentemente ocorre o fechamento dos canais de K^+ sensíveis ao ATP. A diminuição resultante no efluxo de K^+ provoca a despolarização da membrana celular, culminando em abertura dos canais de Ca^{2+} regulados por voltagem e ocorre a entrada rápida de Ca^{2+} na célula. O aumento de Ca^{2+} intracelular desencadeia a liberação dos grânulos de insulina por exocitose. Alguns fármacos secretagogos da insulina, tais como sulfoniluréia, meglitinidas e d-fenilalanina, também utilizam certos pontos destes mecanismos promotores da secreção do hormônio (SONIA; SHARMA, 2014; THOMAS *et al.*, 2016; KATZUNG; TREVOR, 2017).

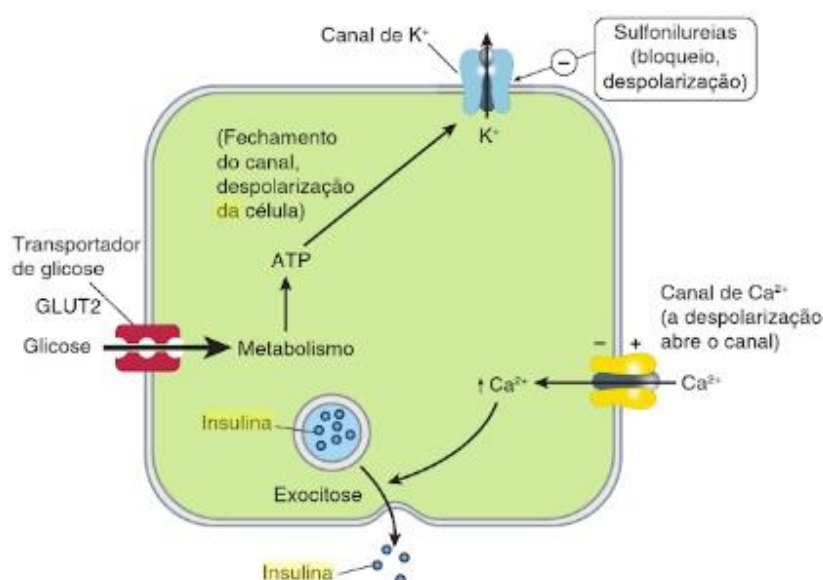


Figura 2. Secreção de insulina pelas células beta pancreáticas promovida pela glicose e sulfoniluréias. Fonte: KATZUNG; TREVOR, 2017

A captação de glicose por determinados órgãos, tais como músculo esquelético e tecido adiposo, é estimulada pela ação da insulina. Na ocorrência de prejuízos na secreção e/ou ação da insulina, especialmente no estado alimentado, a captação de glicose pelos referidos órgãos é afetada, levando a hiperglicemia. Desta forma, a sinalização da insulina é fundamental para que ocorram os eventos que culminam em captação, utilização e armazenamento dos principais nutrientes pelas células (BRUNTON *et al.*, 2018).

Os dois principais órgãos envolvidos na degradação da insulina são o fígado e o rim. O fígado depura aproximadamente 60% da insulina circulante, enquanto que os rins removem de 35 a 40% do hormônio. Todavia, em pacientes diabéticos que recebem injeções subcutâneas de insulina diariamente, os rins depuram em torno de 60% e os fígado cerca de 30 a 40% (KATZUNG; TREVOR, 2017).

2.2.2 Sinalização da insulina e controle de eventos metabólicos

A insulina atua na manutenção da homeostase de glicose controlando diversos processos metabólicos, promovendo especialmente (i) diminuição da produção hepática de glicose, através da inibição da gliconeogênese e da glicogenólise, e (ii) aumento da captação da glicose tecidual, via aumento da translocação de vesículas contendo os transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4) do citoplasma para a membrana plasmática das células musculares esquelética e adipócitos. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos, reduz a lipólise, estimula a síntese de glicogênio (glicogênese) e a síntese proteica, e inibe a degradação proteica ou proteólise (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

A transdução do sinal da insulina (Figura 3) ocorre a partir do momento no qual a insulina se liga a um receptor específico de membrana, denominado receptor da insulina (IR). O IR é uma glicoproteína heterotetramérica que apresenta atividade tirosina quinase; é composto por duas subunidades α (extracelulares) e duas subunidades β (intracelulares); quando o IR encontra-se desligado do hormônio, as subunidades α inibem a atividade tirosina quinase das subunidades β . A ligação da insulina às subunidades α do IR desfaz o seu efeito inibitório sobre as subunidades β , liberando a atividade tirosina quinase. Conseqüentemente, ocorre o processo de autofosforilação do IR, o qual aumenta ainda mais a atividade tirosina quinase deste receptor. Em seguida ocorre a fosforilação de resíduos de tirosina dos substratos do receptor de insulina, e que incluem IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4. Esta fosforilação origina pontos de ancoramento para diversos componentes pertencentes à sinalização da insulina, incluindo a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K). Uma vez ancorada em IRS (especialmente IRS-1), PI3-K torna-se ativa, e assim fosforila fosfolípídeos de membrana, em especial fosfatidilinositol difosfato, gerando fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). A geração de PIP3 na membrana plasmática representa o surgimento de novos pontos de ancoramento para proteínas subsequentes da sinalização da insulina, em especial PDK1 e AKT. Ancoradas em PIP3, PDK1 fosforila a AKT. Uma vez fosforilada, AKT é ativada e se dissocia de PIP3. Uma vez ativada, a proteína quinase AKT representa um dos principais efetores das ações intracelulares controladas pela insulina, e que incluem (HABER *et al.*, 2001; CARVALHEIRA *et al.*, 2002; PETERSEN; SHULMAN, 2018):

- i. estímulo à translocação de vesículas contendo GLUT 4 do citoplasma para a membrana plasmática das células, em músculos esqueléticos e tecidos adiposos, culminando em aumento na captação de glicose;
 - ii. inibição da produção hepática de glicose;
 - iii. estímulo à síntese de lipídeos e síntese proteica;
 - iv. regulação da mitogênese;
 - v. diferenciação celular.
-

No fígado, a insulina exerce ações fundamentais no controle do metabolismo de carboidratos, pois estimula a glicólise, inibe a degradação de glicogênio (glicogenólise) e a síntese de glicose a partir de compostos que não glicídicos (neoglicogênese), além de estimular o armazenamento da glicose na forma de glicogênio (glicogênese) (SALTIEL; KAHN, 2001; SAMUEL; SHULMAN, 2016).

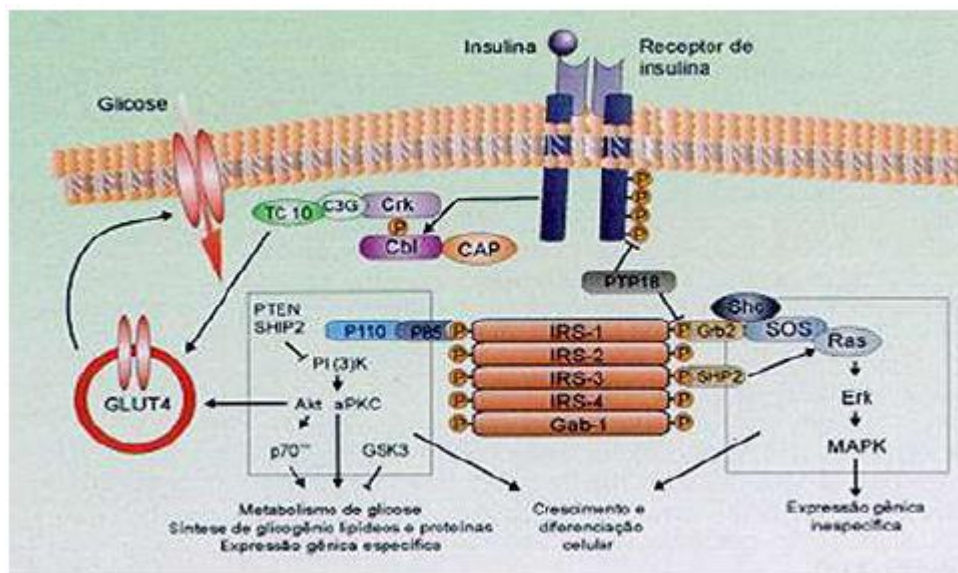


Figura 3. Mecanismo de transdução do sinal da insulina. Fonte: CARVALHEIRA *et al.*, 2002.

2.2.3 Tipos de insulina

Os tipos de insulina (Figura 4) disponíveis no mercado são caracterizados quanto ao seu tempo de ação, início, pico e duração em horas, sendo portanto, classificadas da seguinte forma (SOUZA *et al.*, 2000; OLIVEIRA; MILECH, 2004):

- Ação ultra-rápida: são os tipos de insulina com início de ação entre 5 e 15 minutos, pico de ação de 1 a 2 horas e duração de ação de 3 a 5 horas. Exemplos: Lispro, Asparte e Glulisina.
- Ação rápida: possuem início de ação de 30 a 60 minutos, pico de ação que pode variar de 2 a 4 horas e duração de ação de 3 a 6 horas. Exemplo: Insulina Regular.
- Ação intermediária: início de ação 2 a 4 horas, pico entre 8 e 12 horas e duração de ação entre 12 e 20 horas. Exemplo: Insulina NPH.
- Ação longa: início de ação 4 a 5 horas com pico entre 8 e 14 horas e tempo de ação entre 20 e 36 horas. Exemplos: Detemir e Glargina.

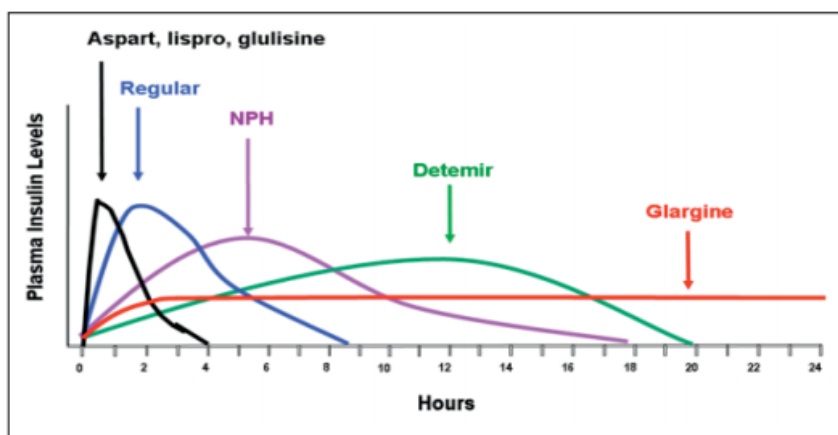


Figura 4. Farmacocinética dos diferentes tipos de insulina. Fonte: CAMPOS, 2011.

2.3 Administração intranasal

Dentre os sistemas não invasivos de administração de fármacos a via intranasal tem sido objeto de diversos estudos sobre vias alternativas para administração de fármacos sistemicamente ativos, como peptídeos e proteínas que são pouco absorvidas oralmente e são extensamente metabolizadas pelo trato gastrointestinal ou são submetidos pelo metabolismo pré-sistêmico. Além desta via possuir uma administração indolor e bem apropriada para a absorção de drogas, uma vez que tem uma grande área de superfície epitelial disponível devido a numerosas microvilosidades, possui uma camada subepitelial altamente vascularizada e o sangue venoso desta via passa diretamente para a circulação sistêmica (ILLUM *et al.*, 1987; KUMAR *et al.*, 2016). Como desvantagens desta via, podemos citar a depuração mucociliar muito ativa, possibilidade de degradação enzimática pelo fato da cavidade nasal conter diferentes tipos de enzimas e a baixa permeabilidade da mucosa nasal que frequentemente resulta em baixa biodisponibilidade (ANDREWS *et al.*, 2009; SONIA; SHARMA, 2014; MENZEL *et al.*, 2017).

Existem 4 zonas funcionais distintas na cavidade nasal (Figura 5 e Tabela 1), denominadas de átrio, região vestibular, região olfativa e região respiratória. A região vestibular é a parte mais anterior da cavidade nasal, sendo composta por epitélio escamoso estratificado e funciona como um filtro de partículas aéreas inaladas. O átrio é a área intermediária entre a região vestibular e a região respiratória, sendo formado por epitélio escamoso estratificado epitélio e por células colunares pseudoestratificadas apresentando microvilosidades. A região olfativa que é revestida por epitélio pseudoestratificado que contém células receptoras especializadas olfativas importantes para percepção do olfato, acredita-se que nesta região ocorra o metabolismo de drogas que passam da cavidade nasal para o fluido cerebrospinal, também conhecido por líquido cefalorraquidiano, evitando assim a barreira hematoencefálica e por fim a região respiratória, sendo a mais importante para a liberação sistêmica de fármacos, composta por epitélio ciliado, pseudoestratificado e colunar.

As células colunares são relacionadas com as células vizinhas por junções apertadas nos ápices bem como por interdigitações da membrana celular (TÜRKER *et al.*, 2004; JAIN, 2008; PIRES *et al.*, 2009; KRISHNARAJAN *et al.*, 2016; BADADARE *et al.*, 2018).

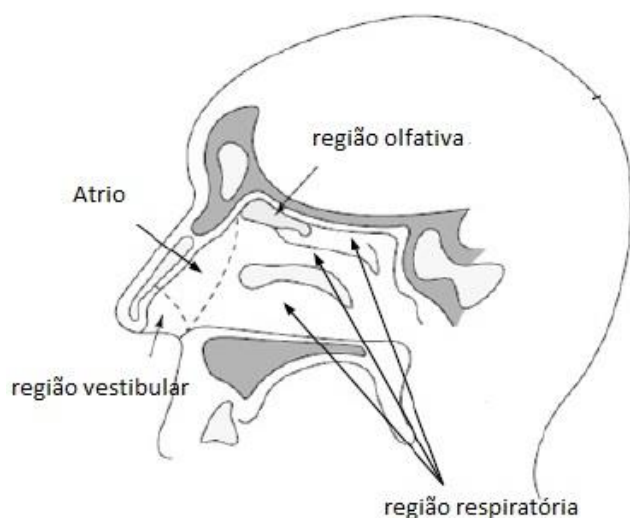


Figura 5. Anatomia da cavidade nasal humana. Adaptado de PIRES *et al.*, 2009.

Tabela 1. Característica epitélio nasal. Fonte: PIRES *et al.*, 2009.

Região	Característica Célula Epitelial	Função	Área Superfície	Vascularização	Permeabilidade
	Células				
Região Vestibular	estratificadas escamosas e queratinizads	Suporte e proteção	$\approx 0.6 \text{ cm}^2$	Baixa	Pobre
Átrio	Células escamosas estratificadas e pseudoestratificadas	Suporte	NE*	Baixa	Reduzida
Região Respiratória	Células não ciliadas colunares, células ciliadas colunares, células globet e células basais	Suporte, depuração mucociliar e secreção de muco	$\approx 130 \text{ cm}^2$	Muito alta	Boa
Região Olfativa	Células sustentaculares, células receptoras olfativas e células basais	Percepção olfativa	$\approx 15 \text{ cm}^2$	Alta	Acesso direto ao SNC**

*NE = não encontrada

**SNC = sistema nervoso central

2.3.1 Transporte paracelular e transcelular

Quando um fármaco é administrado pela via intranasal com a finalidade atingir disponibilidade sistêmica ou mesmo atuar no SNC, a primeira etapa na absorção do fármaco pela cavidade nasal é a passagem pelo muco. Pequenas partículas e sem carga passam facilmente por essa camada, entretanto, partículas grandes ou carregadas tem dificuldade de atravessa-la. A mucina, a principal glicoproteína do muco, tem o potencial de se ligar a solutos, dificultando a difusão. Além disso, alterações no ambiente nasal como por exemplo, pH e temperatura podem contribuir para as mudanças estruturais da camada de muco. Após a passagem através do muco, o fármaco deve atravessar o epitélio nasal e alguns mecanismos (Figura 6) estão descritos como transporte transcelular, transporte paracelular e transcitose mediado por portadores de vesículas. No mecanismo transcelular existem duas barreiras, a membrana celular apical e basolateral, enquanto que no mecanismo paracelular só existe uma barreira, as junções paracelulares (SILVA *et al.*, 2002; PIRES *et al.*, 2009; FORTUNA *et al.*, 2014; DEVAYANI; RAVINDRA, 2015; KRISHNARAJAN *et al.*, 2016;).

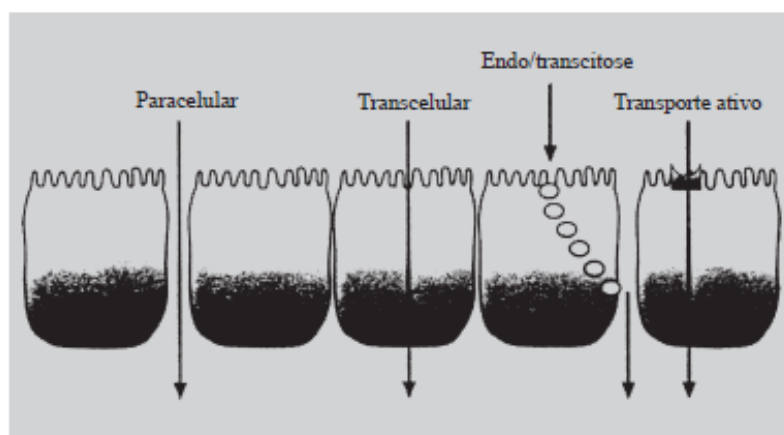


Figura 6. Tipos de transporte através das células epiteliais. Fonte: SILVA *et al.*, 2002.

O transporte transcelular ocorre por difusão passiva através do interior da célula, sendo responsável pelo transporte de fármacos lipofílicos e se mostra dependente da taxa de lipofilicidade da molécula. No entanto, parece que compostos com um peso molecular superior a 1 kDa, tais como peptídeos e proteínas, são transcelularmente transportados por processos endocíticos. Além disso, o transporte transcelular pode ser mediado por portadores que existem na mucosa nasal, incluindo transportadores de cátions orgânicos e transportadores de aminoácidos (HINCHCLIFFE; ILLUM, 1999; PIRES *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2013; FORTUNA *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2017; BAN *et al.*, 2018).

Por outro lado, o transporte paracelular é lento e passivo e está envolvido no transporte de pequenas drogas polares que passam através das junções estreitas e espaços intercelulares entre as células epiteliais adjacentes. Junções estreitas são estruturas dinâmicas localizadas entre as células, que abrem e fecham com tamanho menor que 10 Å, evitando a passagem de moléculas maiores, sendo este processo de transporte altamente dependente do peso molecular da droga (HINCHCLIFFE; ILLUM, 1999; PIRES *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2013; FORTUNA *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2017; BAN *et al.*, 2018).

A transcitose mediada por portadores de vesículas é o transporte de macromoléculas (> 40 kDa) de um lado da célula para o outro dentro de portadores ligados à membrana. Relata-se que, para peptídeos relativamente pequenos, como a insulina (<6 kDa) o transporte paracelular é predominante, enquanto a transcitose é a principal rota para proteínas maiores (HEINEMANN *et al.*, 2001; JAIN, 2008; SINGH *et al.*, 2013; GREGORIADIS, 2016).

Nos últimos anos, pesquisadores adotaram muitas estratégias e perspectivas para superar as várias barreiras de absorção e aumentar a absorção intranasal de insulina. Em 2010, Sintov e colaboradores demonstraram que uma microemulsão A/O contendo insulina pulverizada em narinas de coelhos atingiu uma biodisponibilidade de 21,5% através da via nasal em relação à administração subcutânea, enquanto que o uso de uma microemulsão O/A bem como uma solução simples de insulina produziu menos de 1% de biodisponibilidade (SINTOV *et al.*, 2010).

Adicionalmente, Zhang e colaboradores estudaram β -ciclodextrinas funcionalizadas com poliglicerol hiperramificado (HPG) com o objetivo de aumentar o transporte de insulina, através da barreira nasal e aumentar sua absorção, resultando em uma diminuição significativa nas concentrações de glicose no sangue de ratos. Os resultados obtidos demonstraram grande capacidade de associação à insulina, atingindo eficiência de encapsulação em torno de 88,21%, além do polímero apresentar adequada biocompatibilidade (ZHANG *et al.*, 2011).

D'Souza e colaboradores estudaram o efeito hipoglicemiante de gel de carbopol e hidropilmetilcelulose como agente geleificante contendo insulina em modelo animal e em voluntários saudáveis. Os resultados apresentados demonstraram que o uso deste gel nasal bioadesivo não só promoveu o contato prolongado entre o fármaco e os locais de absorção na cavidade nasal, mas também facilitou a absorção direta da insulina através da mucosa nasal, além de ser uma alternativa indolor à insulina injetável. No entanto, como a absorção foi bastante rápida, o uso desta forma de administração de insulina poderia não ser viável para pacientes crônicos em longo prazo (D'SOUZA *et al.*, 2005).

Alguns avanços tecnológicos estão sendo conduzidos para aplicação intranasal de insulina, conforme descrito na Tabela 2 (SONIA; SHARMA, 2014).

Tabela 2. Avanços tecnológicos para aplicação intranasal de insulina. Fonte: SONIA; SHARMA, 2014.

Nome Comercial	Indústria Farmacêutica	Tecnologia	Fase Clínica
Nasulin TM	Bentley Pharmaceutical, Inc.	Promotor de absorção	Fase II
QDose TM	Vectura, Ltd./ MicroDose Technologies Inc.	Pó seco	Fase I
ChiSys TM	West Pharmaceutical Services	Sistema bioadesivo baseado em quitosana	Fase I

2.4 Lipossomas

Os lipossomas (Figura 7) são biocompatíveis e biodegradáveis, o que permite a liberação prolongada do fármaco, diminuindo a toxicidade, reduzindo os efeitos colaterais e aumentando sua biodisponibilidade. A estabilidade dos lipossomas pode ser afetada por processos químicos, físicos e biológicos e podem apresentar curto tempo de meia-vida. Vários parâmetros influenciam em sua instabilidade, dentre eles o tamanho das vesículas, composição lipídica e a carga elétrica da superfície. Os lipossomas podem ser reconhecidos pelo sistema reticuloendotelial ou sistema mononuclear fagocitário, através de células denominadas macrófagos que eliminam os lipossomas da circulação (LAVERMAN *et al.*, 1999; KHOR *et al.*, 2003; TAKEUCHI *et al.*, 2003; TORCHILIN *et al.*, 2005).

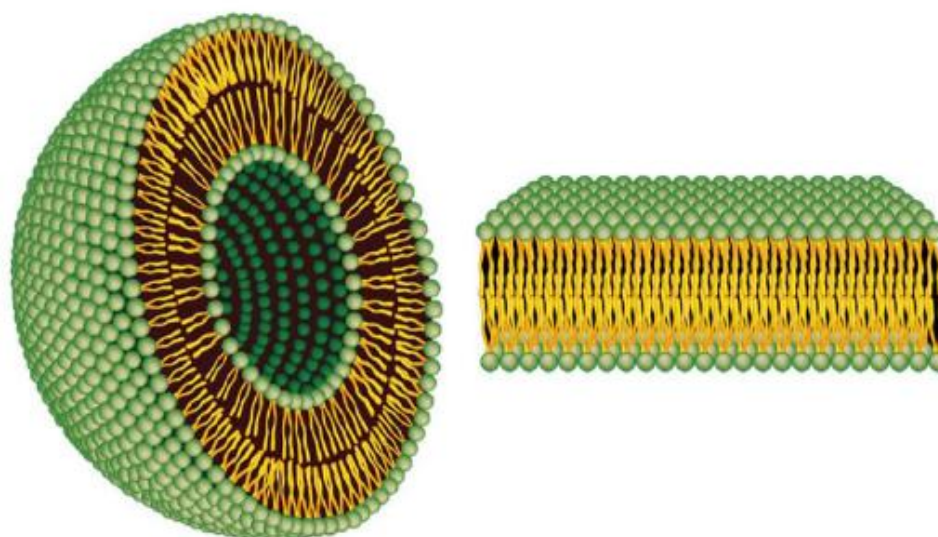


Figura 7. Representação de um lipossoma (esquerda) e uma bicamada lipídica (direita). Fonte: BOZZUTO; MOLINARI, 2015.

Os lipossomas são preparados principalmente por fosfolipídios naturais não-tóxicos idênticos aos que compõem as membranas celulares (ex: fosfatidilcolinas, fosfatidilserina,

fosfatidilglicerol e fosfatidiletanolamina) e de modo geral, podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar. Outro componente lipídico importante é o colesterol utilizado em uma proporção geralmente de 30% (mol), onde demonstrou aumentar a estabilidade estrutural da bicamada dos lipossomas, devido à presença do núcleo esteróide que modula a rigidez, espessura, estabilidade e fluidez de membranas e evita assim o extravasamento do fármaco (FRÉZARD *et al.*, 2005; ELOY *et al.*, 2014; BRIUGLIA *et al.*, 2015; KADDAH *et al.*, 2018).

Lipídios apresentando carga efetiva negativa ou positiva podem também ser incluídos na composição da membrana o que pode influenciar a taxa de incorporação de fármacos, impedir a agregação/fusão das vesículas lipídicas e modular o seu destino no organismo (BONACUCINA *et al.*, 2009; HOSNY, 2010a; ELOY *et al.*, 2014).

2.4.1 Classificação, métodos de preparo e caracterização de lipossomas

Os lipossomas constituem um dos sistemas mais importantes para encapsulação e liberação sustentada de fármacos e podem ser classificados de acordo com o número de lamelas, tamanho, composição e aplicação. Em relação ao número de lamelas e tamanho, os lipossomas podem ser classificados nas seguintes categorias (SANTOS *et al.*, 2002; BITOUNIS *et al.*, 2012; DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013):

- a. Lipossomas unilamelares pequenos (*Small Unilamellar Vesicles - SUV*): consistem em uma única bicamada fosfolipídica, com diâmetro médio variando de 25 a 100 nm.
- b. Lipossomas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles - LUV*): apresentam uma única bicamada fosfolipídica, com diâmetro médio variando de 100 nm a 100 nm.
- c. Lipossomas multilamelares (*Multilamellar Vesicles - MLV*): compostas de várias bicamadas fosfolipídicas concêntricas e possuem diâmetro médio variando de 400 nm a alguns micrômetros.
- d. Lipossomas unilamelares gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles - GUV*): apresentam uma única bicamada fosfolipídica, com diâmetro médio variando de 500 nm a 100 μm .

No que se refere à composição e mecanismo de liberação do fármaco, os lipossomas podem ser classificados como (TORCHILIN *et al.*, 2005; DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013):

- a. Lipossomas convencionais: foi a primeira geração de lipossomas a ser desenvolvida. Consiste em uma bicamada lipídica que pode ser constituída por diferentes composições lipídicas, contendo fosfolipídios catiônicos, aniônicos ou neutro, como por exemplo, as fosfatidilcolinas com ou sem o colesterol. Um grande inconveniente deste tipo de lipossoma refere-se a sua rápida absorção pelo sistema reticuloendotelial ou sistema mononuclear fagocitário, após administração sistêmica (DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013; SERCOMBE *et al.*, 2015).
- b. Lipossomas de longa circulação: consiste no revestimento da superfície do lipossoma com componentes hidrofílicos naturais ou polímeros hidrofílicos sintéticos, como o polietilenoglicol (PEG). Este revestimento aumenta o tempo de circulação dos lipossomas, reduzindo a agregação de partículas através de estabilização estérica e previne o reconhecimento pelo sistema reticuloendotelial ou sistema mononuclear fagocitário por inibição da opsonização (TORCHILIN *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2007; LEE, Y.; THOMPSON, 2017).
- c. Lipossomas polimórficos: são lipossomas que se tornam reativos quando submetidos a alterações de membrana provocadas por variações no pH e na temperatura ou alterações na carga superficial (BATISTA *et al.*, 2007; DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013).
- d. Lipossomas direcionados ou imunolipossomas: possuem anticorpos (monoclonal) e fragmentos de anticorpos acoplados a superfície do lipossoma de forma covalente ou não covalente que permitem que se liguem seletivamente ao antígeno ou receptor que são expressos ou superexpressos nas células cancerígenas (TORCHILIN *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2007; ELOY *et al.*, 2017).

A preparação de lipossomas envolve as etapas de formação de vesículas e redução do tamanho da vesícula. Vários métodos de preparação foram estabelecidos com base na escala da produção, eficiência de encapsulação, características físico-químicas do fármaco e a via de administração a ser utilizada (DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013).

Os métodos de preparação de lipossomas são diversos e dentre os disponíveis, o mais frequentemente utilizado é a hidratação do filme lipídico, por ser um método simples e rápido que foi descrito inicialmente por Bangham e colaboradores em 1965. Este método consiste em dissolver os lipídeos em solvente orgânico adequado, seguido pela remoção do solvente por evaporação rotativa sob pressão reduzida, dando origem a formação do filme lipídico fino. A hidratação deste filme pode ser efetuada com água ou solução tampão, através do uso de vórtex ou agitação mecânica em rotaevaporador dando origem a uma dispersão lipossomal. Fármacos hidrofílicos são

dissolvidos no meio aquoso, ao passo que, fármacos lipofílicos são dissolvidos na mistura de lipídeos. Entretanto, a desvantagem deste método é a baixa taxa de encapsulação de fármacos hidrofílicos, pois uma grande quantidade do fármaco permanece não encapsulada no meio aquoso externo. Com a finalidade de melhorar a eficiência de encapsulação de moléculas hidrofílicas dentro dos lipossomas, os seguintes métodos estão disponíveis: aplicação ciclos de congelamento-descongelamento, evaporação em fase reversa, e desidratação-reidratação de vesículas vazias pré-formadas (SHARMA; SHARMA, 1997; BATISTA *et al.*, 2007; ELOY *et al.*, 2014).

Ademais, o método de evaporação em fase reversa baseia-se na formação, através de breve sonicação de uma emulsão de duas fases contendo fosfolipídios em solvente orgânico e tampão aquoso contendo o fármaco hidrofílico. A remoção da fase orgânica é efetuada por evaporação rotativa sob pressão reduzida, dando origem à formação de um organogel. Posteriormente é realizada a hidratação com a formação dos lipossomas. Este método permite a encapsulação de grandes quantidades de drogas hidrofílicas com a formação de LUV com a obtenção de eficiência de encapsulação em torno de 65%. As desvantagens deste método são: i) exposição dos fármacos a serem encapsulados em solventes orgânicos que podem levar à inativação; ii) breves períodos de sonicação; iii) pouco adequada para a produção industrial devido a muitas etapas (AKBARZADEH *et al.*, 2013; ELOY *et al.*, 2014; ANDHALE *et al.*, 2016).

Os métodos de preparação de lipossomas podem dar origem a grandes vesículas com distribuição de tamanho heterogêneo, com isso faz-se necessário reduzir o tamanho e a lamelaridade dos lipossomas submetendo-os a métodos de homogeneização a alta pressão, extrusão através de membranas de policarbonato ou sonicação empregado ultrassom de haste (DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013; PATIL; JADHAV, 2014).

As formulações lipossomais são avaliadas por caracterizações químicas, físicas e físico-químicas, com o objetivo de garantir sua eficácia e a estabilização. As caracterizações químicas referem-se à quantificação de fosfolipídios e lisofosfolipídios, a avaliação da oxidação lipídica e a determinação da eficiência de encapsulação da droga. As caracterizações físicas consistem em avaliar o tamanho da vesícula, a natureza e a densidade da carga na superfície e a lamelaridade dos lipossomas. Enquanto que, a caracterização físico-química, podemos avaliar a fase lipídica e a temperatura de transição de fase (DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013; HUA; WU, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2014).

2.4.2 Mecanismos de interação entre lipossomas e célula-alvo

A liberação do fármaco a partir dos lipossomas depende do tamanho e multilamelaridade do lipossoma. Este mecanismo de liberação pode ser descrito em três etapas: a absorção do fármaco na

bicamada lipídica interna do lipossoma, sua difusão através da membrana e por fim sua excreção ao meio externo, sendo que o sucesso deste mecanismo depende da fluidez da bicamada lipídica e do tipo de fármaco encapsulado (tamanho, coeficiente de partição em óleo/água) (BONACUCINA *et al.*, 2009; BITOUNIS *et al.*, 2012).

Os mecanismos referentes às interações entre lipossomas e células alvos ainda não estão bem esclarecidos, entretanto, existem cinco maneiras diferentes que influenciam a entrega do fármaco encapsulado e sua distribuição na célula-alvo (CHORILLI, M *et al.*, 2004; BONACUCINA *et al.*, 2009; BITOUNIS *et al.*, 2012; BOZZUTO; MOLINARI, 2015):

1. Compreende a absorção de lipossomas nas membranas celulares, onde a bicamada lipídica do carreador é degradada por enzimas (lipases) ou por tensão mecânica. Isso resulta na liberação do fármaco para o fluido extracelular, onde este pode ser difundido através da membrana celular e do citoplasma, entretanto, este processo pode ser complicado para fármacos hidrofílicos. Deve-se salientar também que, uma vez que o fármaco tenha abandonado o seu carreador, a sua disposição farmacocinética é a mesma que a do fármaco em sua forma livre.
 2. Uma segunda via envolve a fusão da membrana lipossomal com a membrana plasmática da célula-alvo, causando a liberação do conteúdo lipossomal diretamente no citoplasma.
 3. O terceiro caminho é a endocitose mediada por receptores. Este processo apenas abrangem vesículas com um diâmetro máximo de 150 nm e fármacos que podem resistir ao ambiente ácido dos lisossomos.
 4. O processo de fagocitose pode ocorrer, mas contempla os lipossomas de tamanho superior a 150 nm e são realizados por células especializadas do sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos e células de Kupffer presentes no fígado.
 5. A interação entre o lipossoma e a célula-alvo é influenciada também pela natureza e a carga de superfície dos lipossomas, que são alteradas pela mudança da composição lipídica, conferindo uma carga global seja neutra, positiva ou negativa. Lipossomas neutros tendem a sofrer agregação, reduzindo a sua estabilidade física, além de não interagirem significativamente com a célula-alvo causando, por conseguinte a liberação do fármaco a partir dos lipossomas no espaço extracelular. Por outro lado, a presença de uma carga de superfície induz a repulsão eletrostática entre as vesículas, criando um potencial, seja positivo ou negativo, que impede sua agregação e floculação, o que pode promover a interação de lipossomas com células-alvo.
-

2.4.3 Formulações lipossomais comerciais, ensaios clínicos e estudos científicos

Diversos medicamentos utilizando lipossomas estão disponíveis para uso humano e outros produtos estão sob diferentes ensaios clínicos, devido ao desenvolvimento extensivo nesta área, conforme descritos respectivamente nas Tabelas 3 e 4 (TORCHILIN *et al.*, 2005; ALLEN; CULLIS, 2013; BOZZUTO; MOLINARI, 2015; ZYLBERBERG; MATOSEVIC, 2016; BULBAKE *et al.*, 2017).

Tabela 3. Produtos à base de lipossomas usados clinicamente. Adaptado de ZYLBERBERG;MATOSEVIC, 2016 ; BULBAKE *et al.*, 2017.

Produto (Ano aprovação)	Fármaco	Indicação Terapêutica	Indústria Farmacêutica
Doxil® (1995)	Doxorrubicina	Câncer de mama e ovários, mieloma múltiplo e sarcoma de Kaposi	Sequus Pharmaceuticals
DaunoXome® (1996)	Daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS	NeXstar Pharmaceuticals
Depocyt® (1999)	Citarabina / Ara-C	Meningite neoplásica	SkyPharma Inc.
Myocet® (2000)	Doxorrubicina	Terapia combinada com ciclofosfamida no câncer de mama metastático	Elan Pharmaceutical
Mepact® (2004)	Mifamurtida	Osteosarcoma de alto grau operável não metastático	Takeda Pharmaceutical Limited
Marqibo® (2012)	Vincristina	Leucemia linfoblástica aguda	Talon Therapeutics, Inc.
Onivyde™ (2015)	Irinotecano	Terapêutica combinada com fluorouracil e leucovorina no adenocarcinoma metastático do pâncreas	Merrimack Pharmaceuticals Inc.
Abelcet® (1995)	Anfotericina B	Infecções fúngicas graves invasivas	Sigma-Tau Pharmaceuticals
Ambisome® (1997)	Anfotericina B	Infecções fúngicas	Astellas Pharma
Amphotec® (1996)	Anfotericina B	Infecções fúngicas severas	Ben Venue Laboratories Inc.
Visudyne® (2000)	Verteporfin	Degeneração macular	Novartis

Produto (Ano aprovação)	Fármaco	Indicação Terapêutica	Indústria Farmacêutica
DepoDur™ (2004)	Sulfato de morfina	Controle da dor	SkyPharma Inc.
Exparel® (2011)	Bupivacaína	Gerenciamento da dor	Pacira Pharmaceuticals, Inc
Epaxal® (1993)	Vírus da hepatite A inativado	Hepatite A	Crucell, Berna Biotech
Inflexal® V (1997)	Hemaglutinina inativada das cepas A e B do vírus Influenza	Influenza	Crucell, Berna Biotech

Tabela 4. Formulações lipossomais em ensaios clínicos. Adaptado de BULBAKE et al., 2017.

Produto	Fármaco	Indicação Terapêutica	Fase Clínica / Indústria Farmacêutica
ATI-1123	Docetaxel	Tumores sólidos	Fase I / Azaya therapeutica
Alocres	Vinorelbina	Câncer de pulmão e mamas	Fase I / Spectrum Pharmaceuticals
LiPlaCis	Cisplatina	Tumores sólidos avançados	Fase I / Oncology Venture
SPI-077	Cisplatina	Câncer de cabeça, pescoço e pulmão	Fase II / Alza Corporation
Endotag-I	Paclitaxel	Câncer de pâncreas e mamas	Fase II / Medigene
OSI-211	Lurtotecana	Câncer de cabeça, pescoço e ovários	Fase II / OSI Pharmaceuticals
Arikace	Amikacin	Infecção de pulmão	Fase III / Transave Inc.
Lipoplatin	Cisplatina	Câncer de pulmão	Fase III / Regulon Inc. Platinum
ThermoDox	Doxorrubicina	Carcinoma hepatocelular e recidiva do câncer de mama na parede torácica	Fase III / Celsion

Um marco importante em produtos à base de lipossomas foi à introdução do DOXIL® (lipossoma carregado com doxorubicina) no mercado dos EUA em 1995, para o tratamento do sarcoma de Kaposi, câncer de ovário recorrente, câncer de mama metastático e mieloma múltiplo e obteve os seguintes avanços em relação à doxorubicina livre: (i) tempo prolongado de circulação do fármaco evitando o sistema reticuloendotelial ou sistema mononuclear fagocitário, devido ao uso de nano-lipossomas PEGilados; (ii) carga estável da doxorubicina conduzida por um gradiente de sulfato de amônia transmembrana, que permite a liberação do fármaco no tecido tumoral; (iii) diminuição da toxicidade cardíaca (BARENHOLZ *et al.*, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2014; BULBAKE *et al.*, 2017).

No contexto científico relacionado à utilização de lipossomas para a liberação de insulina, alguns estudos foram desenvolvidos como o realizado por Zhang e colaboradores que desenvolveram e caracterizaram lipossomas contendo insulina modificados por lectina e avaliaram seu potencial hipoglicemiante e os resultados demonstraram uma maior absorção oral de insulina, devido a receptores de lectina na membrana gastrointestinal, quando comparados com lipossomas convencionais contendo insulina (ZHANG *et al.*, 2005).

Em 2011, Park e colaboradores demonstraram que lipossomas catiônicos podem ser um sistema de liberação sustentada em potencial para administração parenteral de insulina por prolongar a eficácia e melhorar a sua biodisponibilidade, devido à complexação com a insulina aniônica (PARK *et al.*, 2011). Adicionalmente, Niu e colaboradores desenvolveram um sistema de administração lipossomal contendo glicocolato como inibidor enzimático e potenciador da permeação para a administração oral de insulina (NIU *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Zheng-Hong e colaboradores demonstrou uma queda da glicemia em camundongos saudáveis quando foram administrados pela via oral lipossomas revestidos com quitosana contendo insulina, isto ocorreu devido a redução da digestão da insulina e o aumento da absorção enteral da insulina (ZHENG-HONG *et al.*, 2004).

2.5 Peptídeos de transdução de membrana (CPPs)

Recentemente surgiu uma nova abordagem para a liberação de fármacos, que é fundamentada na utilização de peptídeos de transdução de membrana (CPPs) que têm a habilidade de penetrar nas células e com isso tornaram-se promissores para fins terapêuticos (TORCHILIN *et al.*, 2005; ISMAIL; CSOKA, 2017).

Embora vários critérios diferentes tenham sido propostos para a classificação de CPPs com base em sua origem, seqüência, função ou mecanismo de captação e aplicação biomédica, entretanto, atualmente não existe uma taxonomia unificada desses peptídeos. De acordo com suas propriedades físico-químicas, elas podem ser divididas em três categorias principais; CPPs

catiônicos, anfipáticos e hidrofóbicos (WANG *et al.*, 2014; RAUCHER; RYU, 2015; GUIDOTTI *et al.*, 2017).

Todos os CPPs têm estruturas químicas bastante diferentes, mas possuem carga altamente positiva devido à contribuição de resíduos básicos de aminoácidos, como lisina e arginina (BAE *et al.*, 2013).

Os CPP catiônicos são uma classe de peptídeos com uma carga positiva elevada. Estes peptídeos correspondem a pequenas sequências de aminoácidos que são muitas vezes constituídas por arginina, lisina e histidina (FARKHANI *et al.*, 2014). Estudos sugerem que pelo menos oito cargas positivas podem interagir com GAGs e entrar na célula através de caminhos endocíticos e acima de certo limiar de concentração, eles também podem translocar a membrana diretamente. Os CPPs catiônicos incluem, por exemplo, as poliargininas, TAT e PNT (WANG *et al.*, 2014; GUIDOTTI *et al.*, 2017).

Os CPPs anfipáticos são uma classe de peptídeo que contém regiões tanto polares como apolares. Além da lisina e da arginina, que são distribuídos ao longo da sequência, eles também são ricos em resíduos hidrofóbicos, como valina, leucina, isoleucina e alanina. Os CPPs anfipáticos são geralmente classificados como CPP primários, secundários e ricos em prolina. Estes peptídeos possuem blocos lipofílicos e hidrofílicos que são responsáveis pela mediação da translocação do peptídeo através da membrana celular e se acumulam principalmente no núcleo. Os CPPs anfipáticos incluem MPG, proteína de caderina endotelial murina (pVec), Transportan, Pep-1, peptídeo de antígeno múltiplo (MAP), receptor de integrina visando peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), proteína do vírus herpes simplex (VP22) e CADY-2, por exemplo, (BOLHASSANI, 2011; BECHARA *et al.*, 2013; GUIDOTTI *et al.*, 2017).

A terceira classe de CPPs são os peptídeos hidrofóbicos, que contêm aminoácidos hidrofóbicos que são cruciais para o processo de internalização celular. Até o momento, apenas um número limitado de peptídeos hidrofóbicos foi descoberto e seus mecanismos de internalização foram menos estudados em comparação com as classes catiônica e anfipática. No entanto, pesquisas recentes sugerem que alguns CPPs hidrofóbicos podem translocar espontaneamente através de membranas de forma independente de energia e, portanto podem ser especialmente vantajosos, porque estarão imediatamente disponíveis no citosol e o risco de aprisionamento endosomal e a degradação seriam eliminados. Esta classe inclui peptídeo derivado do fator de crescimento de fibroblastos de Kaposi (K-FGF), Pep-7 e C105Y, por exemplo, (LANGEL, 2006; RAUCHER; RYU, 2015; GUIDOTTI *et al.*, 2017).

2.5.1 Mecanismos de internalização

Apesar de diversos estudos realizados e ainda que os CPPs demonstrem serem muito promissores devido a sua capacidade de transportar várias moléculas através das membranas plasmáticas *in vitro* e *in vivo* ou até mesmo em ensaio clínico, no entanto, os mecanismos exatos pelo quais os CPPs são capazes de atravessar membranas biológicas ainda não são totalmente compreendidos (THORÉN *et al.*, 2003; TAKECHI *et al.*, 2011; DI PISA *et al.*, 2014).

Existem evidências de mecanismos que podem possibilitar a entrada celular dos CPPs, alguns CPPs demonstraram inclusive usar mais de um destes mecanismos de internalização e por vezes utilizam diferentes mecanismos simultaneamente, dependendo das propriedades físico-químicas, concentração, carga e comprimento dos CPPs, conforme demonstrados na Figura 8. Os mecanismos são a translocação direta ou penetração direta que é independente de energia e a endocitose que é dependente de energia. No entanto, em ambos os mecanismos, o contato direto entre os CPPs e os resíduos negativos na superfície celular é um pré-requisito para uma absorção ser bem-sucedida. Além disso, a captação celular depende ainda do tipo, tamanho e carga do fármaco e a linha celular na qual está sendo testada, que podem produzir diferentes graus de acumulação e aplicações terapêuticas (FONSECA *et al.*, 2009; LANGEL, 2011; RAUCHER; RYU, 2015).

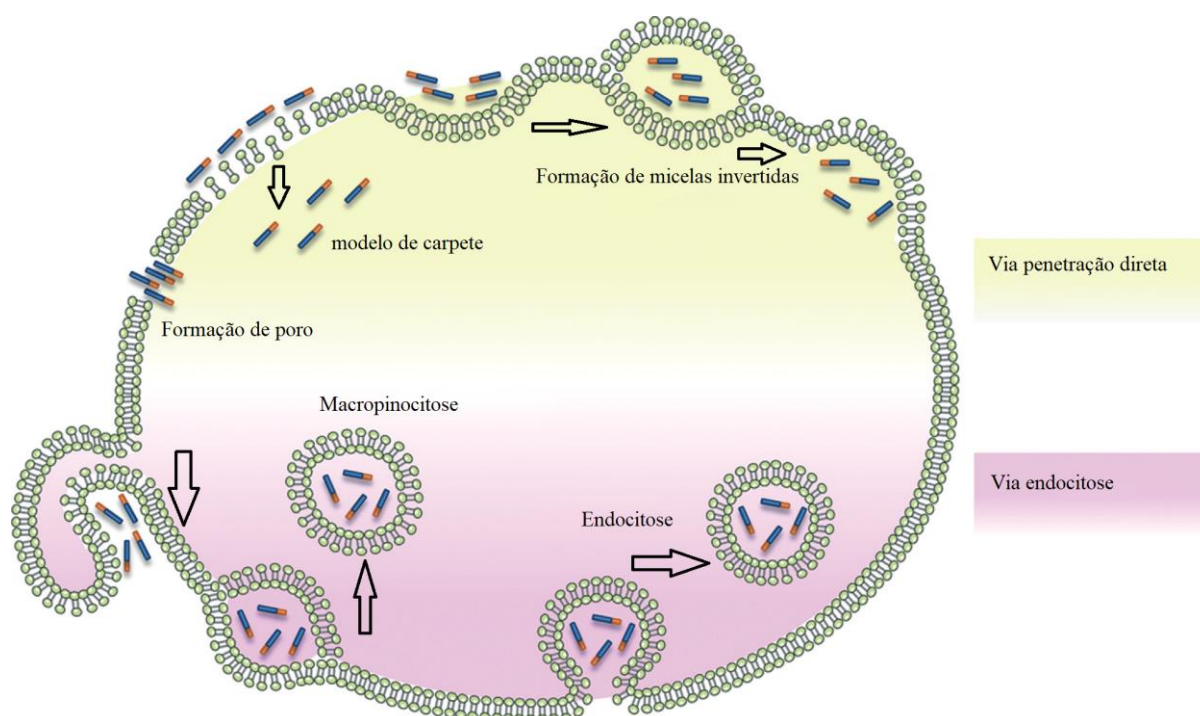


Figura 8. Mecanismos de internalização celular de CPPs . Adaptado de GUIDOTTI *et al.*, 2017.

O mecanismo de penetração direta ou translocação direta tem características peculiares, como ser independente de energia e ocorrer mesmo em baixas temperaturas e na presença de

inibidores endocitóticos. Este mecanismo envolve várias rotas de entrada que são inicialmente baseadas sobre a interação dos CPPs carregados positivamente com os componentes de membrana carregados negativamente e sua bicamada lipídica. Após esta interação, ocorre a entrada dos CPPs através de várias vias que foram descritos como: formação de poros transitórios, modelo de tapete e micelas invertidas (LANGEL, 2002; ZORKO; LANGEL, 2005; WANG *et al.*, 2014; RAMSEY; FLYNN, 2015; RAUCHER; RYU, 2015; GUIDOTTI *et al.*, 2017):

1. Formação de poros transitórios: neste modelo, os CPPs se acumulam na camada externa da bicamada fosfolipídica, causando distorção da membrana e levando à formação de um poro transitório.
2. Micela invertida: descrito pela desestabilização da bicamada lipídica e sua consequente invaginação com a formação de micelas invertidas encapsulando os CPPs, a partir da interação entre os resíduos carregados positivamente do CPP (arginina e lisina) que inicialmente se ligam aos fosfolipídios carregados negativamente da membrana celular seletivamente permeável. Esta translocação através da membrana celular ocorre eventualmente em uma fração das micelas, que liberaram os CPPs no citosol por inversão, permitindo assim a entrega intracelular.
3. Modelo de tapete: definido por um incremento transitório na fluidez da membrana após a interação da carga positiva do CPPs com as cargas negativas na superfície celular, cobrindo a membrana celular de maneira equivalente a um tapete.

O mecanismo de endocitose é considerado a principal via de internalização para muitos CPPs e complexos CPP-fármaco. A endocitose é um processo natural e dependente de energia que ocorre em todas as células. Este mecanismo compreende vias distintas, que podem ser divididas em macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose clatrina-caveolina independente. O tamanho e a natureza físico-química dos CPPs e do complexo CPP-fármaco irá determinar qual via será utilizada. Portanto, após a internalização endocítica, os CPPs e os complexos CPP-fármaco devem escapar dos endossomos para o citosol para evitar a degradação dos lisossomos, para atingir seus locais-alvo e exercer sua respectiva atividade biológica. Um mecanismo de fuga endossomal sugere que as cargas positivas dos CPPs interagem com os componentes de carga negativa da membrana endossômica causando o enrijecimento da membrana, determinando sua ruptura e a liberação do conteúdo da vesícula (LANGEL, 2002; LANGEL, 2006; RAMSEY; FLYNN, 2015; RAUCHER; RYU, 2015; GUIDOTTI *et al.*, 2017).

2.5.2 Ensaios clínicos e pré-clínicos

Embora muitos estudos relacionados aos CPPs tenham sido direcionados ao mecanismo de penetração celular e nas propriedades físico-químicas dos CPPs, diversos pesquisadores se concentraram no uso de CPPs como carreadores para a liberação de vários tipos de moléculas terapêuticas, tais como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios, antineoplásicos. Apesar do grande número de estudos pré-clínicos realizados em modelos animais e ensaios clínicos de Fase I, Fase II e, em alguns casos, de Fase III demonstrar claramente a capacidade dos CPPs transportarem vários tipos de moléculas terapêuticas, através das barreiras celulares e teciduais, permitindo assim que alcancem os seus alvos, nenhum conjugado CPP ou CPP obteve aprovação pelo FDA até momento. O primeiro ensaio clínico utilizando um conjugado de ciclosporina com o CPP (poliarginina) foi realizado pela empresa CellGate Inc. para o tratamento tópico da psoríase por administração transdérmica de ciclosporina A (BOLHASSANI, 2011; KOREN; TORCHILIN *et al.*, 2012; RAUCHER; RYU, 2015; GUIDOTTI *et al.*, 2017).

No contexto acadêmico, relacionado ao uso de CPPs para a absorção de insulina, alguns estudos foram desenvolvidos como o realizado em 2005, por Liang e Yang em que demonstraram que CPP catiônico TAT ligado a insulina para formar um complexo híbrido aumentou em 6 a 8 vezes a eficiência de absorção intestinal da insulina quando comparada a insulina normal, conforme testes realizados em monocamadas de células Caco-2, um modelo *in vitro* amplamente utilizado para a absorção intestinal e este transporte demonstrou ser similar a transcitose através de um mecanismo ativo (Liang; Yang, 2005). Ademais, Nielsen e colaboradores sugeriram também que CPP catiônico PNT efetivamente melhorou a absorção oral de insulina e sua degradação foi diminuída pela presença deste peptídeo no fluido intestinal (NIELSEN *et al.*, 2014).

Por outro lado em relação à utilização de CPPs para a absorção de insulina pela via nasal, foi desenvolvido em 2009, Khafagy e colaboradores que demonstraram que o CPP catiônico PNT, aumentou a permeabilidade da insulina em toda a membrana nasal sem causar danos detectáveis à integridade celular da mucosa nasal, podendo ser uma alternativa viável às terapias parenterais existentes (KHAFAGY *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar lipossomas contendo insulina, funcionalizados com os peptídeos de transdução de membrana (TAT e PNT) e avaliar o seu potencial pela via intranasal, *in vivo*, para a melhora dos níveis séricos e efeito hipoglicemiante da insulina.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de lipossomas contendo insulina funcionalizados com os peptídeos de transdução de membrana (TAT e PNT) para administração nasal;
 - Caracterização físico-química das formulações desenvolvidas por técnicas microscopia eletrônica de transmissão (TEM), medidas de diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e potencial zeta, dicroísmo circular (CD) e microcalorimetria exploratória diferencial (Nano DSC);
 - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação da insulina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
 - Avaliação da eficiência de encapsulação da insulina nas formulações desenvolvidas;
 - Determinação do perfil de liberação de insulina *in vitro*;
 - Avaliação da permeação de insulina em mucosa nasal suína;
 - Avaliação da força mucoadesiva;
 - Avaliação da seringabilidade;
 - Avaliação das propriedades reológicas;
 - Ensaios das respostas anti-hiperglicêmicas em ratos diabéticos após a administração nasal de lipossomas contendo insulina;
 - Ensaio de análise temporal da presença de insulina na circulação sistêmica em ratos não diabéticos após a administração nasal de lipossomas contendo insulina.
-

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 . Materiais, Solventes e Reagentes

- Acetato de uranila;
 - Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker®, USA);
 - Ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma Aldrich®, USA);
 - Ácido clorídrico (Synth®, Brasil);
 - Água Milli-Q (Millipore®);
 - Coluna C18 Luna® Phenomenex (d.i. 4,6 x 250 mm; 5 µm);
 - Cloreto de potássio (Synth®, Brasil);
 - Cloreto de sódio (Synth®, Brasil);
 - Cloreto de cálcio dihidratado (Synth®, Brasil);
 - Clorofórmio (Merck, USA);
 - Colesterol (Sigma Aldrich®, USA);
 - Dicetil fosfato (Sigma Aldrich®, USA);
 - Filtro de ultrafiltração Amicon®, (Millipore, Billerica, USA);
 - Fita adesiva dupla face 3M;
 - Fosfatidilcolina de soja (Lipoid GMBH,Alemanha);
 - Fosfato de sódio bibásico.12H₂O (Synth®, Brasil);
 - Fosfato de sódio monobásico (Synth®, Brasil);
 - Hidroxietilcelulose (HEC) - (Natrosol®);
 - Insulina Novolin R ® (Novo Nordisk, Lote GS63F52);
 - Membrana sintética de acetato de celulose (12-14kDA) (Sigma Aldrich®, USA);
 - Metanol grau CLAE (J.T. Baker®, USA);
 - Micropipeta de 10 e 100 µL – Eppendorf;
 - Micropipeta de 100 e 1000 µL – Eppendorf;
 - Mucina Tipo II de estômago suíno (Sigma Aldrich®, USA);
 - Oleilamina ;
 - Peptídeos de transdução de membrana (PNT) (Aminotech®, Brasil);
 - Peptídeos de transdução de membrana (TAT) (Aminotech®, Brasil);
-

4.2 . Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (Fisatom, modelo 752^a);
- Analisador de textura TA-XT plus[®] (Stable Micro Systems[®], UK);
- Balança analítica, Mettler H51;
- Banho ultrassônico – Ultrasonic Cleaner (Unique);
- Bomba a vácuo (Nortecientífica);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent, modelo 1200 DAD/UV;
- Espectropolarímetro J-815 (JASCO);
- Homogeneizador a alta pressão, EmulsiFlex-C3;
- Microette Plus HANSON 0700-1251;
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-100CX2 (JEOL);
- Peagômetro (Digimed);
- Refrigerador Consul;
- Reômetro, modelo RS-1 – Haake Rheostress
- Rotaevaporador RV10 digital (IKA);
- Sistema de purificação de água MILLIPORE[®], Milli - Q Plus, condutividade 18,2 μ S.cm-1;
- Spectrafuge[™] 16 M Microcentrífuga (Labnet[®], USA);
- Q700 Sonicator (Qsonica, Newtown, CT, USA);
- Termômetro (Incoterm[®]);
- Tubo Falcon[®];
- Ultrassom (Unique[®]);
- Ultraturrax Digital T25 - Ika[®];
- Vórtex MVS-1(Biomixer);
- Zetasizer Nano NS Malvern Instruments (Malvern, UK);

4.3 . Métodos

4.3.1 Preparação dos lipossomas incorporados com insulina

Os lipossomas foram preparados a partir das técnicas de hidratação do filme lipídico ou evaporação de fase reversa, sendo que esta última tem o potencial de aumentar a encapsulação da insulina, um fármaco hidrofílico (BATISTA *et al.*, 2007; ELOY *et al.*, 2014). O componente lipídico (100 mg) baseados no estudo de Hosny, incluiu fosfatidilcolina de soja, colesterol e

indutores de carga na razão molar de 5:3:0.2, conforme descritos na Tabela 5. Os indutores testados foram a oleilamina (indutor de carga positivo) e o dicetil fosfato (indutor de carga negativo). Os materiais foram pesados em um balão de fundo redondo e dissolvidos em uma mistura de clorofórmio/metanol (1:2v/v). Um filme lipídico fino foi formado na parte interna do balão de fundo redondo pela evaporação do solvente orgânico utilizando o rotaevaporador a 40°C, sob vácuo, por 30 minutos (Figura 9a). O filme lipídico formado foi hidratado a 40°C por 30 minutos em 10 mL de tampão fosfato (PBS, pH 7,4) contendo 4 mL de solução de insulina (Novolin R ®), equivalente a 1400 µg/mL (4UI) de insulina. Paralelamente, para a obtenção da suspensão lipossomal pela técnica de evaporação em fase reversa, o filme lipídico formado foi redissolvido em 10 mL de éter e emulsificado com 10 mL de tampão fosfato (PBS, pH 7,4) contendo 4 mL de solução de insulina (Novolin R ®), equivalente a 1400 µg/mL (4UI) de insulina e a mistura foi rotaevaporada 40°C, sob vácuo, por 2 h. Os lipossomas preparados pelas duas técnicas tiveram o volume corrigido com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) para 15 mL e foram processados em homogeneizador a alta pressão, EmulsiFlex-C3 (Figura 9b), durante 5 minutos utilizando pressão de 10.000 psi, e, logo em seguida, armazenados no refrigerador, na temperatura de 2-8°C (ZHENG-HONG *et al.*, 2004; HOSNY, 2010b).

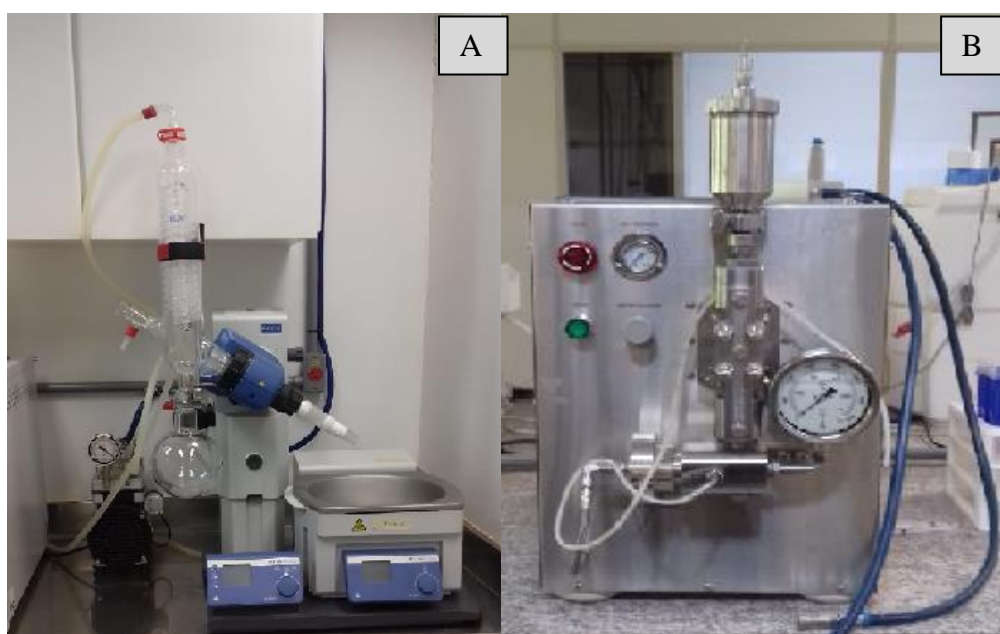


Figura 9. (A) Rotaevaporador RV10 digital (IKA); (B) Homogeneizador a alta pressão, EmulsiFlex-C3

Tabela 5 Razão molar dos componentes da formulação A, B, C e D.

Componentes	Formulação A		Formulação B		Formulação C		Formulação D	
	Razão Molar	Quant. (mg)	Razão Molar	Quant. (mg)	Razão Molar	Quant. (mg)	Razão Molar	Quant. (mg)
Fosfatidilcolina de soja (PC)	5	76,57	5	76,57	5	74,91	5	74,55
Colesterol (CH)	3	23,43	3	23,43	3	22,93	3	22,82
Dicetil Fosfato (DP)	-		-		0,2	2,16	-	
Oleilamina (OAM)			-		-		0,2	2,63
Insulina	-		14mg					

4.3.2 Funcionalização dos lipossomas com CPPs

Os peptídeos de transdução de membrana (TAT e PNT) foram pesados e dissolvidos em água Milli-Q, com o objetivo de se obter as seguintes concentrações para as soluções mães: 1 mM para TAT e 1 mM para PNT. Logo em seguida, estas soluções de CPPs foram adicionadas aos lipossomas contendo solução de insulina (Novolin R ®) na concentração de 1400µg/mL, preparados por técnicas previamente descritas e incubadas durante 30 min à temperatura ambiente para interação eletrostática entre lipossoma e CPP, a fim de obter concentração final de 0,1mM tanto para TAT como para PNT (KHAFAGY *et al.*, 2009; PETRILLI *et al.*, 2016).

4.3.3 Preparação do hidrogel

Foram dissolvidos 200 mg de hidroxietilcelulose (HEC-Natrosol®) em 10 mL de água Milli-Q a 40°C, sob agitação magnética constante durante 30 minutos, com o objetivo de obter um gel não iônico a 2% (m/v). Em seguida, a solução foi mantida durante 24 h no refrigerador na temperatura de 2-8°C em tubo Falcon® de 15 mL, para assegurar a completa dissolução e homogeneidade. Posteriormente, em 5 mL de hidrogel de HEC foram incorporados 15 mL de dispersão lipossomal contendo solução de insulina funcionalizadas com peptídeos de transdução (MOURTAS *et al.*, 2007; VELICKOVA *et al.*, 2009; NEMEN *et al.*, 2011).

4.3.4 Caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos

4.3.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras foram diluídas previamente em tampão fosfato (PBS, pH 7,4) de forma que a concentração final de lipídios obtida foi de 0,5 mg/mL. Em seguida, foram colocadas na grade de

cobre de 200 mesh e deixadas em repouso até adsorção e, então, o excesso foi removido com papel de filtro. Subsequentemente, uma gota de uma solução a 1% (p/v) de acetato de uranila foi adicionado para contrastação negativa. Depois de 2 minutos, o excesso foi removido e a amostra foi seca à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão com aceleração de 100 kV e aumento de 100.000 vezes (ELOY *et al.*, 2016).

4.3.4.2 Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e potencial zeta

Alíquotas de suspensão lipossomal (100 μ L) foram diluídas em 10 mL com água Milli-Q, homogeneizadas, e submetidas logo em seguida às medidas de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) índice de polidispersão (Ipd), utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmica no equipamento Zetasizer Nano NS. Foram efetuadas, em média, 12 leituras à temperatura de 25°C utilizando o comprimento de onda de 633 nm. Posteriormente, as análises de potencial zeta (PZ) foram realizadas no mesmo equipamento e com a mesma amostra. (ZHENG-HONG *et al.*, 2004).

4.3.4.3 Dicroísmo circular (DC)

Os espectros de DC para avaliação da integridade da estrutura secundária da insulina após a encapsulação foram adquiridos a 25°C usando um espectropolarímetro na região ultravioleta (190-280 nm) em uma célula de caminho ótico de 0,01 cm usando um tamanho de passo de 1 nm. O invólucro da lâmpada foi purgado com nitrogênio e uma solução de insulina (1400 μ g/mL) preparada em tampão fosfato (PBS, pH=7,4) utilizada como controle. Todas as amostras foram diluídas 10 vezes e realizadas leituras em triplicata. Os espectros de DC da referência em branco apropriada foram registrados e subtraídos dos espectros de insulina, para eliminar as contribuições da fase aquosa. A elipsidade molar por residual média foi calculada a partir do sinal de DC bruto, utilizando um peso médio de resíduos de 116 Da e uma concentração de insulina calculada a partir da absorbância corrigida da solução de insulina (PARK *et al.*, 2011; ANDREANI *et. al*, 2015).

4.3.4.4 Microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC)

Para confirmar os eventos térmicos produzidos em função das variações de temperatura foi realizada análise em Nano DSC. As medidas microcalorimétricas foram conduzidas em equipamento Nano-DSC (TA Instruments) a uma taxa de aquecimento de 1°C/ min, com uma faixa de varredura de 25 - 100°C. As amostras foram desgaseificadas sob vácuo antes de serem carregadas nas células capilares e as curvas de DSC obtidas foram avaliadas utilizando-se Software NanoAnalyze, os quais permitiram a aquisição de parâmetros termodinâmicos relacionados ao

processo de envelhecimento e denovelamento proteico (ANDREANI *et al.*, 2015; GATTI *et al.*, 2018).

4.3.4.5 Estabilidade das formulações

Análise de diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e potencial zeta foram realizadas nos tempos 24 h, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 dias após o preparo das formulações. As formulações foram armazenadas em refrigerador em temperatura de 2-8°C, durante todo o período de análise.

4.3.5 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação da insulina utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.3.5.1 Parâmetros para validação de metodologia analítica

A validação da metodologia analítica foi adaptada da metodologia de Sarmento *et al.*, 2006. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, conforme descritos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2017). O equipamento empregado foi um CLAE Agilent, modelo 1200.

O método analítico validado foi utilizado para a quantificação de insulina em amostras provenientes dos ensaios de eficiência de encapsulação, liberação *in vitro* e permeação em mucosa nasal suína. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica

Fase móvel	Acetonitrila: Solução aquosa de TFA 0.1% (60:40, v/v)
Coluna	Coluna C18 Luna [®] Phenomenex dimensões 4,6mm x250mm, 5 µm de tamanho de partícula
Detecção	214 nm
Fluxo	1,0mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura do forno	25°C
Tempo de corrida	6 minutos

4.3.5.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Para assegurar o desempenho do sistema cromatográfico antes e durante a realização das análises, foram efetuadas seis injeções de solução padrão de insulina na concentração de 50 µg/mL>

conforme Food and Drug Administration é recomendado que os valores calculados para o número de pratos teóricos seja > 2000 , os fatores de cauda e de assimetria do pico sejam $\leq 2,0$ (FDA, 1994).

4.3.5.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas, determinada pela análise de sete níveis de concentração em três dias diferentes. A partir da solução estoque de insulina (700 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram preparadas soluções padrões nas concentrações de 0,5, 1, 5, 20, 40, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, utilizando-se a tampão fosfato (PBS, pH 7,4) como diluente. Para cada concentração descrita, foram realizadas três injeções previamente filtradas em membrana filtrante de 0,45 μm . A partir da média dos valores das áreas encontradas e das concentrações testadas para as três curvas a equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e calculada por meio de análise de variância ANOVA a nível de $\alpha = 0,05$ (95% do intervalo de confiança).

4.3.5.4 Seletividade

Com o objetivo de garantir que os componentes da formulação não interferem nas análises quantitativas da insulina, componentes da fase móvel, amostras das formulações sem a insulina, solução receptora compostas por tampão fosfato (PBS, pH=7,4) que foram utilizadas posteriormente respectivamente nos ensaios de liberação *in vitro* e permeação em mucosa nasal suína. As alíquotas foram filtradas em membrana filtrante de 0,45 μm e injetadas no CLAE nas condições cromatográficas descritas no item 3.3.5.1, com o objetivo de verificar alguma interferência do pico do placebo no pico do padrão de insulina.

Para avaliação da interferência da mucosa nasal, picotou-se a mucosa nasal suína com o auxílio de uma tesoura e os fragmentos foram colocados em tubo para centrifuga, onde se adicionou 5 mL da solução extratora, sendo logo em seguida agitada em vórtex por um minuto, levada ao homogeneizador Turrax[®] por um minuto e em seguida para banho ultrassônico por 30 minutos. Ao final, filtrou-se em membrana de 0,45 μm injetou-se em CLAE para avaliação da interferência na região característica do pico de insulina.

4.3.5.5 Precisão

4.3.5.5.1 Repetibilidade

A precisão intracorrida ou repetibilidade foi avaliada usando seis réplicas a 100% da concentração de 50 µg/mL individualmente preparadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista.

4.3.5.5.2 Precisão Intermediária

A precisão intercorrida ou intermediária foi realizada nas mesmas condições, com analistas diferentes em dias diferentes e consecutivos. A proximidade entre os resultados obtidos foi verificada, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), conforme a Equação 1.

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

4.3.5.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pela adição de padrão ao placebo das formulações escolhidas, nas concentrações de 5, 20 e 50 µg/mL. As amostras foram preparadas em triplicata. O grau de concordância entre os resultados obtidos em relação aos valores teóricos foi avaliado por meio do cálculo de recuperação, conforme Equação 2:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Equação 2})$$

Foi realizada também a recuperação na mucosa nasal suína, onde a mucosa não submetida ao teste de permeação em mucosa nasal suína foi contaminada com quantidades conhecidas de padrão de insulina em três concentrações distintas (5, 20 e 50 µg/mL), após agitação em vórtex por um minuto as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom por 30 minutos. A solução obtida foi filtrada em membrana 0,45 µm e injetada em CLAE para quantificação de insulina.

4.3.5.7 Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado com base na obtenção de três curvas analíticas do fármaco e a partir da fórmula descrita na literatura (ANVISA, 2017), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. A fórmula usada para o cálculo está representada na Equação 3.

$$\text{LD} = \frac{3,3\sigma}{\text{IC}} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

4.3.5.8 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado com base na obtenção de três curvas analíticas do fármaco e a partir da fórmula descrita na literatura (ANVISA, 2017), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. A fórmula usada para o cálculo está representada na Equação 4.

$$\text{LQ} = \frac{10\sigma}{\text{IC}} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

4.3.5.9 Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (ANVISA, 2017). Realizou-se a quantificação do padrão de insulina com variações nas seguintes condições cromatográficas: comprimento de onda, composição da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura do forno.

4.3.6 Avaliação da eficiência da encapsulação da insulina

4.3.6.1 Eficiência de encapsulação medida por BCA

A eficiência de encapsulação (EE) da insulina foi determinada pelo método indireto, quantificando a insulina livre, não encapsulada, e descontando do total de insulina, para calcular a eficiência de encapsulação. Brevemente, 1 mL de lipossoma contendo insulina foi centrifugado usando filtro de ultrafiltração Amicon[®] -100 kDa (13.000 rpm, 12 min) para separar insulina não encapsulada. A insulina foi quantificada usando-se o kit de análise de proteína Pierce BCA. Para a análise, foi adicionado 100 µl do filtrado (insulina livre) em tubos em replicata. Em seguida, foi adicionado 2 mL de solução de reagente de trabalho a cada tubo, agitado, coberto e incubado a 37°C durante 30 min. Posteriormente, a absorbância de todas as amostras foi medida a 562 nm em espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV-Vis. Para a quantificação, foi preparada um curva de calibração com insulina (PARK *et al.*, 2011).

4.3.6.2 Eficiência de encapsulação medida por CLAE

O protocolo de separação de insulina livre seguiu o previamente descrito no item 3.3.6.1. Após a centrifugação, 250µl do filtrado foram diluídos para 2 mL com tampão fosfato (PBS, pH 7,4). A análise por CLAE foi realizada imediatamente a partir do método analítico anteriormente validado, descrito no item 3.3.5 (DEGIM *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2012).

A eficiência de encapsulação, avaliada tanto por BCA quanto por CLAE, foi calculada de acordo com a Equação 5 para os dois métodos:

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade Total de Insulina} - \text{Quantidade Livre de Insulina}}{\text{Quantidade Total de Insulina}} \times 100$$

(Equação 5)

4.3.7 Análises reológicas

4.3.7.1 Ensaio reológico contínuo

Para os ensaios reológicos das formulações contendo hidrogel de hidroxietilcelulose (HI,HLI,HLI_{TAT} e HLI_{PNT}) foram realizadas análises em triplicata a temperatura de 32±0,2°C e 37±0,2°C utilizando reômetro HR-2 - TA *Instruments* de acordo com Figura 10 com o emprego de geometria cone/placa (ângulo 2°) com diâmetro de 40 mm e *gap* de 52 µm. Alíquotas das formulações foram cuidadosamente colocadas sobre a placa inferior do equipamento a fim de evitar ao máximo o cisalhamento das amostras. Em seguida, aguardou-se 3 minutos para ambientação da

amostra com a temperatura do equipamento para o início da análise. O ensaio reológico contínuo foi realizado para determinar as propriedades de fluxo das formulações utilizando uma taxa de cisalhamento de 0.1 a 100 s⁻¹ para a curva ascendente e de 100 a 0.1 s⁻¹ para a curva descendente, com um tempo total de ensaio de 120 segundos, com a tomada de 24 pontos para cada (MOURTAS *et al.*, 2008).



Figura 10. Reômetro, modelo RS-1 – Haake Rheostress.

Para análise quantitativa das formulações quanto ao comportamento de fluxo, o índice de consistência e o índice de fluxo foram determinados por meio da lei da potência, descrita na Equação 6.

$$\tau = k \cdot \gamma^n \text{ (Equação 6)}$$

Na qual o τ corresponde a tensão de cisalhamento (Pa), γ é a taxa de cisalhamento (1/s); k é o índice de consistência [(Pa. s)ⁿ], e o n indica o índice de fluxo (CALIXTO *et al.*, 2015).

4.3.7.2 Ensaio reológico oscilatório

Os ensaios reológicos oscilatórios das formulações contendo hidrogel de hidroxietilcelulose (HI,HLI,HLI_{TAT} e HLI_{PNT}) foram realizados com a mesma geometria, diâmetro e gap (cone/placa-ângulo 2° / diâmetro de 40 mm / gap de 52 µm) do ensaio reológico contínuo.

Inicialmente, foi realizado o teste de varredura de tensão para determinação da região viscoelástica. Para essa análise foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0.01 a 10 Pa e frequência de 1 Hz.

Após a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, realizou-se o teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para

esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0.01 a 10 Hz, à tensão de 0.3 Pa, nas temperaturas de $32\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $37\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (MOURTAS *et al.*, 2008).

4.3.8 Avaliação da força mucoadesiva

A força mucoadesiva das formulações contendo hidrogel de hidroxietilcelulose (HI, HLI, HLI_{TAT} e HLI_{PNT}) foi avaliada por meio da medida da força máxima e trabalho necessário para destacar as formulações mantidas em contato com uma membrana modelo utilizando para isso o analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems®). Foram utilizadas duas membranas modelo: discos produzidos com a compressão direta de 250 mg de mucina em pó umedecida com 50 μL de dispersão de mucina 8% (p/p), utilizando uma peleteira com diâmetro de 123 mm (BRUSCHI *et al.*, 2007) e mucosas nasais suínas.

No primeiro ensaio, discos foram aderidos horizontalmente em uma prova cilíndrica com mesmo diâmetro com fita adesiva dupla face 3M, conforme Figura 11.



Figura 11. Imagem dos discos de mucina aderidos horizontalmente em prova cilíndrica em contato com formulação.

No segundo ensaio, primeiramente procede-se ao isolamento da mucosa suína (Figura 12) a partir de animais provenientes de abatedouro, segundo a metodologia adaptada de Hägerström e Edsman (2001). A mucosa foi removida com auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica e mantida em banho de gelo imersa em FNS até o momento da análise. Os fragmentos de mucosa nasal suína foram aderidos à prova analítica com auxílio de anéis de borracha. Antes do início do teste, as membranas modelo (disco de mucina e mucosa nasal) já aderidas à prova analítica foram imersas em FNS por 30 s e o excesso retirado com papel absorvente macio. A composição do FNS utilizado foi de 8 % (p/V) de mucina, 7,45 mg/mL de NaCl, 1,29 mg/mL KCl e 0,32 mg/mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH ajustado para 6,0 (CALLENS *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2013).



Figura 12. Corte longitudinal de septo nasal suíno.

Amostras das formulações contendo hidrogel de hidroxietilcelulose (HI,HLI,HLI_{TAT} e HLI_{PNT}) foram previamente acondicionadas em tampa plástica cilíndrica e rasa, sendo colocadas abaixo da prova analítica e mantidas imersas em banho maria à temperatura de $32\pm 0,5$ °C e a temperatura de $37\pm 0,5$ °C. Após atingir as duas temperaturas descritas, o disco de mucina e a mucosa nasal foram colocados em contato com a superfície das formulações e logo em seguida foi aplicada uma força para baixo de 0,1 N durante 30 s para assegurar um contato íntimo entre o disco / mucosa com as formulações. A prova analítica foi então elevada a uma velocidade de 1,0 mm / s e a força mucoadesiva foi determinada a partir do valor resultante da curva força *versus* tempo e os resultados foram obtidos através dos valores médios de cinco replicatas. (GUPTA *et al.*, 2012).

4.3.9 Determinação da seringabilidade

O ensaio de seringabilidade das formulações contendo hidrogel de hidroxietilcelulose (HI,HLI,HLI_{TAT} e HLI_{PNT}) foi adaptado da metodologia descrita em Nunes, 2016, onde foi utilizado o analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems®). Um volume total de 1 mL das formulações descritas acima foi colocado cuidadosamente com o objetivo de evitar a presença de bolhas em uma seringa plásticas de 1 mL (BD Plastipak™). A seringa foi colocada verticalmente sob a sonda, que foi rebaixada até o contato inicial com o êmbolo, conforme Figura 13. O êmbolo da seringa foi movimentado em módulo de compressão a uma velocidade constante de $2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ percorrendo uma distância de 30 mm. O trabalho necessário para a formulação percorrer 30 mm pela seringa foi determinado pela área do gráfico de força versus distância registrada para a compressão do êmbolo. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C e os resultados foram obtidos através dos valores médios de seis replicatas (NUNES *et al.*, 2016).



Figura 13. Fotografia do dispositivo adaptado utilizado para determinação da seringabilidade.

4.3.10 Ensaio de liberação *in vitro*

O perfil de liberação de insulina em solução e incorporadas nas formulações foi realizado no equipamento *Microette Plus* HANSON 0700-1251, constituído por seis células de difusão de Franz de volume aproximado de 7 mL (Figura 14). Foi utilizada membrana sintética de acetato de celulose (12-14kDA) previamente hidratada e solução receptora composta por tampão fosfato (PBS, pH=7,4) sob agitação de 300 rpm. As formulações foram previamente pipetadas (300 μ L) e transferidas para o copo dosador colocado sobre a membrana disposta na célula de difusão de Franz com área de exposição de 1,77cm². Os experimentos foram conduzidos a 32°C para simular a temperatura nasal (KECK *et al.*, 2000; LINDEMANN *et al.*, 2002) com agitação constante de 300 rpm da solução receptora composta por tampão fosfato (PBS, pH=7,4). Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas do compartimento receptor em intervalos pré-determinados (5 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16h e 24h) e volumes de 0,8 mL foram repostos com solução receptora fresca. A insulina liberada das amostras foi quantificada por CLAE a partir do método analítico anteriormente validado (PARK *et al.*, 2011; DEUTEL *et al.*, 2016).

A Equação 7 (USP, 2010), demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular a quantidade liberada (Q real) em determinado tempo:

$$Q = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c$$

(Equação 7)

No qual:

Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) = quantidade permeada no tempo t ;

C_t ($\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{cm}^2$) = concentração obtida no referido tempo t ;

V_r (mL) = volume da solução receptora (7 mL);

C_c ($\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{cm}^2$) = concentração da amostragem coletada anteriormente;

V_c (mL) = volume de amostra coletado;

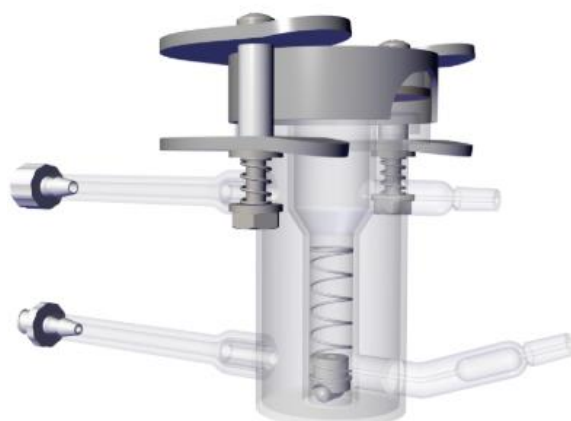


Figura 14. Célula de difusão utilizada para estudos de liberação *in vitro* e permeação em mucosa nasal suína. Disponível em: <<http://www.hansonresearch.com>>. Acesso em dezembro/18.

4.3.10.1 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* da insulina

Com os resultados obtidos foi construído o gráfico do perfil cumulativo de liberação da insulina *versus* tempo. Alguns modelos matemáticos conhecidos na literatura farmacêutica foram aplicados para discutir os mecanismos de liberação, como os modelos de Baker–Londsdale, Primeira-Ordem, Higuchi, Hixon–Crowell, Korsmeyer–Peppas e Weibull (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006; JAIN; JAIN, 2016).

4.3.11 Ensaios de permeação em mucosa nasal suína

Os ensaios de permeação em mucosa nasal suína de insulina em solução e incorporadas nas formulações foi realizado no equipamento *Microette Plus* HANSON 0700-1251, constituído por seis células de difusão de Franz de volume aproximado de 7 mL.

A membrana modelo utilizada foi uma mucosa nasal suína obtida de animais de abatedouro. Para retirada da mucosa, foi seguido o procedimento descrito por Osth, Grasno e Bjork (2002). Resumidamente, as cavidades nasais foram separadas através de uma incisão ao longo do septo

nasal. A mucosa foi removida com auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica curva, mantida em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/V) e armazenadas em refrigerador, na temperatura de 2-8°C (OSTH *et al.*, 2002).

No dia do experimento, as mucosas nasais foram descongeladas e mantidas refrigeradas em gelo, mergulhadas em salina e colocadas nas câmaras de difusão com o lado apical voltado para a câmara doadora e o lado basolateral voltado para a câmara receptora, resultando num fluxo de permeação do lado apical para o basolateral. As formulações foram previamente pipetadas (300µL) e transferidas para o copo dosador colocado sobre a mucosa nasal suína disposta na célula de difusão de Franz com área de exposição de 1,77cm². Os experimentos foram conduzidos a 32°C com agitação constante de 300 rpm da solução receptora composta por tampão fosfato (PBS, pH=7,4). Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas do compartimento receptor em intervalos pré-determinados (5 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16h e 24h) e volumes de 0,8 mL foram repostos com solução receptora fresca. A insulina permeada através da mucosa nasal suína foi quantificada por CLAE a partir do método analítico anteriormente validado (JOSE *et al.*, 2015).

Parâmetros relacionados à permeação foram calculados, como o fluxo no estado de equilíbrio (J, µg/cm.min) o qual foi calculado a partir da porção linear da quantidade permeada por área versus tempo e o coeficiente de permeabilidade aparente (Kp, cm/min), derivados da lei de Fick, de acordo com a Equação 8 (SAMSON *et al.*, 2012; PUND *et al.*, 2013).

$$\boxed{Kp = \frac{J}{C}} \quad (\text{Equação 8})$$

No qual:

Kp = coeficiente de permeabilidade aparente (Kp, cm/min);

J = fluxo no estado de equilíbrio (J, µg/cm.min);

C = concentração do fármaco no veículo (compartimento doador) em contato com a membrana;

4.3.12 Ensaios biológicos *in vivo*

Para todos os ensaios utilizando animais, as solicitações foram encaminhadas para o Comitê de Ética no Uso de Animais da FCFAR/UNESP e aprovadas conforme Parecer nº 04/2018 (ANEXO 1).

Os ensaios biológicos *in vivo* foram realizados em colaboração com o Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

4.3.12.1 Ensaios de análise temporal da presença de insulina na circulação sistêmica em ratos não diabéticos

4.3.12.1.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar não diabéticos (Krauland *et al*, 2004), para avaliação dos níveis de insulina na circulação sistêmica após a administração nasal de insulina nos sistemas de liberação, com peso entre 140-160 g provenientes do Biotério Central de Botucatu, UNESP, mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Análises Clínicas, FCFAr/UNESP. Foram mantidos cinco animais em caixas de polipropileno em condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo de 12 h claro / escuro), com livre acesso a água e ração, durante os 15 dias de experimento.

4.3.12.1.2 Desenho experimental e tratamento

Os animais foram deixados em jejum por 12 h antes do experimento. Antes da aplicação das formulações, 50 μL de sangue foram coletados da veia caudal para verificação da glicemia no tempo 0 (antes da administração nasal e subcutânea das preparações). Os níveis de glicose no sangue foram determinados utilizando o kit comercial denominado Accu-Chek[®] Performa. Na sequência, o sangue foi deixado coagular por 30 min e centrifugado por 10 min a 6400g. O soro foi separado do sobrenadante e estocado a -20°C . Após a determinação do nível de glicose sanguínea e coleta de amostra para quantificação de insulina no tempo 0 (antes da administração nasal e subcutânea das preparações), os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina, nas doses de 90 mg/kg / 10 mg/kg respectivamente, via intraperitoneal. os níveis de insulina foram determinados com kit de ELISA EZRMI-13K-insulina Rato/Camundongo.

Após anestesia, os animais foram tratados de acordo com os grupos abaixo descritos. A dose de insulina a ser administrada subcutaneamente foi de 0,25U/animal (DYER *et al*, 2002). A administração intranasal referente à 2U insulina /formulação/animal foi realizada utilizando uma micropipeta para instilar um volume total de no máximo 100 μL divididos em aplicações de 25 μL introduzidas alternadamente em cada narina. A instilação alternada foi realizada para evitar um extravasamento ou o escoamento da formulação para a via gastrointestinal (KHAFAGY *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2013).

Os animais foram tratados de acordo com os seguintes grupos, utilizando 5 animais por grupo, para avaliação e comparação das alterações dos níveis séricos de insulina, no intervalo de tempo de 0 a 360 minutos após as administrações dos sistemas de liberação:

- I. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com TAT, contendo solução de insulina (HLI_{TAT});
- II. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT, contendo solução de insulina (HLI_{PNT});
- III. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma convencional, contendo solução de insulina (HLI);
- IV. Administração intranasal de hidrogel, contendo solução de insulina (HI_I);
- V. Administração subcutânea 0,25U de insulina (INS_{sub});
- VI. Administração intranasal de solução salina (SS_{nasal});
- VII. Administração intranasal de insulina em solução salina (IS_{nasal});

Os animais foram mantidos em caixas aquecidas para que ocorra vasodilatação periférica e, após um minuto, foi cortado aproximadamente 3 mm da extremidade da cauda, por onde foi coletado o sangue do animal (50 μ L). Amostras de sangue foram colhidas nos tempos 0 (antes dos tratamentos), 60, 120, 180, 240 e 360 minutos para verificar os níveis de insulina sérica através do kit de ELISA EZRMI-13K-insulina Rato/Camundongo e os resultados foram expressos em ng/mL (KHAFAGY *et al.*, 2009).

Ao final do experimento, ocorreu a eutanásia por aprofundamento da anestesia, com a combinação de quetamina 90 mg/kg / xilazina 10 mg/kg administrada por via intraperitoneal, conforme o Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados, Conselho Federal de Medicina Veterinária de 2012 e Resolução Normativa 13/2013.

4.3.12.2 Ensaios das respostas anti-hiperglicêmicas em ratos diabéticos

4.3.12.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 140-160 g provenientes do Biotério Central de Botucatu, UNESP, foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Análises Clínicas, FCFAr/UNESP. Foram mantidos cinco animais em caixas de polipropileno em condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo de 12 h claro / escuro), com livre acesso a água e ração, durante os quinze dias de experimento.

4.3.12.2.2 Indução do diabetes mellitus experimental

O diabetes experimental foi induzido por uma única injeção intravenosa de 40 mg/kg de estreptozotocina (STZ) de peso corporal, dissolvida em tampão de citrato 0,01 M (pH 4,5), em ratos jejuados (12 h de jejum). Todos os animais foram anestesiados com isoflurano (Arcaro *et al*, 2014). Três dias após a administração de STZ, os animais foram distribuídos nos diferentes grupos distribuídos de acordo com valores médios de glicemia e de peso corporal e os ratos com valores de glicemia pós-prandial igual ou superior a 350 mg/dL foram utilizados nos ensaios. Os níveis de glicose no sangue foram determinados, utilizando o kit comercial denominado Accu-Chek® Performa (TRINDER, 1969).

4.3.12.2.3 Desenho experimental e tratamento

Sete dias após o pareamento (dez dias pós-STZ), os animais foram anestesiados (quetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, via intraperitoneal), foi coletada uma amostra de sangue obtida por pequena punção na cauda (50 µL) para verificação da glicemia no tempo 0 (antes da administração nasal e subcutânea das preparações). Em seguida, os animais foram tratados de acordo com os seguintes grupos, utilizando 6 animais por grupo:

- I. Administração intranasal de hidrogel+ lipossoma funcionalizado com TAT, contendo solução de insulina (HLI_{TAT});
- II. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT, contendo solução de insulina (HLI_{PNT});
- III. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma convencional, contendo solução de insulina (HLI);
- IV. Administração intranasal de hidrogel, contendo solução de insulina (HI);
- V. Administração intranasal de insulina em solução salina (INS_{nasal});
- VI. Administração intranasal de solução salina (SS_{nasal});
- VII. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com TAT (HL_{TAT});
- VIII. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT (HL_{PNT});
- IX. Administração subcutânea de 2 U insulina Novolin R® (INS_{sub});
- X. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma branco (HLB);

Após anestesia, os animais foram tratados de acordo com os grupos acima descritos. A dose de insulina a ser administrada subcutaneamente foi de 2U/animal (ARCARO *et al.*, 2014). O volume a

ser administrado por via intranasal referente à 2U insulina /formulação/animal (em solução salina ou nas formulações desenvolvidas) foi de 100µL divididos em aplicações de 25µL introduzidas alternadamente em cada narina, utilizando uma micropipeta para instilar. Esta instilação alternada foi realizada para evitar um extravasamento ou o escoamento da formulação para a via gastrointestinal (MAINARDES *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2013).

Os níveis de glicose no sangue foram verificados nos tempos 0 (antes dos tratamentos), 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 minutos, via punção caudal (50 µL), com o auxílio de utilização de fitas reativas e glicosímetro (FreeStyle[®] Optium Neo) e os resultados foram expressos em mg/dL .

4.3.12.2.4 Alterações na ativação da sinalização da insulina na musculatura esquelética de ratos diabéticos

No tempo de 360 minutos após cada administração realizada, os animais foram eutanasiados por dióxido de carbono (CO₂) via inalatória e músculos tibialis anterior de ratos diabéticos foram imediatamente retirados e mantidos a -80°C antes das análises.

Alterações na ativação da sinalização da insulina em músculos tibialis anterior foram investigadas via estudo da ativação do intermediário AKT, analisando os níveis de fosforilação estimulatória em resíduo de serina-473 (Western blot).

Os músculos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (50 mM; pH 7,4) contendo 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, inibidores de proteases (5 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL de leupeptina, 1 mM de PMSF) e inibidores de fosfatases (10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio). O homogenato foi centrifugado a 14000 g e 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de proteínas (BRADFORD, 1976). Volumes iguais de sobrenadante e tampão da amostra (20% de glicerol, 125 mM de Tris-HCl, 4% SDS, 100 mM de ditiotretitol, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) contendo 100 µg de proteínas foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Em seguida as proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para membranas de nitrocelulose (TOWBIN, 1979).

As membranas foram incubadas a 4°C *overnight* com anticorpos primários específicos: anti-AKT ou anti-fosfo-[Ser-473]-AKT. Anti-alfa-tubulina foi usado como controle interno. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a HRP, seguidas de incubação com substrato quimiluminescente. As bandas geradas foram captadas e analisadas via de scanner de sinal quimiluminescente (C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner, LI-COR).

4.3.13 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância (One-way ANOVA), seguido do teste Student-Newman-Keuls foi utilizado para comparar as diferenças entre os grupos e análise de área sob a curva (AUC). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. As análises foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism[®] 5.01 (GraphPad Software, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparação dos lipossomas incorporados com insulina

Para o desenvolvimento das formulações e antes do início das análises de caracterização, foram realizados ensaios preliminares com a finalidade de se definir: (a) razões molares dos componentes lipídicos; (b) inclusão ou não de indutores de carga positivo (oleilamina) ou negativo (dicetil fosfato); (c) método de preparo com melhor capacidade de encapsulação da insulina; (d) concentração de trabalho dos peptídeos de transdução (TAT e PNT); (e) obtenção do hidrogel e posterior incorporação dos lipossomas contendo insulina para administração nasal.

A fosfatidilcolina (PC) é um dos fosfolipídios utilizados como constituinte principal das bicamadas de lipossomas, por ser o principal componente estrutural da membrana celular. Do ponto de vista biológico, os lipossomas contendo fosfolipídios apresentam vantagens devido à sua biocompatibilidade, particularmente para fins farmacêuticos. A PC aumenta a estabilidade da membrana lipídica e a inclusão de colesterol (CH) na bicamada do lipossoma aumenta a sua estabilidade estrutural (BANGHAM *et al.*, 1965; LASIC, 1998; CHORILLI *et al.*, 2013; ELOY *et al.*, 2017). O DP é um lipídio aniônico que foi utilizado como indutor de carga negativo (PARDAKHTY *et al.*, 2007; CHANNARONG *et al.*, 2011). A OAM é um lipídio catiônico que foi utilizado como indutor de carga positivo (KAOURMA *et al.*, 2005; PETRILLI *et al.*, 2016).

A insulina é uma molécula anfótera, sendo que o seu ponto isoelétrico (pI) está compreendido entre 5,3 e 5,4 e sua carga elétrica geral varia de acordo com o pH do meio (BRANGE *et al.*, 2012). Logo, adicionaram-se os indutores de carga negativo (DP) e positivo (OAM) com a finalidade de observar as interações eletrostáticas entre a insulina e estes indutores e verificar se haveria a redução da agregação e fusão das vesículas, além de observar a influência da eficiência de encapsulação da insulina nos lipossomas aniônicos e catiônicos (BATISTA *et al.*, 2007; FREZARD *et al.*, 2005).

5.2. Caracterização físico-química e estudos de estabilidade dos sistemas desenvolvidos baseados nas medidas de diâmetro hidrodinâmico médio, I_{pd} e potencial zeta

As Figuras de 15 e 16 se referem aos valores obtidos para as medidas de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (I_{pd}) e potencial zeta (PZ) e as análises de estabilidade realizadas nos tempos 24 h, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 dias após o preparo das formulações.

1. Com e sem a adição de insulina;
2. Com e sem a adição de indutores de carga negativo (DP) e positivo (OAM);
3. Utilizando as técnicas de preparo de hidratação do filme lipídico (HFL) ou evaporação de fase reversa (REV);

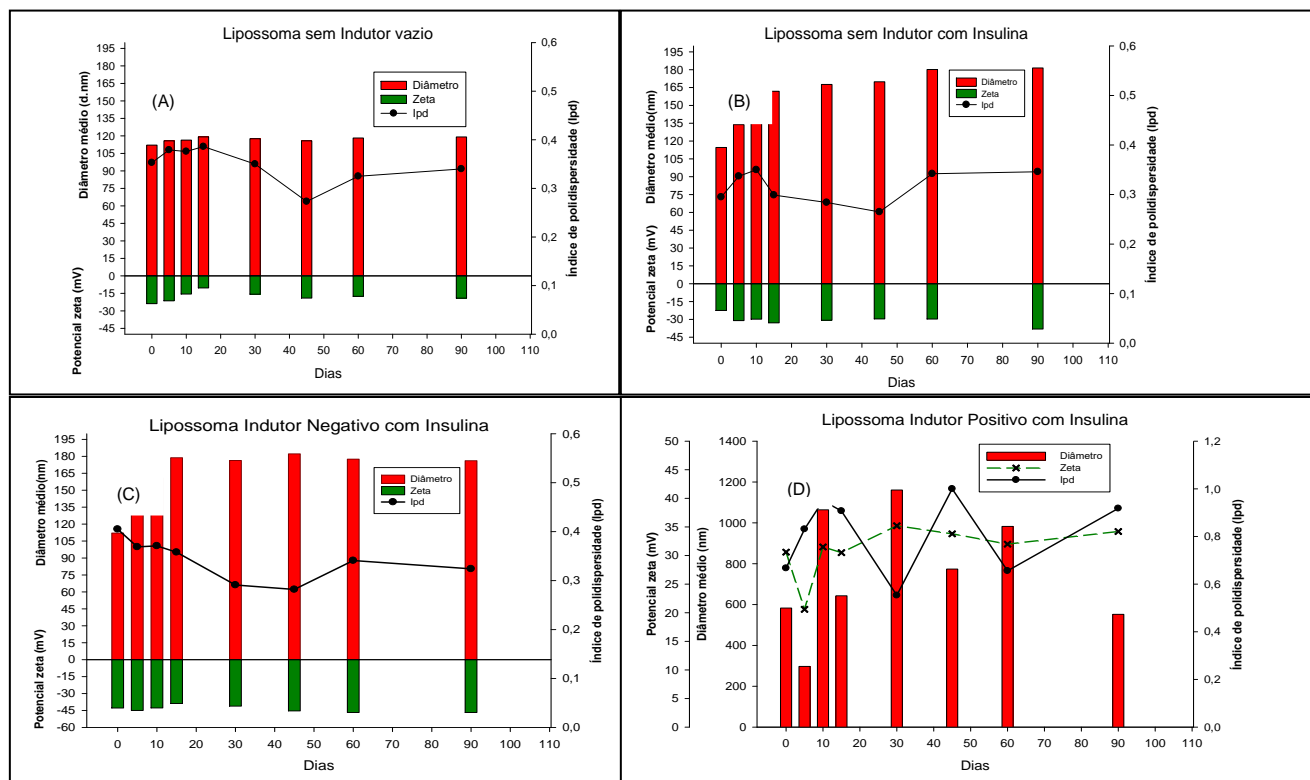


Figura 15. Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e PZ. (A) Formulação A, obtida pelo método HFL; (B) Formulação B, obtida pelo método HFL; (C) Formulação C, obtida pelo método HFL; (D) Formulação D, obtida pelo método HFL.

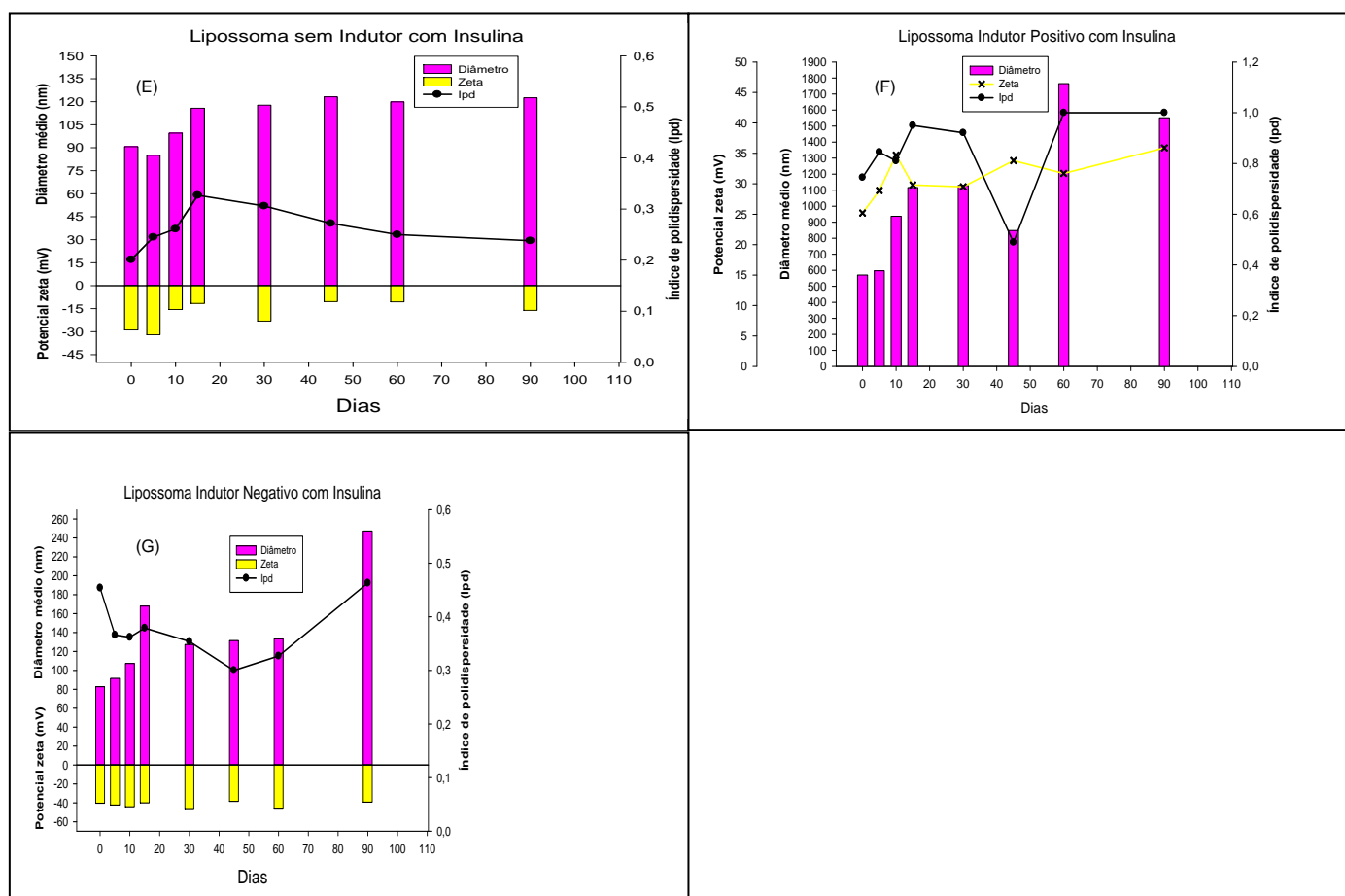


Figura 16. Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e potencial zeta. (E) Formulação B, obtida pelo método REV; (F) Formulação C, obtida pelo método REV; (G) Formulação D, obtida pelo método REV.

Geralmente, os lipossomas são definidos como vesículas esféricas com tamanhos de partículas variando de 30 nm a vários micrômetros. Ademais, os lipossomas podem ter membranas de uma ou duas camadas, sendo respectivamente chamados de unilamelares ou multilamelares (AKBARZADEH *et al.*, 2013). Um parâmetro a ser estudado é o diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), pois o tamanho desejável varia de 50 a 200 nm especialmente quando os lipossomas são destinados ao uso terapêutico (WOODLE; 1995; MONTEIRO *et al.*, 2014; PATIL; JADHAV, 2014).

Outro parâmetro importante que determina a distribuição de tamanhos das partículas é o índice de polidispersão (Ipd) que descreve a intensidade da luz espalhada por várias frações das partículas diferindo em seus tamanhos. Enquanto valores de $Ipd \leq 0,1$ são considerados altamente monodispersos, os valores entre 0,1-0,4 e valores $> 0,4$ são considerados moderadamente e altamente polidispersos, respectivamente (BHATTACHARJEE *et al.*, 2016).

O potencial zeta é a propriedade física de partículas coloidais em suspensão e caracteriza interações resultantes de cargas elétricas (ZETA-METER, 1997). Em geral, para se atingir estabilidade elétrica as partículas podem ser consideradas estáveis quando o valor absoluto do potencial zeta é próximo de 30 mV, em módulo, pois ocorre a repulsão entre as partículas o que

evita a agregação entre as vesículas, enquanto que potenciais entre 5 mV e 15 mV resultam em floculação limitada e potenciais entre 0 mV e 5 mV produzem uma floculação máxima (GUO *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2013).

Analisando os gráficos obtidos (Figuras 15 e 16) em relação às medidas DHM, Ipd e PZ realizadas no período de 90 dias de armazenamento, foi possível observar que a formulação A preparada sem a inclusão de indutor de carga e insulina, apresentou valor de DHM de $116,78 \pm 2,33$ nm. Em relação ao Ipd, todos os valores se encontram abaixo de 0,4, indicando baixa polidispersão. Em relação às medidas de PZ, os valores médios foram de $-17,8 \pm 4,10$ mV, proveniente da carga dos lipídios que compõem a bicamada lipídica.

As formulações B preparadas sem a inclusão do indutor de carga + insulina, obtiveram os valores de DHM $156,93 \pm 3,59$ nm para o método de HFL e $109,32 \pm 5,25$ nm para o método de REV. Em relação ao Ipd, todos os valores se encontram abaixo de 0,4, indicando que a distribuição de tamanho de partícula foi homogênea. Em relação às medidas de PZ, os valores médios ($-30,54 \pm 4,31$ mV, para o método de HFL e $-18,54 \pm 8,46$ mV para o método de REV) proveniente da carga dos lipídios que compõem a bicamada lipídica.

As formulações C preparadas com a inclusão do indutor de carga negativo (DP) + insulina, obtiveram os valores de DHM $162,73 \pm 6,04$ nm para o método de HFL e $136,18 \pm 9,89$ nm para o método de REV. Em relação aos valores de Ipd todos se encontram abaixo de 0,5, sugerindo um possível aumento na heterogeneidade entre os tamanhos das partículas. Em relação às medidas de PZ, os valores médios $-43,60 \pm 2,80$ mV, para o método de HFL e $-42,04 \pm 2,96$ mV para o método de REV, proveniente da adsorção do DP à superfície do lipossoma.

As formulações D preparadas com a inclusão do indutor de carga positivo (OAM) + insulina, obtiveram os maiores de DHM ($757,16 \pm 38,83$ nm para o método de HFL e $1064,55 \pm 39,88$ nm para o método de REV), demonstrando agregação entre as vesículas o que poderia ser explicado pela atração eletrostática da insulina carregada negativamente no pH 7,4, devido ao seu ponto isoelétrico (pI) estar compreendido entre 5,3 e 5,4 e a OAM carregada positivamente. Em relação aos valores de Ipd, todos se encontram acima de 0,7, em decorrência de um elevado grau de heterogeneidade entre os tamanhos das partículas. Em relação às medidas de PZ, $+31,05 \pm 4,56$ mV, para o método de HFL e $-31,16 \pm 3,55$ mV para o método de REV, proveniente da adsorção da OAM à superfície do lipossoma.

Portanto, os valores de DHM das formulações A, B e C preparados tanto pelo método de HFL quanto por REV durante o período de armazenamento de 90 dias, demonstraram-se estáveis visando à futura administração nasal, pois a manutenção do diâmetro das partículas (em torno de 150 nm) torna-se uma forte evidência que a estabilidade da formulação foi mantida (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000). Além disso, Laverman e colaboradores relataram a comparação do

tamanho dos lipossomas de composição lipídica idêntica sobre seu tempo de residência na circulação. Neste estudo, variou-se o diâmetro dos lipossomas de 200 a 400 nm e observou-se uma diferença significativa, visto que os lipossomas grandes foram removidos da corrente sanguínea mais rapidamente pelo sistema reticuloendotelial, com tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) = 0,2 h, comparado com os lipossomas menores que apresentaram $t_{1/2}$ = 1,5 h. Portanto, ajustando seu tamanho para diâmetro médio relativamente pequeno (≈ 100 nm), o tempo de residência dos lipossomas na circulação pode ser aumentado (LAVERMAN *et al.*, 1999).

5.3. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação da insulina utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O método analítico utilizado para a quantificação da insulina foi desenvolvido e validado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Agilent, modelo 1200, segundo metodologia adaptada de Sarmento *et al.* 2006 e os parâmetros utilizados estão demonstrados na Tabela 7. A validação da metodologia analítica foi realizada usando os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, conforme descritos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2017).

Tabela 7. Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica.

Fase móvel	FM: Acetonitrila : Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (60:40, v/v)
Coluna	C18-Luna® Phenomenex, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 μ m de tamanho de partícula
Deteção	214 nm
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 μ L
Temperatura	25°C \pm 1°C
Tempo de retenção da insulina	\pm 4,5 minutos
Tempo de corrida	5 minutos

5.3.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi avaliada pela análise quantitativa, através do cálculo dos coeficientes de variação da assimetria do pico da insulina, fator de cauda, número de pratos teóricos da coluna, tempo de retenção e área do pico principal de seis replicatas de insulina, na concentração de 50 μ g/mL⁻¹. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise da insulina.

Injeções	Tempo de retenção	Área	Assimetria ($\leq 2,0$) ¹	Fator de cauda ($\leq 2,0$) ¹	nº de pratos teóricos (N) (>2000) ¹
1	4,51844	2738,77	0,63802	1,45655	5120
2	4,52293	2737,52	0,63284	1,39788	5062
3	4,52357	2742,63	0,63689	1,39694	5049
4	4,52302	2734,39	0,64771	1,38121	5045
5	4,52519	2749,95	0,63996	1,42387	5124
6	4,52544	2733,27	0,64073	1,41843	5133
Média	4,52	2739,42	0,64	1,41	5089
D.P.R %	0,06	0,22	0,77	1,88	0,80

¹ Valor de referência (FDA, 1994)

Os dados obtidos na verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico (Tabela 8) demonstraram que o método de análise e o equipamento são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, a qual sugere que o fator de cauda e a assimetria do pico deve ser ≤ 2 e o número de pratos teóricos > 2000 . Em geral também é adotado como critério valor de DPR% $\leq 2\%$ para todos os parâmetros testados, conforme descritos pelos guias FDA (1994).

O cromatograma típico obtido pelo método proposto representado na Figura 17 demonstra a resolução e a simetria do pico correspondente à insulina, sendo o seu tempo de retenção em torno de 4,5 minutos.

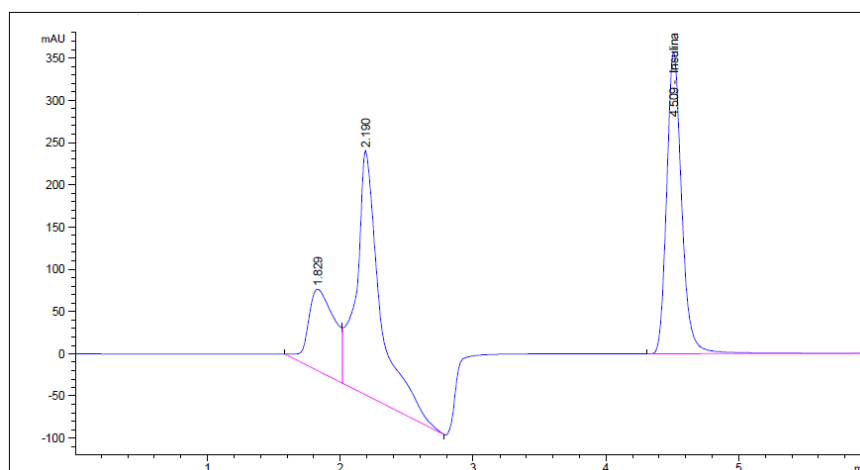


Figura 17. Cromatograma típico de insulina (50 $\mu\text{g/mL}$ -1) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: Acetonitrila: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (60:40, v/v); Coluna C18-Luna® Phenomenex, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 μm ; Vazão de 1,0 mL/min; λ : 214 nm; Injeção: 20 μL ; 25°C.

5.3.2 Seletividade

Neste ensaio injetaram-se separadamente as amostras de acetonitrila, solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%, tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e uma amostra de lipossoma sem a incorporação da insulina, conforme representado na Figura 18. Os ensaios foram realizados em

triplicata e observou-se que todas as amostras injetadas não interferiram na análise, uma vez que não se observou interferência no pico de insulina, com tempo de retenção em aproximadamente 4,5 minutos, conforme demonstrado no ensaio de adequabilidade do sistema cromatográfico.

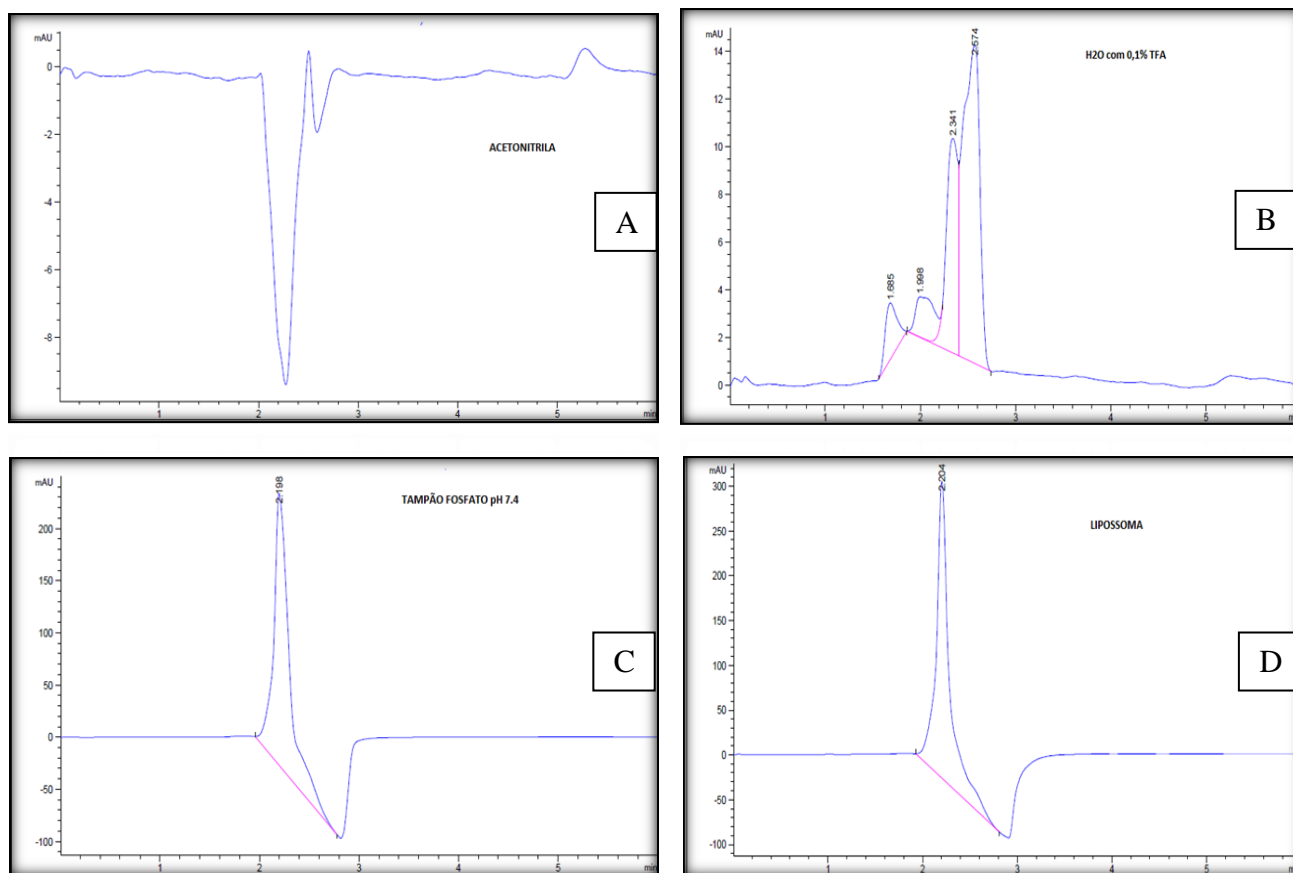


Figura 18. Cromatograma da Acetonitrila (A); H2O c/ 0,1% TFA (60:40, v/v) (B); tampão fosfato (PBS, pH 7,4) (C); lipossoma branco (D), obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: Acetonitrila: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (60:40, v/v); Coluna C18-Luna® Phenomenex, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 µm; Vazão de 1,0 mL/min; λ: 214 nm; Injeção: 20µL; 25°C.

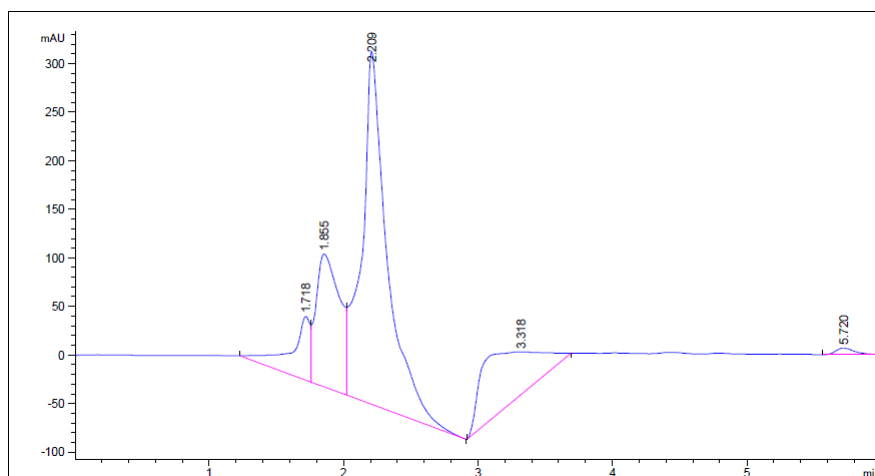


Figura 19. Cromatograma da mucosa nasal suína, obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: Acetonitrila: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (60:40, v/v); Coluna C18-Luna® Phenomenex, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 µm; Vazão de 1,0 mL/min; λ: 214 nm; Injeção: 20µL; 25°C.

A Figura 19 representa a injeção de amostra de mucosa suína nasal não submetida ao teste de permeação e pelo cromatograma não se observa qualquer interferência no pico característico da insulina.

5.3.3 Linearidade

Para a construção da curva analítica foi preparado uma solução estoque de insulina na concentração de $700 \mu\text{g/mL}^{-1}$. A partir desta solução, prepararam-se as seguintes concentrações: 0,5, 1, 5, 20, 40, 50 e $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Para cada concentração foram realizadas três injeções e os resultados médios das áreas dos picos cromatográficos obtidos foram utilizados para o estudo da regressão linear a partir do método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

A curva analítica da insulina baseado três curvas de calibração, demonstrou ser linear ao longo do intervalo proposto ($0,5\text{-}100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) resultando na regressão linear $y = 55,01775x + 36,56067$, com $R^2 = 0,99925$, como particularmente recomendado (EPSHTEIN, 2004) e conforme mostrado na Figura 20.

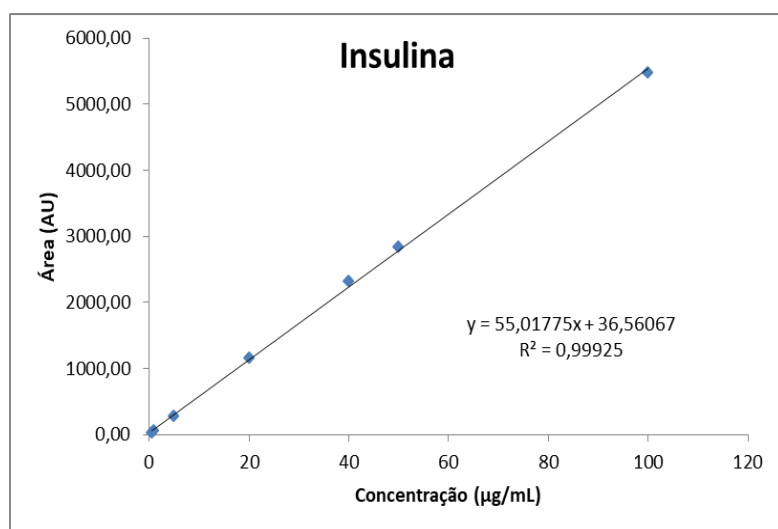


Figura 20. Curva de calibração de insulina obtida por CLAE.

A análise de variância ANOVA comprovou que a regressão linear é significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) e que não existe diferença significativa entre as três curvas analíticas ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) a partir dos dados obtidos no intervalo de 95% de confiança (Tabela 9) (PINTO *et al*, 2017).

A análise estatística comprovou que não existe desvio significativo das linearidades das concentrações utilizadas e que existe regressão linear nos dados obtidos para o limite de confiança de 5%, demonstrando que método empregado é linear na faixa de $0,5$ a $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

Tabela 9. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de insulina por CLAE.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	6	71158775	11859796	717,42	2,85
Regressão Linear	1	70927340	70927340	4290,54	4,60
Desvio da Linearidade	5	231435	46287	2,80	2,96
Dentro (resíduo)	14	231435	16531		
Total	20	71160997			

*Significativo para $p < 0,05\%$

5.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas aos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

5.3.4.1 Repetibilidade

Foram injetadas 6 (seis) réplicas a 100% da concentração do teste individualmente preparadas, expressando-se os resultados com base no DPR%. As injeções foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Determinação da precisão intracorrída (repetibilidade) de insulina por CLAE.

Insulina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Área	Área média	DPR (%)
50	2778,77	2758,25	0,77
	2789,51		
	2752,68		
	2734,23		
	2749,01		
	2745,27		

5.3.4.2 Precisão intermediária

Foram injetadas 6 (seis) réplicas a 100% da concentração do teste individualmente preparadas, expressando-se os resultados com base no DPR%. As injeções foram realizadas em dois dias diferentes e por analistas diferentes (A e B), utilizando o mesmo equipamento. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Determinação da precisão intermediária de insulina por CLAE.

Analista	Insulina ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	Área	Área média	DPR (%)	DPR Geral (%)
A	50	2778,77	2758,25	0,77	1,18
		2789,51			
		2752,68			
		2734,23			
		2749,01			
		2745,27			
B	50	2841,55	2804,84	1,67	
		2788,56			
		2840,80			
		2767,39			
		2852,45			
		2738,28			

O D.P.R % observado para todas as amostras nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foi inferior à 5%, como preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2017), portanto, o método desenvolvido é preciso.

5.3.5 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pela aplicação do método analítico utilizado em relação ao valor teórico real e valores próximos a 100% são desejáveis. A exatidão foi calculada e os valores estão apresentados na Tabela 12, demonstrando que a metodologia analítica desenvolvida é adequada para a quantificação do fármaco.

Tabela 12. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de insulina.

Concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	DPR%	Recuperação %
5	4,88	2,26	93,88
20	19,85	0,27	99,26
50	49,74	1,28	99,61

Na Tabela 13, estão representados os valores obtidos em relação a recuperação da insulina na mucosa nasal suína não submetida ao teste de permeação em mucosa nasal suína. Os dados demonstram que a metodologia analítica desenvolvida também é adequada para a quantificação do fármaco, estando dentro da faixa de 80 – 120%, conforme preconizado em BRASIL, 2017. Além disso, os resultados obtidos foram muito interessantes por se tratar de resultados de recuperação provenientes de um material biológico.

Tabela 13. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de insulina na mucosa nasal suína.

Concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	DPR%	Recuperação %
5	4,07	0,68	81,4
20	17,44	2,51	87,2
50	42,47	0,56	85,0

5.3.6 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são utilizados para medir a sensibilidade do método. O LD representa a menor quantidade do fármaco presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado e o LQ representa a menor quantidade de fármaco na amostra que pode ser medida com precisão e exatidão pelo método desenvolvido escolhido (BRASIL, 2017). Os valores de LD e de LQ calculados foram de $0,097\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e $0,294\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, respectivamente, demonstrando que o método proposto é adequado e seguro para a quantificação e detecção de baixas concentrações de insulina.

5.3.7 Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017). Foi avaliada, variando quatro parâmetros pré-estabelecidos, tais como, fluxo da fase móvel, proporção da fase móvel, temperatura do forno e comprimento de onda (nm). Os resultados obtidos em relação ao DPR % e Recuperação % estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Determinação da robustez do método por CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	50	50 *	50
N	3	3	3
Fluxo FM (mL/min)	0,900	1,00	1,10
DPR (%)	0,60	0,33	0,18
Recuperação (%)	98,8	99,6	104,4
λ máx (nm)	213	214	215
DPR (%)	0,83	0,61	0,34
Recuperação (%)	100,8	101,3	100,3
Proporção F.M (v/v)	61:39	60:40	59:41
DPR (%)	0,05	0,13	0,20
Recuperação (%)	99,3	99,0	98,0
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	24	25	26
DPR (%)	0,58	0,62	0,49
Recuperação (%)	101,3	102,6	99,2

* - Esta coluna refere-se as condições originais do método de análise

De acordo com a Tabela 14, foi possível verificar que o método é robusto, pois mesmo com as variações efetuadas nas condições analíticas, os resultados obtidos de recuperação encontram-se na faixa entre 80-120%, conforme previsto em BRASIL, 2017.

Baseado nos resultados obtidos, o método analítico validado foi utilizado para a quantificação de insulina em amostras provenientes dos ensaios de eficiência de encapsulação, liberação *in vitro* e permeação em mucosa nasal suína.

5.4 Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação (EE) representa a porcentagem de fármaco que permanece dentro do lipossoma em relação à quantidade total adicionada durante o processo de obtenção (PARK *et al.*, 2011). O ensaio de EE foi realizado pelo método indireto, com o objetivo de dosear a insulina livre, onde 1 mL de lipossoma foi centrifugado usando filtro de ultrafiltração Amicon[®] - 100 kDa (3.000 rpm, 10 minutos). Após a centrifugação, 250 μL do filtrado foram diluídos para 2 mL com tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e analisados por CLAE. Optou-se por realizar a quantificação comparativa da insulina utilizando o kit de análise de proteína Pierce BCA e para tanto foram utilizados 100 μL do filtrado (insulina livre) em tubos em replicata.

De acordo com os resultados obtidos na caracterização físico-química e estudos de estabilidade das formulações desenvolvidas e baseados nas medidas de DHM, Ipd e PZ, optou-se por realizar os ensaios de EE% em todas as formulações com o objetivo de verificar quais teriam os maiores resultados em relação a EE.

Tabela 15. Porcentagem de Eficiência de encapsulação (EE%) das formulações quantificadas por BCA.

Formulações	EE%
Lipossoma s/ Ind. + Insulina (Método HFL)	59,42±4,9
Lipossoma c/ Ind. Negativo+ Insulina (Método HFL)	30,18±5,8
Lipossoma c/ Ind. Positivo + Insulina (Método HFL)	49,75±9,6
Lipossoma s/ Ind. + Insulina (Método REV)	50,37±5,5
Lipossoma c/ Ind. Negativo+Insulina (Método REV)	34,87±6,6
Lipossoma c/ Ind. Positivo + Insulina (Método REV)	48,78±8,5

Tabela 16. Porcentagem de Eficiência de encapsulação (EE%) das formulações quantificadas por CLAE.

Formulações	EE%
Lipossoma s/ Ind. + Insulina (Método HFL)	67,19±2,4
Lipossoma c/ Ind. Negativo+ Insulina (Método HFL)	57,04±2,9
Lipossoma c/ Ind. Positivo + Insulina (Método HFL)	60,87±5,1
Lipossoma s/ Ind. + Insulina (Método REV)	64,53±3,6
Lipossoma c/ Ind. Negativo+ Insulina (Método REV)	50,83±3,1
Lipossoma c/ Ind. Positivo + Insulina (Método REV)	52,70±5,5

O maior desafio no desenvolvimento de lipossomas está relacionado à obtenção de eficiência e estabilidade na encapsulação do fármaco (LASIC, 1998). A determinação da EE é essencial uma vez que a eficácia de lipossomas *in vivo*, bem como suas propriedades físico-químicas, depende do total de fármaco incorporado a esses sistemas (DE ARAÚJO LOPES *et al.*, 2013).

A obtenção de porcentagens de EE elevadas é essencial e pode ser obtida pela escolha adequada do método de encapsulação bem como da escolha da composição lipídica que compõe a bicamada. Assim, quanto menor for a quantidade de lipídeo veiculada, menores são os riscos de efeitos colaterais associados aos mesmos (SWARBRICK; BOYLAN, 1994; FRÉZARD *et al.*, 2005).

A porcentagem de EE dos lipossomas (Tabelas 15 e 16) variou de 30,18 a 59,42% quando quantificado pelo método de BCA e de 50,83 a 67,19% quando quantificado pelo método de CLAE. Apesar dos dois métodos de quantificação (BCA e CLAE) de insulina terem demonstrados resultados de EE mais elevados em relação ao método de preparo HFL, optou-se pela quantificação por CLAE por ser mais robusta e confiável e por ter sido um método previamente desenvolvido e validado. Ademais, Zaia e colaboradores demonstraram que o método de BCA possui algumas

desvantagens, como a dependência da temperatura de incubação das amostras, a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas e algumas substâncias podem reagir ou com os íons cobre (reações de óxido-redução, formação de complexos, precipitação) ou com o reagente de BCA e neste sentido alguns lipídios podem reagir com o reagente de BCA e resultar em um resultado falso positivo (ZAIA *et al.*, 1998).

A partir da definição do método de quantificação, neste caso, por CLAE e baseado nos resultados obtidos (Tabela 16) optou-se pelo método de preparo HFL, por apresentar os resultados de EE mais elevados, além de ser um método de preparo amplamente descrito na literatura (BANGHAM *et al.*, 1965; QIN *et al.*, 2011 ; ELOY *et al.*, 2014; SMISTAD *et al.*, 2017).

De acordo com as Tabelas 11 e 12 a EE dos lipossomas aniônicos, constituídos pelo lipídio DP, expressaram os valores de EE% mais baixo quando comparados às demais preparações. Isto se deve ao fato da molécula de insulina estar carregada negativamente em PBS (pH 7,4), devido ao seu ponto isoelétrico (pI) estar compreendido entre 5,3 e 5,4 e a inclusão do lipídio aniônico na formulação deu origem a repulsão eletrostática entre a insulina e o lipossoma ambos carregados negativamente, diminuindo por conseguinte os resultados de EE% no lipossoma. Este resultado também foi observado por Pardakhty e colaboradores que estudaram a encapsulação de insulina em lipossomas preparados pelo método HFL com DP para liberação oral (PARDAKHTY *et al.*, 2007).

Em relação aos lipossomas catiônicos, constituídos pelo lipídio OAM, os resultados obtidos foram menores quando comparados aos lipossomas sem indutor de carga, apesar de que o esperado fosse o aumento na EE% neste tipo de lipossoma, devido à interação eletrostática da insulina carregada negativamente e o lipossoma carregado positivamente, como observado nos estudos de Hosny quando foram incorporados gatifloxacino e ciprofloxacino (ambos carregados negativamente) em hidrogel lipossomal constituídos por esterilamina (indutor positivo) para liberação ocular (HOSNY, 2010a e HOSNY, 2010b). Entretanto, o que se observou foi um alto grau de agregação das vesículas comprovado pelos resultados de DHM e Ipd, causando a instabilidade do sistema e baixa eficiência de encapsulação,

5.5 Funcionalização dos lipossomas com CPPs

Baseados nos resultados obtidos na caracterização físico-química e estudos de estabilidade das formulações desenvolvidas baseadas nas medidas de DH, Ipd e PZ e os dados de eficiência de encapsulação (EE), optou-se por prosseguir com a funcionalização com os peptídeos de transdução TAT e PNT nos lipossomas contendo insulina preparados pelo método HFL e os lipossomas obtidos sem a inclusão do indutor de carga, tais como, DP e OAM..

Com a finalidade de definir qual a concentração mais adequada dos CPPs (TAT e PNT) que deveriam ser utilizadas no momento da funcionalização, decidiu-se construir uma curva de concentração de 0,1 mM a 0,7 mM.

Tabela 17. Resultados das leituras de DHM, Ipd e PZ nas amostras funcionalizadas com concentrações de TAT de 0,1mM a 0,7 mM.

Formulação	Concentração TAT (mM)	DHM (nm)		Ipd		PZ (mV)	
		1º	2º	1º	2º	1º	2º
Lipossoma + Insulina	0,7	373,90	439,60	0,78	0,72	9,41	2,31
	0,6	226,00	209,20	0,76	0,67	-2,44	-1,63
	0,5	317,80	350,40	0,86	0,88	-3,36	-2,66
	0,4	471,60	489,30	0,93	0,86	-4,84	-5,04
	0,35	154,50	478,50	0,67	0,89	-6,26	-5,53
	0,3	176,70	188,50	0,78	0,44	-6,32	-8,76
	0,25	149,10	168,20	0,62	0,57	-6,82	-8,22
	0,2	205,00	168,10	0,81	0,71	-8,02	-8,30
	0,15	130,10	130,10	0,56	0,65	-9,10	-9,10
	0,1	147,20	141,00	0,30	0,28	-10,50	-12,20
sem TAT	104,50	126,90	0,27	0,28	-32,60	-30,00	

Baseados nos resultados obtidos na Tabela 17 observou-se que nas concentrações acima de 0,1 mM foram encontrados valores de Ipd acima de 0,5 em decorrência, de elevado grau de heterogeneidade entre os tamanhos das partículas, devido à intensa interação eletrostática entre as cargas dos CPPs carregados positivamente e a carga do lipossoma contendo insulina carregado negativamente, demonstrado também pela alteração nos valores de PZ. Por isso optou-se por utilizar a concentração de 0,1mM, para prosseguir com a funcionalização dos lipossomas contendo insulina. Kamei e colaboradores em estudo para identificar os CPPs que foram mais eficazes para a absorção de insulina na cavidade intestinal e que não originassem efeitos tóxicos no intestino, também encontraram agregados na mistura física da insulina com o CPP (PNT) dando origem a precipitação em concentrações acima de 0,2 mM de PNT, os pesquisadores demonstraram que isto ocorreu, pois os peptídeos catiônicos interagem com proteínas carregadas negativamente e, conseqüentemente, agregados são formados por neutralização eletrostática (KAMEI *et al.*, 2008).

Tabela 18. Resultados obtidos para as medidas de DHM, Ipd e PZ nas amostras preparadas com e sem a funcionalização.

Formulações	DHM (nm)	Ipd	PZ (mV)
Lipossoma sem Insulina	121,50 ± 1,28	0,316 ± 0,043	-56,20 ± 1,11
Lipossoma + Insulina	97,03 ± 1,85	0,253 ± 0,017	-53,60 ± 3,02
Solução de TAT (0,1mM)	166,00 ± 6,14	0,320 ± 0,046	11,5 ± 6,19
Lipossoma + Insulina+ TAT	104,80± 1,40	0,272 ± 0,009	-10,90± 0,47
Solução de PNT (0,1mM)	187,70 ± 5,87	0,554 ± 0,021	16,8± 3,11
Lipossoma + Insulina + PNT	106,10 ± 1,78	0,265 ± 0,006	-9,05± 0,60

A Tabela 18 demonstra os resultados obtidos para as medidas de DHM, Ipd e PZ nas amostras logo após o seu preparo com e sem a funcionalização, com ambos CPPs preparados na concentração de 0,1 mM.

Os CPPs TAT e PNT possuem carga altamente positiva devido à contribuição de resíduos básicos de aminoácidos, como lisina ou arginina (GUIDOTTI *et al.*, 2017; BAE *et al.*, 2013), o que corrobora aos resultados adquiridos em relação ao PZ, onde houve um decréscimo nos valores de potencial zeta de $-53,60 \pm 3,02$ mV para os lipossomas encapsulados com insulina para $-10,90 \pm 0,47$ mV quando funcionalizados com TAT e $-9,05 \pm 0,60$ mV, quando funcionalizados com PNT.

A Figura 21 se refere aos valores obtidos para as medidas DHM, Ipd e PZ nas análises de estabilidade realizadas nos tempos 24 h, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 dias, após o preparo das formulações.

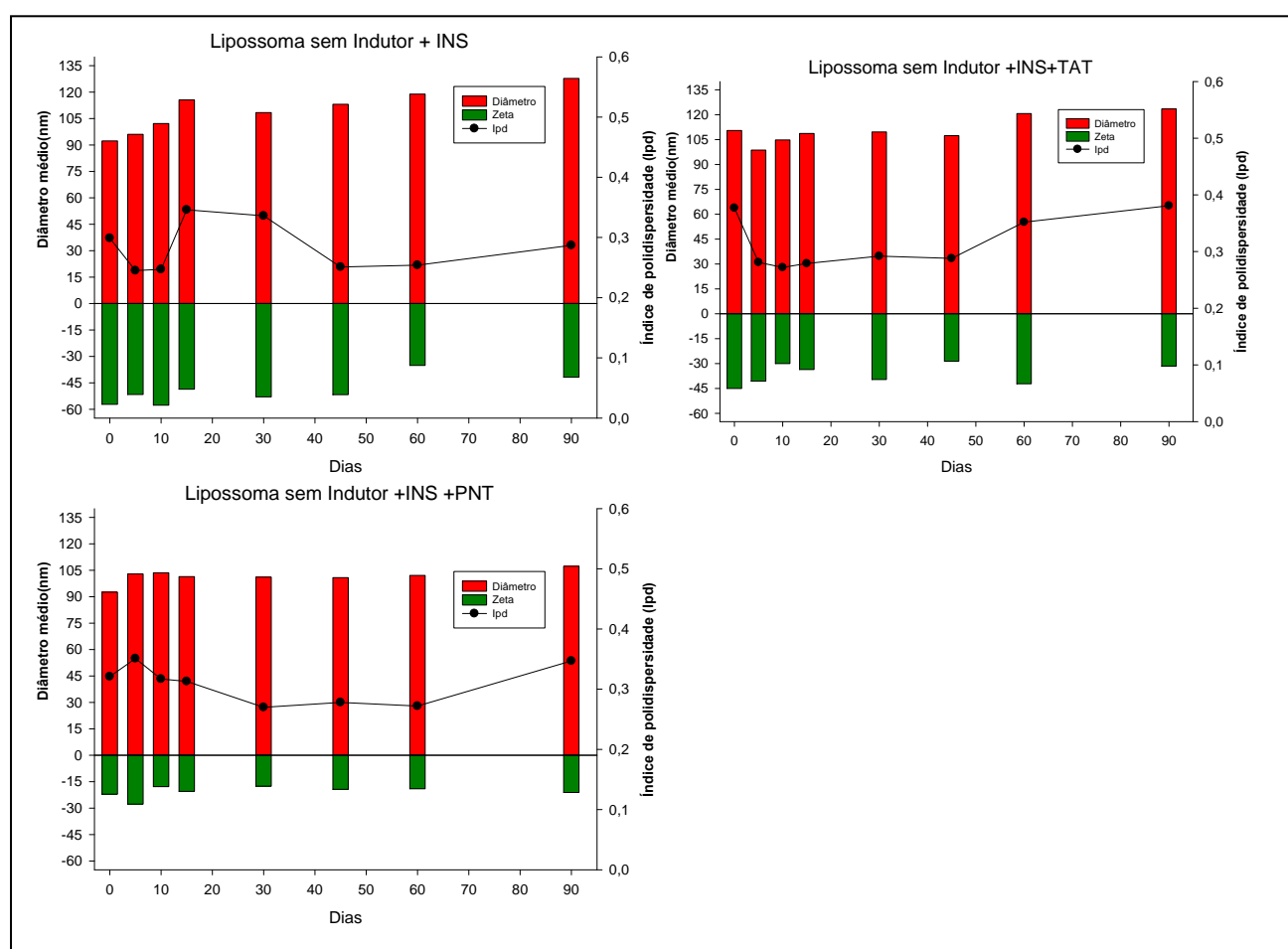


Figura 21 Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd dos lipossomas funcionalizados com CPPs. (A) Lipossoma sem Indutor + Insulina; (B) Lipossoma sem Indutor + Insulina +TAT; (C) Lipossoma sem Indutor + Insulina +PNT.

Analisando os gráficos obtidos em relação às medidas DHM, Ipd e PZ realizadas no período de 90 dias de armazenamento, foi possível observar que a formulação Lipossoma sem Indutor + Insulina apresentou valores de DHM de $127,8 \pm 1,16$ nm. Em relação ao Ipd, todos os valores se encontram abaixo de 0,4, indicando tamanho de partícula distribuído homogeneamente. Em relação

às medidas de PZ, os valores médios foram de $-41,8 \pm 0,95$ mV, proveniente da carga dos lipídios que compõem a bicamada lipídica.

A formulação Lipossoma sem Indutor + Insulina + TAT resultou em valores de DHM de $123,5 \pm 4,12$ nm. Em relação ao Ipd, todos os valores se encontram abaixo de 0,4, indicando que a distribuição de tamanho de partícula foi homogênea. Em relação às medidas de PZ, os valores médios foram $-31,5 \pm 0,74$ mV, proveniente da carga dos lipídios que compõem a bicamada lipídica.

Adicionalmente, a formulação Lipossoma sem Indutor + Insulina + PNT apresentou valores de DHM de $107,3 \pm 1,77$ nm. Em relação ao Ipd, todos os valores se encontram abaixo de 0,4, indicando que a distribuição de tamanho de partícula foi homogênea. Em relação às medidas de PZ, os valores médios foram $-21,1 \pm 2,0$ mV, proveniente da carga dos lipídios que compõem a bicamada lipídica.

Estes resultados obtidos, após as leituras realizadas no período de 90 dias de armazenamento, demonstram que tanto o CPPs TAT quanto o PNT contribuem para o decréscimo dos valores de PZ por possuírem carga altamente positiva, entretanto, não afetaram os valores de DHM e Ipd.

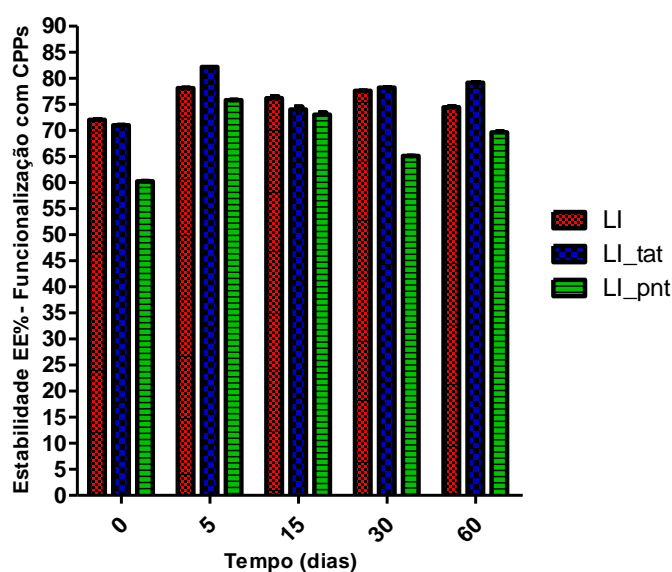


Figura 22. Estabilidade da EE% das formulações funcionalizadas com CPPs.

A Figura 22 se refere aos valores de EE% nas análises de estabilidade realizadas nos tempos 24 h, 5, 15, 30, e 60 dias, após o preparo das formulações descritas na Tabela 18, preparadas pelo método HFL.

De acordo com os valores de EE% obtidos, observa-se que os lipossomas contendo insulina funcionalizados com PNT possuem os menores valores de EE% nas medições que ocorreram em 30

e 60 dias, sugere-se que isto se deve a complexação que pode ter ocorrido entre este CPP e a insulina, o que pode ter dificultado sua encapsulação no lipossoma.

Zhu e colaboradores desenvolveram um nano-complexos funcionalizado com PNT para promover a liberação da insulina através da mucosa intestinal, com a finalidade de melhorar a estabilidade do complexo e a permeabilidade na mucosa intestinal e obtiveram uma EE de 96,2% e DHM de 101,2 nm (ZHU *et al.*, 2013).

5.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para fornecer informações mais detalhadas sobre a morfologia dos lipossomas e tem como finalidade a caracterização desses sistemas mediante a avaliação de parâmetros como lamelaridade e diâmetro, bem como a observação de alterações relacionadas aos fenômenos de agregação e fusão das partículas. Entretanto, o processo de desidratação durante o preparo da amostra pode causar o encolhimento da partícula e distorção no diâmetro e o pré-tratamento da amostra com corantes específicos pode gerar artefatos e causar alterações na estrutura original vesicular (NEW, 1990; BIBI *et al.*, 2011; PATIL; JADHAV, 2014).

A Figura 23 corresponde às imagens obtidas dos lipossomas preparados sem a adição de insulina (L), lipossomas preparados com a adição de insulina (LI), lipossomas preparados com a adição de insulina funcionalizados com TAT (LI_{TAT}) e lipossomas preparados com a adição de insulina funcionalizados com PNT (LI_{PNT}), respectivamente.

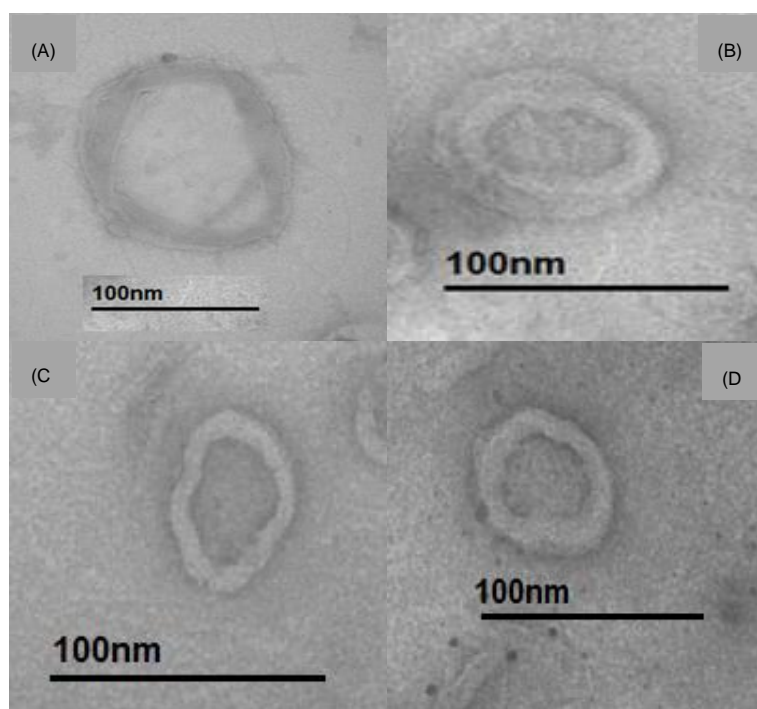


Figura 23. Imagens de MET dos lipossomas funcionalizados com CPPs. (A) - Lipossoma sem a adição de Insulina (L); (B)- Lipossoma com a adição de Insulina – (LI); (C)- Lipossoma com a adição de Insulina e adição de TAT - (LI_{TAT}); (D)- Lipossoma com a adição de Insulina e adição de PNT - (LI_{PNT}). Aumento de 100x.

As imagens obtidas por MET para as formulações (L), (LI), (LI_{TAT}) e (LI_{PNT}) (Figura 17) permitem a visualização de vesículas esféricas com diâmetro de 150 nm, 100 nm, 80 nm e 80 nm. Os diâmetros oriundos do MET se apresentaram um pouco menores quando comparados com as leituras provenientes da técnica de espalhamento de luz dinâmico. Sugere-se que este tipo de diferença ocorre, pois a técnica de espalhamento de luz dinâmico se baseia na leitura de amostras com partículas dispersas, enquanto que as amostras utilizadas no MET são secas sob condição de vácuo e é medida a área de superfície estabelecida em quanto dos elétrons incidentes foram transmitidos através da amostra e desta maneira o tamanho obtido pela técnica de espalhamento de luz dinâmica é geralmente maior que o MET. Este tipo de resultado também foi descrito em estudo de Bhattacharjee (BHATTACHARJEE *et al.*, 2016).

A formulação L possui característica de vesículas multilamelares (MLV), onde as vesículas têm uma estrutura em forma de cebola. Enquanto que as formulações (LI), (LI_{TAT}) e (LI_{PNT}) possui característica de vesículas unilamelares pequenas (SUV) de forma esférica e com alta integridade estrutural (MERTINS *et. al*, 2005; AKBARZADEH *et al.*, 2013; HADIAN *et al.*, 2014).

5.7 Preparação do Hidrogel

O hidrogel de hidroxietilcelulose (HEC) foi preparado na concentração de 2% (m/v) em água Milli-Q e não apresentou separação de fases no período de 30 dias de armazenamento, permanecendo com aspecto homogêneo e translúcido. O HEC foi escolhido por ser um polímero não iônico derivado da celulose, solúvel em água e por ser amplamente utilizado como agente espessante, proporcionando estabilidade as preparações farmacêuticas e como matriz em sistemas de liberação controlada, além de conferir viscosidade adequada às formulações e assim aumentar o tempo de permanência na mucosa nasal. Posteriormente foi adicionada a dispersão lipossomal contendo insulina funcionalizados com peptídeos de transdução e o aspecto continuou homogêneo e translúcido (HOSNY, 2010a ; HOSNY, 2010b; RITTHIDEJ, 2011; SMISTAD *et al.*, 2017).

5.8 Dicroísmo circular (DC)

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica espectroscópica bem conhecida para estudar grande variedade de moléculas quirais, em particular proteínas e peptídeos em solução (SILIGARDI *et al.*, 2014) O CD mede a diferença absorção da luz circularmente polarizada à direita e a esquerda e por cromóforos que possuem quiralidade intrínseca ou estão localizados em condições quirais (VERLI, 2014). Proteínas possuem um número de cromóforos que podem originar um sinal de DC. Na região do UV (240-180nm), o espectro de DC pode ser analisado para

dar informações no que diz respeito às características de estrutura secundária, como por exemplo, α -hélice, folha- β e randômica (KELLY *et al.*, 2005).

Foram utilizados como referência para a análise, espectros representados na Figura 24, que demonstram as diferentes formas espectrais de proteínas, referente às estruturas de proteínas secundárias. A curva (a) representa o espectro característico de uma proteína alfa-hélice, onde apresenta uma banda positiva em torno de 198 nm e duas bandas negativas em torno de 208 nm e 222 nm. A curva (b) representa o espectro característico de uma proteína folha-beta, onde apresenta uma banda positiva em torno de 196 nm e outra negativa em torno 218 nm. Já a curva (c) representa o espectro característico de uma proteína de estrutura irregular (desordenada), onde apresenta uma banda negativa em torno 202 nm (VERLI, 2014).

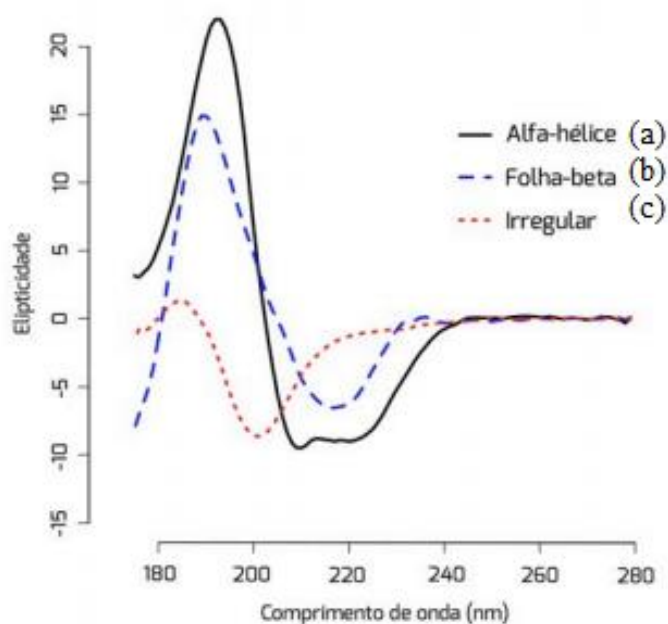


Figura 24. Espectros de DC de estruturas do tipo α -hélices, folhas- β e estruturas irregulares. Fonte: Verli, 2014

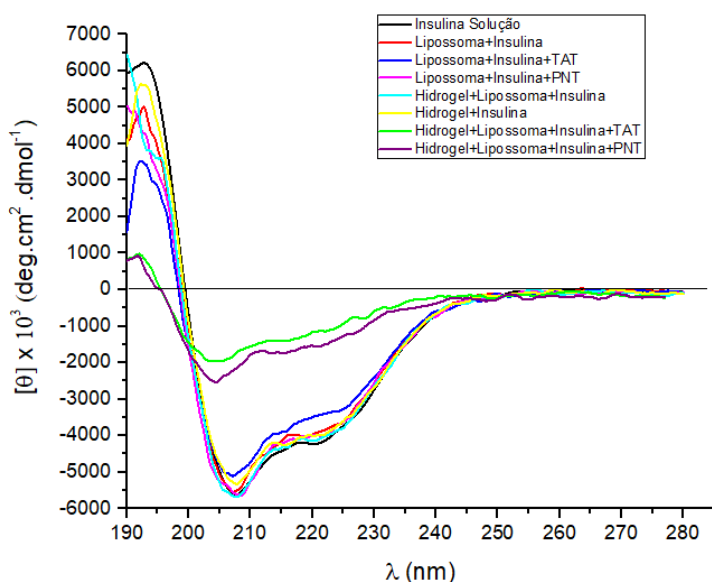


Figura 25. Espectros de DC das amostras analisadas antes do ensaio de liberação *in vitro*.

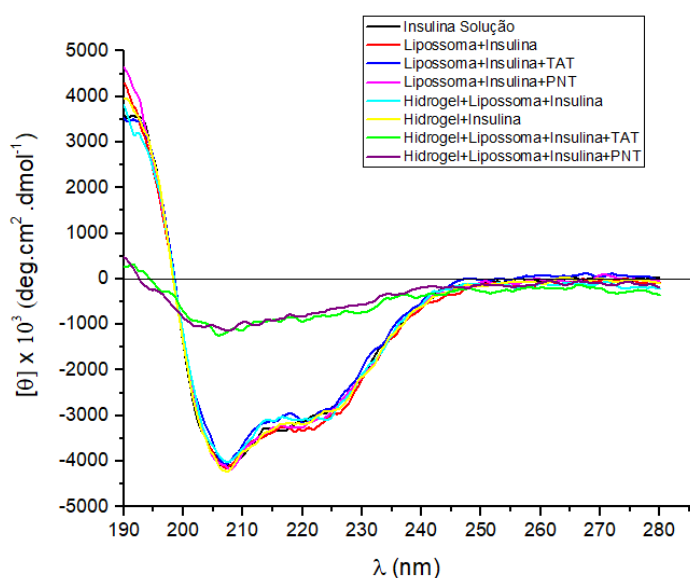


Figura 26. Espectros de DC das amostras analisadas depois do ensaio de liberação *in vitro*.

Foram obtidos os espectros de DC, conforme identificados nas Figuras 25 e 26 das formulações listadas abaixo:

- I. Insulina em solução (IS);
- II. Lipossoma + solução de Insulina (LI);
- III. Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (LI_{TAT});
- IV. Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (LI_{PNT});
- V. Hidrogel + solução de Insulina (HI);
- VI. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina (HLI);
- VII. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT});
- VIII. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT});

Estes espectros de DC foram realizados nas sete formulações listadas em dois momentos distintos, sendo o primeiro deles nas formulações recém-preparadas (Figura 25) e em um segundo momento nas mesmas formulações que foram submetidas ao ensaio de liberação *in vitro* (Figura 20), onde se coletou uma alíquota no tempo de 12 h e analisou-se por CLAE a quantidade de insulina liberada e logo em seguida obtiveram-se os espectros de DC.

Os resultados obtidos na Figura 25 demonstram que a integridade e a estabilidade da insulina após o aprisionamento nas formulações desenvolvidas foi preservada, quando comparada com a insulina em solução. Os espectros de DC das amostras LI, LI_{TAT}, LI_{PNT}, HI e HLI mostraram uma banda positiva em torno de 198 nm e duas bandas negativas em torno de 208 nm e 222 nm, típica da estrutura de uma proteína alfa-hélice o que corrobora aos resultados de outros pesquisadores (TIMASHEFF *et al.*, 1971; CHEN *et al.*, 1974; NIU *et al.*, 2011; ANDREANI *et al.*, 2015). Baseado nestes resultados e apesar da absorção da luz polarizada nas formulações desenvolvidas ter sido bem menor e com isso o sinal ter ficado menos intenso, sugere-se que não houve diferença na estrutura proteica observada entre as medidas realizadas, conforme também observado em um estudo realizado por Park e colaboradores (PARK *et al.*, 2011).

Os resultados das amostras LI, LI_{TAT}, LI_{PNT}, HI e HLI obtidos na Figura 26 demonstram que a integridade e a estabilidade da insulina após as formulações terem sido submetidas aos ensaios de liberação *in vitro* também foi preservada, quando comparada com a insulina em solução, possuindo as mesmas bandas em 198 nm e 208 a 222 nm, entretanto o sinal observado foi menor em relação ao sinal obtido nos espectros de DC nas formulações recém-preparadas e que não foram submetidas aos ensaios de liberação *in vitro*.

As amostras HLI_{TAT} e HLI_{PNT} das Figuras 25 e 26 demonstraram as mesmas bandas em 198 nm e 208 a 222 nm, porém bem menos intensas quando comparada com os espectros de DC das demais amostras estudadas, isto sugere que a intensa interação eletrostática dos CPPs carregados positivamente com a insulina carregada negativamente, dando origem ao complexo CPPs + insulina, pode ter afetado a integridade e a estabilidade da proteína, o que compromete sua ação.

5.9 Microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC)

O nano DSC constitui uma técnica analítica para fornecer informações detalhadas sobre a temperatura de transição, assim como coletar informações sobre a termodinâmica do estado nativo e desnaturado da proteína baseado na capacidade calorífica da amostra em função da temperatura, além de verificar seu estado de associação (SARMENTO *et al.*, 2006a; ANDREANI *et al.*, 2015).

Foram realizadas medidas microcalorimétricas das seguintes amostras listadas abaixo:

- I. Insulina em solução (IS);
- II. Lipossoma branco (LB);
- III. Hidrogel branco (HB);
- IV. Hidrogel + Lipossoma (HL);
- V. Lipossoma + solução de Insulina (LI);
- VI. Hidrogel + solução de Insulina (HI);
- VII. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina (HLI);
- VIII. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT});
- IX. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT});

Tabela 19. Parâmetros calorimétricos das amostras testadas. Temperaturas de pico (T_{max}) e variações de entalpia (ΔH) nos termogramas de nano DSC coletados.

Amostras	T_{max} ($^{\circ}C$)	ΔH ($kJ\ mol^{-1}$)
	73,98	25,14
IS	86,26	25,34
	88,92	-28,18
LB	75,06	-18,74
	72,20	4,60
LI	83,38	9,16
	87,44	19,69
	76,11	15,18
HI	88,18	7,37
	90,56	-11,30
HLI	73,14	23,35
HLI _{TAT}	73,69	13,99
HLI _{PNT}	72,19	17,22

A Tabela 19 resume os resultados termodinâmicos das amostras analisadas, onde T_{max} é definido como o pico máximo e ΔH refere-se à variação de entalpia associada a cada pico obtido. As curvas foram registradas a partir de 25 ° C a 100 ° C na taxa de aquecimento 1°C/ min., o que é suficiente para registrar a ocorrência de desnaturação da insulina.

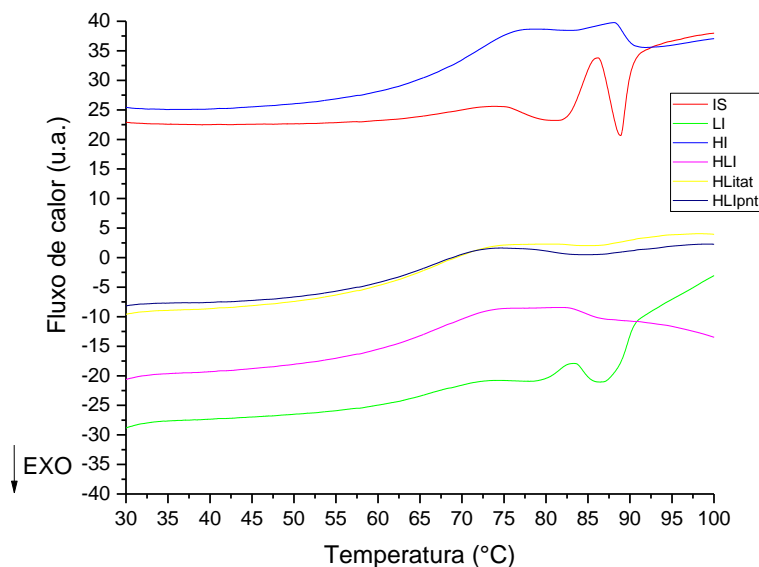


Figura 27. Curvas de microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC) de IS; LI; HI; HLI; HLI_{TAT}; HLI_{PNT}, aquecidas de 25 a 100 °C.

Conforme Figura 27 e Tabela 19, a curva de nano DSC revelou três eventos térmicos, sendo dois picos endotérmicos da solução de insulina, onde o primeiro ocorreu a 73,98 °C ($\Delta H = 25,14 \text{ kJ mol}^{-1}$) e o segundo a 86,26 °C ($\Delta H = 25,34 \text{ kJ mol}^{-1}$) e um pico exotérmico a 88,92 °C ($\Delta H = -28,18 \text{ kJ mol}^{-1}$). Os dois picos endotérmicos encontrados seguidos de pico exotérmico podem ser atribuídos ao processo de desnaturação protéica seguida de agregação, conforme elucidado no estudo de Sarmento e colaboradores (SARMENTO *et al.*, 2006). Estes tipos de eventos também foram encontrados por Huus e colaboradores ao testar a estabilidade térmica da insulina humana por DSC e DC em função da relação zinco / proteína com o objetivo de elucidar os processos de dissociação e desdobramento da insulina em diferentes estados de associação (HUUS *et al.*, 2005). Quando a insulina foi associado ao lipossoma, ocorreu o deslocamento dos picos endotérmicos (72,20 °C / $\Delta H = 4,60 \text{ kJ mol}^{-1}$ e 83,38 °C / $\Delta H = 9,16 \text{ kJ mol}^{-1}$) e do pico exotérmico (87,44 °C / $\Delta H = -19,69 \text{ kJ mol}^{-1}$) para temperaturas mais baixas o que pode ser uma consequência da interação entre a proteína e a estrutura lipídica do lipossoma. No estudo de Biltonen e Lichtenberg, foi demonstrado que as interações fármaco-lipídico, naturalmente, resultam na alteração dos termogramas dos lipossomas e nas temperaturas de transição térmica (T_m) e na entalpia (ΔH) (BILTONEN; LICHTENBERG, 1993). Onde se sugere que o lipossoma pode diminuir a estabilidade térmica da insulina, demonstrado pela diminuição do T_{max} . Entretanto, a associação da insulina ao hidrogel aumentou a estabilidade térmica da insulina, por ter havido o aumento do T_{max} dos picos endotérmicos (76,11 °C / $\Delta H = 15,18 \text{ kJ mol}^{-1}$ e 88,18 °C / $\Delta H = 7,37 \text{ kJ mol}^{-1}$) e do pico exotérmico (90,56 °C / $\Delta H = -11,30 \text{ kJ mol}^{-1}$). Por outro lado, quando a insulina foi associada aos hidrogéis + lipossomas funcionalizados com TAT e PNT, um pico endotérmico e o pico

exotérmico desapareceram, o que sugere que este tipo de associação pode ter movido estes picos para temperaturas mais altas, acima da faixa de condições experimentais (100°C), aumentando assim a estabilidade térmica da proteína.

Estes resultados obtidos corroboram aos achados por Andreani e colaboradores e Gatti e colaboradores quando a insulina foi associada à nanopartículas poliméricas. Andreani e colaboradores, utilizaram o ensaio de nano DSC para coletar informações sobre a interação entre o modelo de nanopartículas e biomembranas e verificar a estabilidade térmica da insulina dissolvida em soluções poliméricas para produção de nanopartículas de sílica (SiNP), sendo que a SiNP alterou o pico endotérmico da insulina para temperaturas mais altas (ANDREANI *et al.*, 2015). Enquanto que, Gatti e colaboradores demonstraram que a insulina parecia ser parcialmente protegida da degradação quando encapsulada em nanopartículas poliméricas, de acordo com o ensaio de nano DSC realizados (GATTI *et al.*, 2018).

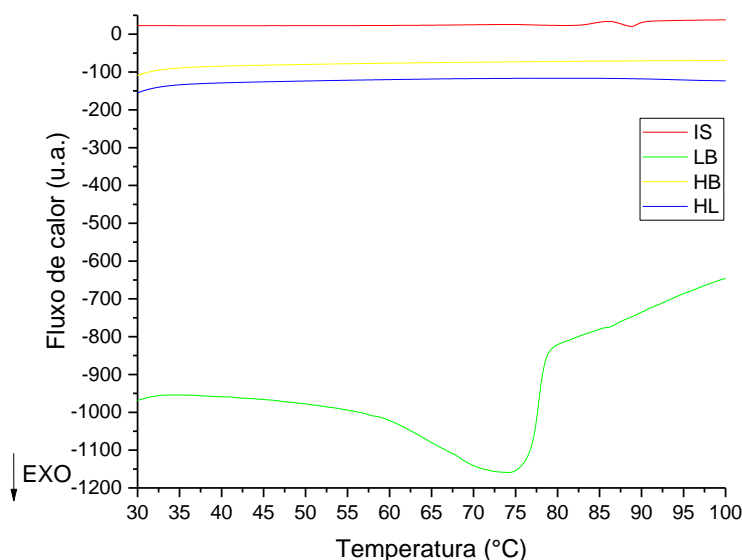


Figura 28. Curvas de microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC) de IS; LB; HB e HL, aquecidas de 25 a 100 ° C.

De acordo com a Figura 28, a curva de nano DSC do lipossoma branco (LB) revelou apenas um evento térmico, sendo um pico exotérmico na temperatura de 75,06 °C ($\Delta H = -18,74 \text{ kJ mol}^{-1}$), onde sugere-se que pode ter evidenciado à presença de uma fase lamelar quasicristalina (características intermediárias entre as fases lamelar $L\beta$ e L_c) que consiste em uma estrutura com grupos de cabeça altamente ordenados, como na fase L_c , mas com cadeias de hidrocarbonetos mais desordenadas na região apolar da bicamada do lipossoma, como na fase $L\beta$, conforme também observado por Yokota e colaboradores (YOKOTA, *et al.*, 2012). Já nas curvas de nano DSC do hidrogel branco (HB) e hidrogel + lipossoma (HL) não foram observados eventos térmicos,

indicando que os eventos ocorram em temperaturas acima da faixa de condições experimentais (100 ° C).

5.10 Análises reológicas

O termo reologia pode ser definido como a ciência que estuda o escoamento da matéria. Entretanto, a forma mais conveniente e completa de defini-la seria como a ciência que estuda a deformação e o fluxo da matéria. A reologia é uma área da física que analisa as deformações ou as tensões de um material provocadas pela aplicação de uma tensão ou deformação (CASTRO *et al.*, 2001; SCHRAMM, 2006).

5.10.1 Ensaio reológico contínuo

As curvas de fluxo e de viscosidade foram obtidas pela determinação da tensão de cisalhamento e da viscosidade em função da taxa de cisalhamento, respectivamente. A taxa variou entre 0,1 e 100 s⁻¹ (curva ascendente) e entre 100 e 0,1 s⁻¹ (curva descendente). O tempo total de análise (curvas ascendente e descendente) com um tempo total de ensaio de 120 segundos, com a tomada de 24 pontos para cada.

A curva ascendente que corresponde ao comportamento de fluxo do material quando se aumenta a taxa de cisalhamento sobre ele e permite classifica-lo o fluxo em Newtoniano ou não Newtoniano. O fluxo não Newtoniano pode ser do tipo pseudoplástico, dilatante ou plástico. Enquanto que a curva descendente corresponde ao comportamento de fluxo desse material quando se diminui a taxa de cisalhamento e o classifica quanto à tixotropia ou reopexia (SCHRAMM, 2006).

Foram realizadas medidas reológicas de fluxo (Figura 29) e de viscosidade (Figura 30), das formulações listadas abaixo, contendo hidrogel de HEC a 2%. As medidas foram realizadas em triplicata.

- I. Hidrogel Puro;
 - II. Hidrogel + solução de Insulina (HI);
 - III. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina (HLI);
 - IV. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT});
 - V. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT});
-

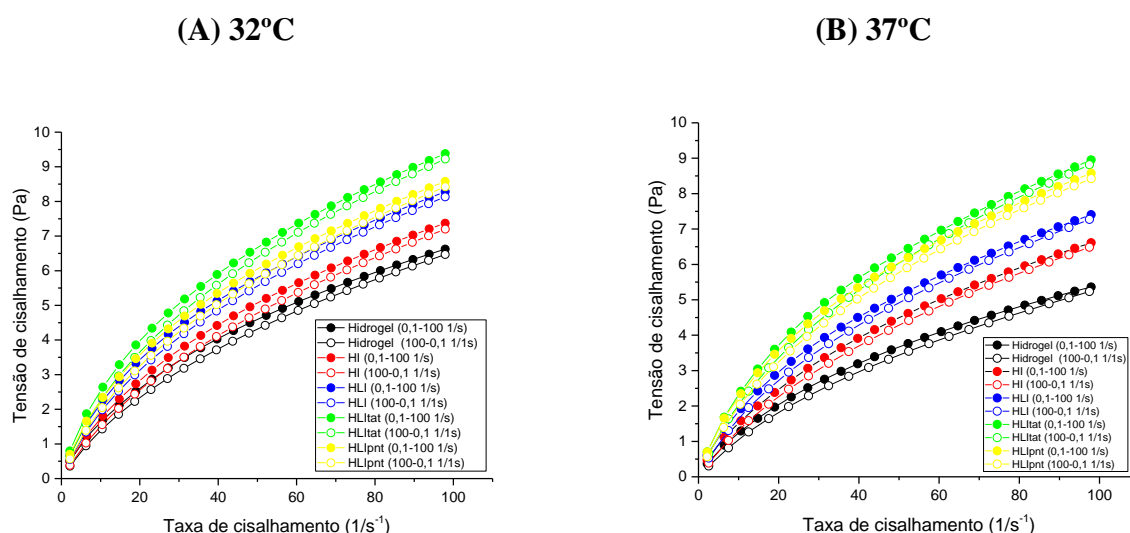


Figura 29. Reogramas de fluxo das formulações a temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (A) e $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (B). Curvas ascendentes (símbolos cheios) e as curvas descendentes (símbolos vazios) ($n=3$).

O gel de HEC (Natrosol[®]) é formado a partir da reação da celulose com o óxido de etileno e vem sendo amplamente utilizada como agente suspensor e estabilizante, agente de consistência para emulsões e agente formador de gel não-iônico. Dentre as suas propriedades físico-químicas destacam-se a estabilidade em uma ampla faixa de pH (a viscosidade sofre pequenas alterações entre pH 2-12), a compatibilidade com substâncias aniônicas, não-iônicas, anfotéricas e catiônicas, a possibilidade de obtenção do gel tanto à frio quanto à quente e não requer a utilização de neutralizantes. Comporta-se como fluido não-newtoniano com perfil reológico pseudoplástico (BRAUN; ROSEN, 2000).

Analisando os reogramas (Figura 29), observa-se que as formulações preparadas à base do gel composto por HEC a 2%, contendo insulina lipossomas + insulina e lipossomas + insulina funcionalizados com os CPPs TAT e PNT apresentaram comportamento reológico de fluidos pseudoplástico ($n < 1$) (Tabela 20) nas temperaturas de 32°C e de 37°C . Percebe-se também que a incorporação dos lipossomas (HLI, HLI_{TAT} e HLI_{PNT}) nos hidrogéis não alterou o comportamento pseudoplástico original característico do hidrogel de HEC (Hidrogel Puro).

Tabela 20. Valores de índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) e regressão linear (R) a temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ($n=3$).

Formulações	32°C			37°C		
	n	K	R	n	K	R
Hidrogel Puro	0,59146	0,44693	0,99785	0,61356	0,32728	0,99791
HI	0,60650	0,46455	0,99768	0,61916	0,39254	0,99829
HLI	0,56480	0,62962	0,99772	0,58344	0,51663	0,99823
HLI _{TAT}	0,55209	0,75802	0,99731	0,56237	0,68899	0,99670
HLI _{PNT}	0,56144	0,66301	0,99737	0,56329	0,55264	0,99789

Conforme resultados apresentados na Tabela 20, os valores dos coeficientes de regressão linear obtido dos hidrogéis foram superiores a 0,99 em todas as formulações analisadas. Os índices de fluxo (n) obtidos foram inferiores a 1, estando de acordo com as características de fluido não newtonianos com comportamento pseudoplástico. Pode-se perceber que os valores de K na temperatura de 37°C são menores quando comparados as medidas realizadas na temperatura de 32°C.

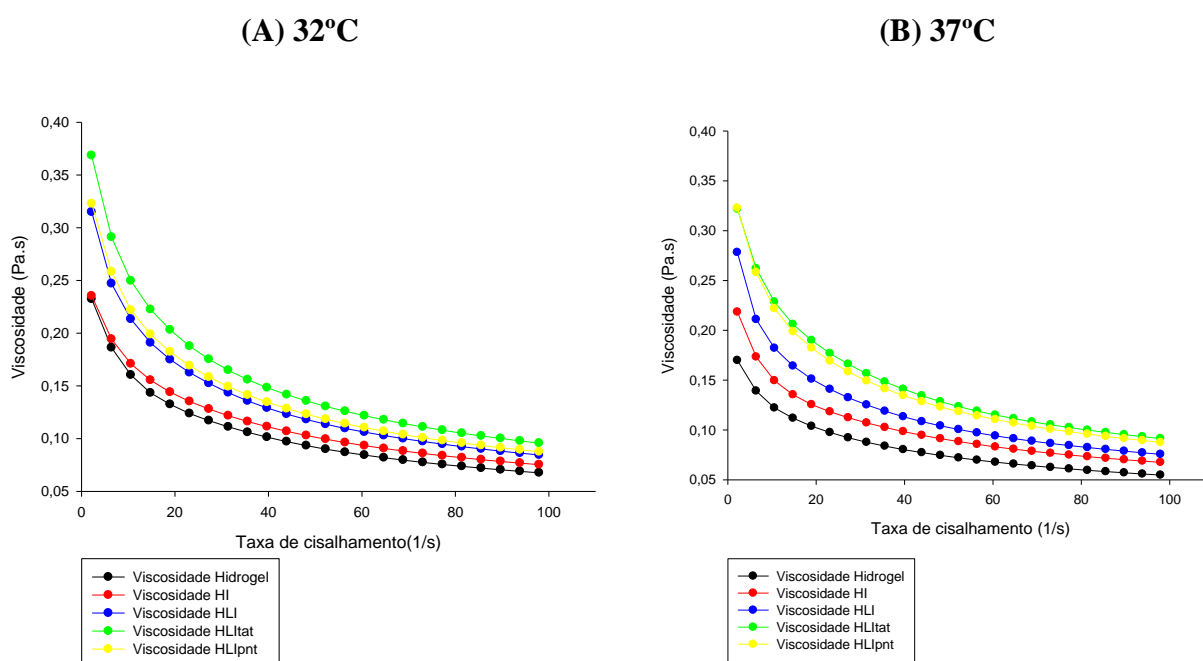


Figura 30. Viscosidades das formulações a temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (A) e $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (B) ($n=3$).

Em relação às medidas de viscosidade (Figura 30) observa-se que quando se aumenta a taxa de cisalhamento os valores de viscosidade diminuem para todas as formulações testadas tanto na temperatura de 32°C como a 37°C preparadas à base do gel composto por HEC a 2%. Este tipo de comportamento é característico de fluidos não newtonianos com comportamento pseudoplástico conforme demonstrado nas curvas da Figura 23 e também foi verificado por Nemen e Lemos-Senna que testaram hidrogéis de HEC puro e associados a diferentes nanocarreadores lipídicos em que as amostras compostas apenas por hidrogéis de HEC exibiram a redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (NEMEN *et al.*, 2011). O aumento da taxa de cisalhamento neste caso pode causar o afinamento do fluxo, conhecido por shear thinning, onde favorece as interações intermoleculares que causam resistência ao fluxo tornando-as menores (SCHRAMM, 2006). Por outro lado, observa-se que as viscosidades iniciais de todas as formulações testadas (HI, HLI, HLI_{TAT} e HLI_{PNT}) foram maiores quando comparadas com hidrogel puro, este tipo de comportamento também foi observado por Chieng e Chen que verificaram que a inclusão de concentrações lipídicas em hidrogel de hidroxietilcelulose hidrofobicamente modificada (HMHEC)

aumentou a viscosidade e isto ocorreu, pois algumas ligações hidrofóbicas se agregaram até formar micelas, enquanto que outras foram incorporadas nas bicamadas das vesículas e por este motivo as vesículas poderiam ser interconectadas, contribuindo para o aumento da viscosidade (CHIENG; CHEN, 2010).

O comportamento de fluxo pseudoplástico das formulações estudadas é uma propriedade desejável para as formulações destinadas para a administração de fármacos por via nasal, em que após o cisalhamento a resistência inicial para a formulação fluir diminui, refletindo a facilidade de aplicação (MORAIS *et al.*, 2005).

5.10.2 Ensaio reológico oscilatório

Dois parâmetros são importantíssimos para avaliar a viscoelasticidade de um fluido. São eles o módulo viscoso e o módulo elástico.

O módulo elástico ou de armazenamento (G') é a medida elástica do material, ou seja, a capacidade que o material possui de armazenar energia. O módulo viscoso ou de perda (G'') determina a capacidade do fluido em dissipar energia pela forma de calor.

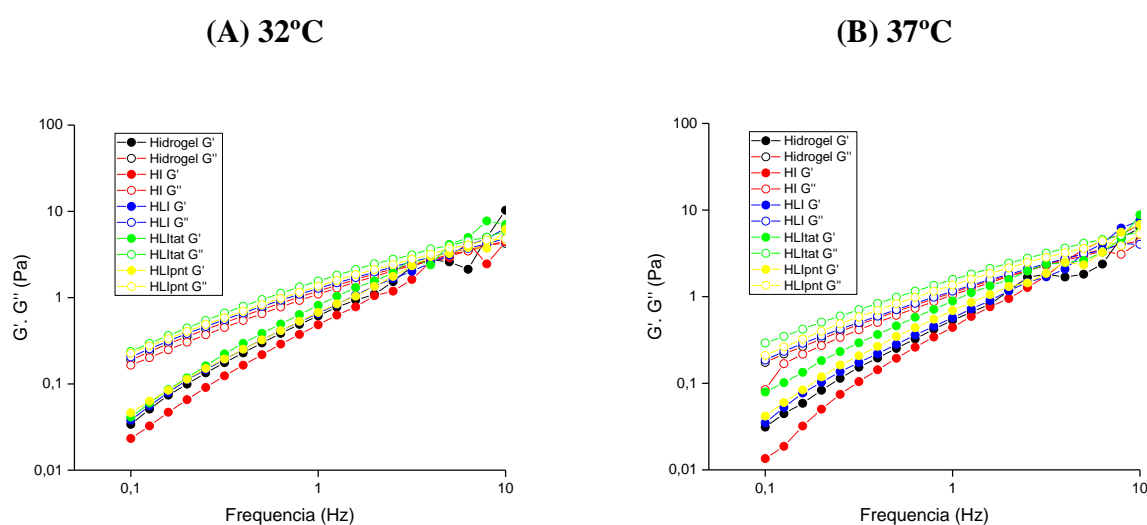


Figura 31. Reogramas de variação do módulo de armazenamento G' (símbolo cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência para todas as formulações ($n=3$).

Tabela 21. Valores de G' e G'' da análise oscilatória para as formulações a temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ($n=3$).

Formulações	32°C		37°C	
	G'	G''	G'	G''
Hidrogel Puro	0,61502	1,19306	0,53392	1,1102
HI	0,48396	1,09694	0,44103	1,04699
HLI	0,65501	1,28254	0,57007	1,15608
HLI _{TAT}	0,81508	1,55873	0,89033	1,57806
HLI _{PNT}	0,67231	1,35616	0,69005	1,36092

O ensaio oscilatório das formulações está demonstrado na Figura 31 e a partir dos reogramas obtidos e os valores de G'' e G' que constam na Tabela 21, pode-se verificar que todas as formulações, tanto a 32°C quanto a temperatura de 37°C demonstraram a predominância de G'' sobre G' em todo intervalo de frequência estudado (aproximadamente 2 vezes superior) e dependentes da frequência, ou seja, a medida que aumenta a frequência aumenta-se seus valores, o que determina um comportamento predominantemente viscoso e pode implicar em menor tendência a fluir, ocasionando o prolongamento do tempo de contato da formulação e tempo de absorção do fármaco na cavidade nasal, onde sugere-se ser um importante requisito para o aumento da biodisponibilidade nasal de insulina, conforme também observado em um estudo com várias misturas em pós utilizadas para administrar insulina através da via nasal realizado por Callens e colaboradores (CALLENS *et al.*, 2003) e em outro estudo que verificou a melhora do tempo de residência nasal da zidovudina na mucosa nasal, a partir de sistemas precursores de cristal líquido, compostos por compostos pelo tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PPG-5-CETETH-20), ácido oleico e água, desenvolvido por Carvalho e colaboradores (CARVALHO *et al.*, 2010).

Da mesma forma, Mourtas e colaboradores estudaram o comportamento reológico de dois compostos modelo, a calceína (corante hidrofílico) e o griseofulvina (fármaco lipofílico) dissolvidos em hidrogéis (gel de controle) ou dispersos na forma de lipossomas (hidrogel lipossomal) e observaram que o comportamento do hidrogel composto por 4% de HEC era predominantemente viscoso (MOURTAS *et al.*, 2007).

5.11 Avaliação da força mucoadesiva

O termo mucoadesão é utilizado quando a adesão ocorre entre o material e a camada de muco que reveste a mucosa (SMART, 2005; VARUM *et al.*, 2008).

O principal desafio relacionado com a administração nasal de fármacos é o tempo de permanência da formulação na mucosa nasal, pois um mecanismo de depuração mucociliar muito ativo elimina rapidamente o fármaco da cavidade nasal. Portanto, um sistema de administração nasal de fármaco ideal deve manter a formulação na cavidade nasal por um período de tempo prolongado e assim aumentar sua absorção e seu efeito terapêutico (CARVALHO *et al.*, 2013; KARAVASILIS; FATOUROS, 2016).

Foram realizadas medidas da força mucoadesiva nas duas membranas modelo: discos de mucina e mucosas nasais suínas, conforme identificados nas Figuras 32 e 33 das formulações listadas abaixo, contendo hidrogel de HEC a 2%:

- I. Hidrogel Puro;
- II. Hidrogel + solução de Insulina (HI);
- III. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina (HLI);
- IV. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT});
- V. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT});

Os resultados de força mucoadesiva obtidos nas duas membranas modelo foram comparados estatisticamente usando One-way ANOVA com pós-teste de Tukey, utilizando nível de significância de $p < 0,05$.

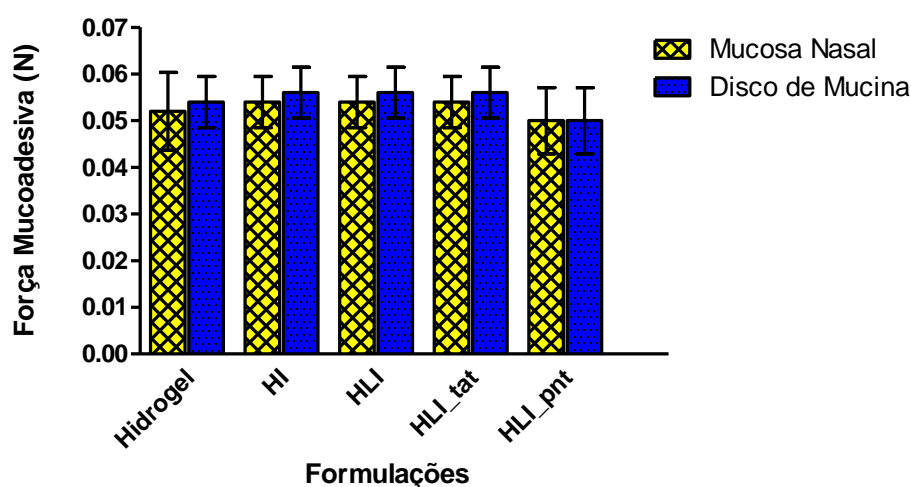


Figura 32. Comparação entre as medidas da força mucoadesiva na temperatura de 32°C das formulações de Hidrogel, HI, HLI, HLI_{TAT} e HLI_{PNT} , utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como membrana modelo (n=5).

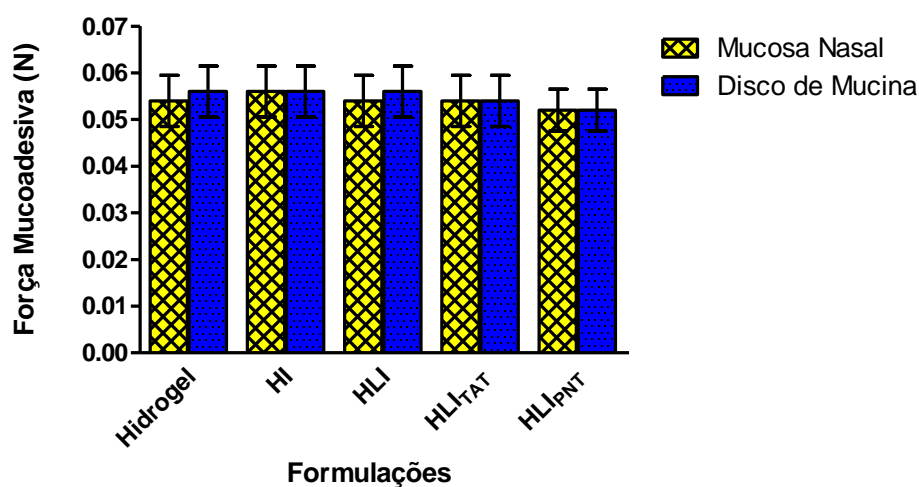


Figura 33. Comparação entre as medidas da força mucoadesiva na temperatura de 37°C das formulações de Hidrogel, HI, HLI, HLI_{TAT} e HLI_{PNT} , utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como membrana modelo (n=5).

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 32 e 33, a força mucoadesiva nas duas membranas modelos foram muito similares e da ordem de 0.06 N, sendo que na formulação HLI_{PNT}

o resultado foi um pouco menor da ordem de 0.05N, entretanto, não apresentaram diferença significativa (valor de $p > 0,05$). Estes resultados corroboram aos achados por Andrews e colaboradores que desenvolveram sistemas para aplicação tópica em mucosas compostos por HEC e policarbofil, com forças de mucoadesão da ordem de 0,07 a 0,39 N (Andrews *et al.*, 2008). Enquanto que, Gupta e colaboradores desenvolveram hidrogéis lipossomais para aplicação intravaginal, onde utilizaram hidrogel de HEC a 6% contendo uma dispersão lipossomal e obtiveram valores de força mucoadesiva de 0.50N para o HEC puro e 0.39 N para o hidrogel com dispersão lipossomal (GUPTA *et al.*, 2012). Por outro lado, Khutoryanskiy verificou que polímeros não-iônicos, como é o caso do hidrogel de HEC não apresentam um bom desempenho mucoadesivo em comparação aos polímeros catiônicos (ex: quitosana) e aniônico (ex: carbopol, alginato de sódio e carboximetilcelulose), pois suas interações específicas com a mucina são geralmente muito fracas, todavia, sugere-se que o desempenho mucoadesivo de formulações preparadas com polímeros não-iônicos pode ser alcançado predominantemente através da difusão de suas macromoléculas o que pode aumentar a permeabilidade do fármaco através do epitélio, modificando as junções estreitas entre as células (KHUTORYANSKIY, 2011)

5.12 Determinação da seringabilidade

O trabalho de seringabilidade é um parâmetro importante para avaliar durante o desenvolvimento de um sistema de liberação que será mantido em um local específico, como a cavidade vaginal ou nasal, o saco conjuntival ou a bolsa periodontal. Para uma administração clínica bem-sucedida, o sistema de liberação deve ter fluidez adequada para facilitar a aplicação nos locais desejados da mucosa (NUNES *et al.*, 2016)

O ensaio de seringabilidade foi realizado à 25 °C nas seguintes formulações:

- I. Hidrogel + solução de Insulina (HI);
- II. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina (HLI);
- III. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT});;
- IV. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT});

Foi utilizado um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems®) em modo de compressão. É importante verificar este parâmetro, pois possibilita avaliar o trabalho necessário para a extrusão das formulações contendo hidrogel a partir de uma seringa, com o objetivo de utiliza-la para a aplicação da formulação na cavidade nasal.

Os resultados de trabalho de seringabilidade obtidos nas formulações testadas foram comparados estatisticamente usando One-way ANOVA com pós-teste de Tukey, utilizando nível de significância de $p < 0,05$.

Na Tabela 22, observa-se o trabalho necessário para expulsar cada formulação a partir de uma seringa sem agulha.

Tabela 22. Trabalho de seringabilidade das formulações à 25°C.

Determinações	Trabalho de seringabilidade (N.mm)			
	HI	HLI	HLI _{TAT}	HLI _{PNT}
1	24,764	24,386	24,892	24,767
2	24,172	24,059	24,854	24,484
3	25,64	24,005	24,715	25,978
4	25,171	24,695	24,08	25,37
5	24,442	24,337	24,554	24,91
6	24,796	24,669	24,9	24,077
Média	24,83	24,36	24,67	24,93
DP	0,89	0,52	0,29	0,32
DPR(%)	2,17	2,10	1,20	1,28

O valor de trabalho de seringabilidade para a formulação HI foi de 24,83 N.mm, HLI 24,36 N.mm, HLI_{TAT} 24,67 N.mm e para HLI_{PNT} foi 24,93 N.mm, resultados estes muito semelhantes entre si e que não apresentaram diferença significativa (valor de $p > 0.05$). Estes resultados se assemelham também com os obtidos por Jones e colaboradores que observaram o aumento nos valores de trabalho de seringabilidade associado ao aumento das concentrações de HEC nas formulações, onde formulações com 3% de HEC produziram um trabalho de seringabilidade de 44,33 N.mm, enquanto que formulações com 5% de HEC resultaram em um trabalho de 81,69 N.mm (JONES *et al.*,1997).

Por outro lado El Kechai e colaboradores avaliaram a seringabilidade de géis de ácido hialurônico (HA) contendo diferentes formulações de lipossomas para projetar um sistema flexível de liberação de fármacos para injeções locais e observaram que a adição de lipossomas ao gel de HA teve um impacto moderado nas forças de injeção que variaram entre 8 e 15 N (EL KECHAI *et al.*,2015).

Desta forma, o trabalho para a extrusão das formulações a partir da seringa mostrou-se favorável, no que diz respeito à facilidade de aplicação deste tipo de formulação pelo paciente na via nasal.

5.13 Ensaios de liberação *in vitro*

Para que o fármaco possa ser absorvido após sua administração, é necessário que ocorra sua dissolução, ou seja, suas moléculas devem ser liberadas da forma farmacêutica como uma dispersão molecular (RODRIGUES; SILVA, 2005). A dissolução pode ser avaliada através do perfil de liberação *in vitro* do fármaco, que é de fundamental importância, pois visa determinar a velocidade e eficiência do processo de interação entre a dissolução, a difusão e os mecanismos de erosão,

possibilitando, desta forma, identificar as características de determinada formulação em pHs semelhantes aos fisiológicos (FREIBERG *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2005).

O ensaio foi executado para verificar o mecanismo pelo qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica em um intervalo de tempo específico, de modo a caracterizar seu modelo cinético de liberação.

As formulações avaliadas foram as seguintes:

- I. Insulina em solução (IS);
- II. Lipossoma + solução de Insulina (LI);
- III. Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (LI_{TAT});
- IV. Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (LI_{PNT});
- V. Hidrogel + solução de Insulina (HI);
- VI. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina (HLI);
- VII. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT});
- VIII. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT});

Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas nos tempos de 5, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12,16 e 24 h, filtradas em membrana 0,45 µm e analisadas por CLAE a partir de método validado, conforme dados que constam no item 4.3 e os resultados da porcentagem liberada em 24 h estão representados na Tabela 23.

Tabela 23. Liberação de insulina em solução (I); Formulação LI (II); Formulação LI_{TAT} (III); Formulação LI_{PNT} (IV); Formulação HI (V); Formulação HLI (VI); Formulação HLI_{TAT} (VII); Formulação HLI_{PNT} (VIII). Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32°C.

Tempo (hs)	Liberação I (%) ^a	CV I (%)	Liberação II (%) ^a	CV II (%)	Liberação III (%) ^a	CV III (%)	Liberação IV (%) ^a	CV IV (%)	Liberação V (%) ^a	CV V (%)	Liberação VI (%) ^a	CV VI (%)	Liberação VII (%) ^a	CV VII (%)	Liberação VIII (%) ^a	CV VIII (%)
0,08	3,97	8,42	8,14	9,10	6,21	7,16	5,21	9,08	9,76	8,61	9,99	9,56	4,51	8,68	4,20	8,05
0,5	39,14	5,78	37,88	5,92	35,47	9,88	31,45	7,02	46,86	5,71	32,86	7,81	19,12	9,77	20,15	7,48
1	69,35	3,58	60,17	8,41	58,00	4,74	51,77	8,39	70,72	8,65	43,96	8,79	28,82	4,63	30,24	7,40
2	94,99	6,97	73,83	9,91	71,62	7,21	68,62	6,01	85,45	8,95	52,26	9,75	37,21	6,59	38,14	7,93
4	102,72	7,87	82,73	9,66	78,91	8,46	74,37	8,00	91,03	8,26	56,57	9,19	39,98	6,26	39,96	9,43
8	106,83	8,54	85,87	7,81	82,16	10,01	75,16	9,59	91,21	8,56	57,37	9,83	40,75	6,28	39,92	7,42
12	109,16	9,50	86,47	8,50	82,78	10,10	75,36	10,01	90,92	9,38	58,64	8,33	41,45	6,34	40,46	8,30
16	107,83	10,01	84,94	7,62	83,54	8,90	75,09	9,91	91,25	8,42	59,15	8,33	41,96	6,37	41,45	7,40
24	110,34	8,45	86,00	7,42	83,16	9,98	75,78	9,26	90,74	8,22	59,69	8,01	42,46	6,19	41,83	7,53

^aValor médio de seis determinações

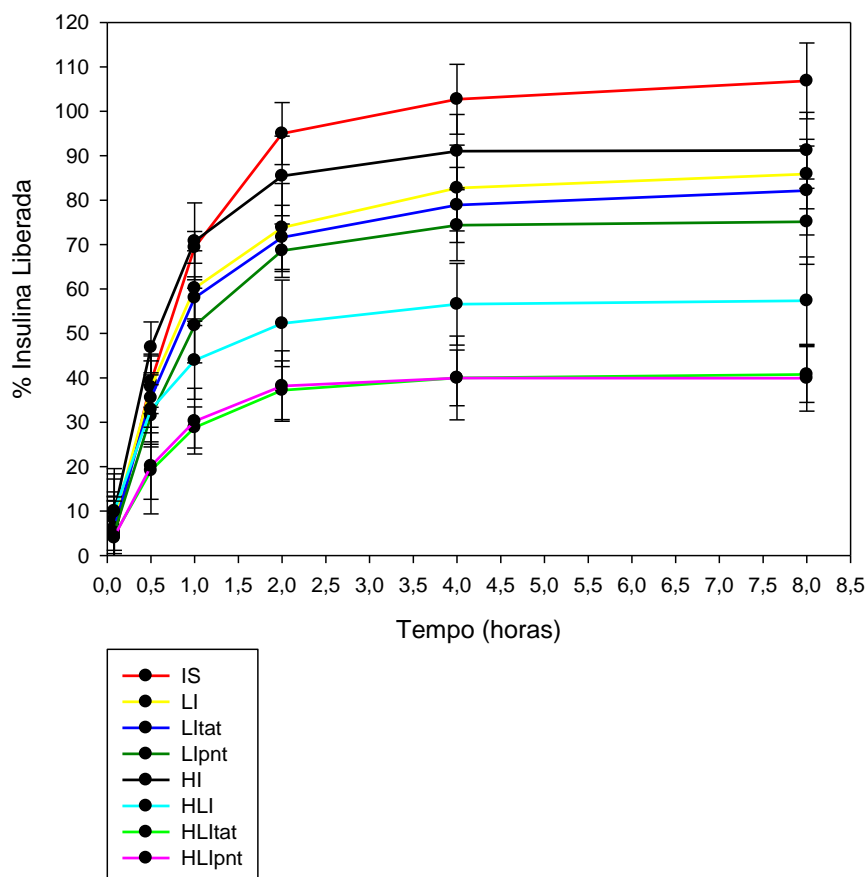


Figura 34. Perfil de liberação *in vitro* das formulações em 8 h. Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32°C.

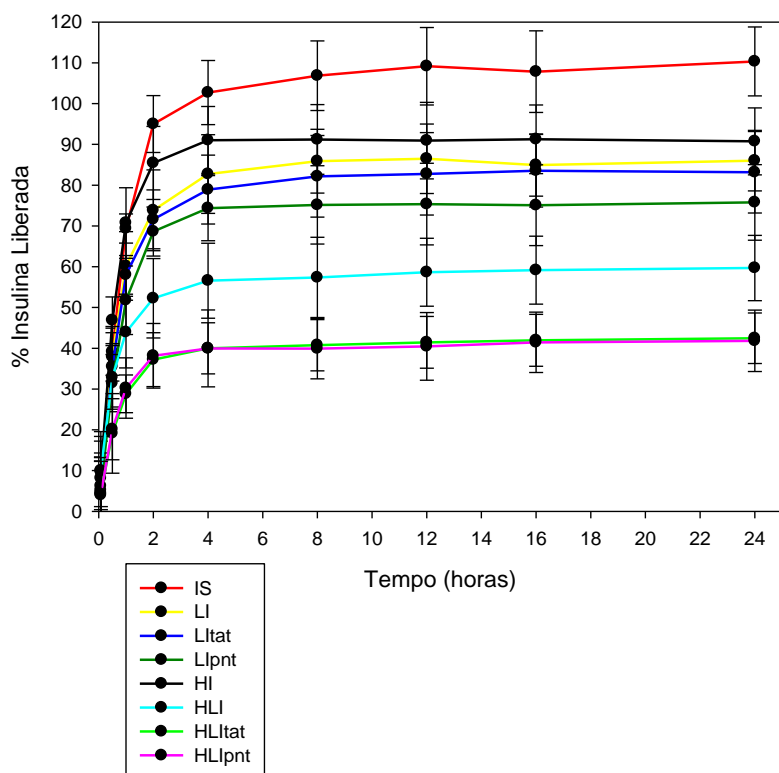


Figura 35. Perfil de liberação *in vitro* das formulações em 24 h. Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32°C.

Os perfis de liberação durante 8 h e 24 h foram representados graficamente em porcentagem de insulina liberada versus tempo e as curvas resultantes estão dispostas respectivamente nas Figuras 34 e 35.

Os resultados obtidos (Tabela 23) demonstram que após 2 h de ensaio foram liberados 73,83 % de insulina da formulação LI, 71,62 % da formulação LI_{TAT}, 68,62 % da formulação LI_{PNT}, 85,45% da formulação HI, 52,26 % da formulação HLI, 37,21 % da formulação HLI_{TAT}, 38,14 % da formulação HLI_{PNT} e 94,99% de insulina do controle IS e após 24 h de ensaio foram liberados 86,00 % de insulina da formulação LI, 83,16 % da formulação LI_{TAT}, 75,78 % da formulação LI_{PNT}, 90,74 % da formulação HI, 59,69 % da formulação HLI, 42,46 % da formulação HLI_{TAT}, 41,83 % da formulação HLI_{PNT} e 110,34% de insulina do controle IS. Comparando as porcentagens de liberação obtidas em 2 h e 24 h, percebe-se que a formulação HI foi a que liberou maior quantidade de insulina sendo 85,45% em 2 h e sustentou esta liberação até 90,74 % em 24 h, possivelmente em função da matriz viscosa do hidrogel, conforme observado nos ensaios reológicos.

Por outro lado, as formulações compostas por lipossoma, insulina e CPPs (LI, LI_{TAT}, LI_{PNT}) liberaram maior quantidade de insulina quando comparada com as mesmas formulações acrescidas de hidrogel (HLI, HLI_{TAT}, HLI_{PNT}), sugere-se então que nas formulações compostas por hidrogel lipossomal a liberação da insulina ocorre de uma forma mais lenta, devido à rigidez da membrana lipossomal que determina a taxa de liberação e o comportamento reológico do hidrogel usado para a dispersão do lipossoma que fornece uma barreira extra para a liberação do composto através do hidrogel. O mesmo tipo de comportamento foi estudado e observado por Mourtas e colaboradores que avaliaram a liberação de dois compostos modelo a calceína (corante hidrofílico) e o griseofulvina (fármaco lipofílico) incorporados em hidrogéis lipossomal (MOURTAS *et al.*, 2007).

Outro ponto importante a ser considerado, é o comportamento de liberação bifásico de todas as formulações testadas, ou seja, apresentaram liberação imediata em 2 h (“efeito burst”) motivada pela liberação do fármaco livre não encapsulado no lipossoma ($\approx 25\%$) seguido de liberação mais lenta e sustentada a partir de 4 h, proveniente do fármaco encapsulado no compartimento aquoso do lipossoma ($\approx 75\%$). Considera-se que este efeito burst torna-se importante para controlar a glicemia pos-prandial, na qual se espera um efeito imediato.

Déat-lainé e colaboradores também obtiveram o mesmo tipo de comportamento quando encapsularam insulina em micropartículas compostas por proteínas de soro desnaturadas e alginato usando um processo de extrusão / gelificação a frio com íons de cálcio, onde ocorreu a liberação imediata, com “efeito burst” de 40% em 15 min, seguida por uma liberação mais lenta de 80% em 1 h (DÉAT-LAINÉ *et al.*, 2012). Além disso, Lopes e colaboradores descreveram que este modelo é geralmente utilizado para descrever a liberação por vários tipos de formas farmacêuticas de

liberação controlada, como é o caso dos comprimidos matriciais, dos sistemas osmóticos e formas revestidas (LOPES *et al.*, 2005).

Tabela 24. Coeficientes de determinação (R^2) da insulina liberada a partir das formulações obtidas através de diferentes modelos matemáticos.

Modelos de Liberação	IS	LI	LI _{TAT}	LI _{PNT}	HI	HLI	HLI _{TAT}	HLI _{PNT}
Baker-Lonsdale	$r^2=0,6949$	$r^2=0,8637$	$r^2=0,8507$	$r^2=0,7393$	$r^2=0,6961$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,1677$	$r^2=0,0367$
	$k=0,0438$	$k=0,0412$	$k=0,0413$	$k=0,0416$	$k=0,0409$	$k=0,0084$	$k=0,0033$	$k=0,0032$
Korsmeyer-Peppas	$r^2=0,7877$	$r^2=0,7875$	$r^2=0,7882$	$r^2=0,7593$	$r^2=0,7263$	$r^2=0,7979$	$r^2=0,7954$	$r^2=0,7611$
	$n=0,2244$	$n=0,1994$	$n=0,2049$	$n=0,2029$	$n=0,1761$	$n=0,1716$	$n=0,1967$	$n=0,1863$
Hixon-Crowell	$k=61,7685$	$k=52,1914$	$k=49,7038$	$k=45,6811$	$k=59,5583$	$k=38,5740$	$k=25,6058$	$k=26,0210$
	$r^2=0,2010$	$r^2=0,0037$	$r^2=0,0384$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$
Higuchi	$k=0,0703$	$k=0,0625$	$k=0,0610$	$k=0,0574$	$k=0,0652$	$k=0,0237$	$k=0,0120$	$k=0,0118$
	$r^2=0,2680$	$r^2=0,0158$	$r^2=0,0824$	$r^2=0,0549$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$
Primeira-Ordem	$k=30,9278$	$k=24,6026$	$k=23,7443$	$k=21,7000$	$k=26,5167$	$k=17,0386$	$k=11,9990$	$k=11,8869$
	$r^2=0,9667$	$r^2=0,8249$	$r^2=0,7476$	$r^2=0,4658$	$r^2=0,9348$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$	$r^2=0,0000$
Weibull	$k=1,1437$	$k=0,7835$	$k=0,6977$	$k=0,5554$	$k=1,1737$	$k=0,0984$	$k=0,0426$	$k=0,0416$
	$k=104,5062$	$k=85,6224$	$k=82,5540$	$k=70,0746$	$k=91,0103$	$k=58,7619$	$k=41,5194$	$k=40,7898$
Weibull	$r^2=0,9987$	$r^2=0,9984$	$r^2=0,9978$	$r^2=0,9999$	$r^2=0,9998$	$r^2=0,9992$	$r^2=0,9985$	$r^2=0,9979$
	$b=0,7157$	$b=0,8523$	$b=0,8637$	$b=0,9862$	$b=1,1295$	$b=0,9691$	$b=0,8999$	$b=0,9824$

Para determinar uma melhor correlação *in vitro* - *in vivo*, alguns modelos matemáticos de cinética de liberação conhecidos na literatura foram aplicados para discutir o mecanismo que rege a liberação do fármaco a partir dos sistemas estudados, os modelos utilizados foram: Baker–Londsdale, Korsmeyer-Peppas, Hixon–Crowell, Higuchi, Primeira-Ordem e Weibull (JAIN; JAIN, 2016).

De acordo com o coeficiente de determinação R^2 (Tabela 24), o modelo que melhor descreve a cinética de liberação das formulações avaliadas é o de Weibull. Estudos recentes encontraram uma relação entre a equação de Weibull e os mecanismos de difusão, dado que este modelo relaciona a quantidade de fármaco acumulado em função do tempo e o valor do coeficiente b é indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz, sendo que valores de $b < 0,75$ sugerem que liberação ocorre por difusão Fickiana, onde a matriz não controla a liberação do fármaco. Quando o valor de b encontra-se entre 0,75 e 1 ($0,75 < b < 1$) o mecanismo ocorre por difusão Fickiana associada ao transporte anômalo ou caso II (relaxamento da matriz), onde a matriz controla a liberação do fármaco e por outro lado, valores de $b > 1$ indicam um mecanismo complexo de liberação em que pode envolver difusão, intumescimento e/ou erosão da matriz (COSTA; LOBO, 2001; MANADAS *et al.*, 2002; PAPADOPOULOU *et al.*, 2006; KADDAH *et al.*, 2018).

No entanto, conforme observado na Tabela 24, os valores de coeficiente b para a formulação HI foram maiores que 1, indicando que a liberação do fármaco ocorreu através de um mecanismo complexo que envolve simultaneamente o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão do polímero. Enquanto que as formulações (LI, LI_{TAT}, LI_{PNT}, HLI, HLI_{TAT} e HLI_{PNT}) tiveram valores de coeficiente b entre 0,75 e 1, demonstrando um mecanismo de difusão não fickiana, em que a matriz controla a liberação do fármaco. Por outro lado, a formulação IS, obteve o valor de coeficiente b abaixo de 0,75, demonstrando um mecanismo de difusão fickiana, em que a matriz não controla a liberação do fármaco.

Em um estudo desenvolvido por Carvalho e colaboradores foi observado um comportamento semelhante quando investigaram a liberação de zidovudina incorporada em sistemas precursores de cristal líquido, compostos por compostos pelo tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PPG-5-CETETH-20), ácido oleico e água, para administração nasal. Eles relataram que o mecanismo de liberação de todas as formulações testadas seguiu o modelo de Weibull (CARVALHO *et al.*, 2010). Por outro lado Gatti e colaboradores também obtiveram cinética de liberação da insulina conforme modelo de Weibull quando encapsulada em nanopartículas poliméricas carregadas negativamente (GATTI *et al.*, 2018).

5.14 Ensaios de permeação em mucosa nasal suína

A natureza vascular ricamente presente da mucosa nasal e a alta taxa de permeação de fármacos tornam a via de administração nasal atraente para muitos fármacos, incluindo fármacos polares de pequeno peso molecular, proteínas e peptídeos (BAN *et al.*, 2018).

O ensaio foi executado para verificar o processo pelo qual o fármaco é permeado através da mucosa nasal suína em um intervalo de tempo específico e parâmetros como o fluxo no estado de equilíbrio (J , $\mu\text{g}/\text{cm}\cdot\text{min}$) e o coeficiente de permeabilidade aparente (K_p , cm/min), foram calculados. Ademais, buscou-se investigar o papel promotor de absorção nasal de insulina a partir de hidrogel, lipossoma e CPPs, isoladamente e combinados.

As formulações avaliadas foram as seguintes:

- I. Insulina em solução (IS);
- II. Lipossoma + solução de Insulina (LI);
- III. Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (LI_{TAT});
- IV. Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (LI_{PNT});
- V. Hidrogel + solução de Insulina (HI);
- VI. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina (HLI);
- VII. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT});
- VIII. Hidrogel + Lipossoma + solução de Insulina funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT});

Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas nos tempos de 5, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12,16 e 24 h, filtradas em membrana 0,45 μm e analisadas por CLAE a partir de método validado, conforme dados que constam no item 4.3 e os resultados da porcentagem insulina permeada em 24 h estão representados na Tabela 25.

Tabela 25. Permeação de insulina em solução (I); Formulação LI (II); Formulação LI_{TAT} (III); Formulação LI_{PNT} (IV); Formulação HI (V); Formulação HLI (VI); Formulação HLI_{TAT} (VII); Formulação HLI_{PNT} (VIII). Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32°C.

Tempo (hs)	Permeação I (%) ^a	CV I (%)	Permeação II (%) ^a	CV II (%)	Permeação III (%) ^a	CV III (%)	Permeação IV (%) ^a	CV IV (%)	Permeação V (%) ^a	CV V (%)	Permeação VI (%) ^a	CV VI (%)	Permeação VII (%) ^a	CV VII (%)	Permeação VIII (%) ^a	CV VIII (%)
0,08	7,03	12,40	5,80	13,98	3,89	6,09	3,59	14,12	8,83	14,56	3,00	13,64	0,68	15,36	2,88	15,47
0,5	41,31	15,53	46,97	4,69	30,97	13,68	34,46	14,10	40,04	12,63	23,86	11,43	21,51	5,48	14,26	8,21
1	68,93	7,37	58,53	3,82	50,95	8,60	57,90	4,69	52,64	16,33	39,49	15,55	37,35	8,28	16,28	10,64
2	92,59	2,44	78,34	8,76	55,34	8,72	63,62	8,52	60,19	14,19	50,64	9,79	46,93	3,96	22,51	8,85
4	98,42	1,43	86,97	8,32	69,38	9,75	73,54	5,56	60,14	14,90	55,41	9,05	49,49	1,15	42,41	2,86
8	101,19	3,40	92,49	6,77	71,96	5,91	61,33	4,38	57,43	13,97	60,02	12,56	46,63	2,61	49,63	4,83
12	95,70	1,25	86,62	11,58	67,70	9,16	59,53	3,47	54,11	13,74	55,70	11,44	46,08	3,87	47,20	5,69
16	94,17	0,92	84,29	10,23	65,57	7,55	58,00	4,27	53,29	14,09	55,57	11,03	46,02	4,24	45,75	4,36
24	92,63	0,29	83,96	9,80	63,32	8,83	57,11	4,54	52,72	13,64	54,87	11,14	45,96	4,02	44,91	5,95

^aValor médio de seis determinações

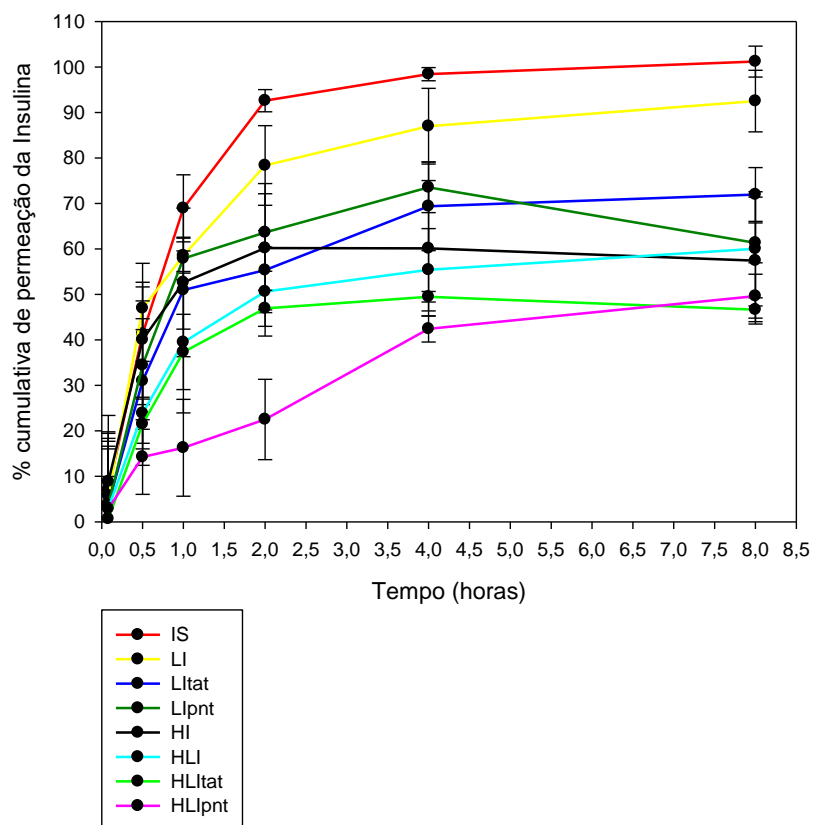


Figura 36. Perfil de permeação cumulativa em porcentagem das formulações em 8 h

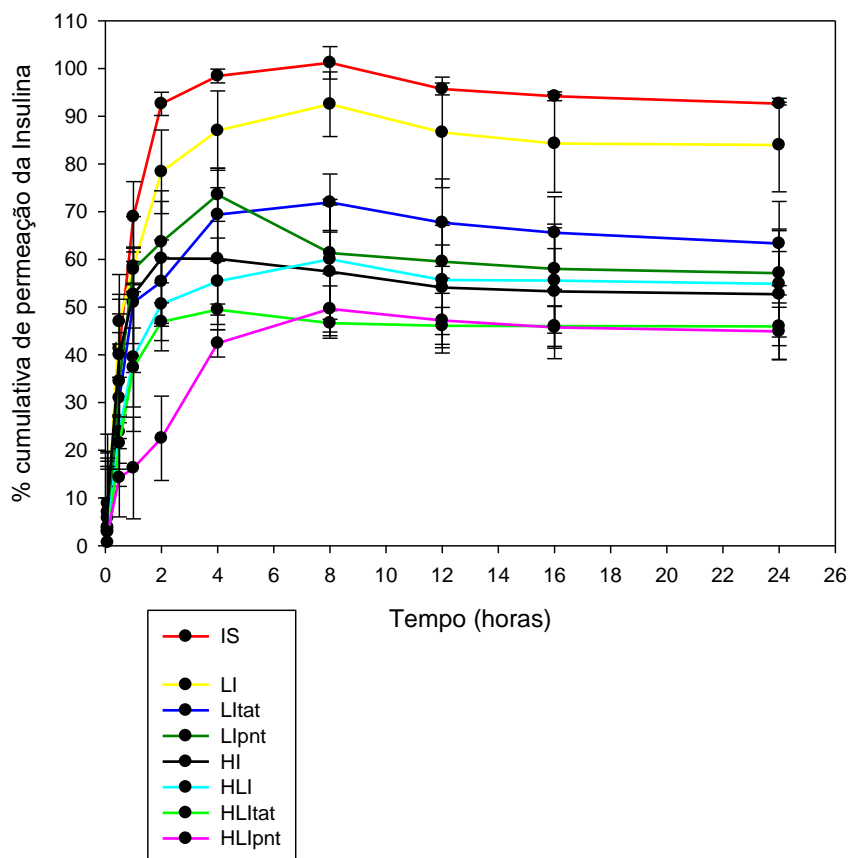


Figura 37. Perfil de permeação cumulativa em porcentagem das formulações em 24 h

Os perfis de permeação durante 8 h e 24 h foram representados graficamente em porcentagem cumulativa de insulina permeada versus tempo e as curvas resultantes estão dispostas respectivamente nas Figuras 36 e 37.

Os resultados obtidos (Tabela 25) demonstram que após 24 h de ensaio foram permeados 83,96 % de insulina da formulação LI, 63,32 % da formulação LI_{TAT}, 57,11 % da formulação LI_{PNT}, 52,72 % da formulação HI, 54,87 % da formulação HLI, 45,96 % da formulação HLI_{TAT}, 44,91 % da formulação HLI_{PNT} e 92,63% de insulina do controle IS. O perfil de permeação cumulativa da insulina na maioria das formulações foi sempre crescente até 2h de ensaio, sendo que nos tempos seguintes houve o aparecimento de um platô da porcentagem permeada para cada formulação e não houve uma relação linear entre a insulina permeada (%) versus tempo (horas) para nenhuma das formulações testadas.

Os resultados obtidos se assemelham aos resultados obtidos nos ensaios de liberação *in vitro* onde houve um perfil de liberação crescente até 2h de ensaio, sendo que nos tempos seguintes houve o aparecimento de um platô da porcentagem permeada para cada formulação.

Comparando a porcentagem cumulativa de insulina permeada em das formulações HLI_{TAT} e HLI_{PNT} em relação com as formulações HLI e HI, percebe-se que a quantidade de insulina permeada nas formulações HLI e HI foi maior, isto se deve a propriedade mucoadesiva do hidrogel de HEC que garante o prolongamento do tempo de retenção da insulina na cavidade nasal e, por conseguinte melhora a porcentagem permeada, enquanto que o lipossoma pode ser utilizado com vetor da insulina, apresentando importante papel como a proteção do fármaco encapsulado contra a degradação das peptidases presentes no epitélio nasal (PIRES *et al.*, 2009; QIANG *et al.*, 2012). Todavia, a adição do CPPs nas formulações deu origem a valores de porcentagem permeada inferiores o que pode ser explicado pelo fato da forte interação eletrostática resultando na complexação da insulina com os CPPs, pois os peptídeos são carregados positivamente e as moléculas de insulina possuem cargas negativas no ambiente neutro (pH 7,4), devido ao seu ponto isoelétrico (pI) estar compreendido entre 5,3 e 5,4. Esta interação pode ter atrapalhado a ação de promotor de absorção conferida aos CPPs, fazendo com que eles possibilitassem o aumento da permeação da insulina através da mucosa nasal, o que o pode ser confirmado também pelos valores de K_p (Tabela 25) menores obtidos pelas formulações HLI_{TAT} e HLI_{PNT}.

Estes resultados corroboram aos achados por Zhu e colaboradores e Kamei e colaboradores. Zhu e colaboradores desenvolveram nano-complexos funcionalizado com CPPs (PNT) para a administração intestinal de insulina, com a finalidade de melhorar a sua estabilidade e a permeabilidade na mucosa intestinal, entretanto estes nano-complexos funcionalizados com CPPs (PNT) não foram tão estáveis e eficientes para a permeação de insulina quando comparados aos nano-complexo de ciclodextrinas funcionalizados com CPPs (PNT) (P-bis-CD NC) (ZHU *et al.*,

2013). Por outro lado, Kamei e colaboradores demonstraram que a absorção intestinal da insulina foi prejudicada pelos agregados provenientes da precipitação da mistura física da insulina com o CPP (PNT) em concentrações acima de 0,2 mM de PNT, devido à interação eletrostática (KAMEI *et al.*, 2008).

Tabela 26. Fluxo de permeação (J) e coeficiente de permeabilidade (Kp) obtidos para 300 μ L das formulações contendo insulina a 214 μ g/mL, dispostas numa área de 1,77cm² de mucosa nasal suína em contato com o meio receptor tampão fosfato (PBS,pH 7,4).

Amostra	J (μ g/min.cm)	Kp (cm/min)
IS	138,330	0,816
LI	118,664	0,980
LI _{TAT}	78,054	0,645
LI _{PNT}	88,989	0,735
HI	89,949	0,743
HLI	60,134	0,497
HLI _{TAT}	32,794	0,271
HLI _{PNT}	31,722	0,262

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 26, observa-se que o fluxo (J) da formulação HLI foi quase duas vezes maior em relação às formulações HLI_{TAT} e HLI_{PNT} e a mesma relação foi observada para os resultados de coeficiente de permeabilidade (Kp). Enquanto que o fluxo (J) da formulação HI foi 1,5 vezes maior em relação a formulação HLI, sendo que a mesma relação foi observada para o resultado de Kp. Sintov e colaboradores demonstraram que uma microemulsão A/O contendo insulina pulverizada em narinas de coelhos obteve um Kp 0,210 e atingiu uma biodisponibilidade de 21,5% através da via nasal em relação à administração subcutânea, enquanto que o uso de uma microemulsão O/A bem como uma solução simples de insulina produziu menos de 1% de biodisponibilidade (SINTOV *et al.*, 2010).

5.15 Ensaios biológicos *in vivo*

5.15.1 Ensaios de análise temporal da presença de insulina na circulação sistêmica em ratos não diabéticos

Como alternativa à injeção subcutânea para o tratamento de DM, a administração nasal de insulina tem sido amplamente investigada, sendo considerada uma via de administração promissora pelos seguintes motivos: i. A cavidade nasal possui uma grande área de superfície epitelial altamente vascularizada disponível para a absorção de fármacos sendo coberta por numerosas microvilosidades; ii. O sangue venoso da cavidade nasal passa diretamente para a circulação sistêmica, evitando a perda do fármaco pelo metabolismo pré-sistêmico no fígado; iii. Permite doses menores com obtenção rápida de níveis terapêuticos no sangue e início mais rápido da atividade

farmacológica; iv. Diminuição dos efeitos colaterais (KISSEL; WERNER, 1998; KHAFAGY *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2016).

No presente trabalho, propusemos o uso o lipossoma para melhorar a absorção nasal de insulina e o veiculamos em um gel de HEC (PRINGELS *et al.*, 2006). Ademais, investigamos a utilização de CPPs para potencializar o efeito biológico do fármaco, visto que estes demonstraram aumentar a biodisponibilidade de fármacos à base de proteínas e ácidos nucleicos, melhorando, por conseguinte a possibilidade de biomacromoléculas cruzar barreiras fisiológicas, como a mucosa nasal, parede vascular, mucosa gastrointestinal, pele e barreira hematoencefálica (BHE), funcionando como promotores de absorção (RAMSEY; FLYNN, 2015).

Os animais foram tratados de acordo com os seguintes grupos, utilizando 5 animais por grupo, para avaliação e comparação das alterações dos níveis séricos de insulina, no intervalo de tempo de 0 a 360 minutos após as administrações dos sistemas de liberação abaixo:

- I. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com TAT, contendo solução de insulina (HLI_{TAT});
 - II. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT, contendo solução de insulina (HLI_{PNT});
 - III. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma convencional, contendo solução de insulina (HLI);
 - IV. Administração intranasal de hidrogel, contendo solução de insulina (HI);
 - V. Administração subcutânea 0,25U de insulina Novolin R[®] (Ins_{sub});
 - VI. Administração intranasal de solução salina (SS_{nasal});
 - VII. Administração intranasal de insulina em solução salina (Ins_{nasal});
-

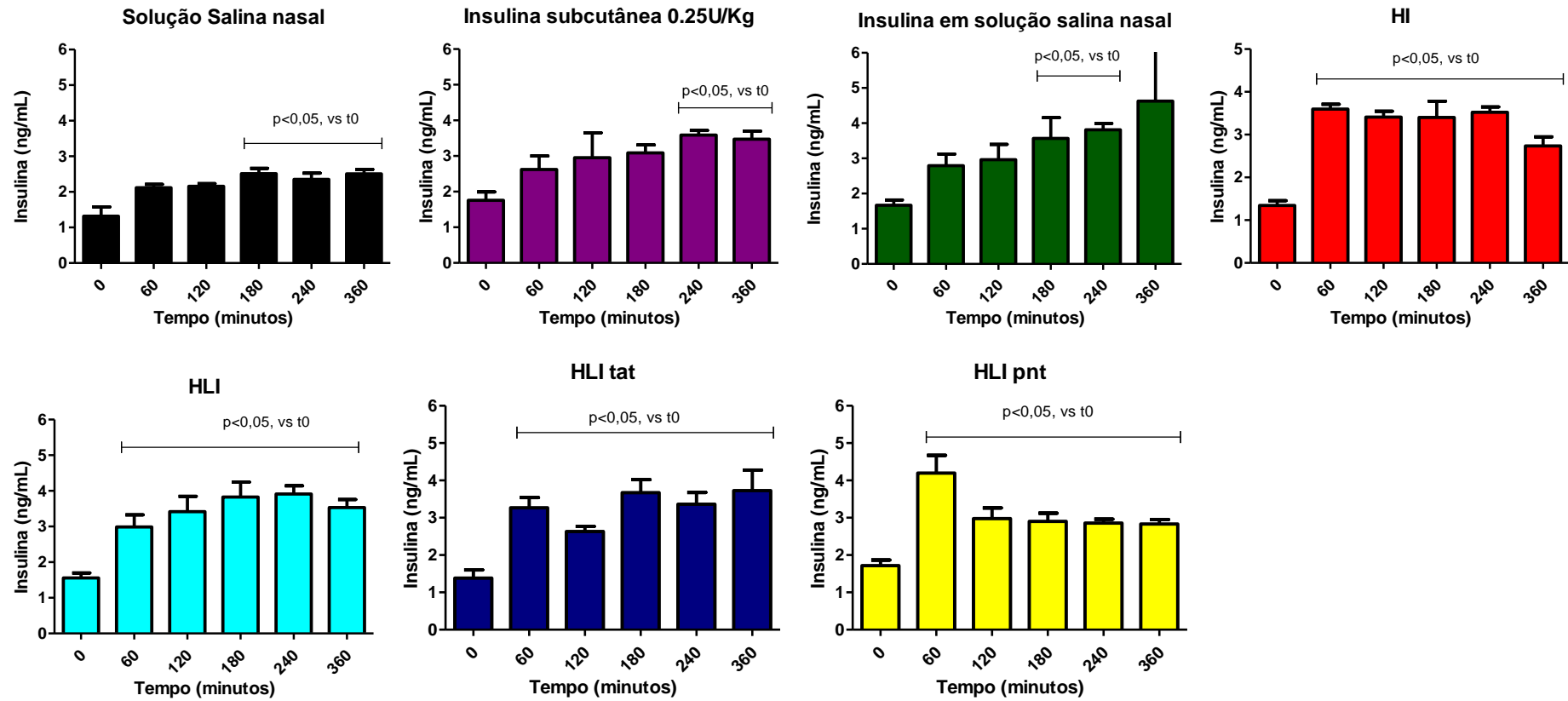


Figura 38. Níveis plasmáticos de insulina (ng/mL) após administração nasal em ratos não diabéticos (n=5). Dose insulina administrada subcutaneamente: de 0,25U/animal. Dose insulina administrada intranasalmente: 2U insulina /formulação/animal. Volume máximo de instilação intranasal: 100 μ L divididos em aplicações de 25 μ L introduzidas alternadamente em cada narina.

A Figura 38 demonstra os níveis plasmáticos de insulina (ng/mL) após administração nasal em ratos não diabéticos.

Em relação ao grupo solução salina nasal (SS_{nasal}) os resultados demonstraram que houve um discreto aumento no nível de insulina sistêmica em 60 minutos sendo mantido até 360 minutos, sendo que entre os tempos de 180 e 360 minutos de experimento os resultados foram significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$).

Observou-se que os animais tratados com insulina subcutânea (ns_{sub}) na dose de 0,25U de insulina apresentou um aumento progressivo nos níveis de insulina sistêmica até o tempo de 360 minutos, bem como entre os tempos de 240 e 360 minutos de experimento os resultados foram significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$).

No tocante ao grupo insulina em solução salina nasal (Ins_{nasal}), demonstrou-se que houve o aparecimento de insulina sistêmica, contudo, devido à apresentação de erros estatísticos altos principalmente no tempo de 360 minutos, não se controla a dose administrada e conseqüentemente a eficácia de absorção fica comprometida. Por isso, se faz necessário a veiculação de insulina em sistema de liberação apropriado que proporcione a sua liberação controlada, para que seja lentamente absorvida.

Em relação aos grupos hidrogel + lipossoma convencional, contendo insulina (HLI) e hidrogel, contendo insulina (HI), os resultados obtidos demonstraram que estes dois grupos obtiveram a partir de 60 minutos resultados significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$), havendo um aumento dos níveis de insulina sistêmica. Entretanto, o grupo HI apresentou o melhor resultado em relação ao aumento dos níveis de insulina sistêmica.

Da mesma forma, a administração nasal dos grupos que continham os CPPs, sendo este grupo hidrogel+ lipossoma funcionalizado com TAT, contendo insulina (HLI_{TAT}) e hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT, contendo insulina (HLI_{PNT}) também apresentaram resultados satisfatórios em relação aos níveis de insulina sistêmica, pois foram obtidos a partir de 60 minutos resultados significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$), sendo que o grupo HLI_{TAT} apresentou um aumento do nível de insulina mais tardio e o grupo HLI_{PNT} apresentou um aumento do nível de insulina mais precoce, principalmente em 60 minutos. Ademais, os resultados alcançados pelos CPPs corroboram aos achados na literatura no que diz respeito à ação promotora de absorção conferida estes tipos de peptídeos catiônicos. Por outro lado, possivelmente devido a forte interação eletrostática e conseqüente complexação da insulina com os CPPs, pode ter atrapalhado a obtenção de níveis séricos do hormônio mais adequados. Além disso, a concentração de 0,1 mM dos CPPs empregada nos estudos pode ter sido insuficiente para melhorar a biodisponibilidade nasal da insulina.

Da mesma maneira, Khafagy e colaboradores estudaram pela primeira vez em 2009 as formas L ou D do CPP (L-PNT ou D-PNT) e as formas L ou D do CPP octaarginina (L-R8 ou D-R8), entretanto, os resultados evidenciaram que apenas a forma L do PNT, atuou de maneira mais eficiente como promotor de absorção da insulina quando comparado com os diferentes CPPs testados (D-PNT; L-R8 e D-R8), aumentando a permeabilidade da insulina em toda a membrana nasal sem causar danos detectáveis à integridade celular da mucosa nasal, podendo ser uma alternativa viável às terapias parenterais existentes. Da mesma forma em 2013, Khafagy e colaboradores estudaram que L-PNT e um análogo denominado PenetraMax não foram tóxicos sistemicamente ou localmente nas duas concentrações selecionadas (0.5mM e 2mM) (KHAFAGY *et al.*, 2009; KHAFAGY *et al.*, 2013).

Em outro estudo, Khafagy e colaboradores estudaram o efeito da eliminação, substituição e adição de cationicidade aos resíduos modificados de L-PNT na absorção nasal de insulina e respectivo efeito hipoglicemiante, demonstrando que a insulina foi absorvida a partir da cavidade nasal. Contudo, a eliminação dos resíduos de aminoácidos catiônicos (Arginina ou Lisina) diminuiu significativamente a absorção da insulina em comparação com a observada com a L-penetratina (KHAFAGY *et al.*, 2010).

De acordo com os resultados apresentados a administração das formulações (HLI_{TAT} , HLI_{PNT} , HLI e HI) apresentaram resultados satisfatórios em relação ao aumento da insulina temporal. Possivelmente, a liberação sustentada de insulina pode ter contribuído para este resultado, assim como o papel bioadesivo do hidrogel de HEC, fornecendo uma matriz gelificada que sugere manter um contato prolongado entre o fármaco e o local de absorção a partir do qual é liberada e absorvida.

D'Souza e colaboradores estudaram o efeito hipoglicemiante de gel de carbopol e hidroxipropilmetilcelulose como agente geleificante contendo insulina em modelo animal e em voluntários saudáveis. Os resultados foram avaliados medindo os níveis de glicose no sangue e os níveis de insulina no soro em intervalos de tempo especificados em ratos e humanos e demonstraram que o uso deste gel nasal bioadesivo não só promoveu o contato prolongado entre o fármaco e os locais de absorção na cavidade nasal, mas também facilitou a absorção direta da insulina através da mucosa nasal. No entanto, como a absorção foi bastante rápida, o uso desta forma de administração de insulina poderia não ser viável para pacientes crônicos em longo prazo (D'SOUZA *et al.*, 2005).

5.15.2 Ensaio das respostas anti-hiperglicêmicas em ratos diabéticos

Em resposta ao aumento da glicose circulante após as refeições, a insulina é secretada e age principalmente em tecidos periféricos, como fígado, músculo e tecido adiposo, diminuindo por consequência a glicemia (ZECCHIN *et al.*, 2004).

Para verificar as respostas anti-hiperglicêmicas das formulações testadas foi realizado experimento *in vivo*, seguindo o mesmo desenho experimental adotado no experimento de concentração temporal de insulina. Sete dias após a indução do diabetes (dez dias pós-STZ), os animais foram tratados de acordo com os seguintes grupos, utilizando 6 animais por grupo:

- I. Administração intranasal de hidrogel+ lipossoma funcionalizado com TAT, contendo solução de insulina (HLI_{TAT});
- II. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT, contendo solução de insulina (HLI_{PNT});
- III. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma convencional, contendo solução de insulina (HLI);
- IV. Administração intranasal de hidrogel, contendo solução de insulina (HI);
- V. Administração intranasal de insulina em solução salina (Ins_{nasal});
- VI. Administração intranasal de solução salina (SS_{nasal});
- VII. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com TAT (HL_{TAT});
- VIII. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT (HL_{PNT});
- IX. Administração subcutânea de 2 U insulina Novolin R[®] (Ins_{sub});
- X. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma branco (HLB);

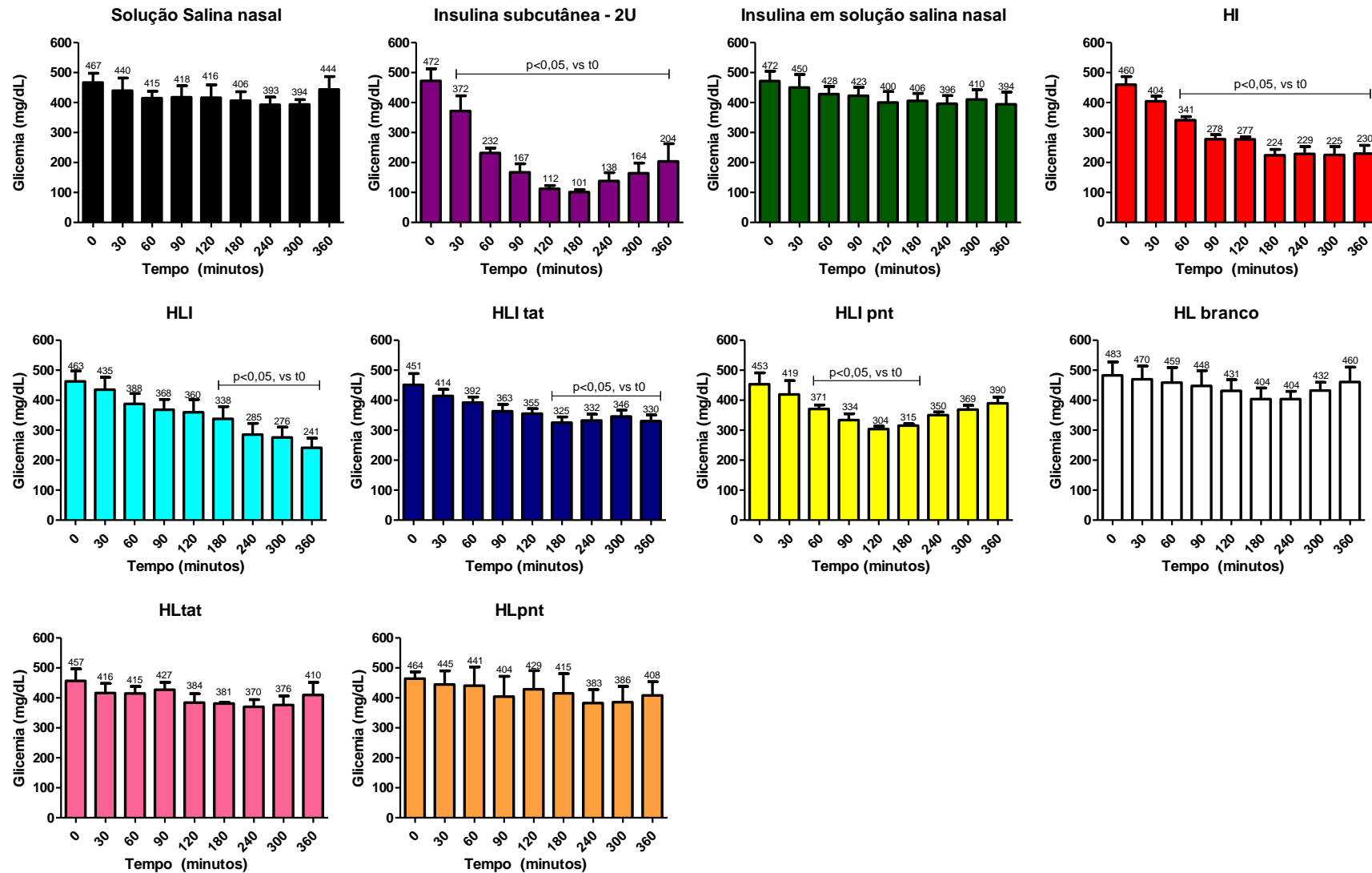


Figura 39. Efeito do tratamento das formulações contendo insulina sobre a glicemia (mg/dL), após a administração nasal em ratos diabéticos (n=6). Dose Insulina administrada pela via subcutânea e intranasal: 2U insulina /formulação/animal. Volume máximo de instilação intranasal: 100µL divididos em aplicações de 25µL introduzidas alternadamente em cada narina.

Foi observado que a indução do diabetes experimental em ratos foi eficiente, pois todos os grupos apresentaram valores médios de glicemia inicial em torno de 450 - 480 mg/dL no início do experimento, confirmando o pareamento e permitindo assim comparações temporais inter e intra grupos no decorrer do experimento. Os animais não foram alimentados até o período de 360 minutos do experimento.

A Figura 39 demonstrou os resultados apresentados pelos grupos testados no efeito hipoglicêmico.

O primeiro gráfico do grupo solução salina nasal (SS_{nasal}), representa o modelo experimental de DM tipo 1. Baseado nos dados obtidos, percebemos que no tempo 0 a glicemia obtida foi de 467 mg/dL e a partir deste momento o animal não foi mais alimentado. Diferente de um animal com uma fisiologia normal (aquele que não apresenta o quadro de DM instalado) a glicemia em todas as coletas apresentou valores de glicemias acima de 400 mg/dL ou próximas deste valor, resultados que não foram significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$). Além disso, os valores obtidos para este grupo demonstram que mesmo que este animal não tenha sido alimentado a sua glicemia não se reduziu, sendo a principal característica da hiperglicemia crônica em indivíduos com DM não controlada. Ademais, no tempo de 360 minutos, foi obtido o valor de 444 mg/dL o que sugere o aparecimento do processo de produção hepática de glicose.

Em relação ao grupo controle de animais tratados com 2U de insulina subcutânea (Ins_{sub}) mostrou uma redução da glicemia logo após o início do tratamento (30 minutos) normalizando os níveis glicêmicos entre 120 e 180 minutos, visto que os resultados obtidos a partir de 30 minutos foram significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$). Entretanto, como desvantagens podemos citar que a via subcutânea torna-se dolorosa com a instalação de um quadro crônico de DM e existe o risco de episódios de hipoglicemia (valores menores do que 60 mg/dL) (GUTIERRES *et al.*, 2019) e além disso, baseados nos resultados obtidos neste experimento pode-se observar que não houve a manutenção da glicemia após 240 minutos de tratamento, o que sugere a necessidade de uma nova administração subcutânea do fármaco, pois a duração do efeito não se mostrou duradoura.

Sobre o grupo insulina em solução salina nasal (Ins_{nasal}) e de acordo com os resultados apresentados anteriormente no ensaio de concentração temporal da insulina, sugeriu-se que a eficácia de absorção da insulina ficou comprometida, pois não houve a normalização dos níveis glicêmicos em nenhum tempo analisado. Ademais, nenhuma resposta hipoglicêmica aparente foi observada também após administração nasal dos grupos controle negativo: i) hidrogel + lipossoma branco (HLB); ii) hidrogel + lipossoma funcionalizado com TAT (HL_{TAT}); iii) hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT (HL_{PNT}), o que sugere-se que nenhum componente do hidrogel branco + lipossoma branco ou funcionalizados com os CPPs (TAT e PNT) tem a capacidade de influenciar o

efeito hipoglicemiante, uma vez que nenhum resultado apresentado por estes grupos (Ins_{nasal} , HLB, HL_{TAT} e HL_{PNT}) foram significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$) e desta forma conclui-se que qualquer queda do valores de glicemia encontrados no experimento para os demais grupos (HI, HLI, HLI_{PNT} e HLI_{TAT}) são provenientes dos efeitos da insulina presente nas formulações.

Em relação ao grupo hidrogel + lipossoma convencional, contendo insulina (HLI), os resultados obtidos estão em concordância ao que foi observado no ensaio de concentração temporal da insulina, uma vez que este grupo reduziu a glicemia tardiamente (após 180 minutos) com resultados significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$), com a ocorrência da possível capacidade de manutenção da normoglicemia, contudo, os valores apresentados não tiveram a capacidade de normalizar a glicemia pós-prandial a níveis abaixo de 140 mg/dL. Ainda, os resultados obtidos para o grupo hidrogel, contendo insulina (HI), demonstraram que houve a redução da glicemia com 60 minutos de experimento com resultados obtidos significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$), sendo progressiva até o tempo de 180 minutos e mantida até 360 minutos, demonstrando a possível capacidade de manutenção da normoglicemia. Portanto, o que foi observado para estas duas formulações (HLI e HI) em relação à efetividade biológica com uma única administração nasal, foi a queda gradativa da glicemia que foi mantida por um período de 360 minutos, sugerindo que certamente estas formulações liberaram a insulina gradativamente e de forma contínua, diferentemente do que ocorreu na aplicação subcutânea, em que a glicemia não foi mantida por um período superior a 180 minutos.

Por outro lado, os grupos que continham os CPPs, sendo estes hidrogel+ lipossoma funcionalizados com TAT, contendo insulina (HLI_{TAT}) e hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT, contendo insulina (HLI_{PNT}) possuem potencial para serem melhorados, visto que o grupo HLI_{TAT} promoveu a redução da glicemia a partir de 180 minutos, com resultados significativamente diferentes quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$) e o grupo HLI_{PNT} promoveu uma rápida queda da glicemia em 120 minutos, com resultados significativamente diferentes compreendidos entre 60 e 180 minutos, quando comparado ao tempo inicial ($p < 0.05$).

Portanto, os resultados de concentração temporal de insulina e resposta antihiper-glicêmica mostraram em conjunto que a estratégia de funcionalização de lipossomas com CPPs, contendo insulina dispersos em hidrogel possuem potencial para serem melhoradas e sugere-se que o grupo HLI_{PNT} pode ser considerado um promotor de absorção precoce, enquanto que, o grupo HLI_{TAT} pode ser considerado um promotor de absorção tardia. Isto pode ser justificado pela complexação CPP + insulina e/ou a baixa concentração dos CPPs, abaixo da concentração necessária para

desencadear o efeito promotor de absorção, conforme descrito na literatura (MILLETTI *et al.*, 2012; KOREN; TORCHILIN *et al.*, 2012; BECHARA *et al.*, 2013).

Neste sentido, Jain e colaboradores elaboraram lipossomas multivesiculares revestidos com quitosana e carbopol com propriedades mucoadesivas com o objetivo de liberação sustentada de insulina através da via nasal e ocular em ratos diabéticos e demonstraram que a liberação da insulina foi prolongada por um período de 7 a 9 dias, sem liberação imediata (‘efeito *burst*’) contrariando a literatura referente aos sistemas de liberação sustentada, entretanto, os lipossomas convencionais obtiveram uma redução 34% dos níveis de glicose no plasma em 8 horas contra uma redução de 35% em 2 dias para lipossomas multivesiculares revestidos com quitosana (JAIN *et al.*, 2007).

De outro modo, Dyer e colaboradores investigaram se o uso de quitosana como sistema de liberação de insulina nasal poderia ser melhorada pela aplicação de quitosana formulada como nanopartículas e foi observado que as nanopartículas de quitosana não melhoraram o efeito de aumento da absorção da insulina quando comparada à solução de quitosana e as formulações de pó de quitosana (DYER *et al.*, 2002).

5.15.2.1 Alterações na ativação da sinalização da insulina na musculatura esquelética de atos diabéticos

A insulina é um importante hormônio anabólico sintetizado no pâncreas pelas células β das ilhotas de Langerhans, participando da regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (HABER *et al.*, 2001; KATZUNG; TREVOR, 2017; BRUNTON *et al.*, 2018).

Os efeitos metabólicos imediatos da insulina incluem aumento da captação tecidual de glicose especialmente pela musculatura esquelética e tecidos adiposo, através do aumento da translocação de vesículas contendo transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4) do citoplasma para a membrana plasmática do adipócito e miócitos (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

As formulações avaliadas foram as seguintes:

- I. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma branco (HLB);
 - II. Administração intranasal de solução salina (SS_{nasal});
 - III. Administração intranasal de insulina em solução salina (Ins_{nasal});
 - IV. Administração subcutânea de 2 U insulina Novolin R[®] (Ins_{sub});
 - V. Administração intranasal de hidrogel, contendo solução de insulina (HI);
 - VI. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma convencional, contendo solução de insulina (HLI);
-

- VII. Administração intranasal de hidrogel + lipossoma funcionalizado com PNT, contendo solução de insulina (HLI_{PNT});
- VIII. Administração intranasal de hidrogel+ lipossoma funcionalizado com TAT, contendo solução de insulina (HLI_{TAT});

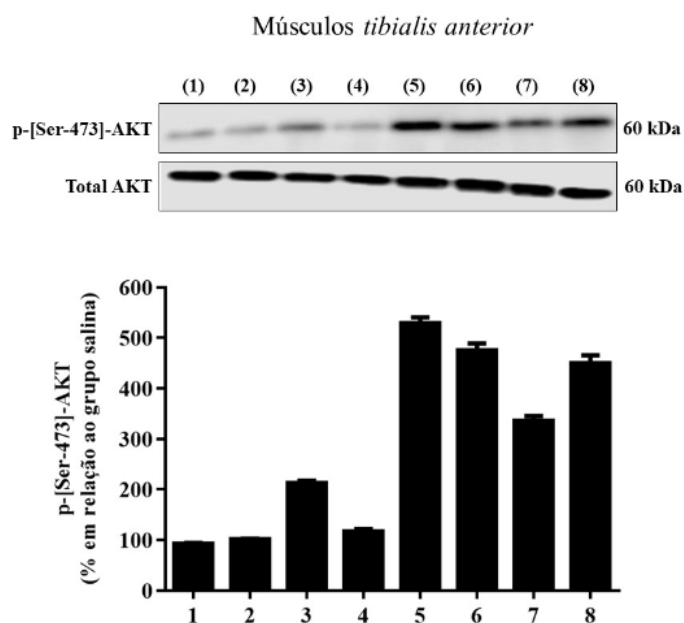


Figura 40. Níveis de fosforilação de AKT (Ser-473) em músculos tibialis anterior de ratos diabéticos 360 minutos após a administração nasal de formulações de 1.HLB; 2.SSnasal; 3.Ins. nasal; 4.Ins. sub; 5.HI; 6.HLI; 7.HLI_{pnt}; 8.HLI_{tat} contendo 2 U de insulina.

Foram obtidos resultados da fosforilação da proteína AKT baseados em músculos esquelético tibialis anterior de um animal, conforme demonstrado na Figura 40. Neste ensaio observou-se que após 6 horas, todas as formulações (HLI_{TAT}, HLI_{PNT} HI e HLI) foram capazes de promover liberação de forma contínua ou mantida de insulina. No músculo esquelético ativou a sinalização e aumentou a fosforilação da AKT, translocando mais transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4), onde houve maior estimulação a captação de glicose no músculo e com isso diminuição da glicemia.

Foi verificado também que estes resultados corroboram aos resultados obtidos no ensaio de respostas anti-hiperglicêmicas, pois as formulações HI e HLI foram capazes de promover uma liberação de forma contínua ou mantida maior de insulina (após 60 minutos para a HI e 180 minutos para HLI) quando comparado aos resultados observados para as formulações HLI_{TAT}, HLI_{PNT} e dentre as quatro formulações a HI obteve os melhores resultados em relação à queda da glicemia e a sinalização da AKT.

Por outro lado, observamos que uma das formulações controle (insulina subcutânea) obteve resultado inferior em relação à fosforilação da AKT no músculo esquelético, quando comparado às

formulações testadas (HLI_{TAT} , HLI_{PNT} HI e HLI), isto demonstra que uma pequena quantidade de insulina alcançou o músculo esquelético, pois a maior parte atingiu a circulação sistêmica, desempenhou suas ações e foi degradada, pois a meia vida da insulina é de 4-6 minutos.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- ❖ Os valores médios de DMH, Ipd e de PZ das formulações A, B e C preparados tanto pelo método de HFL quanto por REV durante o período de armazenamento de 90 dias, demonstraram-se estáveis visando à futura administração nasal para o tratamento do diabetes mellitus;
- ❖ O método analítico para quantificação da insulina foi validado, onde se obtiveram valores satisfatórios de linearidade, especificidade, LQ, LD, precisão, exatidão e robustez e este foi utilizado para a quantificação de insulina em amostras provenientes dos ensaios de eficiência de encapsulação, liberação *in vitro* e permeação em mucosa nasal suína.
- ❖ A eficiência de encapsulação (EE%) da insulina apresentou valores satisfatórios e optou-se pelo método de preparo de hidratação do filme lipídico (HFL), por apresentar os resultados de EE% mais elevados, além de ser um método de preparo amplamente descrito na literatura e de acordo com os valores de EE% obtidos, observou-se que os lipossomas contendo insulina funcionalizados com PNT possuem os menores valores de EE% nas medições de estabilidade que ocorreram em 30 e 60 dias.
- ❖ Os resultados de funcionalização demonstraram que houve um decréscimo nos valores de potencial zeta de $-53,60 \pm 3,02$ mV para os lipossomas encapsulados com insulina para $-10,90 \pm 0,47$ mV quando funcionalizados com TAT e $-9,05 \pm 0,60$ mV quando funcionalizados com PNT, indicativo de interação eletrostática, devido à carga altamente positiva dos CPPs (TAT e PNT).
- ❖ As leituras de estabilidade realizadas no período de 90 dias de armazenamento demonstram que tanto o CPPs TAT quanto o PNT contribuem para o decréscimo dos valores de PZ por possuírem carga altamente positiva, entretanto, não afetam os valores de DHM e Ipd.
- ❖ As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) confirmaram a estrutura de lipossomas com e sem fármaco e funcionalizados com CPPs (TAT e PNT), uma vez que foram visualizadas vesículas esféricas com tamanho de 150 nm, 100 nm, 80 nm e 80 nm, as quais se correlacionam com o DHM medido pela técnica de espalhamento de luz dinâmica.
- ❖ O hidrogel de HEC preparado na concentração de 2% não apresentou separação de fases no período de 30 dias de armazenamento, permanecendo com aspecto homogêneo e translúcido.
- ❖ Os espectros de DC foram realizados nas formulações recém-preparadas e quando estas mesmas formulações foram submetidas ao ensaio de liberação *in vitro* e demonstraram que a integridade e a estabilidade da insulina após o aprisionamento nos sistemas desenvolvidos (LI, LI_{TAT}, LI_{PNT}, HI e HLI) foi preservada, quando comparada com a insulina em solução.
- ❖ As curvas de nano DSC revelaram três eventos térmicos, sendo dois picos endotérmicos da

solução de insulina e um pico exotérmico. Quando a insulina foi associado ao lipossoma se sugere que o lipossoma diminui a estabilidade térmica da insulina. Entretanto, a associação da insulina ao hidrogel aumentou a estabilidade térmica da insulina, por ter havido o aumento do Tmax dos picos. Por outro lado, quando a insulina foi aos hidrogéis + lipossomas funcionalizados com TAT e PNT, houve o desaparecimento de dois picos o que sugere que pode ter movido estes picos para temperaturas mais altas, acima da faixa de condições experimentais (100°C), aumentando assim a estabilidade térmica da proteína.

- ❖ Nos ensaios de reologia, verificou-se que as formulações comportaram-se como fluidos não-newtonianos com comportamento pseudoplástico, onde se observou que G'' permaneceu em toda a faixa de frequência acima de G' , indicando comportamento mais viscoso das amostras analisadas;
- ❖ No ensaio de força mucoadesiva os resultados das duas membranas modelos (discos de mucina e mucosas nasais suínas) foram muito similares e satisfatórios.
- ❖ No ensaio de seringabilidade o trabalho obtido para a extrusão das formulações a partir da seringa mostrou-se favorável, no que diz respeito à facilidade de aplicação deste tipo de formulação pelo paciente na via nasal.
- ❖ Os ensaios de liberação *in vitro* apresentaram comportamento de liberação bifásico, com liberação imediata em 2 h (“efeito burst”) motivada pela liberação do fármaco não encapsulado ($\approx 25\%$) seguida de liberação mais lenta e contínua proveniente do fármaco encapsulado ($\approx 75\%$). Todas as formulações testadas apresentam cinética de liberação, conforme modelo matemático de Weibull, que relaciona a quantidade de fármaco acumulado em solução em função do tempo.
- ❖ Nos ensaios de permeação em mucosa nasal suína observou-se que o fluxo (J) da formulação HLI foi quase duas vezes maior em relação às formulações HLI_{TAT} e HLI_{PNT} e a mesma relação foi observada para os resultados de coeficiente de permeabilidade (K_p). Enquanto que o fluxo (J) da formulação HI foi 1,5 vezes maior em relação a formulação HLI, sendo que a mesma relação foi observada para o resultado de coeficiente de permeabilidade (K_p).
- ❖ Os ensaios *in vivo* de resposta anti-hiperglicêmica em ratos diabéticos e análise temporal da presença de insulina na circulação sistêmica em ratos não diabéticos a administração nasal das formulações HLI_{TAT} , HLI_{PNT} , HI e HLI demonstraram resultados satisfatórios e promissores, entretanto, as formulações HLI_{TAT} e HLI_{PNT} possuem potencial para serem melhoradas quando comparadas as formulações HI e HLI. Sugere-se que as formulações funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT}), podem ser consideradas promotoras de absorção tardia e as formulações funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT}), promotoras de absorção precoce.
- ❖ Nos ensaios da fosforilação da proteína AKT, os resultados demonstraram que as formulações HLI_{TAT} , HLI_{PNT} , HI e HLI após 6 horas, foram capazes de promover liberação de forma contínua ou mantida de insulina quando comparadas a formulação controle (insulina subcutânea).

7. PERSPECTIVAS

As conclusões apresentadas indicam que a administração intranasal das formulações HLI_{TAT} , HLI_{PNT} , HI e HLI demonstraram resultados satisfatórios e promissores em relação aos níveis de insulina sistêmica e resposta anti-hiperglicêmica, sugerindo que estas formulações liberaram a insulina gradativamente e de forma contínua. Entretanto, as formulações HLI_{TAT} e HLI_{PNT} possuem potencial para serem melhoradas quando comparadas as formulações HI e HLI, devido aos achados na literatura relatarem um excelente desempenho destes CPPs catiônicos no que se refere à ação promotora de absorção de fármacos.

Todavia, sugere-se que este potencial pode ser aprimorado com a utilização de dose maior de insulina em conjunto com a combinação dos peptídeos TAT e PNT em uma única formulação, pois de acordo com os resultados obtidos as formulações funcionalizadas com TAT (HLI_{TAT}) podem ser consideradas promotoras de absorção tardia e as formulações funcionalizadas com PNT (HLI_{PNT}), promotoras de absorção precoce, presumindo um tratamento realizado concomitante com as administrações subcutâneas de insulina, com a finalidade de diminuir o número de aplicações subcutâneas pelo paciente diabético crônico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A.; UVERSKY, V. N.; HONG, D.; FINK, A. L. Early events in the fibrillation of monomeric insulin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 52, p. 42669-42675, 2005.

AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S.W.; ZARGHAMI, N. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n.1.,p.102, 2013.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n.7, p 539-553, 1998.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. 1, p. S62-S69, 2010.

ANDHALE, V. A.; PATIL, P. R.; DHAS, A. U.; CHAUHAN, P. D.; DESAI, S. V. Liposome: An emerging tool in drug carrier system. **Int J Pharmacy Technol**, v. 8, p. 10982-11011, 2016.

ANDREANI, T.; MIZIARA, L.; LORENZÓN, E.N.; DE SOUZA, A.L.R.; KIILL, C.P.; FANGUEIRO, J.F.; GARCIA, M.L.; GREMIÃO, P.D.; SILVA, A.M.; SOUTO, E.B. Effect of mucoadhesive polymers on the *in vitro* performance of insulin-loaded silica nanoparticles: interactions with mucin and biomembrane models. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 93, p.118–126, 2015.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2009.

ARCARO,C.A.; GUITIERRES,V.O.; ASSIS, R.P.; MOREIRA, T.F.; COSTA, P.I.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **Plos One**, v. 9, p. 1-21, 2014.

ASCHE, C.; LAFLEUR, J.; CONNER,C. A review of diabetes treatment adherence and the association with clinical and economic outcomes. **Clinical Therapeutics**, v.33, p.74-109, 2011.

BADADARE, S. S., RAJE, V. N.; JADHAV, R. S. Overview on intranasal mucoadhesive drug delivery. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.16, p.166-188, 2018.

BAE, H.D.; LEE, K. On employing a translationally controlled tumor protein-derived protein transduction domain analog for transmucosal delivery of drugs. **Journal of Controlled Release**, v.170, n.3, p.358-364, 2013.

BAN, M.M.; CHAKOTE, V.R.; DHEMBRE, G.N.; RAJGURU, J.R.; JOSHI, D.A. In-situ gel for nasal drug delivery. **International Journal of Development Research**, v.8, n.2, p.18763-18769, 2018.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p.238-252, 1965.

BARENHOLZ, Y. C. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117-134, 2012.

BATISTA, C.M.; DE CARVALHO, C.M.B; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BECHARA, C.; SAGAN, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? **FEBS Letters**, v.587, p.1693-1702, 2013.

BIBI, S.; KAUR, R.; HENRIKSEN-LASEY, M.; McNEIL, S. E.; WILKHU, J.; LATTMANN, E.; CHRISTENSEN, D.; MOHAMMED, A.R.; PERRIE, Y. Microscopy imaging of liposomes:from coverslips to environmental SEM. **International Journal of Pharmaceutics**, v.417, p. 138-150, 2011.

BILTONEN, R. L.; LICHTENBERG, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, n.1-3, p.129-142, 1993.

BITOUNIS, D.; FANCIULLINO, R.; ILIADIS, A.; CICCOLINI, J. Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, 2012.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, 235, 337-351, 2016.

BOLHASSANI, A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v.1816, n.2, p.232-246, 2011.

BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; PALMIERI, G. F. Colloidal soft matter as drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, . 98, n. 1, p. 1-42, 2009.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p. 975-999, 2015.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n1-2, p.248-254, 1976.

BRANGE, J. Galenics of insulin: the physico-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations. **Springer Science & Business Media**, 2012.

BRANGE, J.; LANGKJER, L. Insulin structure and stability. In: **Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs**. Boston, MA: Springer, 1993. p. 315-350.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União, 2017.

BRAUN, D. B.; ROSEN, M. R. **Rheology modifiers handbook**: Practical use and application. New York: William Andrew Publishing, 2000.

BRIUGLIA, M. L.; ROTELLA, C.; MCFARLANE, A.; LAMPROU, D. A. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, n. 3, p. 231-242, 2015.

BRUNTON, L.L.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**, 13 ed. Porto alegre: AMGH, 2018.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: *in vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2074–2089, 2007.

BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P.; JONES, D. S. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 3, p. 267-278, 2008.

BULBAKE, U.; DOPPALAPUDI, S.; KOMMINENI, N.; KHAN, W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, p. 12, 2017.

CALIXTO, G.; YOSHII, A. C.; ROCHA, S. H.; STRINGHETTI, F. C. B.; CHORILLI, M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, p. 490-496, 2015.

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J.P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, p. 323-328, 2003.

CAMPOS, R.A. Insulinoterapia. **Nascer e crescer**, v. 20, p. S182-S184, 2011

CARVALHEIRA, J. B.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiro Endocrinologia & Metabolismo**, v. 46, n.4, p. 419-425, 2002.

CARVALHO, F. C.; BARBI, M. S.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; NETTO, F. M.; GREMIÃO, M. P. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 430-439, 2010.

CARVALHO, F. C.; DA LUZ, G. M.; DA SILVA BARBI, M.; LANDGRAF, D. S.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; GREMIÃO, M. P. D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 280-289, 2012.

CARVALHO, F.C.; CAMPOS, M.L.; PECCININI, R.G.;GREMIÃO, M. P.D. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, p. 219-227, 2013.

CASTRO, A. G.; COVAS, J. A.; DIOGO, A. C. **Reologia e Suas Aplicações Industriais**. Ciência e Técnica. Lisboa, Portugal: Instituto Piaget,. 2001. 462 p.

CHANNARONG, S.; CHAICUMPA, W.; SINCHAIPANID, N.; MITREVEJ, A. Development and evaluation of chitosan-coated liposomes for oral dna vaccine: the improvement of peyer's patch targeting using a polyplex-loaded liposomes. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p.192–200, 2011.

CHEN, Y. H.; YANG, J. T.; CHAU, K. H. Determination of the helix and β form of protein in aqueous solution by circular dichroism. **Biochemistry**, v. 13, n. 16, p. 3350-3359, 1974.

CHIENG, Y. Y.; CHEN, S. B. Rheological study of hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose and phospholipid vesicles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 349, n. 1, p. 236-245, 2010.

CHO, N.; SHAW, J. E.; KARURANGA, S.; HUANG, Y.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; OHLROGGE, A. W.; ALANDA, B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.138, p. 271-281, 2018.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 73-77, 2004.

CHORILLI, M.; CALIXTO, G.; RIMÉRIO, T.C.; SCARPA, M.V. Caffeine encapsulated in small unilamellar liposomes: characterization and *in vitro* release profile. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n, 10, p. 1465–1470, 2013.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais: Conceitos e procedimentos recomendados**. Brasília, 2012.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n.9513, p. 847–858, 2006.

DE ARAÚJO LOPES, S. C.; DOS SANTOS GIUBERTI, C.; ROCHA, T. G. R.; DOS SANTOS FERREIRA, D.; LEITE, E. A.; OLIVEIRA, M. C. Liposomes as carriers of anticancer drugs. In Cancer Treatment-Conventional and Innovative Approaches. **IntechOpen**, v. 1, p. 85-124, 2013.

DE CARVALHO PINCINATO, E. Atualização do diagnóstico, classificação e tratamento para Diabetes Mellitus (DM). **Revista de Atenção à Saúde (antiga Rev. Bras. Ciên. Saúde)**, v. 1, n. 1, 2010.

DÉAT-LAINÉ, E.; HOFFART, V.; CARDOT, J. M.; SUBIRADE, M.; BEYSSAC, E. Development and *in vitro* characterization of insulin loaded whey protein and alginate microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.439, n.1-2, p.136-144, 2012.

DEGIM, Z., ÜNAL, N., EŞSİZ, D.; ABBASOĞLU, U. The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer. **Life sciences**, v.75, n.23, p.2819-2827, 2004.

D'SOUZA, R.; MUTALIK, S.; VENKATESH, M.; VIDYASAGAR, S.; UDUPA, N. Insulin gel as an alternate to parenteral insulin: formulation, preclinical, and clinical studies. **AAPS PharmSciTech**, v.6, n.2, p.184-189, 2005.

DEUTEL, B.; LAFFLEUR, F.; PALMBERGER, T.; SAXER, A.; THALER, M.; Bernkop-Schnürch, A. *In vitro* characterization of insulin containing thiomeric microparticles as nasal drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 157-161, 2016.

DEVAYANI, P.; RAVINDRA, S. A Review on gels as a nasal drug delivery system. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 6, p. 4831-4861, 2013.

DI PISA, M.; CHASSAING, G.; SWIECICKI, J. M. Translocation mechanism (s) of cell-penetrating peptides: biophysical studies using artificial membrane bilayers. **Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 194-207, 2014.

DISSANAYAKE, S.; DENNY, W. A.; GAMAGE, S.; SAROJINI, V. Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 250, p. 62-76, 2017.

DYER, A.M.; HINCHCLIFFE, M.; WATTS, P.; CASTILE, J.; JABBAL-GILL, I.; NANKERVIS, R.; SMITH, A.; ILLUM, L. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n.7, p. 998–1008, 2002.

EL KECHAI, N.; BOCHOT, A.; HUANG, N.; NGUYEN, Y.; FERRARY, E.; AGNELY, F. Effect of liposomes on rheological and syringeability properties of hyaluronic acid hydrogels intended for local injection of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 487, n. 1-2, p. 187-196, 2015.

ELOY, J. O.; DE SOUZA, M. C.; PETRILLI, R.; BARCELLOS, J. P. A.; LEE, R. J.; MARCHETTI, J. M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.123, p.345-363, 2014.

ELOY, J. O, PETRILLI, R., TOPAN, J. F., ANTONIO, H. M. R., BARCELLOS, J. P. A., CHESCA, D. L., ... & MARCHETTI, J. M. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and *in vitro* and *in vivo* evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74-82, 2016.

ELOY, J.O.; PETRILLI, R.; CHESCA, D.L.; SAGGIORO, F.P.; LEE, R.J.; MARCHETTI, J.M. Anti-her2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 159–167, 2017.

EPSHTEIN, N. A. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 38, n. 4, p. 212-228, 2004.

EVERT, A. B.; BOUCHER, J. L.; CYPRESS, M.; DUNBAR, S. A.; FRANZ, M. J.; MAYER-DAVIS, E. J.; ... & YANCY, W. S. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement 1, p. S120-S143, 2014.

FARKHANI, S.M.; VALIZADEH, A.; KARAMI, H.; MOHAMMADI, S.; SOHRABI, N.; BADRZADEH, F. Cell penetrating peptides: efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. **Peptides**, v.57, p.78-94, 2014.

FAUCI, A.S. **Harrison Medicina Interna**, 17. ed. Porto Alegre: AMGH, 2008. V. II, p. 2275-2276, 2008.

FDA - Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 1994.

FISCHER, P. M.; ZHELEV, N. Z.; WANG, S.; MELVILLE, J. E.; FÅHRAEUS, R.; LANE, D. P. Structure–activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin. **The Journal of Peptide Research**, v.55, n.2, p-163-172, 2000.

FONSECA, S. B.; PEREIRA, M. P.; KELLEY, S. O. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 11, p. 953-964, 2009.

FORTE, P.; ARAÚJO, F.; SILVA, C.; PEREIRA, C.; REIS, S.; SANTOS, H. A.; SARMENTO, B. (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1342-1354, 2015.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

FORTUNA, A.; ALVES, G.; SERRALHEIRO, A.; SOUSA, J.; FALCAO, A. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 8-27, 2014.

FRANSÉN, N.; BJORK, E.; EDSMAN, K. Changes in the mucoadhesion of powder formulations after drug application investigated with a simplified method, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 9, 2008 .

FREIBERG, S.; ZHU, X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 1-18, 2004.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GALAN, B.E. Can inhaled insulin be used for the treatment of diabetes mellitus?, **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v.8, n.1, p. 33-42, 2008.

GATTI, T.H.H.; ELOY, J.O.; FERREIRA, L.M.B.; DA SILVA, I.C.; PAVAN, F.R.; GREMIÃO, M.P.D.; CHORILLI, M. Insulin-loaded polymeric mucoadhesive nanoparticles: development, characterization and cytotoxicity evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.54, p.1–10, 2018.

GENUTH, S. Type 1 diabetes mellitus. **ACP Medicine**, p. 1-19, 2008.

GERMINO, F.W. Noninsulin treatment of type 2 diabetes mellitus in geriatric patients: a review. **Clinical Therapeutics**, v. 33, p. 1868-1882, 2011.

GHALAMI, J.; ZARDOOZ, H.; ROSTAMKHANI, F.; FARROKHI, B.; HEDAYATI, M. Glucose-stimulated insulin secretion: Effects of high-fat diet and acute stress. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 36, n. 10, p. 835-842, 2013.

GREGORIADIS, G. **Liposome Technology**: Entrapment of drugs and other materials into liposomes. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2016.

GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n.4, p. 406-424, 2017.

GUO, C.; LIU, S.; DAI, Z.; JIANG, C.; LI, W. Polydiacetylene vesicles as a novel drug sustained-release system. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 76, p. 362–365, 2010.

GUPTA, A.; JHA, K.K.; ARORA, R. Insulin drug delivery: strategies and technologies. **The Pharma Research**, v.4, p.154-168, 2010.

GUPTA, P.N.; PATTANI, A.; CURRAN, R.M.; KETT, V.L.; ANDREWS, G.P.; MORROW, R.J.; WOOLFSON, A.D.; MALCOLM, R.K. Development of liposome gel based formulations for intravaginal delivery of the recombinant hiv-1 envelope protein cn54gp140. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p.315–322, 2012.

GUTIERRES, V. O.; ASSIS R. P.; ARCARO, C. A.; OLIVEIRA, J. O.; LIMA, T. F. O.; BERETTA, A. L. R. Z., ... & BRUNETTI, I. L. Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 4, p. 976-988, 2019.

HADIAN, Z.; SAHARI, M. A.; MOGHIMI, H. R.; BARZEGAR, M. Formulation, characterization and optimization of liposomes containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids; a methodology approach, **Iranian Journal of Pharmaceutical Research** , v 13, p. 393–404, 2014.

HÄGERSTRÖM, H.; EDSMAN, K. Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p.1589–1599, 2001.

HABER, E.P.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.; CARPINELLI, A.R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**,v.45, n.3, p. 219–227, 2001.

HEINEMANN, L., New ways of insulin delivery. **The International Journal of Clinical Practice**, v.64, n.166, p. 29-40, 2010.

HEINEMANN, L.; PFUTZNER, A.; HEISE, T. Alternative routes of administration as an approach to improve insulin therapy: update on dermal, oral, nasal and pulmonary insulin delivery. **Current Pharmaceutical Design**, n. 14, p. 1327-1351, 2001.

HENKIN, R. I. Intranasal insulin: from nose to brain. **Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 624-633, 2010.

HENRY, R.R.; GUMBINER, B.; DITZLER, T.; WALLACE, P.; LYON, R.; GLAUBER, H.S. Intensive conventional insulin therapy for type II diabetes: metabolic effects during a 6-month outpatient trial. **Diabetes Care**, v. 16, p. 21–31, 1993.

HINCHCLIFFE, M.; ILLUM, L. Intranasal insulin delivery and therapy 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 35, n.2-3, p. 199–234, 1999.

HOSNY, K.M. Optimization of gatifloxacin liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation. **Journal of liposome research**, v. 20, n. 1, p. 31-37, 2010a.

HOSNY, K.M. Ciprofloxacin as ocular liposomal hydrogel. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p.241-246, 2010b.

HU, F. B. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 6, p. 1249-1257, 2011.

HUA, S.; WU, S. Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 143, 2013.

HUNTER S.J.; GARVEY, W.T. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. **American Journal of Medicine**, v.105, n.4, p.331-345, 1998.

HUUS, K.; HAVELUND, S.; OLSEN, H.B.; van de Weert, M; FROKJAER, S. Thermal dissociation and unfolding of insulin. **Biochemistry**, v.44, p. 11171–11177, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. London: ICH, 2005.

IDF. International Diabetes Federation " IDF Diabetes Atlas". 8th ed. 2017. 150p.

IDF. International Diabetes Federation. **About Diabetes**. Disponível em: <<http://www.idf.org/worlddiabetesday>>, Acessado em 05 de maio de 2018.

ILLUM, L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 23, p. 1184-1189, 2002.

ILLUM, E. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 87, p. 187-198, 2003.

ILLUM, L. H. H. O. N.; JØRGENSEN, H.; BISGAARD, H.; KROGSGAARD, O.; ROSSING, N. Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 39, n. 3, p. 189-199, 1987.

ISMAIL, R.; CSOKA, I. Novel strategies in the oral delivery of antidiabetic peptide drugs–Insulin, GLP 1 and its analogs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 257-267, 2017.

IWANAGA, K., ONO, S., NARIOKA, K., KAKEMI, M., MORIMOTO, K., YAMASHITA, S., NAMBA, Y., OKU, N. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v.88, p.248-255, 1999.

JAIN, A.; JAIN, S. K.. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: an insight. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 201, p. 28-40, 2016.

JAIN, A. K.; CHALASANI, K. B.; KHAR, R. K.; AHMED, F. J.; DIWAN, P. V. Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. **Journal of drug targeting**, v. 15, n. 6, p. 417-427, 2007.

JAIN, A. K.; KHAR, R. K.; AHMED, F. J.; DIWAN, P. V. Effective insulin delivery using starch nanoparticles as a potential trans-nasal mucoadhesive carrier. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 426-435, 2008.

JAIN, K. K. **Drug delivery systems**. 2nd. ed. Totowa, NJ: Humana press, 2008.

JONES, C.W. Gestational diabetes and its impact on the neonate. **Neonatal Network**, v. 20, n. 6, p. 17-23, 2001.

JONES, D.S.; BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O., GREMIÃO, M. P. D.; LARA, E. H.; ANDREWS, G. P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 49-58, 2009.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F.; NEILL, M.J.O. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket : *in vitro* release kinetics, syringeability , mechanical and mucoadhesive properties. **Journal of Controlled Release**, v. 49, n. 1, p. 71-79, 1997.

JOSE, A.; MANDAPALLI, P.K.; VENUGANTI, V.V.K. Liposomal hydrogel formulation for transdermal delivery of pirfenidone. **Journal of Liposome Research**,v. 2104, p. 1–9, 2015.

KADDAH, S., KHREICH, N., KADDAH, F., CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 40-48, 2018.

KAHN, S.E. Beta cell failure: causes and consequences. **International Journal of Clinical Practice Suppl.**, v.123, p.13-18, 2001.

KAMEI, N.; MORISHITA, M.; EDA, Y.; IDA, N.; NISHIO, R.; TAKAYAMA, K. Usefulness of cell-penetrating peptides to improve intestinal insulin absorption. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 1, p. 21-25, 2008.

KANG, M. L.; CHO, C. S.; YOO, H. S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 857–886, 2009.

KAOURMA, E.; HATZIANTONIOU, S.; GEORGOPOULOS, A.; KOLOCOURIS, A.; DEMETZOS, C. Development of simple thiol-reactive liposome formulations, one-step analysis and physicochemical characterization. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p.527–531, 2005.

KARAVASILI, C.; FATOUROS, D. G. Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 1, p. 157-166, 2016.

KATZUNG, B.G.; TREVOR, A.J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Brasil, 2017.

KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N.C. How to study protein by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics**, v. 1751, p. 119–139, 2005.

KECK, T., LEIACKER, R., RIECHELMANN, H.; RETTINGER, G. Temperature profile in the nasal cavity. **The Laryngoscope**, v. 110, n. 4, p. 651-654, 2000.

KISSEL, T.; WERNER, U. Nasal delivery of peptides: an *in vitro* cell culture model for the investigation of transport and metabolism in human nasal epithelium. **Journal of Controlled Release**, v.53, p. 195-203, 1998.

KHAN, A. R.; LIU, M.; KHAN M. W.; ZHAI, G. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. **Journal of Controlled Release**, v. 268, p. 364-389, 2017.

KHAFAGY, E.S.; MORISHITA, M.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. **Advances in Drug Delivery Review**, v. 59, n.15, p.1521–1546, 2007.

KHAFAGY, E.S.; MORISHITA, M.; ISOWA, K.; IMAI, J.; TAKAYAMA, K. Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin. **Journal of Controlled Release**, v, 133, n.2, p. 103-108, 2009.

KHAFAGY, E. S.; MORISHITA, M.; IDA, N., NISHIO R.; ISOWA, K.; TAKAYAMA, K. Structural requirements of penetratin absorption enhancement efficiency for insulin delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 143, n. 3, p. 302-310, 2010.

KHAFAGY, E. S.; KAMEI, N.; NIELSEN, E. J. B.; NISHIO, R.; TAKEDA-MORISHITA, M. One-month subchronic toxicity study of cell-penetrating peptides for insulin nasal delivery in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 736-743, 2013.

KHALIL, N. M.; NASCIMENTO, T.C.F.N.; CASA, D.M.; DALMOLIN, L.F.; MATTOS, A.C.; HOSS, I.; ROMANO, M.A.; MAINARDES, R. M. Pharmacokinetics of curcumim-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.101, p.353-360, 2013.

KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24, n.13 p.2339-2349, 2003.

KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p. 748-764, 2011.

KOREN, E.; TORCHILIN, V.P. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. **Trends Mol. Med.**, v.18, n.7, p. 385–393, 2012.

KRAULAND, A. H.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. **Journal of Controlled Release**, v.95, n.3,p. 547-555, 2004.

KRISHNARAJAN, D.; TAMILSELVAN, A.; ABRAHAM, S.; MATHEW, R. J.; RAMYA, S.; RAJA, K. R. NEW APPROCHES OF NASAL DRUG DELIVERY SYSTEM. **Pharmacophore**, v. 7, n. 4, p.242-264, 2016.

KUMAR, V.; TRIPATHI, M. K.; CHAUHAN, P. K.; SINGH, P. K. Different non-pharmacological approaches for management of type 2 diabetes. **Journal of Diabetology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2013.

KUMAR, A.; PANDEY, A. N.; JAIN, S. K. Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 671-683, 2016.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

YOUNG, Matthew. Putting feet first in diabetes. Editorial. **LANCET**, v. 366, n. 9498, p. 1674, 2005.

LANGEL, U. **Cell-penetrating peptides: processes and applications**. Boca Raton: CRC press, 2002.

LANGEL, U. **Handbook of cell-penetrating peptides**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC press, 2006.

LANGEL, U. **Cell-penetrating peptides: Methods and Protocols**. 2nd. ed. New York: Humana Press, 2011.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LASSMANN-VAGUE, V.; RACCAH, D. Alternatives routes of insulin delivery. **Diabetes & Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 513-522, 2006.

LAVERMAN, P.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G.; DAMS, E. T. M.; STORM, G.; CORSTENS, F. H. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 37, p. 225-235, 1999.

LEE, Y.; THOMPSON, D. H. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 5, p. e1450, 2017.

LI, D. Diabetes and pancreatic cancer. **Molecular Carcinogenesis**, v. 51, n. 1, p. 64-74, 2012.

LIANG, J. F.; YANG, V. C. Insulin-cell penetrating peptide hybrids with improved intestinal absorption efficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.335, n.3,p.734-738, 2005.

LINDEMANN, J.; LEIACKER, R.; RETTINGER, G.; KECK, T. Nasal mucosal temperature during respiration. **Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**, v. 27, n. 3, p. 135-139, 2002.

LOCHHEAD, J.J.; THORNE, R.G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**,v. 64, n.7, p. 614–628, 2012.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Current Drug Targets**, v. 3, n. 3, p. 275-285, 2006.

MAINARDES, R.M.; KHALIL, N.M.; GREMIAO, M.P.D. Intranasal delivery of zidovudine by pla and pla-peg blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 395, p. 266–271, 2010.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 376-399, 2002.

MATTHEWS, D.R. Insulin resistance and E-cell function – a clinical perspective. **Diabetes Obesity Metabolism**, v.3, p.28-33, 2001.

MENEGUIN, A. B.; BEYSSAC, E.; GARRAIT, G.; HSEIN, H.; CURY, B. S. Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 123, p. 84-94, 2018.

MENZEL, C.; JELKMANN, M.; LAFFLEUR, F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Nasal drug delivery: design of a novel mucoadhesive and in situ gelling polymer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1-2, p. 196-202, 2017.

MERTINS, O.; SEBBEN, M.; POHLMANN, A.R.; DA SILVEIRA, N.P. Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. **Chemistry and Physics Lipids**, v. 138, p. 29–37, 2005.

MILLETTI, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. **Drug Discovery Today**, v.17, n.15-16, p.850-860, 2012.

MONTEIRO, N.; MARTINS, A.; REIS, R. L.; NEVES, N. M.. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 101, p. 20140459, 2014.

MORAIS, G. G.; SANTOS, O. D.; MASSON, D. S.; OLIVEIRA, W. P.; FILHO, P. A. R. Development of O/W emulsions with annatto oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 591-596, 2005.

MOURTAS, S.; FOTOPOULOU, S.; DURAJ, S.; SFIKA, V.; TSAKIROGLOU, C.; ANTIMISIARIS, S.G. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v.55, p.212–221, 2007.

MOURTAS S.; HAIKOU M.; THEODOROPOULOU M.; TSAKIROGLOU C.; ANTIMISIARIS S.G.; The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: A systematic study. **Journal of Colloid Interface Sciences** v.317, n.2, p.611-619, 2008.

NEMEN, D.; LEMON-SENA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea **Química Nova**, v.36, n.3, p. 171–176, 2011.

NEVES, A. R.; LÚCIO, M.; MARTINS, S.; LIMA, J. L.; REIS, S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p.177-187, 2013.

NEW, R.R.C. **Preparation of liposomes. Liposomes: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 33-104.

NIELSEN, E. J. B.; YOSHIDA, S.; KAMEI, N.; IWAMAE, R.; KHAFAGY, E. S.; OLSEN, J., ... & TAKEDA-MORISHITA, M. In vivo proof of concept of oral insulin delivery based on a co-administration strategy with the cell-penetrating peptide penetratin. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 19-24, 2014.

NIU, M.; LU, Y.; HOVGAARD, L.; WU, W. Liposomes containing glycocholate as potential oral insulin delivery systems: preparation, *in vitro* characterization, and improved protection against enzymatic degradation. **International Journal Nanomedicine**, v.6, p.1155-1166, 2011.

NUNES, K.M.; TEIXEIRA, C.C.C.; KAMINSKI, R.C.K.; SARMENTO, V.H.V; COUTO, R.O.; PULCINELLI, S.H.; FREITAS, O. The monoglyceride content affects the self-assembly behavior , rheological properties , syringeability , and mucoadhesion of in situ-gelling liquid crystalline phase. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 8, p. 2355-2364, 2016.

OLIVEIRA, J. E. P. D.; MILECH, A. **Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004. 362p.

OSTH, K.; GRASNO, J.; BJORK, E. A new method for drug transport studies on pig nasal mucosa using a horizontal Ussing Chamber. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 1259-1273, 2002.

OWENS, D. R.; ZINMAN, B.; BOLLI, G. Alternative routes of insulin delivery. **Diabetic Medicine**, v. 20, n. 11, p. 886-898, 2003.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PARDAKHTY, A.; VARSHOSAZ, J.; ROUHOLAMINI, A. *In vitro* study of polyoxyethylene alkyl ether niosomes for delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n.2, p. 130–141, 2007.

PARK, S. J.; CHOI, S. G.; DAVAA, E.; PARK, J. S. Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.415, n.1,p. 267-272, 2011.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. Chemistry and physics of lipids, **Chemistry and Physics of Lipid** v. 177, p. 8-18, 2014.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 4, p. 2133-2223, 2018.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; PRAÇA, F. S. G.; DEL CIAMPO, J. O.; FANTINI, M. A. C.; FONSECA, M. J. V.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid crystalline nanodispersions functionalized with cell-penetrating peptides for topical delivery of short-interfering RNAs: a proposal for silencing a pro-inflammatory cytokine in cutaneous diseases. **Journal of biomedical nanotechnology**, v.12, n.5, p. 1063-1075, 2016.

PINTO, I. C; CERQUEIRA-COUTINHO, C; FREITAS, Z. M. F.D; SANTOS, E. P.D; CARMO, F. A.D; RICCI JUNIOR, E. Development and validation of an analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC) to determine ethyl butylacetylaminopropionate in topical repellent formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 2, p. 1–8, 2017.

PIRES, A.; FORTUNA, A.; ALVES, G.; FALCÃO, A. Intranasal drug delivery: how, why and what for?. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 288-311, 2009.

PORETSKY, LEONID. **Principles of diabetes mellitus**. 3rd. ed. New York: Springer, 2010. 1066p.

PRABHAKAR, P. K.; KUMAR, A.; DOBLE, M. Combination therapy: a new strategy to manage diabetes and its complications. **Phytomedicine**, v. 21, n.2, p.123-130, 2014.

PRINGELS, E.; CALLENS, C.; VERVAET, C.; DUMONT, F.; SLEGGERS, G.; FOREMAN, P.; REMON, J. P. Influence of deposition and spray pattern of nasal powders on insulin bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.310, p. 1-7, 2006.

PUND, S.; RASVE, G.; BORADE, G. Ex vivo permeation characteristics of venlafaxine through sheep nasal mucosa. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 195–201, 2013.

QIN, Y.; CHEN, H.; YUAN, W.; KUAI, R.; ZHANG, Q.; XIE, F.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; LIU, J.; HE, Q. Liposome formulated with tat-modified cholesterol for enhancing the brain delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 85–95, 2011.

QIANG, F.; SHIN, H. J.; LEE, B. J.; HAN, H. K. Enhanced systemic exposure of fexofenadine via the intranasal administration of chitosan-coated liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 161-166, 2012.

RAUCHER, D.; RYU, J.S. Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment. **Trends Molecular Medicine**, v.21, n.9, p.560-570, 2015.

RAMSEY, J.D.; FLYNN, N.H. Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. **Pharmacology & Therapeutics.**, v. 154, p. 78–86, 2015.

REIS, C.P.; DAMGÉ, C. Nanotechnology as a promising strategy for alternative routes of insulin delivery. **Methods in Enzymology**, Academic Press, v. 508, p. 271-294, 2012.

REKHA, M.R.; SHARMA, C.P. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes – Future perspectives International. **Int. J. Pharm**, v. 440, p. 48-62, 2013.

Resolução Normativa 13/2013 CONCEA- Diretrizes da Prática de Eutanásia.

RITTHIDEJ G. Nasal delivery of peptides and proteins with chitosan and related mucoadhesive polymers. In: VAN DER WALLE, Chris (Editor). **Peptide and Protein Delivery**. Academic Press, 2011. p-47-68.

RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S. Avaliação *in vitro* de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependentes e independentes de análise. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**, v. 34, n. 1, p. 13-23, 2005.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799, 2001.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 1, p. 12-22, 2016.

SAMSON, G.; GARCÍA, A.; CALERA, D.; DUPUIS-GIROD. S.; FAURE, F.; LYON, B. Ex vivo study of bevacizumab transport through porcine nasal mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.80, p.465-469, 2012.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M.A.R.B. Liposomes: has the magic bullet hit the target?. **Química nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicilin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; FERREIRA, D. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n.9, p. 898-903, 2006.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n.1, p. 1-7, 2006a.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; FERREIRA, D. Development and Characterization of New Insulin Containing Polysaccharide Nanoparticles. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v.53, p.193–202, 2006b.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2006.

SCHUETZ, Y.B.; GURNY, R.; JORDAN, O. A novel thermoresponsive hydrogel based on chitosan. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, p. 19–25, 2008.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R.; DE, B. **Diabetes mellitus in 21st century**. Springer, 2016. 186 p.

SERCOMBE, L.; VEERATI, T.; MOHEIMANI, F.; WU, S. Y., SOOD, A. K.; HUA, S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 286, 2015.

SHAH, D.; AGRAWAL, V., PARIKH, R., Noninvasive insulin delivery system: a review. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v.2, n.1, p. 35-40, 2010.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposome in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 154, p.123-140, 1997.

SHUKLA, R.; BARVE, V.; PADHYE, S.; BHONDE, R. Reduction of oxidative stress induced vanadium toxicity by complexing with a flavonoid, quercetin: a pragmatic therapeutic approach for diabetes. **Biomaterials**, v. 19, n. 6, p. 685-693, 2006.

SILIGARDI, G.; HUSSAIN, R.; PATCHING, S.G.; PHILLIPS-JONES, M.K. Ligand- and drug-binding studies of membrane proteins revealed through circular dichroism spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p. 34–42, 2014.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 125-140, 2002.

SINGH, R. M.; KUMAR, A.; PATHAK, K. Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 1, p. 115-130, 2013.

SINTOV, A.C.; LEVY, H. V.; BOTNER, S. Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Controlled Release**, v.148, n.2, p. 168–176, 2010.

SMISTAD, G.; NYSTRÖM, B.; ZHU, K.; GRØNVOLD, M.K.; RØV-JOHNSEN, A.; HIORTH, M. Liposomes coated with hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose: influence of hydrophobic chain length and degree of modification. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v.156, p. 79–86, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Detecção e tratamento das complicações crônicas do Diabetes Mellitus. Disponível em <<http://www.diabetes.org.br>>. Acesso em: 02/02/2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Disponível em <<http://www.diabetes.org.br>> (02/02/2016).

SONIA, T. A; SHARMA, C. P. **Oral Delivery of Insulin**. 15th. ed. Kerala: Elsevier, 2014.

SOUZA,C.R; ZANETTI, M.L. Administração de insulina: uma abordagem fundamental na educação em diabetes. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v.34,n.3,p.264-70, 2000.

STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Advances in physiology education*, **Advances in Physiology Education**, v. 38, n. 4, p. 308-314, 2014.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. Liposome as Pharmaceutical Dosage Forms. In: Dekker M. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. New York:Oxford University Press; p. 1-39, 1994.

TAKEUCHI, H.; MATSUI, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. **Journal of Controlled Release**, v.86, p.235–242, 2003.

TAKECHI, Y.; YOSHII, H.; TANAKA, M.; KAWAKAMI, T.; AIMOTO, S.; SAITO, H.. Physicochemical mechanism for the enhanced ability of lipid membrane penetration of polyarginine. **Langmuir**, v. 27, n. 11, p. 7099-7107, 2011.

TANTIPOLPHAN, R.; ROMEIJN, S.; DEN ENGELSMAN, J.; TOROSANTUCCI, R.; RASMUSSEN, T.; JISKOOT, W. Elution behavior of insulin on high-performance size exclusion chromatography at neutral pH. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 2, p. 195-202, 2010.

THOMAS, N.; KAPOOR, N.; VELAVAN, J.;VASAN K, S. **A practical guide to diabetes mellitus**.7th. ed. JP Medical , 2016. 599 p.

THORÉN, P. E.; PERSSON, D.; KARLSSON, M.; NORDÉN, B. The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers—the first direct observation. **FEBS letters**,v.482, n.3, p.265-268, 2000.

THORÉN, P. E., PERSSON, D., ISAKSON, P., GOKSÖR, M., ÖNFELT, A.; NORDÉN, B. Uptake of analogs of penetratin, Tat (48–60) and oligoarginine in live cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, , v. 307, n. 1, p. 100-107, 2003.

TIMASHEFF, S. N.; ETTINGER, M. J.; STRYCHARZ, M. G. Optical activity of insulin. in nature of the circular dichroism bands. **Biochemistry**, v. 10, n. 5, p. 824-831, 1971.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.145-160, 2005.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyadrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n.9, p.4350-4354, 1979.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n.2, p.246, 1969.

TÜRKER, S.; ONUR, E.; ÓZER, Y. Nasal route and drug delivery systems. **Pharmacy World and Science**, v. 26, n. 3, p. 137-142, 2004.

UGWOKE, M. I.; AGU, R. U.; VERBEKE, N.; KINGET, R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**., v. 57, p. 1640-1665, 2005.

VELICKOVA, E.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; CVETKOVSKA, M.; TSVETANOV, C. Hydroxyethylcellulose cryogels used for entrapment of *saccharomyces cerevisiae* cells. **Reactive & Functional Polymers**.,v. 69, p. 688–693, 2009.

VERLI, H. **Bioinformática**: da biologia à flexibilidade molecular. São Paulo: SBBq, 282 p, 2014.

VIEIRA, E.; LIU, Y. J.; GYLFE, E. Involvement of α 1 and β -adrenoceptors in adrenaline stimulation of the glucagon-secreting mouse α -cell. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 369, n. 2, p. 179-183, 2004.

XU, X.; KHAN, M. A.; BURGESS, D. J. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n.2, p. 410-418, 2012.

WADHER, K.; KALSAIT, UMEKAR, M. Pulmonary insulin delivery: challenges and current status. **Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v.3, n.2, p.1052-1059, 2011.

WANG, F.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, W.; GUO, S.; JIN, F. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. **Journal of Controlled Release**, v.174, p-126-136, 2014.

WOODLE, M.C. Sterically stabilized liposome therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 249-265, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. ISBN 978, p.88, 2016.

YADAV, N. G.; MORRIS, G.; HARDING, S.E.; ANG, S.; ADAMS, G.G. Various non-injectable delivery systems for the treatment of diabetes mellitus. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Target**, v.9, n.1, p.1-13, 2009.

YOKOTA, D.; MORAES, M.; PINHO, S.C. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin : a case study of casein hydrolysate microencapsulation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 325–335, 2012.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quimica Nova**, v. 21, n.6, p. 787–793. ,1988.

ZECCHIN, H. G.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.14, n.4, p. 574-589.2004.

ZETA-METER, Inc. Zeta-potential: A complete course in 5 minutes. **Technical Note**, p. 1-8, 1997.

ZHANG, N.; PING, Q.N.; HUANG, G.H.; XU, W.F. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. **Int. J. Pharm.**, v.294, n.1, p.247-259, 2005.

ZHANG, Y.; WEI, W.; LV, P.; WANG, L.; MA, G. Preparation and evaluation of alginate–chitosan microspheres for oral delivery of insulin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 11-19, 2011.

ZHANG, X.; ZHENG, X.; WU, Z.; GAO, X.; SHU, S.; WANG, Z.; LI, C. β -Cyclodextrin grafting hyperbranched polyglycerols as carriers for nasal insulin delivery. **Carbohydrate Polymers.**, v. 84, n. 4, p.1419–1425, 2011.

ZHENG-HONG W.; QI-NENG P.; YI W.; JIA-MING L. Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.25, n.7, p. 966-972, 2004.

ZHU, X., SHAN, W., ZHANG, P., JIN, Y., GUAN, S., FAN, T., ... & HUANG, Y. Penetratin derivative-based nanocomplexes for enhanced intestinal insulin delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, p. 317-328, 2013.

ZIEGLER, A., SEELIG, J. Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono and multivalent cell-penetrating compounds. **Biophysical Journal**, v.94, n.6, p.2142-2149, 2008.

ZORKO, M., & LANGEL, Ü. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 4, p. 529-545, 2005.

ZYLBERBERG, C.; MATOSEVIC, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3319-3329, 2016.

9. ANEXO

ANEXO 1: Parecer nº 04/2018 – Comissão de Ética no Uso de Animais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Lipossomas funcionalizados com Peptídeos de transdução de membrana para administração nasal de Insulina no tratamento do Diabetes Mellitus" registrada com o Protocolo CEUA/FCE/CAR: 04/2018, sob a responsabilidade da Professora Doutora Amanda Martins Baviera, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP em reunião de 18 de abril de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2018
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico / Wistar- 140 a 160 g 96 M
Nº de animais	96
Peso/idade	140 a 160 g / 03 a 04 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central Unesp/ Botucatu

Araraquara, 18 de abril de 2018.


 Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
 Coordenadora da CEUA