

**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

2016

**MICROPARTÍCULAS DE GOMA GELANA REVESTIDAS COM
FILMES DE AMIDO RESISTENTE/PECTINA COMO
ESTRATÉGIA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA**

Andréia Bagliotti Meneguim

Araraquara/SP



Andréia Bagliotti Meneguín

**MICROPARTÍCULAS DE GOMA GELANA REVESTIDAS COM
FILMES DE AMIDO RESISTENTE/PECTINA COMO
ESTRATÉGIA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

Araraquara/SP

2016

Andréia Bagliotti Meneguín

**MICROPARTÍCULAS DE GOMA GELANA REVESTIDAS COM FILMES DE
AMIDO RESISTENTE/PECTINA COMO ESTRATÉGIA PARA
ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Data de aprovação: 14/01/2016

Titulação: Doutorado em Ciências Farmacêuticas

Componentes da banca examinadora da defesa pública:

Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury (*presidente*)

Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião (*examinador*)

Profa. Dra. Sílvia Stanisquaski Guterres (*examinador*)

Prof. Dr. Marlus Chorilli (*examinador*)

Prof. Dr. Hernane da Silva Barud (*examinador*)

Araraquara, 14 de Janeiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e todos os frutos alcançados com ele à memória do querido **Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista**, homem de inteligência, sabedoria e bondade inabaláveis.

Blackbird

*Blackbird singing in the dead of night
Take these broken wings and learn to fly
All your life
You were only waiting for this moment to arise*

*Blackbird singing in the dead of night
Take these sunken eyes and learn to see
All your life
You were only waiting for this moment to be free*

*Blackbird fly, blackbird fly
Into the light of the dark black night*

*Blackbird fly, blackbird fly
Into the light of the dark black night*

John Lennon/Paul McCartney

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que concedeu-me a oportunidade de realizar meus estudos de Doutorado, superar obstáculos e obter tantas vitórias.

Aos meus pais, **Vânia e Edson**, pelos valores e força sempre transmitidos.

Ao meu marido, **Caio**, pela paciência e companheirismo durante esses longos anos.

Ao **Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista** (no coração) por ter confiado mais esse trabalho a mim.

À **Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury** por ter dado continuidade aos trabalhos do Prof. Raul com maestria. Sou imensamente grata pelos conhecimentos transmitidos sempre com muita paciência e carinho e, acima de tudo, pela nossa amizade.

Aos professores **Palmira Daflon Gremião e Marlus Chorilli**, por toda contribuição para o desenvolvimento deste trabalho ao longo desses anos todos.

A **todos os amigos do laboratório de Farmacotécnica** pelo companheirismo e convivência.

À **Aline Martins dos Santos e Bruno Fonseca-Santos** pela amizade, companheirismo e por toda ajuda prestada para a realização de diversos experimentos deste trabalho.

Aos professores **Eric Beyssac, Ghislain Garrat e Valérie Hoffart** por terem me recebido com tanto carinho e entusiasmo no Laboratório de Biofarmácia da Université D'Auvergne, Clermont-Ferrand (França), dando-me todo o suporte necessário para a realização do Doutorado Sanduíche.

Aos amigos **Fahima Tamani, Pacifique Uw A Manzi, Hassana Hsein, Marina Laurent, Olivia Deb, Okan Yalcin e Angelique Carlin** por tornarem minha estadia na França inesquecível.

Ao **Instituto de Química da UNESP/Araraquara**, pela realização de algumas análises.

Ao **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa**, pela colaboração com o uso do analisador de imagens.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**, especialmente às técnicas de Laboratório Natália e Margarete, pela ajuda dada na realização de meus experimentos.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Doutorado no País (Processo 2012/11798-0) e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (Processo 2015/01268-2).

EPÍGRAFE

"Opte por aquilo que faz seu coração vibrar... Apesar de todas as consequências."

[Osho]

Micropartículas de goma gelana revestidas com filmes de amido resistente/pectina como estratégia para administração oral de insulina.**RESUMO**

O desenvolvimento de um sistema que possibilite a administração oral da insulina (INS) constitui um grande desafio, já que esta pode ser degradada nas porções superiores do trato gastrointestinal (TGI). Seu encapsulamento no interior de matrizes poliméricas baseadas em goma gelana (GG) deve oferecer significativa proteção contra as condições adversas do TGI, além do estabelecimento de interações mucoadesivas. O revestimento de formas farmacêuticas sólidas com amido resistente tipo 3 é uma estratégia tecnológica racional para se alcançar a liberação cólon específica de fármacos. A pectina também agrega propriedades importantes nesse sentido, já que é resistente à proteases e amilases. O objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de micropartículas (MP) de GG (1,5, 2,0 ou 2,5%), reticuladas com Al^{3+} (3 ou 5%) e revestidas com filmes de amido resistente/pectina para a administração oral de INS. O método de obtenção empregado foi eficiente com rendimento máximo de 99,10%, além de ter possibilitado a obtenção de MP com elevada eficiência de encapsulação (máximo de 89,11%). As MP apresentaram diâmetro médio de 1012 a 1197 μm e circularidade variando de 0,68-0,81. A análise de microscopia eletrônica de varredura indicou que o aumento da concentração de GG foi responsável pela obtenção de MP mais esféricas e que a INS alterou o rearranjo das estruturas. A seção transversal mostrou um revestimento contínuo e intacto. De acordo com os dados de difração de raios-X, as MP apresentaram estruturas semicristalinas. A absorção de líquidos foi menor em meio ácido (218-615%) do que em tampão fosfato pH 7,4 (432-812%) e 6,8 (373-703%) e o modelo cinético de Korsmeyer-Peppas foi o que melhor retratou o mecanismo de penetração de líquidos nas amostras, indicando que esse ocorreu por difusão Fickiana (caso-I). Ensaios de degradação enzimática revelaram que o sistema desenvolvido foi capaz de proteger a INS contra a degradação em até aproximadamente 80% após 120 min de incubação com tripsina e α -quimotripsina. Os estudos de liberação *in vitro* da INS foram realizados em aparato I e IV e os resultados demonstraram que o revestimento desenvolvido ofereceu um maior controle da liberação da INS, com reduzidas taxas de liberação em meio ácido, além de prolongar a liberação nos outros meios estudados. Os perfis de liberação originados a partir de ensaio em aparato I e IV tiveram melhor ajuste aos modelos cinéticos de Weibull e Korsmeyer-Peppas e Higuchi e Korsmeyer-Peppas, respectivamente. Ensaios *ex vivo* de bioadesão indicaram que as amostras obtidas com 2,0 e 2,5% de GG geram maiores forças mucoadesivas (F_{ma}). A permeação *ex vivo* da INS foi realizada através das técnicas de intestino invertido e intestino não invertido, tendo esta última revelado a importância do revestimento para o aumento da permeabilidade da insulina, a qual alcançou valores de até 84%. As MP foram capazes de modular a abertura das junções paracelulares, contribuindo para o aumento da permeação da INS através das células Caco-2. Todas as MP produzidas induziram um importante efeito hipoglicemiante, com redução máxima da glicemia sanguínea de 51%. O efeito foi mantido por até 7h. O conjunto de resultados sugere o uso das MP de GG revestidas com amido resistente/pectina como um sistema carreador da INS, contornando problemas específicos, como os de permeabilidade intestinal e biodisponibilidade oral.

Palavras-chave: micropartículas, goma gelana, amido resistente, pectina; insulina, liberação cólon-específica.

Gellan-based microparticles coated with films of resistant starch/pectin as strategy for oral administração of insulin.**ABSTRACT**

The development of a system that enables the oral administration of insulin (INS) is a major challenge, since the INS can be degraded in the upper portions of gastrointestinal tract (GIT). Its encapsulation within polymer matrices based on gellan gum (GG) should offer significant protection against the adverse conditions of the GIT, in addition to establishing mucoadhesive interactions. The coating of solid dosage forms with type 3 resistant starch is a rational strategy to achieve the colon specific drug delivery. Pectin also adds important properties in this sense, since it is resistant to proteases and amylases. The aim of this work was to obtain and to characterize GG MP (1.5, 2.0 or 2.5%), crosslinked with Al^{3+} (3 or 5%) and coated with films resistant starch/pectin for the oral administration of INS. The method employed was effective with a maximum yield of 99.10%, besides having allowed the obtaining of MP with a high encapsulation efficiency (up to 89.11%). The MP showed a mean diameter from 1012 to 1197 μm and circularity ranging from 0.68 to 0.81. The scanning electron microscopy indicated that the increase of the concentration of GG is responsible for obtaining more spherical MP and that INS is responsible for changing the rearrangement structures. The cross section showed a continuous and intact coating. According to the data of X-ray diffractograms, the MP have semi-crystalline structures. The liquid uptake was lower in acid media (218-615%) than in phosphate buffer pH 7.4 (432-812%) and 6.8 (373-703%) and the Korsmeyer-Peppas model was the best fitting for the liquid penetration mechanism in the samples, indicating that this occurred by Fickian diffusion (case-I). Enzymatic degradation tests showed that the system is able to protect the INS against degradation by up to approximately 80% after 120 min of incubation with trypsin and α -chymotrypsin. The *in vitro* release studies of INS were performed in apparatus I and IV, and the results showed that the coating developed offered a greater control of INS release, with reduced release rates in acidic medium, besides prolonging the release in the other media studied. Release profiles derived from the test apparatus I and IV fitted better to the kinetic model Weibull and Korsmeyer-Peppas and Higuchi and Korsmeyer-Peppas, respectively. *Ex vivo* bioadhesion test indicated that the samples obtained with 2.0 and 2.5% GG generate higher mucoadhesive forces (F_{MA}). The *ex vivo* INS permeation was analyzed by the techniques of inverted and non-inverted intestine, and the latter revealed the importance of the coating to the increase of INS permeability. MP showed to modulate the opening of tight junctions, contributing for the INS permeation in both Caco-2 cells and in excised rat intestinal tissues. All MP induced a significant hypoglycemic effect with a maximum reduction in blood glucose of 51%. The effect was kept for up to 7h. The set of results suggests the use of the GG MP coated with resistant starch/pectin as INS carrier to enhance its permeability through the intestinal epithelium and its bioavailability after oral administration.

Key-words: microparticles, gellan gum, resistant starch, pectin; insulin, colon specific delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Panorama mundial da DM.	28
Figura 2- Algoritmo terapêutico para o tratamento da DM-II segundo a fase de evolução da doença.	30
Figura 3 - Estrutura da pró-INS humana ,composta por 3 cadeias de aa interligadas através de pontes dissulfeto.	32
Figura 4 - Dissociação do hexâmero de INS para absorção	33
Figura 5 - Secreção fisiológica da insulina.....	35
Figura 6 - Distribuição da INS administrada pelas vias subcutânea (A) e oral (B).	36
Figura 7 - Mecanismo de ação da INS	37
Figura 8 - Perfil farmacocinético dos diferentes tipos de insulina	38
Figura 9 - Barreiras intestinais e vias de permeação de fármacos.....	41
Figura 10 - Representação esquemática dos estágios da mucoadesão	44
Figura 11 - Tipo de micropartículas quanto à estrutura.....	48
Figura 12 - Estruturas da goma gelana nativa (A) e da goma gelana de baixa acetilação (B).	52
Figura 13 - Representação esquemática do mecanismo de formação do gel de gelana.	53
Figura 14 - Estrutura linear da amilose e ramificada da amilopectina.	54
Figura 15 - Representação esquemática da estrutura das pectinas.	56
Figura 16 - Filme livre de amido resistente e pectina obtido por evaporação do solvente .	57
Figura 17 - Forças atuantes sobre as gotas conforme a lei de Tate.	63
Figura 18 - Processo de obtenção das MP de goma gelana, utilizando-se diferentes concentrações de gelana e reticulante.....	65
Figura 19 - Fotomicrografias de partículas obtidas através de gotejamento em diferentes alturas: A) 20 cm e B) 1 cm.....	70
Figura 20 - MP revestidas (formação de aglomerados) e MP não revestidas (área circulada em vermelho).	73
Figura 21 - Descrição esquemática da medida do diâmetro de Feret.	76

Figura 22 - Representação geral da reação das proteases (A) e substituintes em R1 triptofano (B) e arginina (C).....	79
Figura 23 - Dispositivo de Enslin para determinação da capacidade de absorção de líquidos.	81
Figura 24 - Distribuição de tamanho de partícula para as MP controle.	88
Figura 25 - Distribuição de tamanho de partícula para as MP carregadas com INS.....	89
Figura 26- Absorção de líquidos (%) no equilíbrio (120 min) das MP em diferentes meios (HCl pH 1,2; tampão fosfato pH 7,4 e pH 6,8).	94
Figura 27 - Espectro da INS em HCl 0,1N (pH 1,2) (A), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) (B), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (C) e em tampão TC-199 (pH 7,4) (D).....	101
Figura 28 - Espectros de absorção da INS na região do UV na presença e ausência de gelana ou amido resistente/pectina em HCl 0,1N (pH 2,0) (A), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) (B), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (C) e em tampão TC-199 (pH 7,4) (D).	103
Figura 29 - Curva analítica da INS em HCl 0,1N (pH 1,2) (A), tampão fosfato 0,1 M, (pH 7,4) (B), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (C) e em tampão TC-199 (pH 7,4) (D).	104
Figura 30 -Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (aumentos de 50x, 200x, 1000x, 10000x, respectivamente) das superfícies das MP 155 (a), (b), (c), (d). IN155 (e), (f), (g), (h). CIN155 (i), (j), (k), (l). Setas indicam a presença de cristais de amido resistente.....	110
Figura 31 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (aumentos de 50x, 200x, 1000x, 10000x, respectivamente) das superfícies das MP 205 (a), (b), (c), (d). IN205 (e), (f), (g), (h). CIN205 (i), (j), (k), (l).....	110
Figura 32 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (aumentos de 50x, 200x, 1000x, 10000x, respectivamente) das superfícies das MP. 255 (a), (b), (c), (d). IN255 (e), (f), (g), (h). CIN255 (i), (j), (k), (l).....	111
Figura 33 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (aumentos de 50x, 100x, 200x, respectivamente) das seções transversais de MP controle 155 (a), (b), (c), 205 (d), (e), (f) e 255 (g), (h), (i).	112
Figura 34 - Difratograma do revestimento de amido resistente/pectina, da INS humana em pó, da mistura física de gelana:INS (1:1), das MP controle (253 e 255), das MP carregadas com INS (IN253 e IN255) e MP carregadas com INS e revestidas (CIN253 e CIN255).	113
Figura 35 - Curvas de DSC da gelana, do revestimento baseado em amido resistente/pectina e da insulina em pó.	115
Figura 36- Curvas de DSC das MP controle, carregadas com INS e carregadas com INS e revestidas.	116

Figura 37 - Efeito inibitório enzimático <i>in vitro</i> das dispersões poliméricas e MP sobre a tripsina e a alfa-quimotripsina (n=3)	118
Figura 38- Quantidade de INS que permaneceu intacta a partir da solução comercial de INS (Novolin [®]) (INS livre) e MP carregadas com INS (revestidas e não revestidas), durante incubação com tripsina e quimotripsina.	120
Figura 39 - Fotografias do conjunto MP/enzimas após o ensaio de degradação enzimática. (Setas indicam a camada geleificada formada ao redor das MP).	121
Figura 40 - Aparato de dissolução do tipo "células de fluxo contínuo" (USP 4, Sotax, Switzerland).	124
Figura 41 - Ilustração esquemática da configuração de um sistema fechado para o aparato de células de fluxo contínuo (A) e células de fluxo contínuo (12 mm) para formas farmacêuticas sólidas administradas oralmente (Adaptado de: Copyright 2011 The United States Pharmacopeial Convention) (B).	125
Figura 42 - Perfis de liberação da insulina a partir das MP de gelana revestidas e não revestidas em meios com diferentes valores de pH (de 0 a 120 min pH 1,2; de 120 a 360 min pH 7,4 e de 360 a 720 min pH 6,8).	129
Figura 43 - Localização da INS em MP reticuladas com diferentes concentrações de cloreto de alumínio (3 e 5%).	132
Figura 44 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> da INS a partir de MP revestidas e não revestidas em meios com diferentes valores de pH (0 a 60 min pH 1,2; de 60 a 120 min pH 4,5 e de 120 a 480 min pH 6,8).	140
Figura 45 - Comparação dos perfis de liberação <i>in vitro</i> da INS a partir de MP revestidas e não revestidas nos aparatos I e IV.	145
Figura 46 - Representação esquemática do ensaio para determinação da bioadesão <i>ex vivo</i>	148
Figura 47 - Valores de força mucoadesiva das MP revestidas e não revestidas de gelana e do filme livre de amido resistente/pectina (n=5, média $\pm$ desvio padrão).	150
Figura 48 - Valores de trabalho de mucoadesão (N.s) das MP revestidas e não revestidas de gelana e filmes livre de amido resistente/pectina (n=5, média $\pm$ desvio padrão).	152
Figura 49 - Valores de permeabilidade intestinal da INS a partir de MP revestidas e não revestidas pelo método do saco intestinal invertido.	157
Figura 50 - Fotografia de intestino de rato invertido e preenchido com TC-199 após ensaio <i>ex vivo</i> de permeação com micropartículas de gelana não revestidas (A) e revestidas (B).	158

Figura 51 - Esquema ilustrativo do ensaio de permeação usando saco intestinal de rato não-invertido, o qual foi incubado em uma câmara para tecidos contendo tampão Krebs-Henseleit modificado em 37 °C e oxigenado (O ₂ /CO ₂ 95:5) por 180 min.	159
Figura 52 - Perfil de permeação da INS (%) através de tecido intestinal de rato não invertido após a introdução de solução de INS (INS-Livre), dispersões poliméricas (G1.5-INS, G2.0-INS, RS5-INS) (A), MP revestidas (CIN153 e CIN205) ou não revestidas (INS153 e IN205) (B).....	160
Figura 53 - Fotografias da dispersão RS5-INS geleificada após o ensaio de permeação da INS.....	161
Figura 54 - Esquema da medida de TEER em estudos de permeabilidade utilizando monocamadas de células Caco-2.....	169
Figura 55 - Estudos de permeabilidade da INS a partir de MP incubadas em solução balanceada de Hank's (HBSS) usando monocamada de células Caco-2 em 12 suportes de cultura celular de policarbonato Transwell®	170
Figura 56 - Perfil da TEER para o teste de permeabilidade para amostras IN153, CIN153, IN205 and CIN205, dispersões de goma gelana a 1,5 e 2,0% carregadas com INS (G1.5-INS e G2.0-INS, respectivamente), dispersão de amido resistente/pectina carregada com INS (RS5-INS) e solução de INS (INS livre).....	173
Figura 57 - Medidas de TEER (%) após 24 e 48 h após a remoção apical das seguintes amostras: IN153, CIN153, IN205, CIN205 (MP), G1.5-INS, G2.0-INS, RS5-INS (dispersões poliméricas) e INS-Livre (solução de INS).....	174
Figura 58 - Permeabilidade da INS em ug (A) e % (B) após tratamento com as MP IN153, CIN153, IN205, CIN205 e as dispersões G1.5-IN, G2.0-INS e RS5-INS e a solução de INS (INS-Livre).....	175
Figura 59 - Valores de citotoxicidade (% viabilidade) após incubação das células Caco-2 com as MP IN153, CIN153, IN205 and CIN205 MP, dispersões G1.5-INS, G2.0-INS e RS5-INS or solução de INS (INS-Livre) por 2 h e avaliadas pela técnica de exclusão do azul de tripano.	177
Figura 60 - Efeito hipoglicemiante após administração oral de MP de gelana contendo INS (revestidas e não revestidas), MP de gelana controle (sem INS) e injeção subcutânea de solução de INS (100 UI/mL) em ratos diabéticos (n=6).	182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamento da DM-II com hipoglicemiantes orais.	29
Tabela 2 - Propriedades físicas da INS humana em pó (Sigma®).	34
Tabela 3 - Resumo das principais características dos análogos da insulina.	38
Tabela 4 - Estratégias utilizadas para aumentar a absorção oral de INS usando diferentes sistemas de liberação	46
Tabela 5 - Variáveis exploradas para otimização da obtenção de MP	64
Tabela 6 - Variáveis avaliadas na incorporação de INS às MP de gelana pelo método de imersão.	66
Tabela 7 - Nomenclatura e composição das MP de gelana.	69
Tabela 8 - Eficiência de encapsulação (<i>EE</i>) e dosagem de INS obtidos através de diferentes métodos de carregamento.	72
Tabela 9 - Valores de diâmetro médio e circularidade das MP	91
Tabela 10 - Rendimento das amostras.	92
Tabela 11 - Valores de absorção de líquido (%) no equilíbrio (120 min) em meios com diferentes valores de pH.	93
Tabela 12 - Valores do coeficiente de correlação (r^2) dos dados de absorção de líquido das MP controle para diferentes modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull) em meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2), tampão fosfato pH 7,4 e tampão fosfato pH 6,8.	97
Tabela 13 - Valores do coeficiente de correlação (r^2) dos dados de absorção de líquido das MP carregadas com INS e não revestidas para diferentes modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull) em meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2), tampão fosfato	97
Tabela 14- Valores do coeficiente de correlação (r^2) dos dados de absorção de líquido das MP carregadas com INS e revestidas para diferentes modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull) em meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2), tampão fosfato pH 7,4 e tampão fosfato pH 6,8.	98
Tabela 15 - Valores de <i>Ks</i> e <i>n</i> obtidos a partir dos dados da absorção de líquidos em meios com distintos valores de pH.	99
Tabela 16 - Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.	105
Tabela 17 - Dados para o teste de precisão intracorridas nos diferentes meios.	105
Tabela 18 - Dados para o teste de precisão intercorridas nos diferentes meios.	106

Tabela 19 - Valores obtidos para o teste de exatidão.	106
Tabela 20 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) da INS nos diferentes meios.....	107
Tabela 21 - Eficiência de encapsulação e dosagem de INS (média $\pm$ desvio padrão).	108
Tabela 22 - Parâmetros calorimétricos da INS humana, da gelana, do revestimento baseado em amido resistente/pectina e das MP com e sem INS, revestidas e não revestidas.	117
Tabela 23 - Percentual de insulina liberada em meio ácido (pH 1,2) e em tampão fosfato pH 7,4.	130
Tabela 24 - Redução dos percentuais de liberação da INS a partir de MP de gelana, exercida pela presença do revestimento de amido resistente/pectina, após 120 min em HCL 0,1N (pH 1,2) e 240 min em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4).....	131
Tabela 25 - Coeficientes de correlação da INS liberada a partir de <i>MP não revestidas</i> obtidos através de diferentes modelos matemáticos para o meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2).	134
Tabela 26 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de <i>MP revestidas</i> obtidos através de diferentes modelos matemáticos para o meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2).....	135
Tabela 27 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de <i>MP não revestidas</i> obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 7,4).	135
Tabela 28 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de <i>MP revestidas</i> obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 7,4)	136
Tabela 29 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de <i>MP não revestidas</i> obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 6,8).	136
Tabela 30 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de <i>MP revestidas</i> obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 6,8)	137
Tabela 31 - Porcentagem de INS liberada em meio ácido (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e tampão fosfato (pH 6,8).....	140
Tabela 32 - Redução do percentual de INS liberada a partir de MP revestidas em relação às MP não-revestidas.	141
Tabela 33 - Coeficientes de correlação (r^2) dos modelos matemáticos (Baker-Lonsdale, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, First order, Hixson-Crowell and Weibull) a partir de MP revestidas e não revestidas.....	142
Tabela 34 - Quantidade (%) de INS liberada após 60 min de ensaio nos aparatos I e IV em diferentes meios que simulam o pH gástrico e entérico.	143

Tabela 35 - Valores do tempo requerido para que 80% da INS seja liberada ($t_{80\%}$) utilizando os aparatos de cesto (I) e células de fluxo contínuo (IV) (min)	144
Tabela 36 - Coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) e razão de aumento de permeação (R) da INS através de tecido intestinal excisado de ratos.	162
Tabela 37 - Valores de coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) da INS e razão de aumento de permeabilidade (R) a partir das MP IN153, CIN153, IN205 e CIN205, das dispersões poliméricas G1.5-INS, G2.0-INS e RS5-INS e da solução de INS (INS-Livre).	176

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	– aminoácidos
AMPC	– monofosfato cíclico de adenosina
AR-3	– Amido resistente tipo 3
ATP	– Adenosina trifosfato
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	– Coeficiente de variação
DM	– Diabetes mellitus
DM-I	– Diabetes mellitus tipo I
DM-II	– Diabetes mellitus tipo II
DMEM	– Meio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>)
DMSO	- Dimetilsufóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico
DSC	– Calorimetria exploratória diferencial (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
DP	– Desvio padrão
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
EE	– Eficiência de encapsulação
GG	– Goma gelana
GIP	– Peptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-I	– Peptídeo-1 semelhante ao glucagon (<i>Glucagon-like peptide 1</i>)
GLUT-2	– Transportador celular de glicose-2
HBSS	- Solução salina balanceada de Hanks (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
INS	– Insulina
JP	- Junção paracelular
MP	– Micropartículas
PBS	– Tampão fosfato-salino
pH	– Potencial hidrogeniônico
pI	– Ponto isoeletrico
TFA	– Ácido trifluoracético
TGI	– Trato gastrointestinal
UI	- Unidade internacional
UV	– Ultra-violeta

ORGANIZAÇÃO DA TESE

A Tese a seguir, intitulada "Micropartículas de Goma Gelana Revestidas com Filmes de Amido Resistente/Pectina como Estratégia para Administração Oral de Insulina", encontra-se estruturada em 9 capítulos e 1 anexo.

O Capítulo I, referente à Introdução, Revisão Bibliográfica e Objetivos, tem por objetivo contextualizar o leitor quanto ao cenário da *Diabetes mellitus* e às tecnologias exploradas para o desenvolvimento de sistemas que possibilitem a administração oral de insulina, bem como fornecer o embasamento necessário para a melhor compreensão dos resultados discutidos.

A parte experimental, desenvolvida no Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP) e no Laboratório de Biofarmácia da Universidade D'Auvergne (Clermont-Ferrand, França), é descrita ao longo de 8 capítulos, sendo cada um deles organizado em 3 seções: Introdução, Materiais e Métodos e Resultados e Discussão. Os capítulos estão dispostos com os seguintes temas:

- ✓ Capítulo II: Desenvolvimento das micropartículas.
- ✓ Capítulo III: Caracterização físico-química.
- ✓ Capítulo IV: Estudos de liberação *in vitro* da insulina.
- ✓ Capítulo V: Estudos de mucoadesão *ex vivo*.
- ✓ Capítulo VI: Estudos de permeabilidade *ex vivo*.
- ✓ Capítulo VII: Estudos de permeabilidade em monocamadas de células Caco-2.
- ✓ Capítulo VIII: Estudos de atividade hipoglicemiante oral *in vivo*.
- ✓ Capítulo IX: Conclusões Gerais.
- ✓ Anexo.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
EPÍGRAFE	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
ORGANIZAÇÃO DA TESE	xvii

Capítulo I. Introdução, Revisão Bibliográfica e Objetivos

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1 <i>Diabetes mellitus</i> (DM)	28
2.2 Tratamento da DM II	29
2.3 Tratamento da DM-I	30
2.4 Insulina.....	32
2.4.1 Estrutura química.....	32
2.4.2 Solubilidade	33
2.4.3 Secreção.....	34
2.4.4 Farmacologia	35
2.4.5 Mecanismo de ação	36
2.4.6 Análogos sintéticos da insulina para administração parenteral	37
2.4.6.1 Insulina rápida (regular)	38
2.4.6.2 Insulina de ação muito rápida.....	39
2.4.6.3 Insulina de ação intermediária.....	39
2.4.6.4 Insulina lenta	39
2.5 Barreiras contra a absorção oral de proteínas/peptídeos.....	40
2.6 Estratégias para melhorar a biodisponibilidade da INS administrada oralmente .	42
2.7 Sistemas de liberação modificada de fármacos	47
2.8 Sistemas microparticulados	48
2.8.1 Processo de microencapsulação.....	49
2.9 Polímeros naturais.....	51
2.9.1 Goma gelana (GG).....	51
2.9.2 Amido resistente	53
2.9.3 Pectina	55

3. OBJETIVOS.....	59
3.1 Etapas.....	59

Capítulo II. Desenvolvimento das micropartículas

1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 Materiais	64
2.2 Principais equipamentos	64
2.3 Obtenção das MP controle de gelana.....	64
2.4 Estudos preliminares para seleção do método de incorporação das MP de gelana com INS	65
2.4.1 Método de incorporação por imersão/difusão (Método 1)	65
2.4.2 Incorporação da INS na dispersão polimérica (Método 2).....	66
2.4.3 Incorporação da INS na solução de reticulante/imersão (Método 3)	66
2.5 Revestimento das MP	67
2.5.1 Preparo da dispersão filmógena de amido resistente e pectina	67
2.5.2 Estudos para seleção do método de revestimento das MP	67
2.5.3 Método selecionado para o revestimento das MP	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1 Delineamento e otimização das condições para obtenção das MP	70
3.2 Otimização do processo de carregamento da INS	71
3.3 Otimização do processo de revestimento por imersão das MP	73

Capítulo III. Caracterização físico-química

1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAIS E MÉTODOS	80
2.1 Materiais	80
2.2 Principais equipamentos	80
2.3 Forma e tamanho das partículas.....	80
2.4 Rendimento	80
2.5 Determinação do perfil de absorção de líquidos (AL)	81
2.5.1 Estudo da cinética da AL	82
2.6 Validação de metodologia analítica para quantificação de INS por espectrofotometria na região do ultravioleta	82
2.6.1 Determinação do espectro de absorção da INS na região do UV	82
2.6.2 Especificidade.....	82
2.6.3 Linearidade	82

2.6.4	Precisão.....	83
2.6.5	Exatidão.....	83
2.6.6	Limite de detecção (<i>LD</i>) e limite de quantificação (<i>LQ</i>).....	83
2.7	Eficiência de encapsulação (<i>EE</i>).....	84
2.7.1	Teor de INS	84
2.8	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (<i>MEV-FEG</i>).....	84
2.9	Difração de raios-X.....	85
2.10	Calorimetria exploratória diferencial (<i>DSC</i>).....	85
2.11	Atividade inibitória das dispersões poliméricas e das MP contra enzimas proteolíticas.....	85
2.11.1	Inibição da tripsina	85
2.11.2	Inibição da α -quimotripsina.....	86
2.11.3	Avaliação do efeito protetor das MP contra a degradação da INS	86
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1	Forma e tamanho das partículas.....	88
3.2	Rendimento.....	92
3.3	Determinação do perfil de absorção de líquidos (<i>AL</i>)	93
3.3.1	Avaliação da cinética da <i>AL</i>	96
3.4	Validação de metodologia analítica para quantificação de INS por espectrofotometria na região do ultravioleta	101
3.4.1	Determinação do espectro de absorção da INS na região do UV.....	101
3.4.2	Especificidade.....	102
3.4.3	Linearidade	104
3.4.4	Precisão.....	105
3.4.5	Exatidão.....	106
3.4.6	Limite de detecção (<i>LD</i>) e limite de quantificação (<i>LQ</i>)	106
3.5	Eficiência de encapsulação (<i>EE</i>).....	107
3.6	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (<i>MEV-FEG</i>).....	109
3.7	Difração de raios X (<i>DRX</i>).....	112
3.8	<i>DSC</i>	114
3.9	Atividade inibitória das dispersões poliméricas e das MP contra enzimas proteolíticas.....	118
3.9.1	Inibição da tripsina e α -quimotripsina.....	118
3.9.2	Avaliação do efeito protetor das MP contra a degradação da INS	120

Capítulo IV. Estudos de liberação *in vitro* da insulina

1. INTRODUÇÃO	123
2. MATERIAIS E MÉTODOS	127
2.1 Materiais	127
2.2 Principais equipamentos	127
2.3 Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da INS usando aparato I.....	127
2.4 Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da INS usando aparato IV.....	128
2.5 Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> da INS.....	128
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	129
3.1 Determinação do perfil de liberação da insulina.....	129
3.1.1 Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> da INS	134
3.2 Liberação <i>in vitro</i> da INS usando células de fluxo contínuo (USP IV).....	139
3.2.1 Estudo da cinética de liberação da INS	142
3.3 Comparação da liberação <i>in vitro</i> da INS através dos aparatos I e IV USP	143

Capítulo V. Estudo de mucoadesão

1. INTRODUÇÃO	147
2. MATERIAIS E MÉTODOS	148
2.1 Materias	148
2.2 Principais equipamentos	148
2.3 Ensaio de mucoadesão	148
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	150
3.1 Ensaio de mucoadesão	150

Capítulo VI. Estudos de permeabilidade *ex vivo*

1 INTRODUÇÃO	154
2 MATERIAIS E MÉTODOS	155
2.1 Materiais	155
2.2 Principais equipamentos	155
2.3 Ensaio de permeabilidade <i>ex vivo</i> pelo método do saco intestinal invertido.....	155
2.4 Estudo de permeabilidade <i>ex vivo</i> da INS pelo método do saco intestinal não-invertido	156
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	157
3.1 Ensaio de permeabilidade <i>ex vivo</i> pelo método do saco intestinal invertido.....	157
3.2 Ensaio de permeabilidade <i>ex vivo</i> pelo método do saco intestinal não-invertido....	159

3.3 Comparação dos ensaios de permeação <i>ex vivo</i> através dos métodos do saco intestinal invertido e não invertido	162
---	-----

Capítulo VII. Estudos de permeabilidade *in vitro* utilizando monocamadas de células Caco-2

1. INTRODUÇÃO	166
2. MATERIAIS E MÉTODOS	168
2.1 Materiais	168
2.2 Principais equipamentos	168
2.3 Cultura celular.....	168
2.3.1 Resistência elétrica transepitelial (TEER).....	168
2.3.2 Permeabilidade da INS em monocamadas de células Caco-2.....	170
2.3.3 Citotoxicidade dos polímeros e MP	171
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	172
3.1 Estudos de permeabilidade da INS utilizando monocamadas de células Caco-2....	172
3.2 Medida da resistência elétrica transepitelial (TEER).....	172
3.3 Permeabilidade da INS através das células Caco-2	175
3.4 Citotoxicidade dos polímeros e MP	177

Capítulo VIII. Efeito hipoglicemiante oral *in vivo* da insulina veiculada nas micropartículas

1. INTRODUÇÃO	179
2. MATERIAIS E MÉTODOS	180
2.1 Materiais	180
2.2 Principais equipamentos	180
2.2.1 Efeito <i>in vivo</i> da administração oral de micropartículas contendo INS	180
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	182
3.1 Efeito <i>in vivo</i> da administração oral de micropartículas contendo insulina.....	182

Capítulo IX. Conclusão

1. CONCLUSÃO	186
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	188

ANEXO.....	213
------------	-----



CAPÍTULO I

Introdução, Revisão Bibliográfica e Objetivos

1. INTRODUÇÃO

A *Diabetes mellitus* (DM), doença metabólica crônica que afeta mais de 371 milhões de pessoas no mundo, independentemente do sexo, idade ou raça, representa a sexta causa mais comum de morte no mundo (JOSE et al., 2012; SONIA; SHARMA, 2012; BABU et al., 2008; DANEMAN, 2006). Essa patologia é caracterizada pelo aumento anormal e constante dos níveis de glicose no sangue e suas complicações podem levar à retinopatia, insuficiência renal e neurotrofia (DAMGÉ et al., 2008).

A DM pode ser classificada em dois principais tipos: (i) diabetes tipo I (insulino-dependente), a qual é causada pela destruição autoimune das células beta-pancreáticas, impedindo a produção de INS (hormônio regulador da glicemia) e (ii) diabetes tipo II (insulino-independente), caracterizada pela resistência à INS (REIS; DAMGÉ, 2012), a qual afeta 90% da população diabética no mundo (GERMINO, 2011).

O tratamento da DM-I é realizado através da administração subcutânea diária de insulina (INS) a fim de suprir a secreção fisiológica deficiente, enquanto que a utilização de medicamentos hipoglicemiantes orais é a base do tratamento da DM-II. No entanto, os diabéticos tipo II podem, com o tempo, necessitar de INS exógena para o controle adequado da glicose no sangue (SONIA; SHARMA, 2012).

Apesar da administração da INS via subcutânea mostrar-se eficiente em termos de biodisponibilidade, por ser invasiva causa desconfortos que vão desde a dor, infecção local, lipoatrofia seguida de depressões irregulares da pele até problemas psicológicos, diminuindo, dessa maneira, a adesão do paciente ao tratamento (REIS; DAMGÉ, 2012; BABIKER; DATTA, 2010).

Várias estratégias têm sido abordadas no intuito de possibilitar uma via alternativa para a administração da INS. Nesse sentido, sistemas para administração nasal (ZHANG et al., 2011b), retal (ONUKI et al., 2000), pulmonar (CHONO et al., 2009), transdérmica (YERRAMSETTY et al., 2010), e oral (PEPPAS; KAVIMANDAN, 2006) têm sido desenvolvidos. Contudo, a via oral é considerada a mais conveniente, já que, por ser mais segura e natural, leva a maior aceitação e adesão do paciente ao tratamento (ALEXANDER, 2009).

Na verdade, a vantagem mais importante da administração oral da INS é que ela é um dos poucos fármacos beneficiados pela metabolização pré-sistêmica, de modo que, ao ser absorvida pelo epitélio intestinal e alcançar o fígado através da veia porta hepática, inibe diretamente a produção de glicose, pois mimetiza a secreção natural de INS pelas

ilhotas de Langerhans. Tal efeito não é alcançado através da administração parenteral, uma vez que somente 20% da INS injetada alcança o fígado (PEPPAS; KAVIMANDAN, 2006; PILLAI; PANCHAGNULA, 2001). Dessa maneira, a hiperinsulinemia periférica é provocada, no intuito de se alcançar níveis hepáticos suficientes de hormônio, o que pode causar aterogênese, lipogênese, hipoglicemia, ganho de peso e resistência à INS (ARBIT; KIDRON, 2009; KHAFAGY *et al.*, 2007; ARBIT, 2004; STILL, 2002).

No entanto, a principal limitação da administração oral da INS é que, por ser um peptídeo, ela é degradada no estômago e duodeno por clivagem das ligações peptídicas pelas enzimas proteolíticas locais (DAMGÉ *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2008), causando sua desnaturação e mudanças na sua estrutura, conformação e bioatividade (HEINEMANN, 2010; UBAIDULLA *et al.*, 2009). Dessa maneira, menos de 0,1% da dose oral de INS alcança a circulação sanguínea na forma intacta (KUMAR *et al.*, 2006).

Assim, o grande desafio da utilização da via oral para administração da INS reside na sua proteção contra ataques enzimáticos nos segmentos superiores do TGI, a fim de maximizar sua biodisponibilidade. Nesse sentido, estratégias, como modificações químicas do bioativo, uso de inibidores de protease e promotores de absorção, desenvolvimento de formas farmacêuticas coloidais e sistemas colônicos têm constituído importantes objetos de pesquisa (MARONI *et al.*, 2012; CHONO *et al.*, 2009; WOITISKI *et al.*, 2009).

O cólon apresenta características particulares, como pH próximo a neutralidade, tempo de trânsito relativamente longo e baixa atividade enzimática (enzimas proteolíticas) que o torna um favorável sítio de absorção de peptídeos e proteínas (MENINNI *et al.*, 2012; PERERA *et al.*, 2010) e que podem ser exploradas para a vetorização da liberação dessas substâncias.

A importância dos sistemas microparticulados também deve ser evidenciada, uma vez que estes podem aprisionar os fármacos de origem protéica em uma matriz polimérica, oferecendo proteção contra degradação enzimática, além de oferecerem vantagens em relação aos sistemas monolíticos, como uma distribuição mais homogênea ao longo do TGI e tempo de trânsito mais previsível, o que promove uma absorção mais regular (ZERBINI, 2010).

O revestimento de formas farmacêuticas sólidas com polímeros degradáveis pela microbiota colônica representa uma importante ferramenta tecnológica para se alcançar a liberação cólon-específica de fármacos (AKHGARI *et al.*, 2006). Isso se justifica pelo fato de a atividade enzimática específica do meio colônico representar a estratégia mais confiável para direcionar substâncias para o cólon, pois as propriedades pH dos fluidos e

tempo de trânsito gastrintestinais apresentam elevada variabilidade inter e intra-individual (MAIOR *et al.*, 2008; FADDA; BASIT, 2005).

O amido resistente tipo 3 (AR 3), o qual é obtido através do processo de retrogradação, representa uma fração do amido que escapa da digestão nas porções superiores do TGI e é degradado seletivamente pela microflora colônica (CHUNG *et al.*, 2009, YOON *et al.*, 2009; DIMANTOV *et al.*, 2004). A alta amilose (amido modificado com elevado teor de amilose) vem sendo considerada o material preferido para obtenção de produtos com elevados teores de AR, pois origina uma matriz amorfa onde os cristalitos ficam embebidos e protegidos da exposição às enzimas (HTOON *et al.*, 2009; DIMANTOV *et al.*, 2003; FISHMAN *et al.*, 1996).

Filmes de revestimento de AR associados à pectina foram obtidos em recente trabalho de nosso grupo de pesquisa e suas propriedades mecânicas (resistência à perfuração e alongamento na perfuração), de intumescimento e de barreira (permeabilidade ao vapor d'água) foram avaliadas, demonstrando que essa associação permitiu a obtenção de propriedades filmógenas adequadas. Os resultados obtidos revelaram ainda que os filmes desenvolvidos apresentam características promissoras para a obtenção de sistemas de liberação cólon específica de fármacos, tais como os elevados teores de AR (65,80-96,69%) e a consequente resistência à digestão enzimática nas porções superiores do TGI, bem como reduzida dissolução em meio ácido (MENEQUIN *et al.*, 2014; MENEQUIN, 2012).

Considerando que a maioria dos peptídeos e proteínas é escassamente absorvida no intestino devido ao seu elevado peso molecular e hidrofília (KHAFAFY *et al.*, 2007; PEPPAS, 2004), os sistemas poliméricos bioadesivos representam uma importante abordagem para o êxito da liberação sítio específica e da maximização da permeabilidade e absorção do fármaco, uma vez que imobilizam o fármaco no órgão alvo, prolongando o tempo de contato entre o fármaco e a mucosa e elevando o gradiente de concentração local do fármaco (ANDREWS *et al.*, 2009; KHAFAFY *et al.*, 2007; PEPPAS, 2004).

A GG é um polissacarídeo aniônico linear e hidrofílico, que apresenta importantes propriedades bioadesivas (CARDOSO, 2014; PREZOTTI *et al.*, 2014; NARKAR *et al.*, 2010; SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005). Por ser considerado um material seguro segundo a FDA, e devido à sua habilidade em formar MP na presença de cátions, como os íons Ca^{+2} , a GG tem sido empregada na obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos (PREZOTTI *et al.*, 2014; BABU *et al.*, 2010; RAJINIKANTH; MISHRA, 2007; AGNIHOTRI *et al.*, 2006; PATIL *et al.*, 2006).

Reddy e Tammishetti (2002) pesquisaram a influência de íons metálicos divalentes e trivalentes na formação de partículas de goma guar e concluíram que a reticulação com íons Al^{+3} ocorreu mais rapidamente do que com íons Ca^{+2} , atribuindo tal efeito a maior valência dos íons Al^{+3} . Foi verificado nesse mesmo estudo, que para se encapsular uma concentração máxima de albumina foi necessária uma quantidade menor de sais de Al^{+3} . Além disso, a valência dos íons também teve influência na liberação da proteína, a qual foi liberada por um prolongado período de tempo em fluido intestinal simulado a partir das partículas reticuladas com íons trivalente, ao contrário das partículas reticuladas com íons divalente.

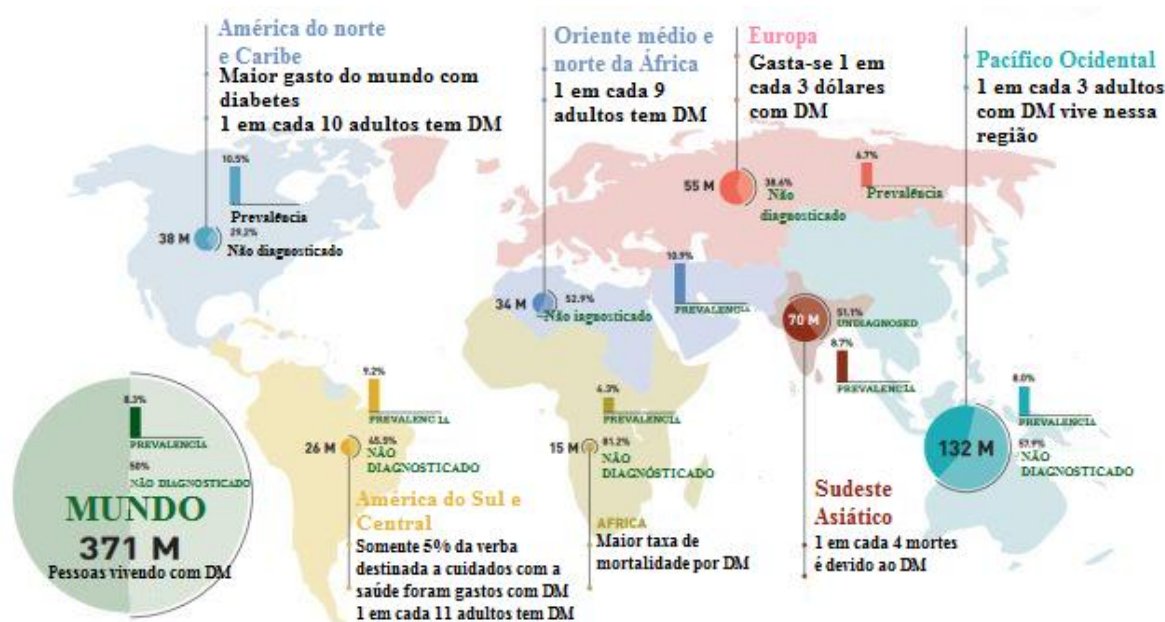
Com base nos fatos expostos, o uso de filmes de AR/pectina para o revestimento de MP mucoadesivas de GG reticuladas com Al^{+3} representa uma estratégia racional para se alcançar a liberação cólon específica da INS administrada oralmente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Diabetes mellitus* (DM)

Segundo IFD (*International Diabetes Federation*) (2014), existem hoje no mundo 387 milhões de pessoas com *Diabetes mellitus*, contra 171 milhões no ano de 2000, sendo que 4,8 milhões de pessoas morreram em 2012 devido a essa patologia (Fig. 1).

Figura 1 - Panorama mundial da DM.



Adaptado de: International Diabetes Federation

(<http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>, acesso em 23/10/2013)

A DM é uma condição patológica na qual o pâncreas não produz INS ou a INS produzida não pode ser aproveitada pelo organismo, levando à hiperinsulinemia. Esta, por sua vez, conduz a danos principalmente nos nervos e vasos sanguíneos, como aterosclerose seguida de falência cardíaca, insuficiência renal, amputação dos membros inferiores, derrame cerebral e cegueira (REKHA; SHARMA, 2013).

Esta patologia pode ser classificada em dois tipos principais: *DM tipo I*, na qual a produção de INS é ausente ou insuficiente e *DM tipo II*, na qual existe a produção de INS, no entanto, as células não a utilizam efetivamente. Um terceiro tipo de DM é conhecido como diabetes gestacional e é desenvolvida durante a gravidez (REKHA; SHARMA, 2013).

2.2 Tratamento da DM II

O tratamento da DM é realizado de acordo com o tipo e grau de evolução desta patologia. A DM-II se manifesta mais comumente após os 30 anos de idade, em pessoas obesas ou idosas e seus portadores são tratados, inicialmente, com hipoglicemiantes orais (ASCHE et al., 2011), os quais são divididos de acordo com o mecanismo de ação em: fármacos que incrementam a secreção pancreática da INS (sulfoniluréias e glinidas), redutores da velocidade de absorção de glicídios (inibidores das alfa-glicosidases), fármacos que diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas) e que aumentam a utilização periférica da glicose (glitazonas) (Tab. 1).

Tabela 1 - Tratamento da DM-II com hipoglicemiantes orais.

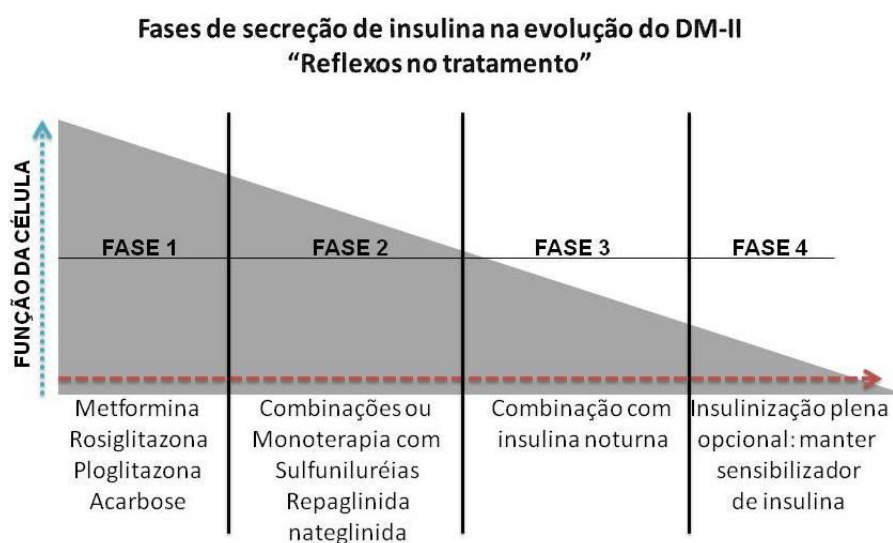
Medicamentos	Mecanismo de ação	↓Glicemia de Jejum (mg/dL)	Efeitos colaterais
Sulfoniluréias <i>Clorpropamida</i> <i>Glibenclamida</i> <i>Glipizida</i> <i>Gliclazida</i> <i>Gliclazida MR</i> <i>Glimepirida</i>	↑ da secreção de INS	60-70	Hipoglicemia, ganho ponderal
Metiglinidas <i>Repaglinida</i> <i>Nateglinida</i>	↑ da secreção de INS	20-30	Hipoglicemia e ganho ponderal discreto
Biguanidas <i>Metformina</i>	↓ produção hepática de glicose	60-70	Desconforto abdominal e diarreia
Inibidores de alfa-glicosidase <i>Acarbose</i>	Retardo da absorção de carboidratos	20-30	Meteorismo, flatulência e diarreia
Glitazonas <i>Rosiglitazona</i> <i>Pioglitazona</i>	Sensibilizadores da INS	35-65	Edema, anemia e ganho ponderal

Adaptado de: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), 2006.

O tratamento da DM-II depende muito da capacidade secretória do pâncreas. Dessa maneira, na fase 1 da patologia, a qual é caracterizada por uma glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL, recomenda-se a prescrição de fármacos que não aumentem a secreção insulínica (Fig. 2). Com a evolução da patologia (fase 2), ocorre uma diminuição da secreção de INS e, então, é comum a prescrição de um secretagogo combinado com

sensibilizadores de INS. A fase 3 ocorre após décadas de evolução da doença com a progressão da perda de secreção insulínica, tornando-se necessária, em associação aos hipoglicemiantes orais, as injeções de INS NPH ao dormir. Com a predominância da insulinopenia (fase 4), o paciente deve fazer uso de INS NPH antes do jejum e antes de se deitar e manter um agente oral sensibilizador de INS (YU et al., 1999).

Figura 2- Algoritmo terapêutico para o tratamento da DM-II segundo a fase de evolução da doença.



Adaptado de: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), 2006.

2.3 Tratamento da DM-I

Os portadores de DM-I representam apenas 10% da população diabética mundial, sendo que esse tipo se manifesta principalmente em crianças e adolescentes quando já houve a destruição de pelo menos 80% da massa de ilhotas de Langerhans. Seu tratamento se baseia, principalmente, na INS exógena, administrada subcutaneamente e deve ser instituída assim que for feito o diagnóstico. No entanto, outras proteínas vêm sendo instituídas no tratamento, como as incretinas (BAVEC, 2014).

As incretinas são hormônios peptídicos produzidos pelo intestino e secretados em resposta à ingestão de alimentos ou de glicose por via oral. Essa classe de hormônios promove o aumento da secreção de INS (atividade incretina) e vários hormônios já foram identificados com essa atividade, mas os mais importantes são o peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). Estes são

rapidamente liberados do intestino após as refeições, alcançando a circulação sanguínea seguida das células alvos, onde se ligam aos receptores G específicos acoplados à proteína, ativando as vias de sinalização (CREUTZFELDT, 2001).

O GLP-1 é um peptídeo de 30 aminoácidos (aa) derivado do pré-pró-glucagon e secretado pelas células L intestinais localizadas no TGI terminal. O GLP-1 diminui a secreção de glucagon, suprime o apetite e retarda o esvaziamento gástrico. Pode ainda diminuir a apoptose das células β e induzir sua proliferação. Em pacientes diabéticos II, a infusão de GLP-1 aumenta a liberação de INS e reduz rapidamente a concentração de glicose no sangue (KJEMS et al., 2003; JUHL et al., 2000). Uma limitação do uso da GLP-1 é sua rápida degradação enzimática no sangue pela dipeptidil-peptidase-4 (DPP-4), podendo ser administrado concomitantemente inibidores de DPP-4. A exenatida e liraglutida são exemplos de análogos do GLP-1 (BAVEC, 2014).

Já os peptídeos insulíntrópicos dependentes de glicose (GIP) são peptídeos com 42 aa derivados da proteína pró-GIP e secretados pelas células endócrinas K presentes principalmente no TGI proximal após ingestão de gordura, carboidratos e fontes de aa. Sua principal função é a estimulação da secreção de INS dependente de glicose (FREEMAN, 2009; KIM et al., 2005 a, b), mediada através do aumento dos níveis intracelulares de AMPc e inibindo os níveis de ATP-K.

A INS foi isolada do pâncreas animal em 1922 por Banting e Best (BANTING; BEST, 1922), tendo a sequência de aa determinada na metade desse século. Mais tarde, Katsoyannis foi responsável pela primeira INS sintética. Então, as pesquisas seguiram sentido à purificação da INS de extratos pancreáticos de boi e porco, as quais têm uma semelhança muito grande com a INS humana. A INS suína difere em um único aa, substituição de alanina ou treonina na posição B30, enquanto que a bovina tem esta modificação mais as substituições de alanina por treonina em A8 e valina por isoleucina em A10 (DUARTE, 1997). Estas modificações não resultam em mudança apreciável da atividade biológica, no entanto, muitas pessoas se mostram alérgicas à INS animal.

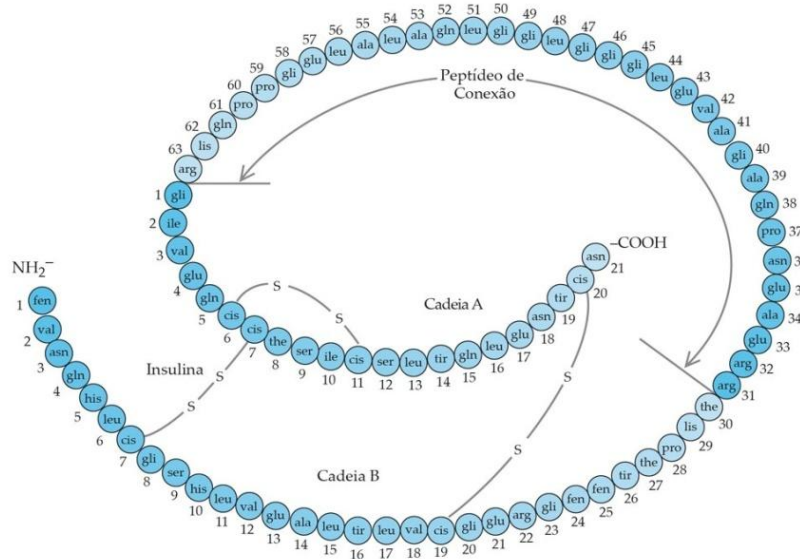
Em meados dos anos 1980, surge então, a INS obtida através das técnicas do DNA recombinante (INS biossintética) ou através da modificação enzimática da INS suína e, em seguida, obtêm-se os primeiros análogos da INS através da evolução da genética, alterando sua farmacocinética.

2.4 Insulina

2.4.1 Estrutura química

A INS é um polipeptídeo de massa molar 5800 Da sintetizada no pâncreas pelas células β das ilhotas de Langerhans, a partir de uma molécula maior chamada pró-INS. Esta é composta por 3 cadeias: *cadeia A*, contendo 21 aa e uma ponte dissulfeto intrapeptídica, *cadeia B*, com 30 aa e ligada à cadeia A por duas pontes dissulfeto e a *cadeia C* que possui 33 aa (Fig. 3). A pró-INS é clivada enzimaticamente para gerar a INS (que possui somente as cadeias A e B interligadas por duas pontes dissulfeto) e um peptídeo de conexão intramolecular, chamado peptídeo C. As duas moléculas são armazenadas nos mesmos grânulos (complexo de Golgi) e são secretadas em uma razão equimolar quando a célula β é estimulada (GENUTH, 2008; DAVIS, GRANNER, 1996; NOLAN, 1971).

Figura 3 - Estrutura da pró-INS humana ,composta por 3 cadeias de aa interligadas através de pontes dissulfeto.

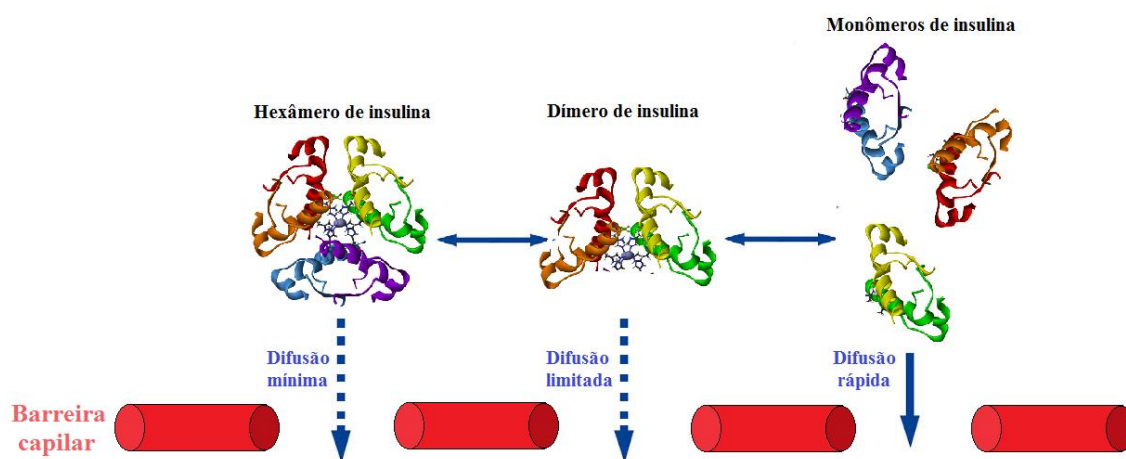


FONTE: GENUTH, 2008.

Apesar da composição variável das cadeias de aa entre os diferentes tipos de INS, existem 10 resíduos em cada cadeia que são invariáveis e responsáveis pela integridade estrutural da molécula e definem a conformação da estrutura primária da INS, enquanto o rearranjo tridimensional da proteína se deve aos resíduos variáveis. A conformação estrutural da INS é fundamental para sua atividade hipoglicemiante (CHIEN, 1996).

Em condições fisiológicas, a INS se encontra em baixas concentrações e na forma de molécula monomérica, para que possa exercer sua atividade. No entanto, quando em altas concentrações ($> 10\mu\text{M}$), a INS dimeriza através dos resíduos apolares de seus monômeros (BRANGE *et al.*, 1987). A associação de 3 dímeros leva à formação de hexâmeros, o que geralmente ocorre na presença de zinco (comportamento explorado para desenvolvimento de INS com longa duração de ação), sendo que a INS na forma de hexâmero não se liga ao seu receptor, tendo que se transformar lentamente para a forma de monômeros para se tornar biologicamente ativa (Fig. 4).

Figura 4 - Dissociação do hexâmero de INS para absorção



FONTE: MENEGUIN, 2016.

2.4.2 Solubilidade

A solubilidade da INS depende de uma série de fatores como sua pureza, natureza do solvente, pH, temperatura e concentração de íons metálicos. Quando em meio aquoso, a INS pode precipitar em valores de pH próximos do seu ponto isoelétrico (Tab. 2). Já quando há uma elevada concentração de sais em uma solução, ocorre o aumento da força iônica seguida da diminuição da solubilidade da INS, fazendo com que esta seja excluída da fase aquosa, na forma de precipitado, ou com separação de uma segunda fase líquida - “salting out” (BRANGE *et al.*, 1987).

A INS humana em pó pode ser solubilizada em ácido acético diluído em pH entre 2-3 na concentração de 10 mg/mL e em HCl 0,01M na concentração de 20 mg/mL. É insolúvel em pH neutro, mas pode ser solubilizada em NaHCO_3 125 mM. Contudo, as soluções estoque alcalinas devem ser evitadas, já que favorecem a deamidação e agregação. Uma solução estoque pode ser armazenada por até 6 meses, em temperatura

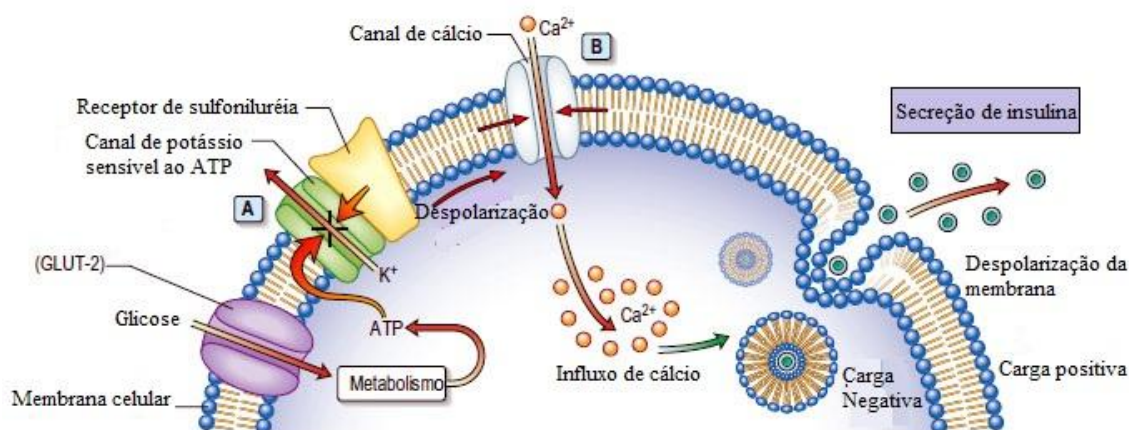
entre 2-8°C, se filtrada em membrana ou se contiver algum agente bacteriostático. Ciclos repetidos de congelamento-descongelamento devem ser evitados (HELMERHORST; STOKES, 1987; LOUGHEED et al., 1981).

Tabela 2 - Propriedades físicas da INS humana em pó (Sigma®).

<i>Aparência</i>	Pó branco
<i>Atividade</i>	27,5 UI/mg
<i>Conteúdo de zinco típico</i>	≤ 1%
<i>Perda por secagem</i>	<10%
<i>Conteúdo de pró-INS</i>	<1 ppm
<i>Massa molar</i>	~ 6000
<i>Ponto isoelétrico</i>	5,30-5,35
<i>Solubilidade</i>	20mg/mL em HCl 0,01 M

2.4.3 Secreção

A secreção fisiológica de INS ocorre através de estímulos que podem ser ocasionados por substâncias específicas como a glicose, a arginina e as sulfoniluréias ou por estímulos neurais, endócrinos e alguns agentes farmacológicos. Contudo, a glicose fisiológica é o maior estimulante. Assim, a glicose é absorvida pelas células intestinais por meio dos receptores GLUT-2 e é oxidada pelas glicoquinases (Fig. 5). Em baixas concentrações (<90mg/dL), ocorre um efluxo de K^+ através de canais de K_{ATP} abertos, o que mantém a membrana das células com um potencial negativo em que os canais de Ca^{2+} voltagem-dependente estão fechados.

Figura 5 - Secreção fisiológica da insulina

Adaptado de: Sociedade Brasileira de Diabetes (SDB). Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/> Acesso em 04/04/2013.

No entanto, com o aumento de glicose no plasma, a glicose é captada e o metabolismo pelas células é aumentado. O aumento na concentração de ATP em resposta ao fechamento dos canais de K_{ATP} leva à despolarização da membrana, à abertura dos canais de Ca²⁺ voltagem-dependente, ao influxo de Ca²⁺, ao aumento da concentração de cálcio intracelular e à exocitose de INS dos grânulos (GRIBBLE; ASHCROFT, 2000).

2.4.4 Farmacologia

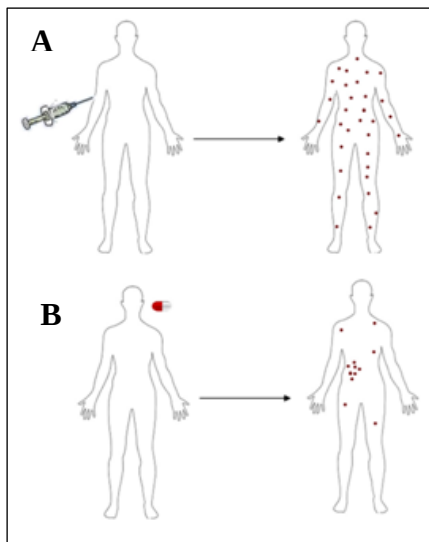
A INS é o principal hormônio anabólico que regula o metabolismo dos carboidratos e da gordura, já que facilita a entrada da glicose nas células e aumenta a síntese de glicogênio, ácidos graxos e proteínas. Quando administrada subcutaneamente apresenta diversos efeitos colaterais e atinge alvos não desejados, como os músculos e os rins (FESKENS; KROMHOUT, 1994; HENRY et al., 1993).

A administração da INS através das vias subcutânea, pulmonar, nasal e bucal leva à liberação do fármaco para a circulação sistêmica, sendo que somente uma pequena porcentagem (aproximadamente 20%) alcança o fígado, primeiro sítio de ação, segundo a fisiologia. O excesso de INS na circulação periférica pode levar à hipoglicemia, resistência insulínica, lipodistrofia, alergia, dentre outras complicações (STILL, 2002).

A administração oral da INS (Fig. 6) apresenta importantes vantagens, uma vez que mimetiza a dinâmica fisiológica da INS endógena, ou seja, atinge primeiramente o fígado, via circulação porta-hepática e, somente depois, os tecidos periféricos. Dessa forma, os níveis de INS na circulação sistêmica permanecem reduzidos, diminuindo os episódios de

hipoglicemia. No entanto, esta via impõe diversas barreiras à absorção de fármacos, particularmente as proteínas e peptídeos.

Figura 6 - Distribuição da INS administrada pelas vias subcutânea (A) e oral (B).



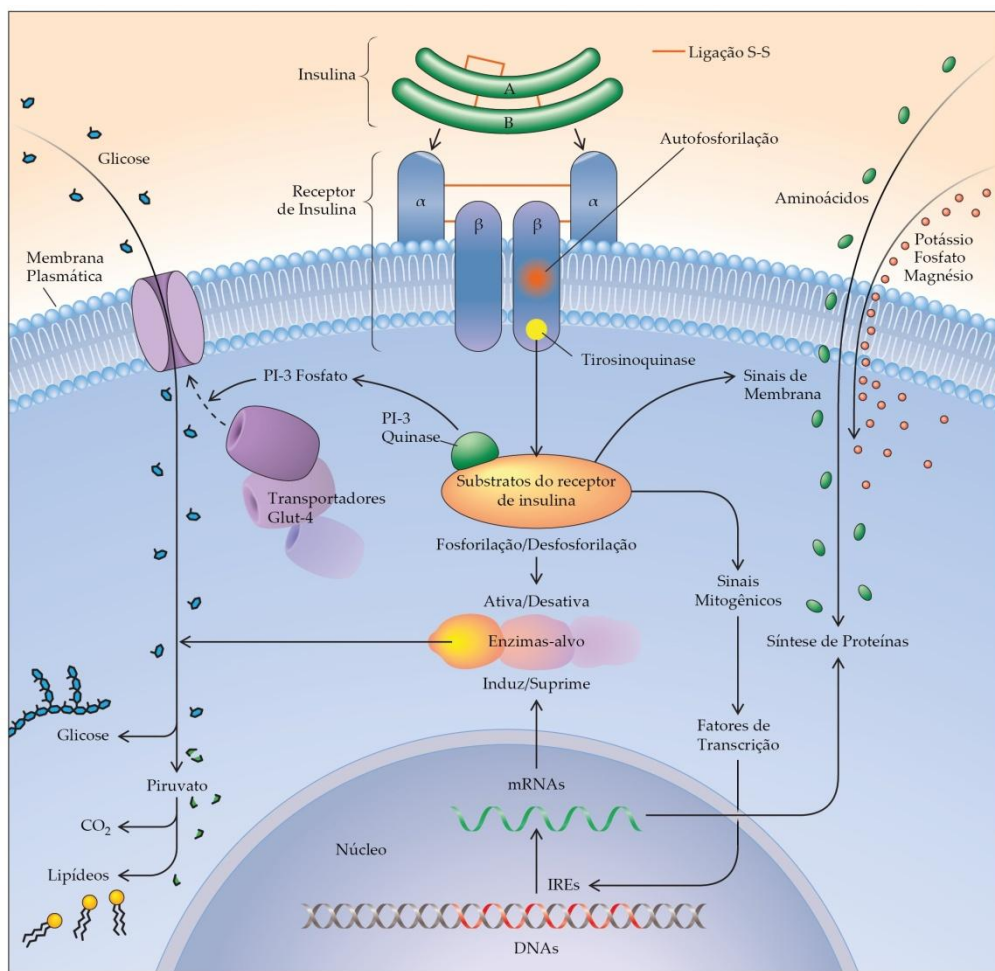
FONTE: REKHA; SHARMA, 2013.

2.4.5 Mecanismo de ação

O receptor de INS é uma proteína heterotetramétrica, isto é, é constituído de duas subunidades α (extracelular) e duas subunidades β (intracelular), com atividade quinase (Fig. 7). Quando a INS se liga a subunidade α do receptor ocorre ativação da subunidade β através da autofosforilação da região intracelular do receptor. A fosforilação também ocorre em outras proteínas e nos substratos dos receptores de INS (IRS1, 2, 3, 4). A fosforilação das IRSs cria sítios de ligação para a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) ocorrendo sua ativação (CARVALHEIRA et al., 2003).

Entre os principais efeitos dessa cascata estimulada pela INS estão a translocação de transportadores da glicose (Glut-4) até a membrana plasmática, onde eles facilitam a difusão da glicose para dentro da célula; o desvio do metabolismo intracelular da glicose em direção ao armazenamento, como glicogênio pela ativação da glicogênio-sintase; o estímulo da captação celular de aa, fosfato, potássio e magnésio; o estímulo da síntese proteica e a inibição da proteólise; e a regulação da expressão de genes por meio de elementos regulatórios de INS (IREs) em moléculas-alvo de DNA (GENUTH, 2008).

Figura 7 - Mecanismo de ação da INS



FONTE: GENUTH, 2008.

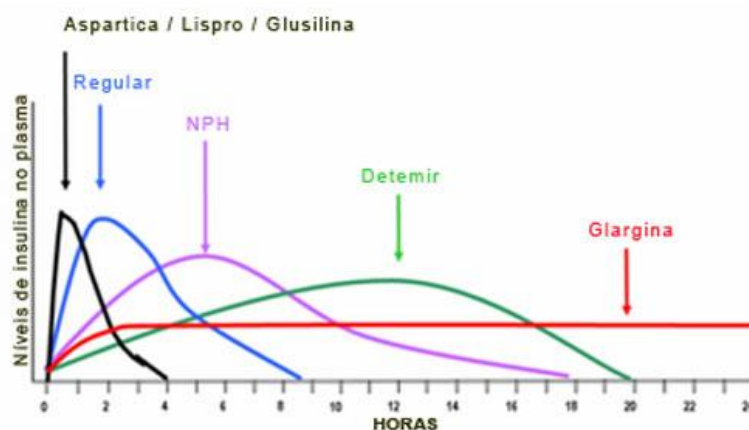
2.4.6 Análogos sintéticos da insulina para administração parenteral

A principal diferença entre os análogos sintéticos de INS (Tab. 3) consiste na velocidade com que a INS injetada é absorvida do tecido subcutâneo para a corrente sanguínea, iniciando assim a sua ação, e no tempo que o organismo precisa para absorver toda INS administrada, que corresponde ao seu tempo de ação (Fig. 8).

Atualmente, a INS humana é produzida através da tecnologia do DNA recombinante, a qual consiste, basicamente, da inserção de genes da INS humana ou da pró-INS em microrganismos, como a *Escherichia coli* (KAMIONKA, 2011). Existem dois tipos principais de análogos de INS no mercado, os de curta duração, ou seja, de ação regular e intermediária e os de liberação controlada, destinados a fornecer o nível basal de INS para o dia.

Tabela 3 - Resumo das principais características dos análogos da insulina.

Tipo de insulina	Início da ação	Duração (horas)	Tempo até o pico (horas)
Ação rápida			
Regular	15 a 30 min	6 a 8	2 a 2,5
Ação muito rápida			
Lispro	15 min	4 a 6	1 a 2
Aspart	15 min	4 a 6	1 a 2
Glulisina	15 min	4 a 6	1 a 2
Ação intermediária			
NPH	1 a 2 horas	10 a 14	4 a 8
Ação longa			
Detemir	2 a 3 horas	9 a 24	Sem pico
Glargina	1,5 a 3 horas	20 a 24	Sem pico

Figura 8 - Perfil farmacocinético dos diferentes tipos de insulina

ADAPTADO DE: CAMPOS, 2011.

O princípio básico da reposição de INS é fornecer um suprimento lento, contínuo e de longa duração que simule a secreção basal interprandial e noturna das células beta normais. Além disso, uma forma de ação rápida e relativamente curta de INS administrada antes das refeições mimetiza a rápida secreção normal de INS estimulada pelas refeições (MOORADIAN *et al.*, 2006; HIRSCH, 2005; SKYLER, 1998).

2.4.6.1 Insulina rápida (regular)

Também conhecida como INS cristalina, tem como característica a associação de seis moléculas com uma molécula de zinco para formar hexâmeros, os quais devem se dissociar em monômeros antes da absorção. Por esse motivo, seu pico máximo de

atividade ocorre 120-150 min após a injeção e deve ser administrada 30-40 min antes das refeições. Seu início de ação é de 15-30 min após a injeção subcutânea e sua ação dura de 6-8 horas.

2.4.6.2 Insulina de ação muito rápida

Vários análogos da INS foram desenvolvidos com o intuito de evitar a formação de hexâmeros e aumentar a velocidade de absorção. Na INS lispro, a lisina e prolina são trocados nas posições 28 e 29 da cadeia B. Com a INS aspart, o ácido aspártico substitui a prolina na posição 28 (RASKIN *et al.*, 2000). Na INS glulisina, a lisina toma o lugar da asparagina na posição 3 e o ácido glutâmico substitui a lisina na posição 29 (ROBINSON; WELLINGTON, 2006). O início de ação dessas INS se dá 15 min após a administração, o pico máximo de atividade entre 1 e 2 horas e sua ação dura de 4-6 horas. Dessa maneira, a INS administrada antes das refeições fornece um perfil plasmático semelhante àquele da secreção normal da INS, tendo como maior vantagem a redução de picos glicêmicos pós-prandiais e a diminuição da hipoglicemia resultante da ação tardia da INS regular (DEL SINDACO *et al.*, 1998; GARG *et al.*, 1996).

2.4.6.3 Insulina de ação intermediária

Também conhecida como INS de ação intermediária, a INS NPH – ou Neutral Protamine Hagedorn – é resultado da conjugação da INS com a protamina, na proporção de 6:1, a fim de prolongar sua ação. A reação de conjugação ocorre através da interação das cargas positivas da protamina com as cargas negativas da INS em pH neutro. O pico de atividade da INS NPH ocorre entre 4-8 horas e a ação dura de 10-14 horas, por isso é comumente administrada ao deitar. Também é acrescida de Zn.

2.4.6.4 Insulina lenta

A INS glargina e detemir são exemplos de INS lentas e são utilizadas como INS basal, pois possibilitam uma liberação lenta e contínua. A glargina tem duas argininas adicionais na carboxila terminal da cadeia B da INS, B31 e B32, e tem uma glicina no lugar da arginina na posição A21; enquanto que a detemir não possui treonina na posição B30 e é acrescida de uma cadeia de ácido graxo C14 na posição B29. A detemir tem ação

longa porque o ácido graxo se liga reversivelmente à albumina plasmática, o que diminui a sua velocidade de saída do plasma e diminui o acesso às células-alvo.

2.5 Barreiras contra a absorção oral de proteínas/peptídeos

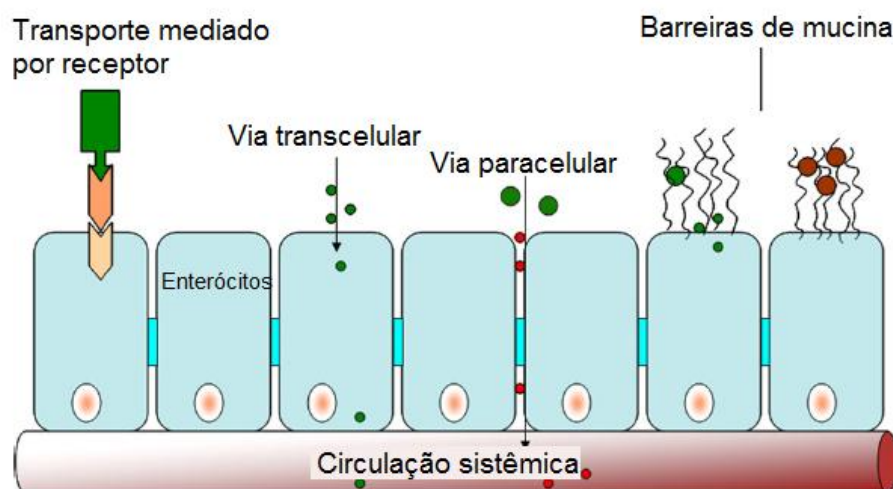
Uma grande variedade de proteínas com atividade terapêutica tem sido desenvolvida graças ao avanço da biotecnologia. No entanto, a biodisponibilidade oral desses compostos é significativamente reduzida devido a sua alta instabilidade mediante às porções superiores do TGI e a escassa permeabilidade através das células epiteliais intestinais.

O intestino faz parte do sistema digestivo e tem como principal função a absorção de nutrientes e a segurança do corpo contra a entrada de microrganismos, macromoléculas e moléculas tóxicas. No entanto, esse mecanismo de proteção também pode se opor à entrada de fármacos administrados oralmente, sendo a própria parede intestinal e a camada de muco, a qual é mais espessa no estômago e no cólon, exemplos de obstáculos físicos à permeabilidade de macromoléculas (Fig. 9) (REKHA; SHARMA, 2013).

Da camada mais interna para a mais externa, o intestino delgado é composto pelas camadas mucosa, submucosa, areolar, muscular, subserosa e serosa, sendo que as três primeiras são as mais difíceis de serem transpostas pelo fármaco. A camada mucosa, devido às vilosidades responsáveis pela absorção de nutrientes e a camada areolar, por ser um tecido muito denso com a presença de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, já que faz conexão entre as camadas mucosa e muscular (BLANCHETTE *et al.*, 2004).

Dessa maneira, a absorção intestinal para a circulação sistêmica pode ocorrer por diferentes vias (Fig. 9). Na via transcelular, a absorção ocorre através das células epiteliais intestinais e das células M (células com micropregas) presentes nas placas de Peyer, enquanto que na via paracelular, a absorção ocorre através do espaço intersticial entre as células e é mediada pelas junções paracelulares, sendo restrita, portanto, aos solutos pequenos, íons e a água e, por isso, é a rota preferencial dos fármacos hidrofílicos (ANDERSON; VAN ITTALIE, 1995).

Figura 9 - Barreiras intestinais e vias de permeação de fármacos



ADAPTADO DE: REKHA; SHARMA, 2013.

Além das barreiras físicas, as proteínas e peptídeos possuem grande suscetibilidade à degradação enzimática, a qual se inicia no estômago, principalmente através da enzima pepsina, responsável por 10 a 20% da degradação desses compostos, seguindo para o duodeno, no qual as serino-endopeptidases, nomeadamente a tripsina, a quimotripsina e as carboxipeptidases, são responsáveis pela continuação da degradação proteica, de maneira que somente uma pequena porcentagem ($\sim 0,1\%$) do composto permanece bioativo para ação (LANGGATH *et al.*, 1997; IKESUE *et al.*, 1993).

Outra dificuldade referente à absorção oral de proteínas e peptídeos é a grande instabilidade físico-química dessas substâncias perante o ambiente hostil do TGI superior, representado por regiões de acentuada acidez, secreção de sais biliares e suco pancreático, além da presença de alimentos e movimentos peristálticos, todos contribuindo para a alteração conformacional e desnaturação protéica (TENHOOR; DRESSMAN, 1992).

É importante destacar que a absorção oral da INS também é prejudicada devido às propriedades intrínsecas deste peptídeo, tais como elevado peso molecular, hidrofílica e carga de superfície, os quais dificultam sua permeação através das células epiteliais intestinais (NIELSEN *et al.*, 2014).

Em face ao exposto, o grande desafio do desenvolvimento de um sistema para administração oral de INS consiste na sua proteção contra a degradação/desnaturação, bem como melhoria da permeabilidade intestinal.

2.6 Estratégias para melhorar a biodisponibilidade da INS administrada oralmente

O surgimento de um sistema para administração oral da INS representaria um grande avanço na terapêutica da *Diabetes mellitus*, uma vez que benefícios além do aumento da adesão do paciente ao tratamento poderiam ser alcançados, já que a INS exerceria sua ação de maneira muito semelhante à INS endógena (CERNEA; RAZ, 2006).

Sendo a INS um peptídeo de aproximadamente 5,8 kDa e com características predominantemente hidrofílicas, sua permeação através da membrana intestinal constitui um grande desafio. Promotores de absorção têm sido utilizados com o objetivo de aumentar a permeabilidade das bicamadas lipídicas das células epiteliais, estando entre os principais tipos os sais biliares, os tensoativos, agentes quelantes de íons cálcio e ácidos graxos. Mesiha e colaboradores (1994) observaram que a administração oral de INS (5UI/Kg) em associação com ácido palmítico levou à redução efetiva dos níveis de glicose sanguínea em ratos diabéticos. Contudo, as mudanças na permeabilidade das membranas são inespecíficas, aumentando também a permeabilidade de compostos como bactérias e vírus, além de comprometer vários outros processos bioquímicos, o que é altamente desfavorável (BERNKOP-SCHNÜRCH et al., 2005).

Devido à degradação enzimática constituir uma importante barreira à administração oral de proteínas e peptídeos, a utilização de inibidores enzimáticos tem sido extensivamente explorada. Dentre as principais enzimas que se deseja inibir, tem-se a tripsina, a quimotripsina e as carboxipeptidases e, seus principais inibidores, são o inibidor de tripsina de soja, aprotinina, inibidor pancreático e mesilato de camostato, respectivamente (REKHA; SHARMA, 2013). Em relação a administração oral de INS, vários grupos de pesquisa têm reportado o aumento da biodisponibilidade com a utilização de inibidores da tripsina ou quimotripsina (LIU et al., 2003).

No entanto, os inibidores enzimáticos convencionais podem levar a sérios efeitos colaterais e tóxicos devido à falta de especificidade da inibição (REKHA; SHARMA, 2013), inibindo a atividade de enzimas participantes da digestão e alterando a digestão de proteínas nutritivas (OTSUKI et al., 1987). Por outro lado, a absorção sistêmica desses compostos pode conduzir à toxicidade sistêmica, a hipertrofia do pâncreas, prejuízo da digestão protéica e alterações no metabolismo (MCCAFREY; JAMIESON, 1993).

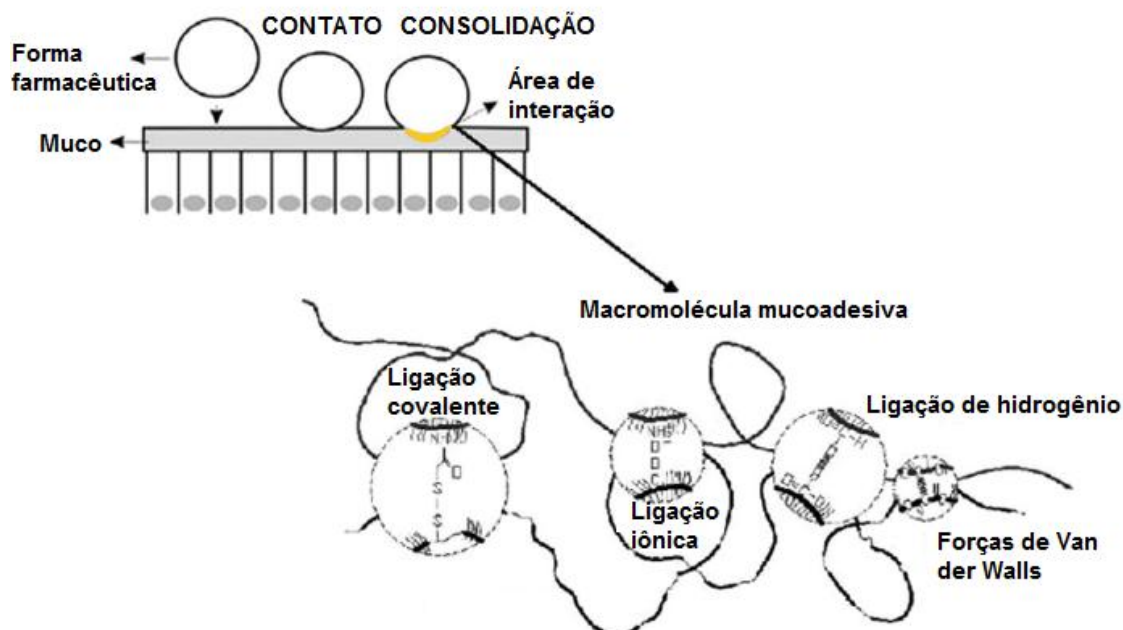
Segundo Kriwet e Kissel (1996), uma alternativa aos inibidores enzimáticos tradicionais é o emprego de polímeros com grupamentos carboxílicos no desenvolvimento de novos sistemas de liberação, já que a sua atividade quelante de cálcio evita a degradação

enzimática causada pelas proteases, as quais necessitam de íons cálcio para exercer sua ação. Além disso, os quelantes de cálcio também podem interferir na absorção paracelular de fármacos por modular a abertura das junções paracelulares. Os polímeros utilizados nesse trabalho (goma gelana, amido resistente e pectina) são polímeros aniônicos que contêm grupos carboxílicos e, portanto, devem exercer essa habilidade de se ligarem aos íons Ca^{2+} .

A modificação química é outra abordagem explorada para o aumento de biodisponibilidade de proteínas e peptídeos oralmente administrados. Alguns tipos de conjugação vêm sendo pesquisadas, tal como o uso de ligantes que são alvo para endocitose mediada por receptor. Shah e Shen (1996) desenvolveram conjugados de INS com transferina e pesquisaram o transporte da proteína terapêutica através das células Caco-2, concluindo que o transporte foi mediado via receptor de transferina e não através de receptor de INS.

A camada de muco que recobre a superfície dos órgãos que compõe o TGI vem sendo explorada para o desenvolvimento de formas farmacêuticas mucoadesivas, as quais apresentam as vantagens de imobilizarem os sistemas de liberação num órgão ou tecido alvo, promovendo um contato mais íntimo e por períodos de tempos prolongados, o que favorece o gradiente de concentração local e pode melhorar a permeabilidade e a biodisponibilidade sistêmica de fármacos, como aqueles pertencentes às classes III e IV segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (HSEIN *et al.*, 2015).

O processo de bioadesão ocorre entre dois materiais, dentre os quais pelo menos um é de natureza biológica e quando esta superfície biológica é a mucosa, o processo é denominado mucoadesão. As ligações bioadesivas estabelecidas num processo mucoadesivo envolvendo sistemas poliméricos geralmente são formadas em 3 etapas principais (Fig. 10), sendo a primeira correspondente ao contato íntimo entre o sistema polimérico e o muco. Num segundo estágio, o contato com o muco, composto por 95% de água, promove o intumescimento do sistema com relaxamento das cadeias poliméricas, as quais interpenetram-se com as cadeias de mucina, principal proteína do muco. Finalmente, um contato mais íntimo é estabelecido através de ligações químicas entre as duas superfícies, as quais podem ser ligações de hidrogênio, iônicas, covalentes, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (HSEIN *et al.*, 2015; SMART, 2005; CHICKERING; MATHIOWTZ, 1999).

Figura 10 - Representação esquemática dos estágios da mucoadesão

ADAPTADO DE: VILLANOVA et al., 2015.

O processo de mucoadesão têm sido explicado por diferentes teorias, incluindo a teoria eletrônica, da adsorção, da molhabilidade, da difusão, da fratura e a mecânica. Apesar da complexidade de cada teoria, acredita-se que o processo de mucoadesão ocorra através de diferentes mecanismos, os quais ocorrem simultaneamente (LYRA et al., 2007).

Diferentes polímeros têm sido utilizados para o desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos, sendo classificados de acordo com sua origem em sintéticos (por ex., derivados da celulose e polihidroxietilmetacrilato) e naturais (por ex., alginato, amido, gelana, pectina e quitosana) e, ainda, segundo sua carga de superfície em polímeros não-iônicos, catiônicos e aniônicos (PARK; ROBINSON, 1984). Contudo, os polímeros naturais merecem destaque, uma vez que além de apresentarem importantes propriedades mucoadesivas, são atóxicos, biodegradáveis, e possuem baixo custo (HSEIN et al., 2015).

A adesividade do sistema é determinada por características específicas do polímero, tais como a hidrofília/hidrofobia, a tensão de superfície, a presença de grupamentos químicos determinantes da carga superficial e a flexibilidade das cadeias poliméricas.

O processo de microencapsulação é uma estratégia racional para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos de origem protéica/peptídica, uma vez que o fármaco permanecerá encapsulado no interior de uma matriz polimérica e, conseqüentemente, protegido da exposição e degradação enzimática. Além disso, os sistemas

microparticulados podem contribuir para o controle das taxas de liberação de fármacos e para a vetorização para tecidos ou órgãos específicos (MA et *al.*, 2014). Neste âmbito, a liberação sítio-específica apresenta importantes vantagens biofarmacêuticas e farmacocinéticas quando comparada aos sistemas convencionais, sendo o cólon considerado um órgão de excelência para absorção de proteínas e peptídeos, mediante a reduzida atividade enzimática, pH mais próximo da neutralidade e tempo de trânsito prolongado (MAIOR et *al.*, 2008).

Analogamente, os filmes de revestimento também podem proteger o fármaco contra a degradação e controlar a cinética de liberação, uma vez que constituem uma barreira física que minimiza o contato com o ambiente ácido estomacal e o acesso das enzimas proteolíticas à proteína (LUO et *al.*, 2008).

A Tabela 4 apresenta algumas estratégias utilizadas para o aumento da biodisponibilidade da INS administrada oralmente.

Tabela 4 - Estratégias utilizadas para aumentar a absorção oral de INS usando diferentes sistemas de liberação

Estratégia	Sistema	Resultados	Referências
Nanocarreador polimérico/ Revestimento muco-penetrante	Nanopartículas auto-organizadas de trimetilquitosana revestidas com derivados do ácido metacrílico	Aumento da permeação através da mucosa intestinal e do transporte paracelular através da abertura das junções paracelulares	LIU et al., 2016
Sistemas micro/nanoparticulados Revestimento entérico	Cápsulas entéricas preenchidas com micropartículas contendo nanopartículas de PLGA	Prolongamento da liberação da INS por 24 h e diminuição prolongada dos níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos	YU et al., 2015.
Sistemas mucoadesivos	Comprimidos de quitosana tiolada	Aumento da mucoadesão em 80x em comparação com a quitosana não conjugada, sustentação da liberação da INS por até 8 h e biodisponibilidade absoluta de 0,83%	MILLOTTI et al., 2014.
Promotores de absorção	Ácidos graxos, surfactantes, quelantes de cálcio	Aumento da permeabilidade da membrana intestinal	WOITISKI et al., 2008; PARK et al., 2011
Inibidores enzimáticos	Micropartículas de polimetacrilato na presença dos inibidores enzimáticos ovomucóide de galinha e pato	Aumento de estabilidade da INS	AGARWAL et al., 2001.
	Adição de agentes complexantes (ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA))	Grande efeito protetor contra proteases	SU et al., 2012.

2.7 Sistemas de liberação modificada de fármacos

As formas farmacêuticas convencionais apresentam diversos inconvenientes relacionados, principalmente, à rápida liberação/ação do fármaco, os quais tornam necessária a administração repetida do medicamento a fim de manter a concentração do fármaco dentro do intervalo terapêutico. Além disso, a flutuação nos níveis plasmáticos é responsável pela ocorrência dos efeitos colaterais, além de representar um risco à superdosagem (DANCKWERTS; FASSIHI, 1991).

Nesse sentido, os sistemas de liberação modificada de fármacos representam uma valiosa estratégia, pois podem permitir o controle temporal e/ou espacial das taxas de liberação de fármacos (COIMBRA, 2010), mantendo os níveis plasmáticos dentro da janela terapêutica, reduzindo os efeitos colaterais e a administração repetida, fatores que frequentemente otimizam a biodisponibilidade e aumentam a adesão do paciente ao tratamento (MAIOR *et al.*, 2008; RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006; SINHA; KUMRIA, 2003).

Diferentes critérios são utilizados para a classificação dos sistemas de liberação modificada. Dessa maneira, de acordo com o tipo de material utilizado, esses sistemas podem ser classificados como poliméricos ou não poliméricos e de acordo com o estado físico em sólidos, líquidos ou semi-sólidos. Outros critérios para classificação incluem o tipo de agente terapêutico incorporado, a via de administração e o mecanismo que controla a liberação do fármaco (COIMBRA, 2010).

Com o avanço da tecnologia farmacêutica e visando atender às necessidades específicas, diferentes sistemas têm sido desenvolvidos, como os lipossomas (DICHEVA *et al.*, 2014, SHAH *et al.*, 2014), os cristais líquidos (OKAWARA *et al.*, 2014), as micelas (ARRANJA *et al.*, 2014; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2014), as nanoemulsões (KANDADI *et al.*, 2012), as nanopartículas (XU *et al.*, 2014), as micropartículas (PREISIG *et al.*, 2014, SOARES *et al.*, 2013), microesferas (PREZOTTI *et al.*, 2014; MAITI *et al.*, 2011), dentre outros.

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade das micropartículas em proteger o fármaco encapsulado e manter níveis terapêuticos adequados de fármacos no organismo, além de vetorizar o fármaco para um tecido ou órgão alvo e prolongar a liberação (PREZOTTI *et al.*, 2014; MAITI *et al.*, 2011; RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006).

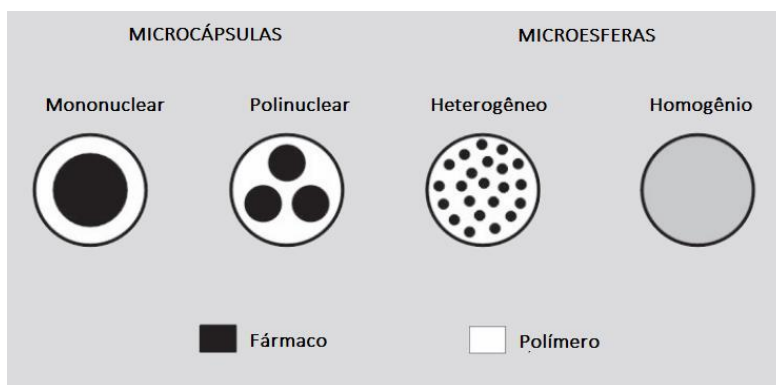
2.8 Sistemas microparticulados

As partículas formadas a partir de um ou mais polímeros e com diâmetro que varia de 1 a 1000 μm são normalmente denominadas de micropartículas (SILVA et al., 2003). De acordo com a maneira que um fármaco se encontra distribuído no seu interior, os sistemas microparticulados podem ser classificadas como microcápsulas e microesferas (COUVREUR; PUISIEUX, 1993).

As microcápsulas são sistemas reservatórios onde o fármaco se encontra revestido pelos polímeros que compõem a membrana da cápsula, enquanto que as microesferas são sistemas matriciais contendo o fármaco uniformemente disperso ou dissolvido na matriz polimérica (SILVA et al., 2003; KAS, ONER, 2000; ANDREO-FILHO, OLIVEIRA, 1999) (Fig. 11).

As microcápsulas, por sua vez, podem ser *polinucleares*, quando o núcleo se encontra dividido no interior da partícula revestida, ou *mononucleares*, quando há existência de um só núcleo. De maneira análoga, as *microesferas heterogêneas* contêm o fármaco na forma de partículas dispersas, enquanto nas microesferas homogêneas o fármaco se encontra no estado molecular, ou seja, dissolvido (AFTABROUCHAD; DOELKER, 1992).

Figura 11 - Tipo de micropartículas quanto à estrutura.



Adaptado de: SILVA et al., 2003.

Uma vantagem importante da utilização dos sistemas multiparticulados em relação aos sistemas monolíticos é seu tamanho reduzido, o qual proporciona um tempo de trânsito mais previsível e distribuição homogênea das micropartículas ao longo do TGI, promovendo uma absorção mais regular e diminuição da irritação causada pelo acúmulo localizado de fármacos que irritam a mucosa (MAITI et al., 2011; KHAN et al., 2010;

KULKARNI et al., 2010; ZERBINI, 2010; MAESTRELLI et al., 2008; ZHANG et al., 2002).

2.8.1 Processo de microencapsulação

A microencapsulação tem sido explorada por diferentes áreas, como a cosmética, alimentícia, agrícola e a farmacêutica, sendo que na indústria farmacêutica o método se aplica para diferentes fins, como o mascaramento de sabor e odor de fármacos, conversão de líquidos em sólidos, proteção do fármaco contra a luz, o calor e a oxidação, redução da irritação gástrica e produção de formas farmacêuticas de liberação controlada (SILVA et al., 2003).

Existe um grande número de fármacos que quando administrados oralmente sofrem degradação nas diferentes porções do TGI e metabolização pré-sistêmica antes mesmo de chegarem ao órgão-alvo e/ou serem absorvidos. Um exemplo clássico são alguns fármacos antineoplásicos, os quais apresentam biodisponibilidade oral de 5 a 20% (THANKI et al., 2013), e aqueles de origem proteica e peptídica, como a insulina, com menos de 1 a 2% de biodisponibilidade (RENUKUNTALA et al., 2013).

A microencapsulação é um processo em que pequenas partículas de sólidos, gotículas de líquido, ou ainda, dispersões de sólidos em líquidos, são aprisionados em um polímero encapsulante, dando origem a micropartículas de dimensões de 1 a 1000 µm (LAM et al., 2012; NAZZARO et al., 2012). Nesse sentido, o processo de microencapsulação de fármacos representa uma importante estratégia para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos orais, protegendo o fármaco contra fatores externos, como alcalinidade, acidez, umidade, luz, calor, oxidação e evaporação, além de promoverem um efeito terapêutico prolongado (LAM et al., 2012; MA et al., 2009).

As MP poliméricas podem ser produzidas por diferentes técnicas, sendo que a técnica de obtenção é responsável pela preservação e estabilidade do fármaco (SILVA et al., 2003). Assim, as MP podem ser obtidas através de (a) processos químicos (método de polimerização interfacial), (b) processos mecânicos (revestimento em leito fluidizado, evaporação do solvente e spray-drying) e (c) processos físico-químicos (coacervação ou separação de fases e gelatinização iônica) (LAM; GAMBARI, 2014).

Resumidamente, a técnica de obtenção de MP através da polimerização interfacial ocorre pela polimerização de um monômero sobre a gota ou partícula, o qual origina uma

parede polimérica. Este método apresenta a vantagem de possibilitar a encapsulação de grandes quantidades de fármaco (COUVREUR *et al.*, 2002), bem como a possibilidade de controlar com eficácia a espessura da membrana a ser formada através da utilização de diferentes monômeros (BANSODE *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2003). No entanto, uma grande limitação é a dificuldade do controle das reações de polimerização, a estabilidade do fármaco nas condições reacionais, a presença de monômeros não polimerizados e a perda de fármacos hidrossolúveis durante os estágios de lavagem (YEO *et al.*, 2001).

O revestimento em leito fluidizado aplica-se aos fármacos sólidos, os quais tem suas partículas suspensas em um jato de ar seguido pela pulverização de uma dispersão polimérica, levando à formação de uma parede solidificada devido à evaporação do solvente. Esse método permite o total controle das temperaturas empregadas para a secagem e possui um baixo custo de operação, no entanto é um processo relativamente longo e que pode levar à aglomeração de partículas (FANG; BHANDARI, 2012; SANTIVARANGKNA *et al.*, 2007).

Outra método utilizado é por spray-drying, no qual a dispersão polimérica acrescida de fármaco é atomizada em uma corrente de ar quente, levando a evaporação do solvente com consequente formação das MP. É um método que não limita a escolha dos polímeros e leva à alta eficiência de encapsulação, mas pode levar a obtenção de MP não uniformes, com alteração do polimorfismo do fármaco e um baixo rendimento (YEO *et al.*, 2001).

No método mecânico de microencapsulação por evaporação do solvente, é formada uma dispersão de polímero e fármaco em um solvente e o sistema é mantido em agitação. A remoção ou evaporação do solvente das gotas poliméricas, provocados pela aplicação de calor ou pressão reduzida, ocasiona a contração do material de revestimento em torno do fármaco, produzindo as MP, as quais, frequentemente, encapsulam baixa quantidade de fármaco (HE *et al.*, 2012).

A coacervação, também conhecida como separação de fases, refere-se à dessolvatação de um polímero e a sua separação da solução polimérica em duas fases líquidas imiscíveis entre si, podendo se iniciar através da mudança de pH, alteração da temperatura, adição de um sal, ou adição de um “não-solvente”. É considerado um processo simples, econômico e que fornece partículas com alta eficiência de encapsulação e de tamanho homogêneo (YEO *et al.*, 2001).

A técnica de emulsificação/solidificação se baseia, primeiramente, na formação de uma emulsão, na qual as gotículas da fase interna serão solidificadas para originar as MP

(DONBROW, 1992). De acordo com o processo de solidificação empregado, o método de emulsificação/solidificação pode ser dividido em secagem em fase líquida, extração do solvente, reticulação química e térmica, *hot-melt* e interação iônica.

A obtenção de MP por gelatinização ionotrópica tem se mostrado como uma técnica vantajosa em relação as demais, uma vez que ocorre em condições mais amenas, sem o emprego de solventes orgânicos nem a aplicação de elevadas temperaturas, o que permite a encapsulação de fármacos instáveis, como as proteínas, células e enzimas (YEO *et al.*, 2001).

Essa técnica é dependente da capacidade dos polieletrólitos se reticularem na presença de íons opostos para formar MP. Dessa maneira, MP hidrofílicas são obtidas através da extrusão de uma dispersão polimérica na forma de microgotas sobre uma solução aquosa de cátions polivalentes, sendo que a difusão dos cátions nas gotas leva à formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares, originando uma estrutura polimérica tridimensional, na qual o fármaco se encontra aprisionado (BODMEIER *et al.*, 1989).

Devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade, existe um interesse crescente na utilização de polímeros naturais para obtenção de MP por geleificação ionotrópica. Entre os polímeros mais utilizados estão o alginato (SILVA *et al.*, 2006), a pectina (PORSNSAK *et al.*, 2007), a quitosana (GUPTA; KUMAR, 2000), carboximetilcelulose (KULKARNI *et al.*, 2010) e a goma gelana (PREZOTTI *et al.*, 2014; CARDOSO, 2014; MAITI *et al.*, 2011).

2.9 Polímeros naturais

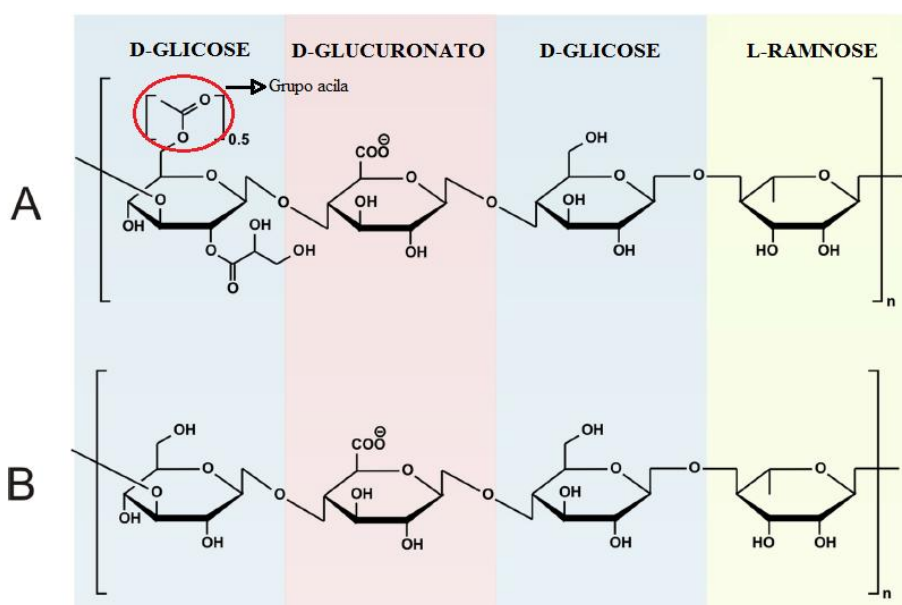
2.9.1 Goma gelana (GG)

As gomas naturais, representadas pelos polissacarídeos provenientes de fontes diversas, como tecidos de plantas, algas, sementes e microrganismos, vêm sendo bastante exploradas como excipientes farmacêuticos devido, principalmente, às suas propriedades de biocompatibilidade, atoxicidade, baixo custo de produção e ampla disponibilidade (OSMAŁEK *et al.*, 2014).

A GG, inicialmente conhecida como polissacarídeo S-60 (MORRIS *et al.*, 2012), é obtida a partir da secreção exocelular de bactérias conhecidas como *Pseudomonas elodea* (AGNIHOTRI *et al.*, 2006). Apresenta na sua estrutura unidades repetidas de α -L-ramnose,

β -D-glicose e β -D-glucuronato, na proporção de 1:2:1, sendo que a forma nativa da GG contem 2 substituintes acila (L-gliceril e acetil), os quais podem ser removidos por hidrólise alcalina, fornecendo a GG desacetilada ou de baixa acetilação (BAJAJ et al., 2007; CHANDRASEKARAN et al., 1992; MILAS et al., 1990; KANG et al., 1982) (Fig. 12).

Figura 12 - Estruturas da goma gelana nativa (A) e da goma gelana de baixa acetilação (B).



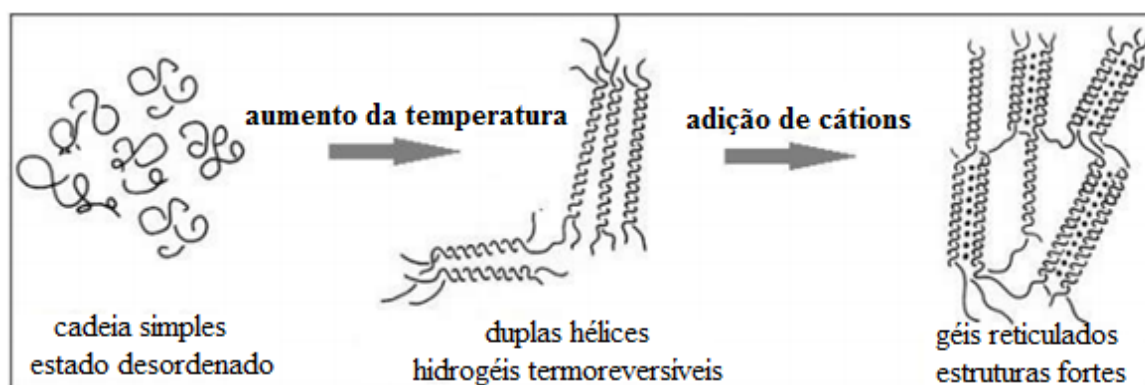
ADAPTADO DE: OSMAŁEK et al., 2014.

O principal interesse na forma desacetilada desse polímero se deve ao fato de os grupamentos acila, presentes na forma nativa, dificultarem o processo de associação das cadeias poliméricas durante a geleificação (MORRIS et al., 1996). Além disso, após o processo de desacetilação, os cátions podem reticular mais facilmente a estrutura polimérica (MORRIS et al., 2012; IKEDA et al., 2004; CHANDRASEKARAN et al., 1988).

O processo de formação de hidrogéis de GG é dependente de diversos fatores, como temperatura (HORINAKA et al., 2004), tipo e presença de cátions (DAI et al., 2010) e valor de pH (PICONE; CUNHA, 2011). Assim, o processo de geleificação através da complexação com cátions e formação de pontes de hidrogênio com a água envolve a formação de zonas de junção helicoidais duplas, seguida pela agregação dos segmentos

helicoidais duplos na forma de uma rede tridimensional (GRASDALEN; SMIDSRØD, 1987) (Fig. 13).

Figura 13 - Representação esquemática do mecanismo de formação do gel de gelana.



ADAPTADO DE: MIYOSHI et al., 1995.

Nesse sentido, sendo a GG um polissacarídeo com propriedades de geleificação específicas, a manipulação dos diferentes fatores influentes no processo de geleificação citados acima, pode fornecer distintos e importantes sistemas de liberação controlada, como sistemas para administração retal (EL-KAMEL; EL-KHATIB, 2006), oral (PREZOTTI et al., 2014; KUBO et al., 2003) e oftálmico (LIU et al., 2010).

Maiti e colaboradores (2011) desenvolveram *beads* de gelana acetilada através da reticulação com AlCl_3 , os quais controlaram de maneira efetiva a liberação do fármaco (glipizida) em meio ácido e fracamente em meio alcalino. Já a liberação de cefalexina a partir de *beads* de gelana obtidos pela reticulação com íons Ca^{+2} e Zn^{+2} foi prolongada em 6 h (AGNIHOTRI et al., 2006).

Em nossos laboratórios, *beads* de gelana e pectina foram obtidos por geleificação ionotrópica, também utilizando Al^{3+} como reticulante e estes se mostraram altamente mucoadesivos, além de reduzirem as taxas de liberação em meio ácido e prolongarem a liberação do cetoprofeno por 6 h (PREZOTTI et al., 2014).

2.9.2 Amido resistente

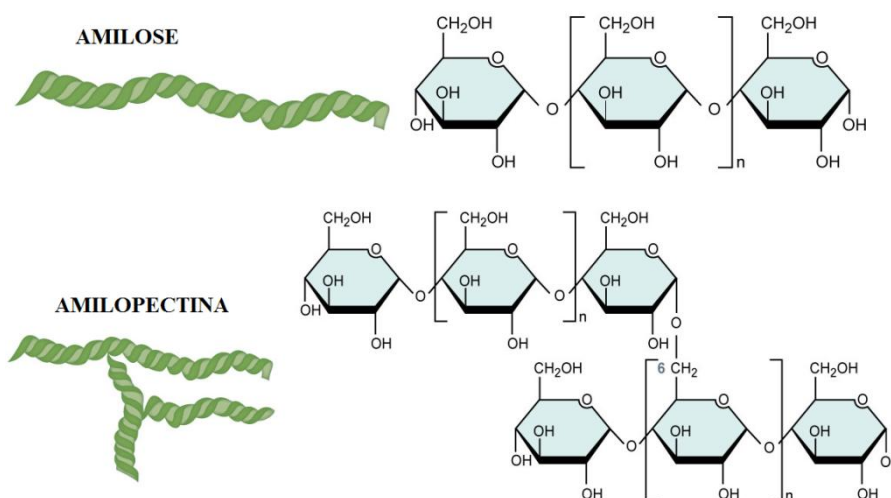
Devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade (RASHID et al., 2011) e baixo custo (RANA et al., 2011), o amido têm sido bastante explorado na indústria farmacêutica como excipiente para sistemas sólidos. No entanto, muitas vezes o amido nativo apresenta

propriedades físicas e químicas inadequadas para fins específicos, como, por exemplo, elevada solubilidade em meio aquoso, tornando-se necessária sua modificação por métodos físicos, químicos e/ou enzimáticos (ZAVAREZE et al., 2011).

O amido é um polissacarídeo semi-cristalino e está presente em diferentes espécies vegetais na forma de grânulos, os quais podem variar em tamanho de 1 a 100 μm . É composto por amilose e amilopectina (Fig. 14), sendo a amilose um poliglicano de cadeia linear com ligações glicosídicas α -1,4 e insolúvel em água quando isolada, enquanto que a amilopectina corresponde ao glicano ramificado, contendo ligações α -1,6 (HARALAMPU, 2000), sendo solúvel em água quando na forma isolada (SMITH; DENYER, 2003; CALVERT, 1997).

As cadeias de amilose e amilopectina podem interagir de diversas maneiras e a relação estrutura-função dessas interações tem sido profundamente investigada. Contudo, quando essas interações ocorrem na forma de duplas hélices, estruturas cristalinas podem ser originadas (CALVERT, 1997).

Figura 14 - Estrutura linear da amilose e ramificada da amilopectina.



ADAPTADO DE: Eberly College of Science Office of Online Education. Disponível em: https://online.science.psu.edu/chem005_wd/node/7882, acesso em 30/01/2015.

A retrogradação ocorre quando o amido é aquecido na presença de água (fase de gelatinização), sendo o grânulo rompido e os polímeros lixiviados da estrutura, levando à formação de uma rede tridimensional mais empacotada que geleifica quando é resfriada. Isso ocorre devido à formação de duplas hélices através da formação de zonas de junção, que nada mais são que a associação das cadeias de glicano (HARALAMPU, 2000).

Nesse sentido, a cristalinidade do amido retrogradado depende de fatores como peso molecular, extensão das cadeias de amilose e amilopectina e padrão de ramificação da amilopectina e temperatura do tratamento empregado, a qual exerce influência na cinética das associações e conteúdo de água (BORDENAVE *et al.*, 2014).

O amido retrogradado (AR), também conhecido como amido resistente tipo 3 (AR3), é capaz de escapar da digestão no intestino delgado, sendo fermentado por enzimas bacterianas presentes no cólon em ácidos graxos de cadeias longas (HTOON *et al.*, 2010). Essa propriedade do AR é fundamental para o delineamento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos.

O principal interesse no amido resistente tipo 3 reside no fato dele possuir maior estabilidade térmica e baixa solubilidade, características que o tornam um potencial candidato para obtenção de sistemas para liberação cólon específica de fármacos (MENEGUIN *et al.*, 2014; DIMANTOV *et al.*, 2004).

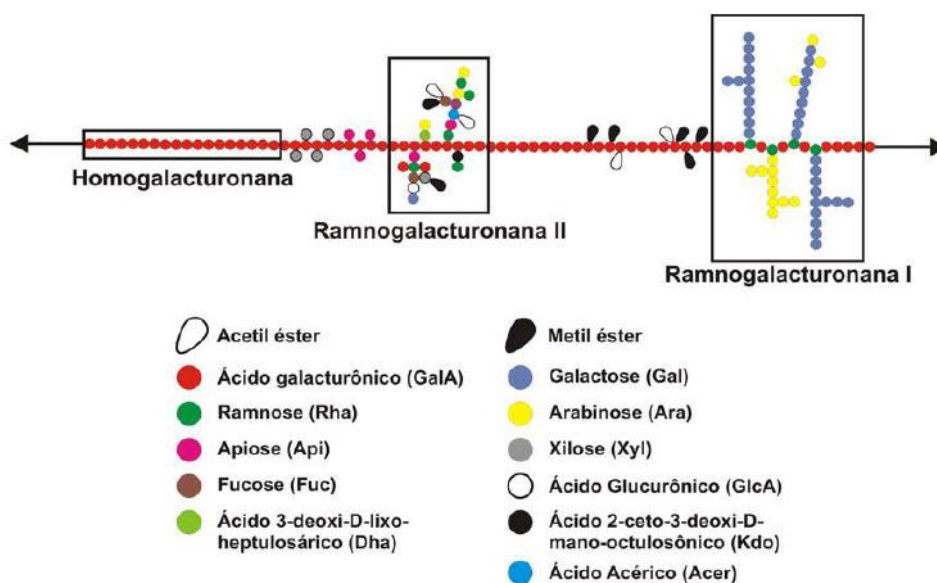
Estudos têm revelado que materiais com alto teor de amilose são os melhores candidatos para obtenção de um material enriquecido com AR-3. Isso porque a amilose é responsável pela formação de uma matriz amorfa onde os cristalitos permanecem embebidos e, portanto, protegidos da degradação enzimática (HTOON *et al.*, 2009; WALTER *et al.*, 2005; DIMANTOV *et al.*, 2003; CUI; OATES, 1997).

2.9.3 Pectina

A pectina é um heteropolisacarídeo natural composto por homogalacturonana (HG) e ramnogalacturonana (RG), a qual pode ser dividida nos tipos 1 e 2, correspondentes, respectivamente, às regiões lisa e ramificada (Fig. 15).

A HG apresenta uma cadeia linear constituída de resíduos de ácido galacturônico (GalA) unidos por ligações glicosídicas α -1,4 e que podem ser esterificados na posição C6. De acordo com o grau de esterificação (GE), a pectina pode ser classificada como pectina de alto grau de esterificação (GE>50%) e pectinas de baixo grau de esterificação (GE<50%) (PILGRIM *et al.*, 1991).

Figura 15 - Representação esquemática da estrutura das pectinas.



Adaptado de: VRIESMANN, 2008.

A pectina tem sido muito explorada no setor alimentício, principalmente como agente espessante. Contudo, devido às suas propriedades físico-químicas, mucoadesivas, facilidade de dissolução em pH alcalino, resistência à degradação nas porções superiores do TGI e a habilidade de formar géis em meio ácido, a pectina têm sido empregada para o desenvolvimento de diferentes sistemas de liberação de fármacos (CURY et al., 2014).

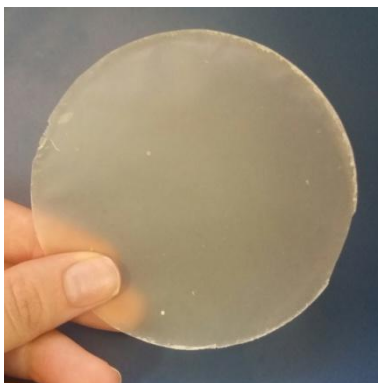
No entanto, devido à variabilidade botânica e o tipo de processamento, a pectina pode ser altamente solúvel em meio ácido, o que poderia contribuir para uma liberação prematura do fármaco. Alguns tipos específicos de tratamento também podem afetar a sua estabilidade ao longo do período de estocagem e seu comportamento em meio aquoso (MARRAS-MARQUEZ et al., 2015).

Visando sanar as desvantagens acima citadas e otimizar as propriedades da pectina, diversas estratégias podem ser empregadas, como a sua combinação com outros polímeros (PREZOTTI et al., 2014; MENEGUIN et al., 2014) e modificações químicas como reações de reticulação (CARBINATTO et al., 2014), estratégias que têm sido extensivamente exploradas em nosso grupo de pesquisa para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos.

Em estudo recente, filmes de revestimento baseados em misturas de amido resistente e pectina foram desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (MENEGUIN et al., 2014) (Fig. 16), os quais foram sistematicamente caracterizados de acordo com suas

propriedades físico-químicas e performance para emprego em sistemas de liberação de fármacos. Dentre outros fatores, o caráter inovador desse estudo residiu no fato de a influência da pectina na retrogradação do amido não ter sido reportada até o presente momento na literatura.

Figura 16 - Filme livre de amido resistente e pectina obtido por evaporação do solvente



FONTE: MENEGUIN, 2013

Para isso, blendas poliméricas de alta amilose e pectina foram submetidas ao processo de retrogradação em ciclos térmicos alternados (2 dias em cada temperatura - 30°C e 4°C por 16 dias), visando a obtenção de um material enriquecido com amido resistente.

O conjunto de dados obtidos demonstrou que a pectina favoreceu a retrogradação do amido, aumentando o teor de AR de, aproximadamente, 65,80% para 96,68% quando misturados na mesma proporção (1:1). As análises de difração de raios-X confirmaram a alteração no padrão de difração após os processos de retrogradação do polimorfo B para V, indicativos da presença de AR.

Além disso, os filmes apresentaram propriedades mecânicas (resistência à perfuração e alongamento durante a perfuração), de absorção de líquidos e de barreira (permeabilidade ao vapor d'água) adequadas, demonstrando que essa mistura polimérica permitiu obter um material com propriedades filmógenas adequadas. Os resultados também mostraram que os filmes possuem importantes características para o desenvolvimento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos, tais como alta resistência contra a degradação enzimática e baixa dissolução nas porções superiores do TGI.

Com base nos fatos expostos, no presente trabalho a veiculação da INS em MP de gelana revestidas com filmes de amido resistente/pectina foi explorada como potencial estratégia para administração oral da INS.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar MP de gelana revestidas com filmes de amido resistente/pectina para a administração oral da INS. As tecnologias de microencapsulação e revestimento foram exploradas a fim de promover o efetivo aprisionamento da INS na matriz polimérica, e consequentemente, alcançar a proteção contra a degradação, bem como a liberação controlada da INS. A escolha da goma gelana para a obtenção das MP foi baseada nas suas importantes propriedades mucoadesivas e biodegradabilidade específica pelas enzimas da microbiota colônica. Além disso, sua habilidade em formar hidrogéis na presença de cátions di ou trivalentes possibilitou a utilização da técnica de geleificação ionotrópica, a qual evita o uso de solventes orgânicos e requer condições reacionais amenas. O uso dos filmes de amido resistente/pectina para o revestimento das MP fundamentou-se em suas propriedades promissoras para se alcançar a liberação colônica, como a baixa solubilidade e degradabilidade enzimática em condições que simulam as porções superiores do TGI, demonstradas em estudo anterior.

3.1 Etapas

- ✓ Otimizar as condições para a obtenção de MP esféricas e monodispersas;
- ✓ Avaliar diferentes métodos de carregamento das MP com INS visando maximizar a eficiência de encapsulação;
- ✓ Determinar a melhor metodologia para o revestimento das MP;
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente as MP (forma e tamanho, habilidade de absorção de líquidos, eficiência de encapsulação, MEV-FEG, DRX, DSC);
- ✓ Avaliar a atividade inibitória das dispersões poliméricas e MP contra enzimas proteolíticas;
- ✓ Determinar os perfis de liberação *in vitro* da INS através dos aparatos cesto (reduzido volume) e células de fluxo contínuo;
- ✓ Avaliar as propriedades mucoadesivas em texturômetro;
- ✓ Analisar a influência da microencapsulação e do revestimento na permeabilidade da INS através de mucosa intestinal de ratos, utilizando as técnicas do saco intestinal invertido e do saco intestinal não invertido;
- ✓ Analisar a influência da microencapsulação e do revestimento na permeabilidade da INS através de monocamadas de células Caco-2 e avaliar a capacidade dos sistemas

desenvolvidos em abrir as junções paracelulares através da determinação da resistência transepitelial elétrica;

- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos sistemas desenvolvidos;
- ✓ Avaliar a atividade hipoglicemiante oral *in vivo* da INS veiculada nas MP.



CAPÍTULO II

Obtenção das Micropartículas

1. INTRODUÇÃO

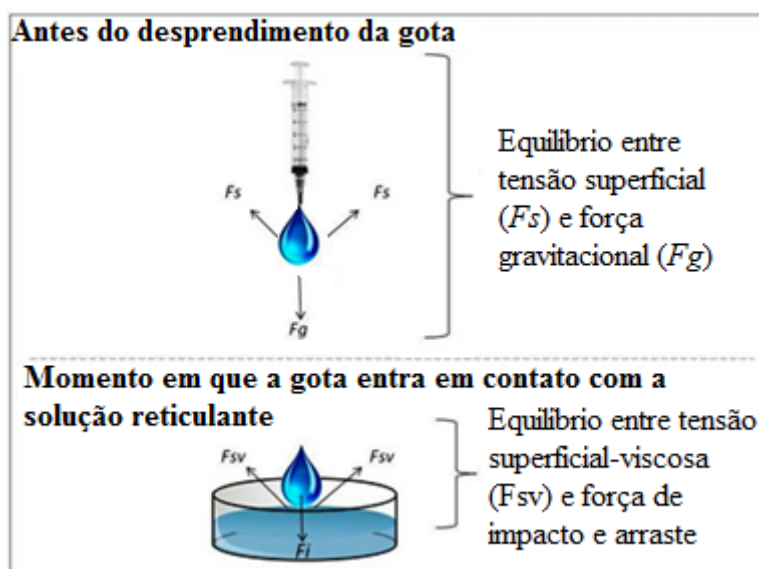
MP baseadas em goma gelana podem ser obtidas utilizando-se diferentes concentrações de polímero e de solução reticulante, através do método de geleificação ionotrópica, uma vez que esse polissacarídeo é hidrossolúvel e aniônico e possui a habilidade de geleificar na presença de íons polivalentes. Na verdade, a formação de MP de gelana na presença de Ca^{2+} é bastante conhecida (CHAKRABORTYA et al., 2014; KANEKASA et al., 2004; KEDZIEREWICZ et al., 1999). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que é possível obter MP utilizando Al^{3+} como reticulante, e que devido a sua maior valência, este pode promover o controle mais efetivo das taxas de liberação do fármaco (MAITI et al., 2011).

A formação das MP em presença de Al^{3+} se dá através da sua ligação iônica com os grupos carboxilatos do ácido glicurônico da gelana e devido aos íons alumínio possuírem uma carga positiva extra, quando comparado com íons cálcio, cada íon pode se ligar com mais de um grupamento carboxílico, permitindo uma reticulação mais efetiva. Fatores como tamanho e estrutura supramolecular do cátion também podem favorecer a orientação do Al^{3+} com os átomos de oxigênio da gelana, fortalecendo as reticulações. Além disso, ao entrar em contato com a solução de cloreto de alumínio, os íons Na^+ , K^+ e H^+ das gotas da dispersão de gelana são substituídos pelos íons Al^{+3} , favorecendo a formação de uma partícula esférica (MAITI et al., 2011).

Segundo Chan e colaboradores (2009), a altura do gotejamento é um fator importante a ser avaliado, já que a forma da gota pode ter significativa influência na forma da partícula. Se uma gota com forma de lágrima é coletada, é possível que essa forma seja preservada durante o impacto com a solução reticulante, resultando numa partícula com cauda. As partículas podem, ainda, apresentar diferentes formas, como forma esférica, oval, forma de lágrima, ou formas irregulares.

O diâmetro médio das partículas obtidas pelo processo de geleificação ionotrópica pode ser explicado através da lei de Tate. Durante o gotejamento das dispersões, o tamanho da partícula produzida é dependente do equilíbrio entre a força gravitacional, a qual empurra a gota para baixo, e a tensão superficial, que mantém a gota presa à ponta da agulha (HEIZEN et al., 2004). Já a forma da partícula produzida está relacionada com o momento em que a gota entra em contato com a solução reticulante, onde existe uma competição entre a tensão superficial-viscosa e a força de impacto e arraste (Fig. 17) (CHAN et al., 2009).

Figura 17 - Forças atuantes sobre as gotas conforme a lei de Tate.



FONTE: MENEGUIN, 2014.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Ácido clorídrico, teor 37% (Quimis); Água purificada (Milli Q); Alta amilose (Hylon VII - National Starch & Chemical); Brometo de cetiltrimetil amônio (Synth); Cloreto de alumínio (Vetec); Estearato de magnésio (Synth); Glicerina (Vetec); Goma gelana (CP Kelco); Hidróxido de sódio (Grupo Química); INS humana (Sigma); Solução de INS injetável Novolin[®] R (Novo Nordisk); Pectina de baixo grau de metoxilação, tipo LM-506CS (CP Kelco).

2.2 Principais equipamentos

Agitador mecânico (Quimis[®], modelo 0250-1), agitador magnético (Fanem[®], modelo 258); autoclave (Fabbe[®], modelo 103), balança analítica (Owa Labor); estufa com circulação forçada de ar (Fabbe[®], modelo 170), peagômetro (Micronal[®]); refrigerador; turbina de secagem.

2.3 Obtenção das MP controle de gelana

As MP foram obtidas através do método de geleificação ionotrópica, baseado em procedimento proposto por Boni e colaboradores (2015) e Prezotti e colaboradores (2014). Variáveis como temperatura da água para dispersão de gelana, altura do gotejamento e velocidade de agitação da solução reticulante foram avaliados de acordo com a Tabela 5, visando a homogeneidade do tamanho e forma das partículas.

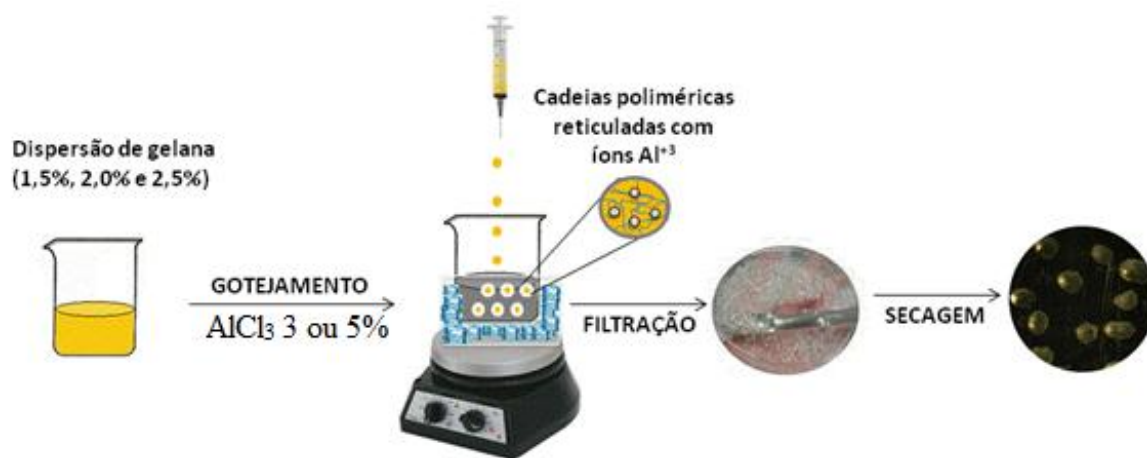
Tabela 5 - Variáveis exploradas para otimização da obtenção de MP

Variáveis	Método 1	Método 2
<i>Temperatura da água para dispersão da gelana</i>	90°C	60°C
<i>Altura do gotejamento em relação à superfície da solução reticulante</i>	20 cm	1 cm
<i>Velocidade de agitação das MP</i>	360 rpm	720 rpm

Resumidamente, dispersões de gelana em diferentes concentrações (1,5%, 2,0% e 2,5%) foram preparadas através da dispersão do polímero em água destilada a aquecida (60 ou 90°C), sob agitação magnética constante durante tempo suficiente para completa

homogeneização. As dispersões foram gotejadas através de seringa e agulha de irrigação sem bisel 23G 1" (0,6 x 25 mm) a uma altura de 20 ou 1 cm, em solução catiônica (cloreto de alumínio - 3 ou 5% m/v) mantida em banho de gelo. As MP foram mantidas sob agitação magnética constante a 360 ou 720 rpm por 24 h. Em seguida, as partículas foram separadas por filtração e secas a 30°C por 24 horas, em estufa com circulação forçada de ar (Fig. 18). MP sem INS também foram obtidas como controle.

Figura 18 - Processo de obtenção das MP de goma gelana, utilizando-se diferentes concentrações de gelana e reticulante.



FONTE: MENEGUIN, 2015.

2.4 Estudos preliminares para seleção do método de incorporação das MP de gelana com INS

Diferentes métodos de incorporação das MP com INS foram avaliados visando maximizar a eficiência de encapsulação (EE).

2.4.1 Método de incorporação por imersão/difusão (Método 1)

Diferentes quantidades de MP (secas ou úmidas) obtidas com 2,5% de gelana e 3% de reticulante através do método 2 (Seção 2.3 deste capítulo) foram imersas em solução de INS (Novolin R[®]). A influência das variáveis massa de amostra, tempo de imersão, volume e pH da solução de INS foi avaliada (Tab. 6).

Tabela 6 - Variáveis avaliadas na incorporação de INS às MP de gelana pelo método de imersão.

Amostra	MP*	Massa MP (g)	Volume Novolin® (mL)	pH**	Tempo (h)
A	Seca	1	5	7,4	1
B	Seca	1	5	4,5	4
C	Seca	0,1	0,5	2,5	5
D	Seca	0,1	0,5	2,5	2
E	Seca	0,1	0,5	8,0	1
F	Úmida	0,1	2	4,5	24
G	Úmida	0,1	3	4,5	24
H	Úmida	0,1	1	3	18
I	Úmida	1,5	5	4,5	24
J	Úmida	2	6,5	4,5	24
K	Úmida	0,1	1	4,5	3

*As MP secas foram submetidas ao processo de secagem em estufa com circulação forçada de ar à temperatura ambiente, enquanto que as MP úmidas foram àquelas utilizadas imediatamente após o processo de gotejamento.

** pH do Novolin® é 4,5. Os valores de pH foram modificados com a adição de NaOH 0,1M ou HCl 0,1 M

2.4.2 Incorporação da INS na dispersão polimérica (Método 2)

Dispersões de gelana contendo INS foram preparadas de acordo com os itens A e B para posterior gotejamento em solução reticulante (3%), mediante agitação magnética por 30 min:

A) A INS foi incorporada em dispersão de gelana (2,5%) na concentração de 10 UI/mL (correspondente à 0,35 mg/mL)

B) A Goma gelana (2,5%) foi dispersa diretamente em solução de insulina à 0,1%.

2.4.3 Incorporação da INS na solução de reticulante/imersão (Método 3)

Uma vez que a INS é um fármaco hidrofílico que pode sofrer difusão para a solução aquosa de reticulante, resultando em baixa eficiência de encapsulação, foi avaliado o carregamento das MP através do gotejamento da dispersão polimérica (2,5%) em solução de reticulante contendo INS (ZHANG et al., 2011a), como segue:

- A) Gotejamento de dispersão de gelana em solução de cloreto de alumínio (3%) contendo 6,67 UI/mL (0,23 mg/mL), sob agitação durante 24 h.
- B) Gotejamento da dispersão de gelana em solução de cloreto de alumínio (3%) contendo 20 UI/mL (0,7 mg/mL), sob agitação durante 30 min;
- C) Gotejamento de dispersão de gelana em solução de cloreto de alumínio (3%) contendo 40 UI/mL (1,4 mg/mL), sob agitação durante 30 min;

2.5 Revestimento das MP

2.5.1 Preparo da dispersão filmógena de amido resistente e pectina

As dispersões filmógenas foram preparadas conforme procedimento proposto por Meneguim e colaboradores (2014). Dispersões aquosas de alta amilose e pectina foram preparadas, separadamente, na concentração de 5% (m/v), sob agitação magnética por 30 min. Em seguida, as dispersões de alta amilose foram submetidas à autoclavação a 121°C por 120 min para gelatinização do amido. Ao final do período de autoclavação, a alta amilose gelatinizada foi resfriada (30°C) sob agitação mecânica e, então, misturada com a dispersão de pectina na proporção de 1:1 (m/m). Para o processo de retrogradação, as dispersões foram submetidas a ciclos térmicos alternados de 4°C e 30°C por 16 dias, sendo 2 dias em cada temperatura. Ao final do ciclo, glicerina (5%) foi adicionada como plastificante, sob agitação magnética durante 120 min.

2.5.2 Estudos para seleção do método de revestimento das MP

Visando evitar a aglomeração das MP durante o processo de revestimento por imersão, diferentes variáveis foram empregadas, como segue:

- 1) Imersão das MP nas dispersões filmógenas, sob aquecimento (37°C ou 60°C) e sob agitação magnética (15 min);
- 2) Imersão das MP nas dispersões filmógenas resfriadas (8°C) e mantidas em banho de gelo, durante agitação magnética (15 min);
- 3) Imersão das MP previamente congeladas nas dispersões filmógenas à temperatura ambiente e sob agitação magnética (15 min);
- 4) Imersão das MP em glicerina, seguida de secagem em estufa e posterior imersão nas dispersões filmógenas à temperatura ambiente e sob agitação magnética (15 min);

- 5) Imersão das MP, previamente pulverizadas com estearato de magnésio, nas dispersões filmógenas à temperatura ambiente e sob agitação magnética (15 min);
- 6) Imersão das MP nas dispersões filmógenas à temperatura ambiente e sob agitação magnética (15 min), contendo brometo de cetiltrimetil amônio, como tensoativo catiônico;
- 7) Imersão das MP nas dispersões filmógenas à temperatura ambiente e sob agitação magnética (15 min), contendo de dodecilsulfato de sódio, como tensoativo aniônico;
- 8) Imersão das MP nas dispersões filmógenas diluídas de 5% para 1 e 2,5%, à temperatura ambiente e sob agitação magnética (15 min);
- 9) Imersão das MP nas dispersões filmógenas acrescidas de solução de álcool polivinílico 0,01M (1:1) como estabilizante polimérico, à temperatura ambiente e sob agitação magnética (15 min);
- 10) Imersão das MP nas dispersões filmógenas à temperatura ambiente e sob agitação magnética contínua por 5 min (tempo 3x menor que o inicialmente proposto);
- 11) Imersão das MP nas dispersões filmógenas à temperatura ambiente e sob agitação magnética contínua por 1 min.

2.5.3 Método selecionado para o revestimento das MP

As MP (controle e carregadas com INS) foram dispersas nas dispersões filmógenas (5%) à temperatura ambiente e mantidas em agitação magnética por 1 min. Em seguida, as MP foram separadas por filtração e secas em turbina de secagem com jato de ar frio até atingir peso constante. Esse processo foi realizado 2 vezes.

As MP obtidas pelos processos selecionados foram denominadas de acordo com a concentração de gelana (1,5, 2,0 e 2,5%), concentração do agente reticulante (3 e 5%), presença de INS (adição do prefixo INS) e presença de revestimento (adição do prefixo C), como sumarizado na Tabela 7.

Tabela 7 - Nomenclatura e composição das MP de gelana.

	Concentração da solução reticulante (AlCl ₃)					
	3%			5%		
Gelana (%)	1,5	2,0	2,5	1,5	2,0	2,5
<i>Controle</i>	153	203	253	155	205	255
<i>Com INS</i>	IN153	IN203	IN253	IN155	IN205	IN255
<i>Controle</i>						
<i>Revestidas</i>	C153	C203	C253	C155	C205	C255
<i>Com INS e</i>						
<i>Revestidas</i>	CIN153	CIN203	CIN253	CIN155	CIN205	CIN255

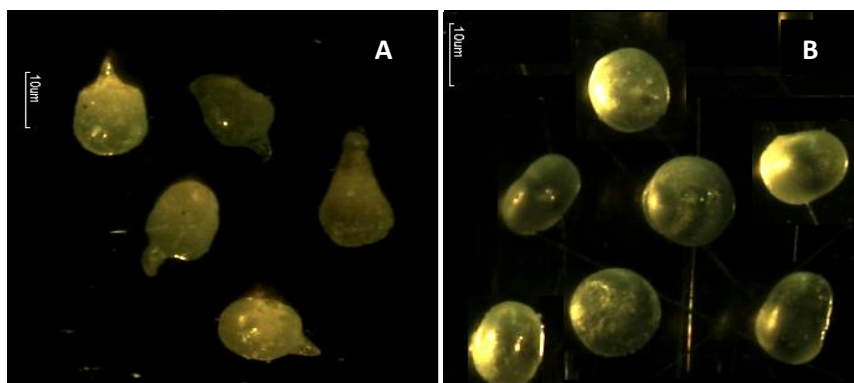
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Delineamento e otimização das condições para obtenção das MP

Visando otimizar as condições de obtenção das MP para produção de uma população homogênea de partículas, primeiramente, foram preparadas MP sem o fármaco (controle) e, em seguida, foi avaliado o efeito das seguintes variáveis sobre o tamanho e a forma: i) temperatura da água para a dispersão do polímero, ii) distância entre a extremidade da agulha e a superfície da solução reticulante e iii) velocidade de agitação. Dessa maneira, as MP foram, inicialmente, obtidas através de duas metodologias diferentes.

Observou-se que o gotejamento das dispersões a partir de uma altura mais elevada (20 cm), segundo o método 1, originou partículas irregulares com cauda (Fig. 19A), o que pode ser atribuído ao maior efeito de impacto e arraste alcançados nesta condição e que não puderam ser superados pela viscosidade e tensão superficial da gota (CHAN et al., 2009; SEIFERT; PHILLIPS, 1997). Já as partículas produzidas pelo método 2, isto é, obtidas através do gotejamento em baixa altura (1 cm) apresentaram forma aproximadamente esférica (Fig. 19B) e maior homogeneidade de tamanho, confirmando que em alturas mais baixas de gotejamento, a gota assume uma menor velocidade de queda e, conseqüentemente, um menor impacto com a superfície da solução reticulante, permitindo que a forma da gota seja preservada (CHAN et al., 2009).

Figura 19 - Fotomicrografias de partículas obtidas através de gotejamento em diferentes alturas: A) 20 cm e B) 1 cm.



A maior taxa de agitação empregada no método 2 (720 rpm) também deve ter contribuído para o aumento de circularidade das MP (0,6955 – 0,8129), enquanto para o método 1 estes valores apresentaram-se entre 0,4790 e 0,5531, uma vez que a solução reticulante em alta velocidade de agitação pode causar um cisalhamento sobre as partículas, o qual exerce um efeito de polimento sobre as mesmas, tornando-as mais esféricas.

Além disso, a temperatura da água em que a gelana é dispersa também teve influência na forma e tamanho das partículas, uma vez que temperaturas mais elevadas, como a aplicada no método 1 (90°C), originam dispersões menos viscosas e diminuem a tensão superficial, levando à formação de gotas menores, as quais são transformadas em partículas de dimensão mais reduzida. A baixa viscosidade dessas dispersões também não deve ser suficiente para superar o impacto e arraste das gotas ao entrar em contato com a solução reticulante, originando partículas mais irregulares e com cauda. Contrariamente, a menor temperatura empregada no método 2 (60°C) origina dispersões poliméricas mais viscosas, as quais são mais resistentes ao arraste e impacto, originando MP mais homogêneas. No entanto, devido às gotas formadas serem maiores, estas dão origem a partículas de tamanho maior, o que pode ser confirmado pela análise de forma e tamanho (Capítulo III).

Com base nos resultados, concluiu-se que as condições do método 2 são mais adequadas para a obtenção de MP homogêneas, uma vez que originou partículas com alto grau de circularidade (0,6955-0,8129) e com distribuição de tamanho mais estreita (700-1400 μm).

3.2 Otimização do processo de carregamento da INS

Devido à INS ser uma proteína hidrossolúvel, seu aprisionamento no interior de MP obtidas a partir de polissacarídeos naturais pelo método de geleificação ionotrópica representa um grande desafio.

Inicialmente, foi proposto o gotejamento de dispersões aquosas de gelana contendo diferentes concentrações de INS (27,5, 55 e 110 UI mL^{-1}), em solução de cloreto de alumínio. No entanto, verificou-se que, após o preparo das MP, aproximadamente 100% da INS foi quantificada na solução reticulante, o que pode ser atribuído à difusão da proteína para esse meio devido à sua elevada hidrofília.

Nesse sentido, diferentes variáveis, tais como o gotejamento das dispersões carregadas com INS, o gotejamento da dispersão em solução reticulante contendo INS ou, ainda, imersão das MP em solução reticulante contendo INS, foram avaliadas com o objetivo de aumentar a eficiência de encapsulação. A Tabela 8 mostra os resultados para EE e dosagem de INS obtidos.

Tabela 8 - Eficiência de encapsulação (EE) e dosagem de INS obtidos através de diferentes métodos de carregamento.

Método	Amostras	EE (%)	UI/100 mg
1	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	<1	0,74
	E	0	0
	F	7,03	14,06
	G	2,05	4,10
	H	1,72	1,71
	I	3,01	<1
	J	7,06	2,32
	K	1,95	1,95
2	A	0,1	0,87
	B	10,24	14,62
3	A	89	31,20
	B	7,26	7,26
	C	2,00	1,98

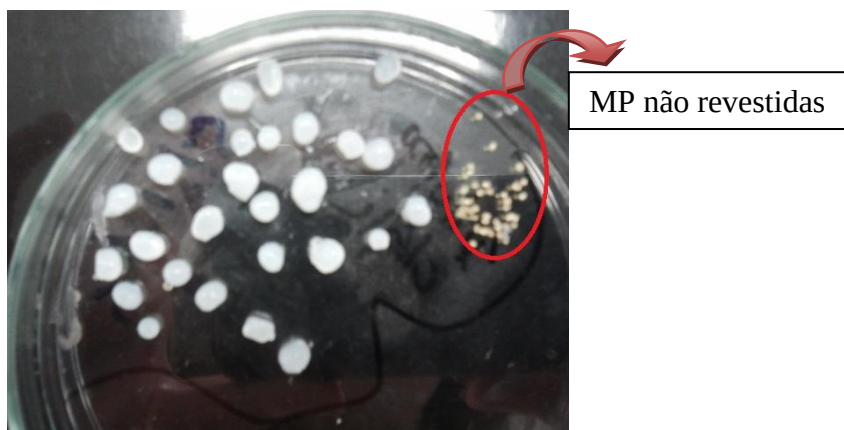
Através da análise dos resultados de EE e da dosagem de INS mostrados na Tabela 8, a metodologia 3A foi selecionada para a continuidade dos estudos, já que essa possibilitou a obtenção de partículas contendo a maior dosagem de INS (31,20 UI/100 mg).

Déat-Lainé e colaboradores (2012) em seus estudos com MP de alginato e proteína do leite para administração oral de INS obtiveram EE máxima de 85%, correspondente a apenas 17,4 UI/100 mg de polímero, demonstrando a eficiência do método de carregamento desenvolvido neste trabalho.

3.3 Otimização do processo de revestimento por imersão das MP

O revestimento das MP através da imersão em dispersões filmógenas de amido resistente/pectina por 15 min sob agitação magnética levou ao revestimento de aglomerados de MP como observado na Figura 20, a qual demonstra a grande diferença de dimensão entre as MP não revestidas e revestidas.

Figura 20 - MP revestidas (formação de aglomerados) e MP não revestidas (área circulada em vermelho).



As variáveis propostas na Seção 2.5.2 deste capítulo para o revestimento das MP aumentaram ou diminuíram a aglomeração em diferentes graus, mas não a evitaram. Assim, a metodologia que minimizou a agregação das MP e permitiu o revestimento das unidades individuais foi o método 11 (imersão das MP em dispersão filmógena a 5% sob agitação magnética contínua por 1 minuto).

Em seguida, foi realizada a secagem das MP revestidas em turbina de revestimento com aplicação de jato de ar frio, a fim de manter as partículas em movimento, uma vez que quando essas foram secas em leito estático (sobre placas de Pétri), ocorreu a adesão das partículas à superfície da placa, bem como a aglomeração entre elas, o que resultou na ruptura do revestimento nos pontos de contato, inviabilizando o processo.



CAPÍTULO III

Caracterização físico-química

Estudos de degradação enzimática

1. INTRODUÇÃO

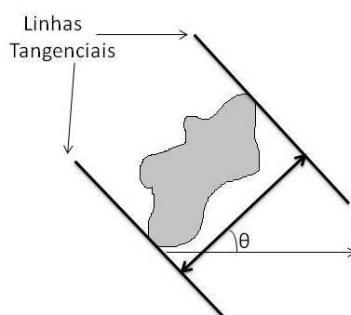
Este capítulo dedica-se à caracterização físico-química das MP obtidas no Capítulo II, no qual serão abordadas as análises de forma e tamanho, capacidade de absorção de líquidos, validação de metodologia analítica para quantificação da INS por espectrofotometria na região do ultravioleta, eficiência de encapsulação (*EE*), microscopia eletrônica de varredura MEV-FEG, difração de Raios-X (*DRX*), calorimetria exploratória diferencial (*DSC*) e estudo da atividade inibitória contra enzimas proteolíticas.

O tamanho e a forma das partículas são parâmetros importantes a serem avaliados nos sistemas multiparticulados, uma vez que a distribuição de tamanho monodispersa e a forma esférica das partículas garantem propriedades de fluxo livre e mais efetivo controle das taxas de liberação dos fármacos (CHAN et al., 2009). Além disso, na área de tecnologia farmacêutica, quanto mais estreita a distribuição granulométrica de uma amostra, mais adequada ela é, por exemplo, para a produção de comprimidos e cápsulas, uma vez que as partículas apresentarão capacidade de fluxo e escoamento semelhantes, tornando o volume de pó a ser processado mais uniforme (STANFORTH, 2005).

Para a obtenção de partículas esféricas e com distribuição estreita de tamanho através do processo de microencapsulação por geleificação ionotrópica, faz-se necessário um intenso controle das características da dispersão a ser gotejada, tais como viscosidade, temperatura e concentração polimérica, bem como das condições experimentais, uma vez que fatores não ajustados, como diâmetro do bisel da agulha e distância e ângulo de gotejamento, podem originar partículas deformadas (FUNDUEANU et al., 1999; SEIFERT; PHILIPS, 1997).

O tamanho de uma esfera pode ser mensurado através do cálculo do diâmetro; no entanto, partículas com formas irregulares necessitam da avaliação de outros parâmetros para a quantificação. Neste trabalho, o tamanho da esfera foi mensurado através do diâmetro de Feret, o qual representa o máximo comprimento de uma partícula medida em uma direção fixa (distância entre tangentes), como mostrado na Figura 21.

Outro estudo abordado é avaliação da absorção de líquidos, a qual fornece importantes informações sobre a hidrofília dos sistemas poliméricos intumescíveis e que são úteis para a previsão do comportamento de intumescimento, podendo ser considerada uma valiosa ferramenta para a predição de importantes comportamentos, como a velocidade e as taxas de liberação de fármacos e o processo de mucoadesão (CASTELLANOS GIL et al., 2009; MAIOR et al., 2008).

Figura 21 - Descrição esquemática da medida do diâmetro de Feret.

FONTE: MENEGUIN, 2014.

Além disso, o conhecimento das propriedades absorptivas está diretamente relacionado à capacidade de proteção oferecida contra a degradação enzimática nas diferentes porções do TGI, considerando-se que o acesso das enzimas às ligações glicosídicas é dependente da entrada de líquidos no interior da estrutura (PREZOTTI *et al.*, 2014; PREZOTTI *et al.*, 2012).

A validação da metodologia analítica para quantificação da INS foi realizada a fim de demonstrar que o método selecionado por espectrofotometria na região do ultravioleta é apropriado, atendendo às exigências das aplicações analíticas e assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, foram avaliados a especificidade, a linearidade, a precisão, a exatidão e o limite de detecção (*LD*) e limite de quantificação (*LQ*).

A especificidade corresponde à capacidade que o método tem de quantificar de forma inequívoca um composto independente de suas impurezas, podendo ser considerado específico quando produz resposta para apenas um analito (BRASIL, 2003). Dessa maneira, o teste de especificidade foi realizado a fim de verificar se algum componente da formulação interfere na quantificação da INS.

A linearidade corresponde à faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado sem que haja alterações na sensibilidade e relaciona de maneira proporcional a concentração do analito com a absorbância. Através da regressão linear da curva de calibração obtida, a linearidade é formulada como uma expressão matemática usada para se conhecer a concentração de analito em uma amostra real (ICH, 1996; BRASIL, 2003; USP 33, 2010).

A precisão é a avaliação da proximidade das respostas obtidas quando uma série de medidas é realizada para uma mesma amostra, em idênticas condições de teste, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, utilizando-se três concentrações

(baixa, média e alta) em triplicata ou, no mínimo, seis determinações com 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

Além disso, a precisão é considerada em três níveis, sendo a repetibilidade ou precisão intra-corrida a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, a precisão intermediária ou precisão inter-corridas a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes e a reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes.

Já a exatidão corresponde à proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em relação ao valor admitido como verdadeiro, sendo considerados desejáveis os valores próximos a 100%, porém admitem-se variações na faixa entre 80 – 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O limite de detecção (*LD*) é a menor quantidade de fármaco presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; USP 33, 2010). Já o limite de quantificação (*LQ*) é determinado pela menor quantidade de fármaco em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; USP 33, 2010).

As MP desenvolvidas para o controle temporal/ou espacial da liberação de fármacos devem ser avaliadas quanto à eficiência de encapsulação, a fim de se estabelecer uma adequada relação entre a quantidade de fármaco utilizado durante o carregamento e a massa real de fármaco encapsulada no interior das partículas. Também é considerado fundamental a análise da microestrutura das MP obtidas, a qual possui uma estreita correlação com suas propriedades fundamentais. Dessa maneira, pequenos detalhes estruturais podem ser detectados através da microscopia eletrônica de varredura MEV-FEG, a qual alcança aumentos muito superiores à técnicas mais tradicionais, como a microscopia ótica

A difração de Raios-X é outra técnica analítica bastante utilizada para a caracterização microestrutural, permitindo conhecer as características dos materiais sólidos, considerados cristalinos, amorfos ou semicristalinos e que difratam com facilidade os raios-X e, também, verificar se os processos envolvidos na produção desses produtos são responsáveis por alterar suas propriedades físicas e estruturais (BARROSO *et al.*, 2002).

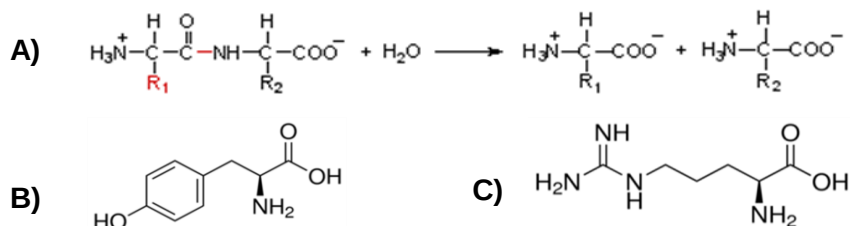
Com relação às análises térmicas, a calorimetria exploratória diferencial (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*) é bastante empregada para se obter informações sobre as propriedades físico-químicas de um material através da medida da diferença do fluxo de calor entre uma amostra e um material de referência, termicamente inerte. A DSC têm sido extensivamente utilizada na área farmacêutica para identificação de polimorfos, transição polimórfica, pureza de fármacos, caracterização polimérica, interações fármaco-excipiente, bem como a compatibilidade entre essas substâncias (Bharvada et al., 2015). Além disso, a DSC de proteínas é um método sensível para acompanhar a transição de fase endotérmica (Mollmann et al., 2006).

Nesse sentido, em um experimento de DSC, a amostra e um material de referência são aquecidos ou resfriados simultaneamente e a variação de entalpia é medida, a qual pode estar relacionada a diferentes eventos térmicos, os quais podem ser de primeira ou segunda ordem (GILL et al., 2010; MORA et al., 2010). Nos eventos de primeira ordem ocorre variação da entalpia e a transição se apresenta no termograma como um pico endotérmico (relacionado à fusão, perda de massa da amostra, vaporização de água, aditivos ou produtos voláteis de reação ou de decomposição, dessorção e reações de redução) ou exotérmico (cristalização, reações de polimerização, oxidação, degradação oxidativa, adsorção). Já as transições de segunda ordem, a exemplo da transição vítrea, não geram picos nas curvas de DSC, sendo caracterizadas pela variação da capacidade calorífica (C_p), a qual gera um deslocamento da linha base.

Outro estudo de marcada importância neste trabalho é a análise do efeito inibidor das dispersões poliméricas e MP desenvolvidas contra a atividade de enzimas proteolíticas. As proteínas administradas oralmente são digeridas, principalmente, pelas enzimas tripsina e α -quimotripsina, sintetizadas e secretadas pelo pâncreas nas formas inativas tripsinogênio e quimotripsinogênio, respectivamente, os quais são ativados somente no duodeno (SAJEESH; SHARMA, 2011). Essas enzimas são consideradas endopeptidases, uma vez que hidrolisam ligações peptídicas, bem como várias ligações dentro da molécula de INS (BROMER; CHANCE, 1967).

A quimotripsina, composta por três cadeias polipeptídicas ligadas entre si por duas pontes dissulfeto, é responsável pela hidrólise de ligações peptídicas contendo grupos hidrofóbicos volumosos, tais como triptofano, fenilalanina e tirosina. Já a tripsina possui uma única cadeia polipeptídica, sendo específica para ligações peptídicas positivamente carregadas, as quais ocorrem quando a arginina e/ou a lisina são os substituintes em R_1 (Fig. 22).

Figura 22 - Representação geral da reação das proteases (A) e substituintes em R1 triptofano (B) e arginina (C).



Sabe-se que a tripsina cliva a INS em apenas dois sítios, os quais apresentam as ligações expostas à clivagem na lateral carboxílica da cadeia B, e correspondem à lisina (29º resíduo) e arginina (22º resíduo). O primeiro metabólito formado possui atividade insulínica (*insulin-like activity*); no entanto, o segundo metabólito (*desoctapeptide-insulin*) é isento de qualquer atividade. A quimotripsina, por sua vez, é responsável pela clivagem da INS em até 7 sítios diferentes, razão pela qual a velocidade de degradação exercida por esse enzima é muito maior (SCHILLING; MITRA, 1991).

A utilização de polímeros inibidores de protease tem sido considerada como uma importante abordagem em relação aos inibidores tradicionais, não somente por se apresentar como uma opção mais econômica, mas principalmente devido à sua baixa absorção sistêmica, a qual contribui para a não ocorrência de efeitos colaterais e tóxicos, além das propriedades mucoadesivas e penetrantes desse tipo de material, merecendo destaque os polímeros naturais (BERNKOP-SCHNÜRCH, 1998).

O processo de microencapsulação também é uma importante ferramenta tecnológica para o aumento de biodisponibilidade de proteínas que são oralmente administradas, o qual ocorre através da otimização da absorção intestinal e diminuição da sua degradação, uma vez que os sistemas microparticulados oferecem proteção adicional ao material encapsulado (REKHA; SHARMA, 2013; SILVA et al., 2003), além de possibilitarem a liberação do fármaco proteico nas porções terminais do intestino, onde se verifica uma atividade enzimática menos intensa em relação às porções superiores (SCHILLING; MITRA, 1991).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Ácido clorídrico, teor 37% (Quimis); acetonitrila grau HPLC (Sigma); água destilada; alta amilose (Hylon VII - (National Starch & Chemical); fosfato de sódio (Henrifarma); Hidróxido de sódio (Grupo Química); INS humana (Sigma); Pectina de baixo grau de metoxilação, tipo LM-506CS (CP Kelco); tripsina de pâncreas bovino (Sigma), N-benzoil-DL-arginina p nitroanilida (BAPNA, Sigma), dimetilformamida (DMF, Fisher Scientific), ácido tricloroacético (Fisher Scientific), N-benzoil-L-tirosina p-nitroanilida (BTPNA, Sigma), ácido trifluoroacético (TFA), α -quimotripsina de pâncreas bovino, sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), ácido fosfórico extra puro (H_3PO_4) (Sigma–Aldrich).

2.2 Principais equipamentos

Agitador magnético (Fanem[®], modelo 258); analisador DSC Q10 da TA instruments; balança analítica (Bel Engineering); Difractômetro de raios X, modelo D5000 (Siemens[®]); espectrofotômetro ultravioleta (Hewlett Packard-Kayak XA); homogeneizador ultra-turrax (IKA); microscópio-estereoscópio com dispositivo de captura e análise de imagens (Leica MZAPO); microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM, modelo T- 330 A; peagômetro (Micronal[®]).

2.3 Forma e tamanho das partículas

A análise da forma e tamanho das partículas foi realizada em estereoscópio Leica MZ APO[®]. O diâmetro de Feret a 0° e a circularidade foram determinados a partir da digitalização das imagens de no mínimo 100 partículas em computador, utilizando o programa analisador de imagem Motic Images Advances 3.2.

2.4 Rendimento

Para avaliar o rendimento do processo de obtenção, as MP foram secas até peso constante em dessecador contendo sílica gel, sob vácuo. O rendimento foi calculado como

sendo a massa obtida de MP secas dividida pela soma das massas dos polímeros e fármaco utilizados na sua obtenção, de acordo com a Equação 1:

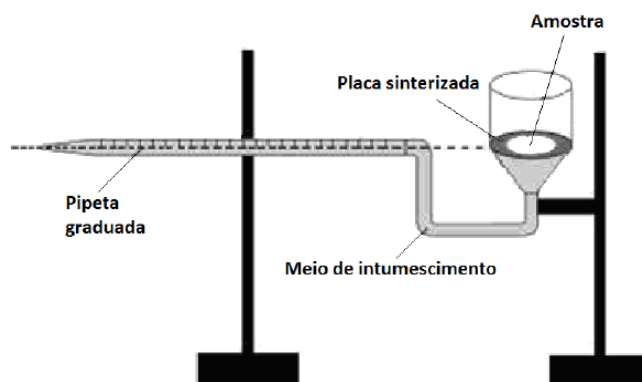
$$R\% = \frac{m_m}{m_p + m_f} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde m_m = massa de MP secas; m_p = massa de polímero e m_f = massa de fármaco.

2.5 Determinação do perfil de absorção de líquidos (AL)

A capacidade de absorção de líquidos das MP foi determinada em dispositivo de Enslin adaptado (Fig. 23) (VOIGT, 2000).

Figura 23 - Dispositivo de Enslin para determinação da capacidade de absorção de líquidos.



Uma massa de MP foi precisamente pesada e imediatamente disposta sobre a placa de vidro sinterizada do funil do dispositivo e o sistema foi fechado com auxílio de filme de policloreto de vinila e papel alumínio. O volume de líquido absorvido pelas MP foi avaliado após 1, 2, 5, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos. Foram utilizados 3 meios para simular os diferentes ambientes do trato gastrintestinal - meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2), tampão fosfato pH 7,4 e tampão fosfato pH 6,8.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de líquido absorvido em relação à massa inicial da amostra, de acordo com a Equação 2:

$$AL(\%) = \frac{V}{m} \quad \text{Equação (2)}$$

em que V (mL) é o volume de meio absorvido e m (g) é a massa de MP.

2.5.1 Estudo da cinética da AL

Os dados obtidos na análise de absorção de líquidos (seção 2.5 deste capítulo) foram tratados de acordo com os modelos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull.

2.6 Validação de metodologia analítica para quantificação de INS por espectrofotometria na região do ultravioleta

A validação foi realizada respeitando os parâmetros preconizados pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (USP, 2011; ICH, 2005; BRASIL, 2003), com o intuito de garantir que o método empregado é apropriado para realizar a avaliação quantitativa da INS, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos. Os parâmetros de validação avaliados foram especificidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Foram validadas quatro metodologias para a quantificação da INS em diferentes meios: meio ácido HCl 0,1 N (pH 1,2), tampão fosfato 0,1M (pH 6,8), tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e tampão TC 199 (pH 7,4).

2.6.1 Determinação do espectro de absorção da INS na região do UV

Soluções de INS na concentração de 45 µg/mL foram preparadas em HCl 0,1N, pH 1,2, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 e tampão TC-199 pH 7,4. Estas soluções foram submetidas à varredura na região do UV-Vis entre 200 a 400 nm e os picos de absorção máxima foram registrados.

2.6.2 Especificidade

A especificidade foi estabelecida pela comparação dos espectros de absorção obtidos das amostras de INS (45 µg/mL) contaminadas com gelana ou amido resistente/pectina (100 µg/mL), com os resultados das amostras de INS (45 µg/mL) sem a presença dos polímeros. As amostras foram analisadas, em triplicata, em HCl 0,1N, pH 1,2, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 e tampão TC-199 pH 7,4.

2.6.3 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica da INS em HCl 0,1N (pH 1,2), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8)

e tampão TC-199 (pH 7,4). A partir de soluções estoque contendo 1000 µg/mL do fármaco, foram preparadas diluições com concentrações variando de 5 a 45 µg/mL, em triplicata. Uma curva analítica da concentração de INS *versus* absorbância foi obtida.

2.6.4 Precisão

A partir das soluções estoque de INS em HCl 0,1N (pH 1,2), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) e tampão TC-199 (pH 7,4), foram preparadas soluções de INS nas concentrações de 5, 25 e 45 µg/mL, correspondentes às concentrações baixa, média e alta do intervalo linear da curva analítica. Estas soluções foram analisadas por espectroscopia na região do UV em triplicata e a precisão pode ser expressa como coeficiente de variação (CV), segundo a Equação 3:

$$CV = \frac{DP}{C} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

onde: *DP* = desvio-padrão e *C* = média das concentrações determinadas experimentalmente.

2.6.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de três diferentes concentrações, baixa (5 µg/mL), média (25 µg/mL) e alta (45 µg/mL), contemplando a faixa de linearidade do método. A exatidão foi calculada através da Equação 4, na qual é expressa a concentração média determinada experimentalmente (*C*) e a concentração teórica correspondente (*C₀*).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

2.6.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Foram preparadas três soluções com concentrações de INS próximas ao limite inferior da curva analítica (5, 7,5 e 10 µg/mL). O LD e LQ foram calculados, baseando-se no desvio padrão (*DP*) e na inclinação da curva analítica (*α*) expressos de acordo com as Equações 5 e 6:

$$LD = \frac{DP}{\alpha} \times 3 \quad \text{Equação 5}$$

$$LQ = \frac{DP}{\alpha} \times 10 \quad \text{Equação 6}$$

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.7 Eficiência de encapsulação (EE)

MP secas foram precisamente pesadas (50 mg) e mantidas sob agitação magnética (720 rpm) constante por 2 horas em solução de HCl 0,1 N, pH 1,2 (v=2,5 mL). Em seguida, para a extração completa da INS, as amostras foram trituradas em ultra-turrax (IKA) a 13.600 rpm, durante 2 min, filtradas e o fármaco quantificado em espectrofotômetro UV-VIS em 271 nm (JIN et al., 2012; JOSE et al., 2012, LU et al., 2012), em triplicata. O mesmo foi feito com MP controle (sem fármaco), usadas como branco.

A EE foi definida como a massa de INS quantificada (m_q) pelo volume total da solução de INS absorvida (DÉAT-LAINÉ et al., 2013). O volume da solução absorvida foi determinado pelo comportamento de absorção de líquidos, como segue: MP controle secas e precisamente pesadas (50 mg) (massa inicial, m_o) foram incubadas em solução de INS (2 mL) por 24 h e, em seguida, separadas por filtração, tendo o excesso de líquido cuidadosamente removido com papel absorvente. Procedeu-se a pesagem das MP intumescidas (massa intumescida, m_i) e a massa de solução de INS absorvida (m_{sia} , em g) foi calculada através da diferença $m_i - m_o$. Em seguida, m_{sia} foi convertida em volume de solução de INS (V_i), a partir do qual foi possível calcular a massa teórica de INS absorvida (M_i), considerando-se que a concentração da INS comercial utilizada para o experimento (Novolin[®]) é 100 UI/mL e que 1 UI corresponde a 0,035 mg de INS.

2.7.1 Teor de INS

O teor de INS contida nas MP foi calculado empregando a Equação 7, onde m_{INS} é a massa de INS quantificada e m_{am} é a massa de MP.

$$\text{Teor de insulina} = \frac{m_{INS}}{m_{am}} \quad \text{Equação 7}$$

Para melhor apreciação do teor de INS, foi feita uma conversão para UI/100mg de partículas, onde 1 UI corresponde a 0,035 mg de INS.

2.8 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG)

A morfologia de superfície e da seção transversal das MP foi avaliada por MEV-FEG em microscópio JEOL JSM-7500F (Japão). O preparo das amostras consistiu na deposição de uma camada fina de carbono sobre a superfície das MP para torná-la

condutoras. A deposição foi feita através da evaporação de um fio de carbono após a aplicação de um potencial elevado. A análise das seções transversais foi realizada após criofatura das amostras. As fotomicrografias de cada amostra foram obtidas com ampliação de 50, 200, 1000 e 10000 x. MP revestidas e não revestidas, contendo ou não INS, foram analisadas.

2.9 Difração de raios-X

A identificação da estrutura cristalina e/ou amorfa da INS humana em pó, da sua mistura física com a gelana, das MP obtidas com 2,5% de polímero contendo ou não INS, revestidas ou não, foi realizada a partir de difratogramas obtidos em difratômetro de raios-X Siemens[®], modelo D5000, com velocidade do goniômetro de 0,05°/s, sob radiação de Cu-K α ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) e com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 70°.

2.10 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC das MP, polímeros isolados e da INS em pó foram obtidas utilizando-se calorímetro exploratório diferencial, a uma razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera inerte de gás nitrogênio (50 mL/min), na faixa de aquecimento de 25 a 300 °C. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se cadinho de alumínio com tampa perfurada contendo aproximadamente 5 mg de amostra e como referência foi utilizado um cadinho de alumínio vazio.

2.11 Atividade inibitória das dispersões poliméricas e das MP contra enzimas proteolíticas

Os estudos de degradabilidade enzimática foram realizados no Laboratório de Biofarmácia (ERT-CIDAM) da Universidade D'Auvergne, em Clermont-Ferrand, França, sob orientação do Prof. Dr. Eric Beyssac, durante período de Doutorado Sandúiche.

2.11.1 Inibição da tripsina

A avaliação do potencial das dispersões poliméricas de gelana (2,0%) e amido resistente/pectina (5%, 1:1) e MP controle revestidas (C153 e C205) e não revestidas (153 e 205) em inibirem os processos enzimáticos relacionados com a degradação de proteínas

foi realizado de acordo com metodologia proposta por Ameye e colaboradores (2000). Resumidamente, N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) foi dissolvido em dimetilformamida (20 mM) como uma solução de substrato. Em seguida, MP ou dispersões poliméricas foram dispersas em tampão fosfato (0,2 M; pH 7.4) na concentração de 1% (p/p) e, imediatamente, misturados com a solução de substrato (1:1). Trinta unidades de tripsina previamente preparada em HCl (10 mM) foram adicionadas e as amostras incubadas a 37 °C por 30 min. A ação enzimática foi parada através da adição de ácido tricloroacético à 1% e o metabólito p-nitroanilina formado foi quantificado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 405 nm.

Experimentos controle foram realizados de maneira similar sem a adição de MP ou polímeros e a atividade enzimática encontrada ($AE_{controle}$) foi assumida como 100%. A inibição da tripsina foi calculada de acordo com a Equação 8:

$$\% \text{ Inibição Enzimática} = \frac{AE_{controle}}{AE_{amostras}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.11.2 Inibição da α -quimotripsina

MP controle (153, C153, 205 ou C205) ou dispersões poliméricas (amido resistente/pectina 1:1 a 5% ou goma gelana a 2,0%) foram dispersas em tampão TRIS-HCl (pH 7,8) a 1% (p/p) e, imediatamente, misturadas com o substrato N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida (BTPNA) previamente dissolvido em dimetilformamida (1,18 mM) na proporção de 1:1. Quarenta unidades de α -quimotripsina foram adicionadas e as amostras incubadas a 37 °C por 30 min. A reação enzimática foi parada com a adição de ácido tricloroacético (1%; v/v) e a inibição da quimotripsina foi calculada de acordo com a Equação 8. As análises foram realizadas em triplicata.

2.11.3 Avaliação do efeito protetor das MP contra a degradação da INS

A capacidade das MP protegerem a INS encapsulada contra a degradação enzimática foi avaliada dispersando-se as MP IN153, CIN153, IN205 ou CIN205 em tampão fosfato (pH 7,4) contendo tripsina (10 UI/mL) e quimotripsina (10 UI/mL). As amostras foram incubadas a 37 °C durante 120 min e em intervalos de tempos pré-determinados, alíquotas foram retiradas e a reação enzimática parada através da adição de uma solução aquosa de ácido trifluoracético (0,1 %; v/v). A quantidade de INS que

permaneceu inalterada foi quantificada por CLAE. Um ensaio similar utilizando solução de INS (Novolin[®]) foi realizado como controle. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

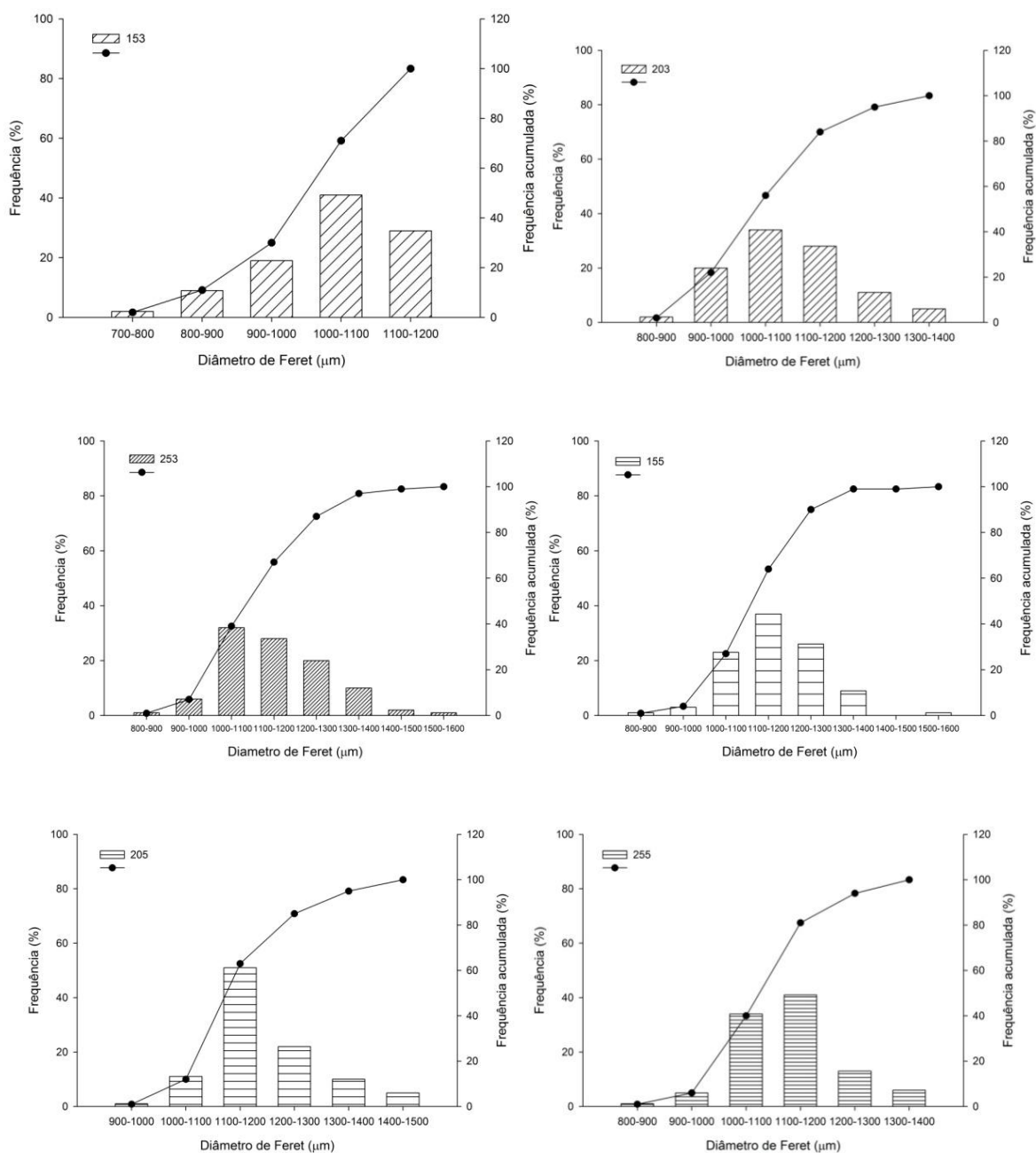
A quantificação de INS por CLAE foi realizada em aparelho Merck-Hitachi equipado com uma bomba inteligente (L-62000 A), detector de arranjo-diodos (DAD), interface D-6000, coluna RP C18 (5 µm, 4 mm ×250 mm, Merck, Darmstadt, Germany) equilibrada a 40 °C com fluxo de 1,0 mL/min. A fase móvel utilizada foi tampão de sulfato de sódio 0,2 M com pH ajustado para 2,3 utilizando ácido fosfórico e acetonitrila (72:28) no modo isocrático e volume de injeção de 20 µL via injetor automático (AS-2000 A). O tempo de corrida foi de 12 min, absorbância da INS foi registrada em 214 nm e a área sob a curva (AUC) foi usada para calcular a concentração de INS baseado nas curvas de calibração (DÉAT-LAINÉ *et al.*, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Forma e tamanho das partículas

Os perfis de distribuição granulométrica das MP de gelana, para uma população de 100 partículas, são apresentados nas Figuras 24 e 25, onde os dados são exibidos em função da frequência percentual e frequência acumulada das classes de tamanhos obtidas pelo diâmetro de Feret.

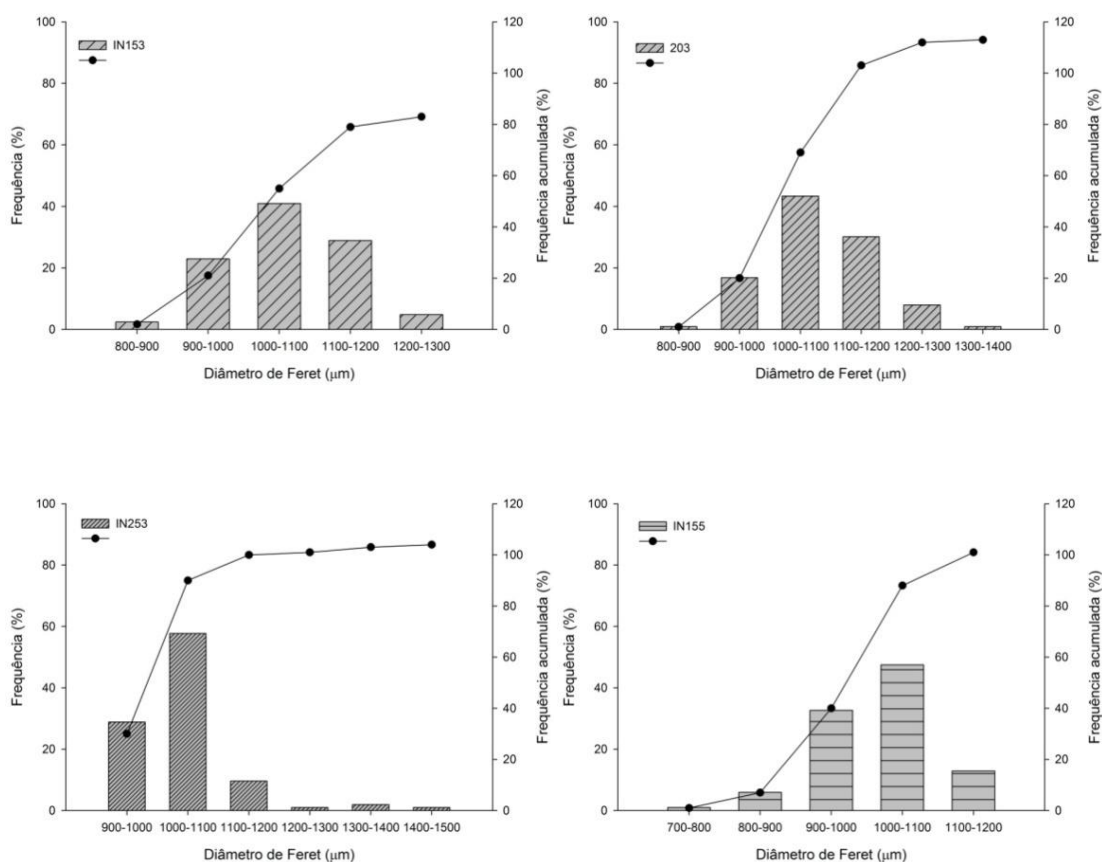
Figura 24 - Distribuição de tamanho de partícula para as MP controle.

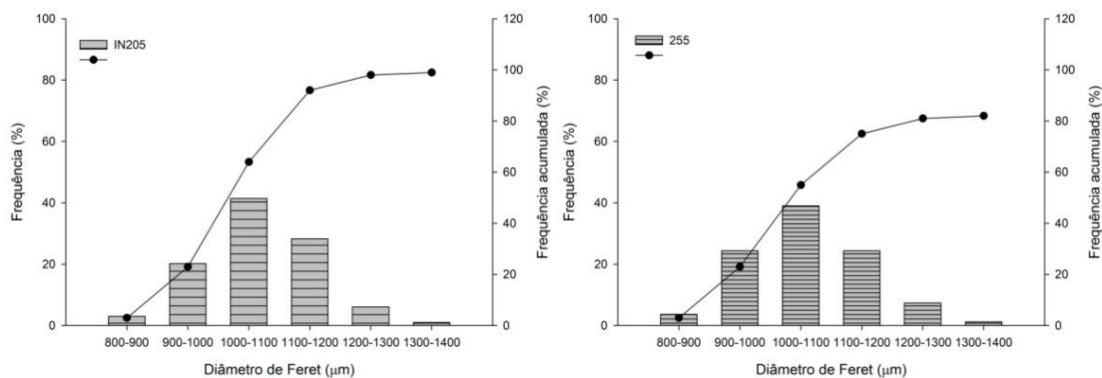


As MP controle (Fig. 24) apresentaram perfis de distribuição em que o tamanho das partículas variou de 700 a 1600 μm e dentre as diferentes amostras, a 153 foi a que apresentou a menor variação (700 e 1200 μm). A maior população de MP reticuladas com a concentração mais baixa de Al^{3+} (3%) situaram-se numa faixa de tamanho inferior (1000-1100 μm) àquela verificada para as amostras reticuladas com concentração mais alta de reticulante (5%) (1100-1200 μm), provavelmente devido ao alto grau de reticulação ter fornecido maior resistência mecânica às partículas, originando MP maiores (CARDOZO, 2014).

As amostras carregadas com INS (Fig. 25) exibiram perfil de distribuição mais estreito em relação às amostras controle, com distribuição de tamanho de 700 a 1500 μm , sendo que a maior população de todas as MP se situaram numa faixa de tamanho inferior (1000-1100 μm). Ambos os comportamentos podem ser atribuídos às interações fármaco-polímero, as quais devem originar uma rede mais compactada e, consequentemente, partículas com tamanho mais reduzido (SOARES, 2013).

Figura 25 - Distribuição de tamanho de partícula para as MP carregadas com INS.





Os valores de diâmetro médio e circularidade das MP estão apresentados na Tabela 9. A comparação entre as MP controle revelou que em concentração mais baixa de reticulante (3%), as maiores concentrações de gelana empregadas no preparado das MP 203 e 253 elevaram o diâmetro médio das partículas (de 1091 para 1156 μm) ($p < 0,05$), uma vez que, na maioria dos casos, o tamanho de uma MP é diretamente proporcional à concentração de polímero, ou seja, à medida que se aumenta a concentração polimérica da dispersão a ser gotejada, espera-se também o aumento do seu tamanho (BHATTACHARYA et al., 2013). O mesmo comportamento não foi observado para as MP reticuladas com 5% de Al^{3+} , para as quais o diâmetro médio das amostras 155 e 205 foi considerado semelhante ($p > 0,05$), enquanto que o aumento de 2,0 para 2,5% de gelana levou à diminuição do diâmetro médio (de 1197 para 1122 μm) ($p < 0,05$), provavelmente devido à formação de estruturas muito compactadas e, conseqüentemente, partículas com tamanho mais reduzido (SOARES, 2013).

Apesar do aumento da concentração da solução reticulante estar frequentemente relacionado à maior retração da MP com conseqüente diminuição de tamanho (MAITI et al., 2011), observou-se que o aumento de Al^{3+} de 3 para 5% levou ao aumento do diâmetro médio das MP controle, com exceção das amostras 253 e 255 ($p > 0,05$).

Tabela 9 - Valores de diâmetro médio e circularidade das MP

Amostra	Diâmetro médio (μm)	Circularidade
153	1033,52 $\pm$ 102,41	0,69 $\pm$ 0,17
203	1091,36 $\pm$ 102,66	0,72 $\pm$ 0,12
253	1156,04 $\pm$ 102,66	0,77 $\pm$ 0,85
155	1171,12 $\pm$ 101,94	0,73 $\pm$ 0,12
205	1197,80 $\pm$ 102,20	0,78 $\pm$ 0,09
255	1122,35 $\pm$ 94,90	0,81 $\pm$ 0,04
IN153	1054,55 $\pm$ 78,58	0,76 $\pm$ 0,07
IN203	1080,29 $\pm$ 85,87	0,81 $\pm$ 0,04
IN253	1036,28 $\pm$ 79,99	0,80 $\pm$ 0,04
IN155	1012,20 $\pm$ 75,64	0,73 $\pm$ 0,06
IN205	1065,92 $\pm$ 92,81	0,73 $\pm$ 0,06
IN255	1053,44 $\pm$ 96,32	0,68 $\pm$ 0,10

A comparação entre as MP controle e as carregadas com INS indicou que a presença do fármaco, geralmente, levou a obtenção de partículas com menor diâmetro médio (Tab. 9), o que pode estar relacionado com a forte interação entre a INS e a gelana, corroborando os resultados verificados anteriormente nos gráficos de distribuição de tamanho. No entanto, as amostras IN153 e IN203 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação às suas contrapartidas (153 e 203) ($p > 0,05$), possivelmente, devido a maior massa de fármaco encapsulada (maior EE) nessas amostras (seção 3.5 deste capítulo) que deve ter preenchido os espaços vazios, não permitindo a compactação estrutural.

A morfologia de um sistema multiparticulado pode ser caracterizada qualitativamente pela sua aparência visual como irregular, acircular, angular ou esférica e, quantitativamente, através dos fatores de forma, como a circularidade, para a qual valores mais próximos de 1 indicam maior esfericidade da amostra (MILKI *et al.*, 2001).

De acordo com a Tabela 9, as MP obtidas neste trabalho por geleificação ionotrópica podem ser consideradas aproximadamente circulares, uma vez que os valores de circularidade são próximos a 1 (0,69 e 0,81). Dentre as amostras controle, a amostra 255 foi a que apresentou maior circularidade (0,81), indicando que o aumento da concentração polimérica favorece a homogeneidade da forma, provavelmente devido à formação de uma estrutura mais compactada, a qual sofre menor impacto da tensão superficial, mantendo sua estrutura preservada. Além disso, a maior viscosidade das dispersões com maior concentração de gelana também permite uma maior resistência mecânica, originando partículas mais circulares ao final do processo de obtenção.

O aumento da concentração da solução reticulante de 3 para 5% não influenciou na circularidade, com exceção da amostra 205 que foi mais circular que a 203 ($p < 0,05$).

A incorporação da INS promoveu o aumento da circularidade das amostras reticuladas com 3% de solução reticulante de 0,69 para 0,76 para as amostras obtidas com 1,5% de gelana, e de 0,72 para 0,81 para aquelas obtidas com 2,0% de gelana, não havendo diferenças significativamente estatísticas entre os valores de circularidade das amostras 253 e IN253 ($p > 0,05$).

No entanto, para as amostras reticuladas com 5% de $AlCl_3$ (com exceção da 155 e IN155), a presença de INS diminuiu a circularidade das amostras, o que pode estar relacionado com a forte interação fármaco-polímero, que leva à compactação da estrutura polimérica, o que pode ter ocorrido de maneira heterogênea e abrupta, levando à irregularidade da forma.

Através do conjunto de dados apresentados, concluiu-se que a temperatura da dispersão de gelana e a velocidade de agitação exercem importante influência no diâmetro das MP, as quais, de maneira geral, têm seu tamanho reduzido quando INS é incorporada. O carregamento com fármaco e o aumento da concentração de gelana permitiram a formação de partículas mais circulares.

3.2 Rendimento

A Tabela 10 apresenta o rendimento (%) do processo de obtenção das amostras, a qual variou entre 69,26 e 99,10%, indicando que o método proposto é eficiente para obtenção de MP.

Tabela 10 - Rendimento das amostras.

Amotra	Rendimento (%)
IN153	98,34
IN155	98,77
IN203	98,52
IN205	99,10
IN253	78,40
IN255	69,23

Observou-se uma significativa redução do rendimento das amostras (até 30%), relacionado com o aumento de concentração de gelana e, conseqüentemente, com o

aumento de viscosidade das dispersões a serem gotejadas, as quais frequentemente levam ao entupimento da agulha com perda de material. No entanto, o valor de rendimento alcançado por estas dispersões (~69-78%) demonstra a viabilidade do processo.

3.3 Determinação do perfil de absorção de líquidos (AL)

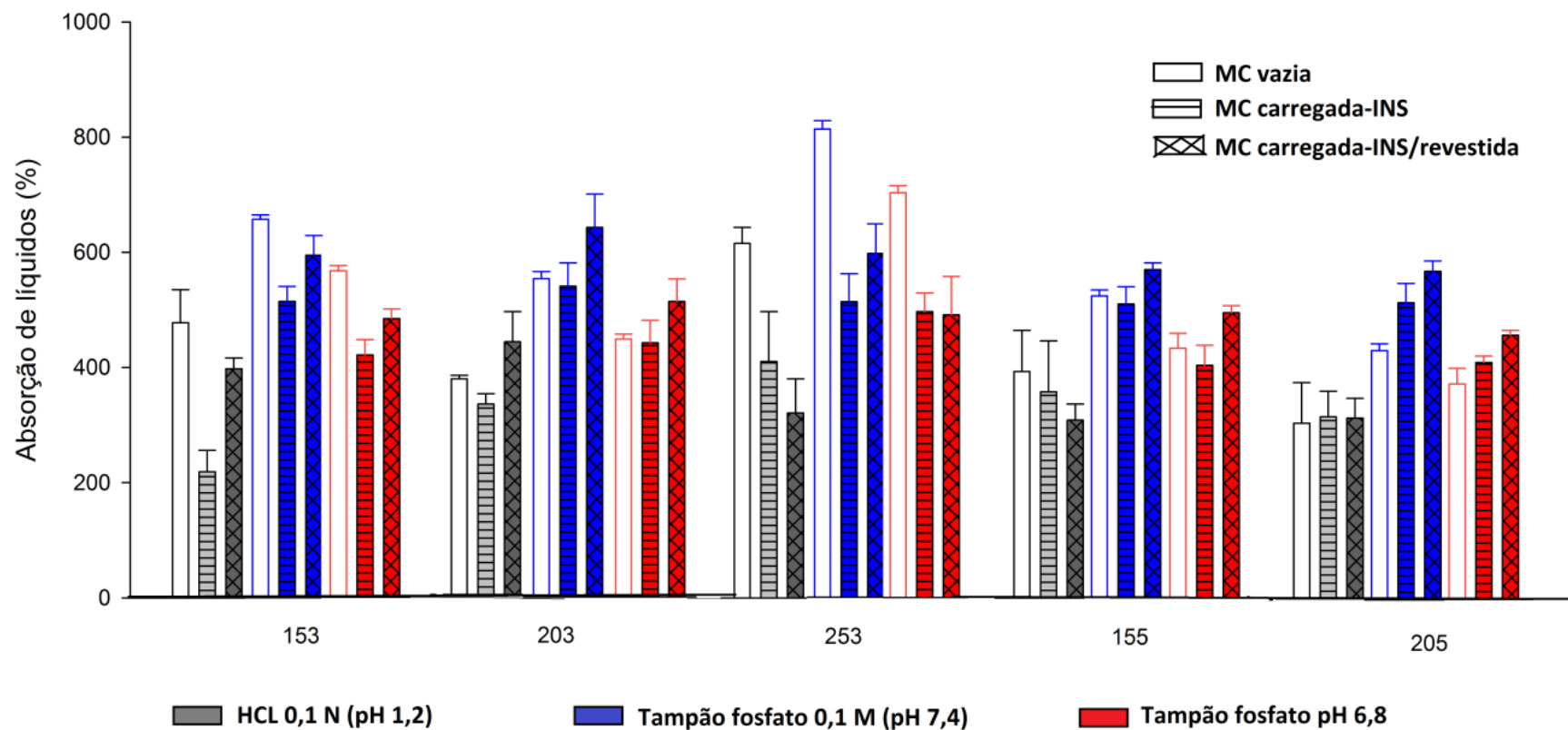
O comportamento de absorção de líquidos no equilíbrio (120 min) (AL_{120}) das MP controle e aquelas carregadas com INS com e sem revestimento em diferentes meios (HCl 0,1N, pH 1,2; tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e pH 6,8) são apresentados na Tabela 11 e na Figura 26.

As MP apresentaram elevada capacidade de AL_{120} , o qual variou entre 210 e 800%.

Tabela 11 - Valores de absorção de líquido (%) no equilíbrio (120 min) em meios com diferentes valores de pH.

Amostras	HCl (0,1 N; pH 1,2)	Tampão fosfato (0,1M; pH 7,4)	Tampão fosfato (0,1M; pH 6,8)
153	477,88 ± 57,47	656,57 ± 7,61	566,98 ± 9,32
IN153	218,77 ± 37,31	514,36 ± 25,75	420,74 ± 9,32
CIN153	397,77 ± 18,76	594,29 ± 34,20	483,83 ± 16,74
203	374,03 ± 6,34	552,17 ± 12,56	447,95 ± 8,58
IN203	330,31 ± 17,99	539,12 ± 40,59	441,21 ± 39,19
CIN203	438,44 ± 52,59	641,39 ± 57,59	513,15 ± 39,38
253	615,49 ± 27,52	812,50 ± 14,53	703,36 ± 11,86
IN253	410,45 ± 118,70	512,95 ± 48,28	496,69 ± 32,17
CIN253	321,04 ± 59,18	596,60 ± 51,41	490,56 ± 67,30
155	393,15 ± 71,30	522,19 ± 10,18	433,34 ± 25,73
IN155	357,67 ± 88,40	508,11 ± 29,92	403,36 ± 34,98
CIN155	308,64 ± 27,91	567,97 ± 11,74	494,83 ± 12,43
205	304,82 ± 70,19	432,59 ± 11,89	373,72 ± 27,35
IN205	315,14 ± 44,58	515,47 ± 33,71	411,40 ± 11,11
CIN205	313,60 ± 34,19	570,33 ± 17,79	458,69 ± 8,67

Figura 26- Absorção de líquidos (%) no equilíbrio (120 min) das MP em diferentes meios (HCl pH 1,2; tampão fosfato pH 7,4 e pH 6,8).



Uma vez que os polímeros que compõem as MP (goma gelana) e o revestimento (amido resistente e pectina) são polieletrólitos que sofrem alteração conformacional das cadeias com a mudança de pH do meio (NARKAR *et al.*, 2010), o comportamento pH-dependente verificado na análise de absorção de líquidos mostra-se coerente.

Pode-se observar a menor AL_{120} em meio ácido do que nos meios com pH 7,4 e 6,8. Este comportamento é típico dos polímeros aniônicos, os quais quando em pH ácido têm os grupos carboxílicos na forma protonada devido à predominância de íons H^+ , o que reduz a repulsão eletrostática, dificultando a penetração de líquidos e diminuindo a hidrofília do sistema (CARBINATTO *et al.*, 2014; PREZOTTI *et al.*, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Por outro lado, o aumento do pH ocasiona a ionização dos grupamentos COOH para COO^- , promovendo a repulsão das cadeias poliméricas com consequente dilatação da rede, o que favorece a hidrofília do sistema (MENEQUIN *et al.*, 2014; MULHBACHER *et al.*, 2004).

Em alguns casos, observou-se a tendência das MP controle absorverem uma maior quantidade de líquidos do que as amostras carregadas com INS e as carregadas com INS/revestidas. Esse comportamento pode estar relacionado com a existência de estruturas poliméricas menos empacotadas na ausência de fármaco, a qual deve permitir o preenchimento dos espaços vazios com o líquido circundante. Por outro lado, o revestimento representa uma barreira física adicional, que desfavorece a permeação de líquidos para o interior da estrutura.

Para avaliar o efeito da concentração de gelana na AL_{120} , primeiramente foram analisadas as amostras controle 153, 203 e 253, para as quais conclui-se que a maior concentração deste polímero (2,5%) foi responsável pela maior AL_{120} . Esse comportamento é bastante coerente, estando relacionado não somente à hidrofília da gelana, mas também à maior massa de polímero e de quantidade de grupamentos -OH disponíveis para interação com as moléculas de água.

Não foram verificadas diferenças entre as amostras controle reticuladas com 5% de $AlCl_3$ ($p > 0,05$), porém o aumento de reticulante de 3% para 5% reduziu a AL_{120} , uma vez que uma rede polimérica mais empacotada e rígida deve ser construída, o que dificulta a difusão das moléculas de água (ANGADI *et al.*, 2013; BANERJEE *et al.*, 2012). Prezotti e co-autores (2014) em estudos com *beads* de gelana e pectina carregados com cetoprofeno também verificaram uma diminuição na habilidade de intumescimento com o aumento da concentração de reticulante.

Observou-se que a presença de INS e do revestimento nas MP CIN253 promoveu uma diminuição na AL_{120} em comparação com a MP controle 253 em todos os meios estudados. Apesar de o revestimento representar uma barreira física adicional à entrada de água, estudos realizados com filmes livres de amido resistente/pectina (MENEQUIN *et al.* 2014) indicaram um alto grau de intumescimento destes nos mesmos meios estudados, sugerindo a formação de uma camada geleificada viscosa que controla a difusão das moléculas de água para o interior de MP revestidas.

Para as amostras obtidas com as mais baixas concentrações de gelana (1,5%) e reticulante (3%), a presença de INS promoveu significativa redução da AL_{120} , enquanto que o revestimento não afetou esse parâmetro ($p>0,05$), provavelmente devido a maior massa de polímero para interagir com a água.

Contudo, para as amostras 203, 155 e 205 ($p>0,05$), a presença de INS e do revestimento não exerceu influência na AL_{120} , as quais absorveram quantidade semelhante de líquidos (pHs 1,2 e 7,4) em relação a seus controles ($p>0,05$). Exceção para a amostra CIN205 em tampão fosfato pH 7,4 que teve o percentual de AL_{120} aumentado em relação a amostra controle.

Com base nos resultados obtidos, foi verificado que fatores como concentração de reticulante, interação fármaco-polímero e o revestimento podem ser modulados a fim de permitir um maior controle das taxas de AL_{120} e intumescimento, os quais também estão relacionados com a menor suscetibilidade à degradação enzimática, visto que o acesso das enzimas às ligações glicosídicas é facilitado pela presença de água. O controle de todos esses parâmetros deve contribuir para a redução das taxas de liberação do fármaco, considerando que um dos mecanismos de liberação é o intumescimento, seguido do relaxamento das cadeias poliméricas.

3.3.1 Avaliação da cinética da AL

A cinética de absorção de líquidos das MP baseadas em gelana carregadas com INS e revestidas com filmes de amido resistente/pectina foi avaliada a partir dos perfis da capacidade de absorção de líquidos (%) em função do tempo (t) em meios com diferentes valores de pH.

Os modelos matemáticos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull foram aplicados aos dados a fim de avaliar a dinâmica da penetração de líquidos nas MP. Os coeficientes de correlação ajustados (r^2) são apresentados nas Tabelas 12-14, para as amostras carregadas

com INS e revestidas, para as amostras carregadas com INS e sem revestimento e para as amostras controle.

Tabela 12 - Valores do coeficiente de correlação (r^2) dos dados de absorção de líquido das MP controle para diferentes modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull) em meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2), tampão fosfato pH 7,4 e tampão fosfato pH 6,8.

HCl 0,1N (pH 1,2)					
	153	203	253	155	205
Higuchi	0,8961	0,0000	0,7009	0,9907	0,6268
Korsmeyer-Peppas	0,9813	0,9262	0,9848	0,9912	0,9305
Weibull	0,9703	0,9047	0,9715	0,9619	0,9277
Tampão fosfato 0,1M (pH 7,4)					
Higuchi	0,8319	0,6677	0,6653	0,8754	0,7617
Korsmeyer-Peppas	0,9758	0,9528	0,9654	0,9739	0,9822
Weibull	0,9484	0,9131	0,9207	0,9666	0,9584
Tampão fosfato 0,1M (pH 6,8)					
Higuchi	0,7226	0,3749	0,4770	0,7507	0,6157
Korsmeyer-Peppas	0,9560	0,9476	0,9607	0,9799	0,9812
Weibull	0,9291	0,9147	0,8587	0,9139	0,9684

Tabela 13 - Valores do coeficiente de correlação (r^2) dos dados de absorção de líquido das MP carregadas com INS e não revestidas para diferentes modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull) em meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2), tampão fosfato

HCl 0,1N (pH 1,2)					
	IN153	IN203	IN253	IN155	IN205
Higuchi	0,0000	0,5661	0,9327	0,0000	0,6693
Korsmeyer-Peppas	0,9078	0,9618	0,9793	0,9574	0,9709
Weibull	0,8518	0,9581	0,9617	0,9250	0,9353
Tampão fosfato 0,1M (pH 7,4)					
Higuchi	0,8604	0,9140	0,9402	0,9006	0,9032
Korsmeyer-Peppas	0,9594	0,9793	0,9954	0,9839	0,9691
Weibull	0,9395	0,9764	0,9945	0,9749	0,9677
Tampão fosfato 0,1M (pH 6,8)					
Higuchi	0,8429	0,8531	0,9274	0,7326	0,7561
Korsmeyer-Peppas	0,9928	0,9962	0,9909	0,9906	0,9925
Weibull	0,9756	0,9860	0,9749	0,9818	0,9782

Tabela 14- Valores do coeficiente de correlação (r^2) dos dados de absorção de líquido das MP carregadas com INS e revestidas para diferentes modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull) em meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2), tampão fosfato pH 7,4 e tampão fosfato pH 6,8.

HCl 0,1N (pH 1,2)					
	CIN153	CIN203	CIN253	CIN155	CIN205
Higuchi	0,8997	0,8967	0,8837	0,8339	0,8340
Korsmeyer-Peppas	0,9814	0,9820	0,9857	0,9801	0,9803
Weibull	0,9699	0,9696	0,9709	0,9679	0,9678
Tampão fosfato 0,1M (pH 7,4)					
Higuchi	0,8643	0,8893	0,8732	0,8548	0,8254
Korsmeyer-Peppas	0,9654	0,9930	0,9816	0,9675	0,9821
Weibull	0,9593	0,9829	0,9741	0,9659	0,9724
Tampão fosfato 0,1M (pH 6,8)					
Higuchi	0,6889	0,7212	0,7367	0,7762	0,6156
Korsmeyer-Peppas	0,9842	0,9925	0,9923	0,9892	0,9849
Weibull	0,9503	0,9777	0,9771	0,9732	0,9812

Uma vez que o coeficiente de correlação (r^2) é uma medida de qualidade do modelo aplicado em relação à sua habilidade de estimar corretamente os valores da resposta, valores de r^2 próximos a 1 indicam uma maior correlação com os dados analisados. De acordo com as Tabelas 12, 13 e 14, conclui-se que para todas as amostras desenvolvidas e testadas nos meios com diferentes valores de pH, o modelo cinético de Korsmeyer-Peppas foi o que melhor se correlacionou com os dados de absorção de líquidos.

A constante cinética de penetração de líquidos (k_s) e o expoente n , relacionado com o mecanismo que rege a penetração do líquido, foram calculados através da Equação de Korsmeyer-Peppas (Eq. 9), em que M_t e M_{eq} são, respectivamente, a massa de MP em um tempo t e no estado de equilíbrio.

$$\frac{M_t}{M_{eq}} = k_s \cdot t^n \quad \text{Equação 9}$$

Os valores de n e k_s são expressos na Tabela 15.

Tabela 15 - Valores de K_s e n obtidos a partir dos dados da absorção de líquidos em meios com distintos valores de pH.

HCl 0,1N (pH 1,2)															
	153	203	253	155	205	IN153	IN203	IN253	IN155	IN205	CIN153	CIN203	CIN253	CIN155	CIN205
K_s (%min⁻ⁿ)	88,70	176,50	167,87	42,60	84,37	102,39	102,12	67,22	145,56	85,70	73,10	81,41	63,27	71,04	72,22
n	0,3425	0,1549	0,2762	0,3707	0,2674	0,1588	0,2542	0,3733	0,1860	0,2707	0,3447	0,3426	0,3340	0,3143	0,3143
Tampão fosfato 0,1M (pH 7,4)															
K_s (%min⁻ⁿ)	142,92	144,03	214,09	98,78	103,82	96,43	92,70	91,12	92,78	89,10	114,40	124,93	115,52	108,37	123,27
n	0,3152	0,2724	0,2697	0,3337	0,2902	0,3317	0,3553	0,3682	0,3442	0,3533	0,3310	0,3345	0,3299	0,3273	0,3093
Tampão fosfato 0,1M (pH 6,8)															
K_s (%min⁻ⁿ)	153,38	156,57	226,37	109,38	111,60	91,71	98,78	92,91	106,81	104,29	126,46	135,31	126,98	118,18	138,22
n	0,2864	0,2321	0,2411	0,2876	0,2608	0,3137	0,3177	0,3610	0,2823	0,2875	0,2725	0,2787	0,2823	0,2925	0,2599

Numa análise comparativa, os valores da constante de intumescimento (k_s) (Tab.15) variaram de 42,60-176,50% min^{-n} em meio ácido, 89,10-214,09 % min^{-n} em tampão fosfato pH 7,4 e 91,71-226,37 % min^{-n} em tampão fosfato pH 6,8, indicando que a taxa de penetração de líquidos nas MP foi significativamente menor em meio ácido do que nos outros meios estudados e esse comportamento está de acordo com os resultados de habilidade de absorção de líquidos (%) discutidos anteriormente. Além disso, os altos valores de K_s sugerem que todas as amostras apresentaram um efeito *burst* de intumescimento (CASTELLANOS GIL et al., 2009).

Valores de k_s de até 2,3 x menores em meio ácido do que em pH 7,4 foram verificados entre as MP controle (exceção 203), revelando uma taxa de penetração de líquidos mais lenta para o interior das partículas. Devido à elevada hidrossolubilidade da INS, sua incorporação às MP tornou os valores de k_s em meio ácido maiores (até 1,57 x) em relação aos outros meios (exceção IN253). No entanto, o revestimento das MP carregadas com INS reverteu invariavelmente esse comportamento, levando ao aumento gradativo das taxas de penetração com o aumento de pH, o que poderá implicar numa maior proteção da INS contra degradação nas porções superiores do TGI.

Em todos os casos, o expoente n foi menor do que 0,43 (Tab. 15), o que indica que a penetração de líquidos nas MP foi controlada por difusão Fickiana (caso-I), isto é, a penetração de líquidos é controlada pela taxa de difusão das moléculas de água na matriz polimérica para o interior da estrutura segundo um gradiente de concentração (RITGER; PEPPAS, 1987).

Uma vez que os filmes livres de amido resistente/pectina apresentaram elevado intumescimento em estudo anterior (MENEQUIN et al., 2014), o mecanismo de penetração de líquidos verificado é um indicativo de que as cadeias poliméricas do revestimento já se encontram num relaxamento máximo, possivelmente com uma camada geleificada e viscosa bem estabelecida, sendo a difusão das moléculas de água para o interior das MP o passo limitante para a absorção de líquidos.

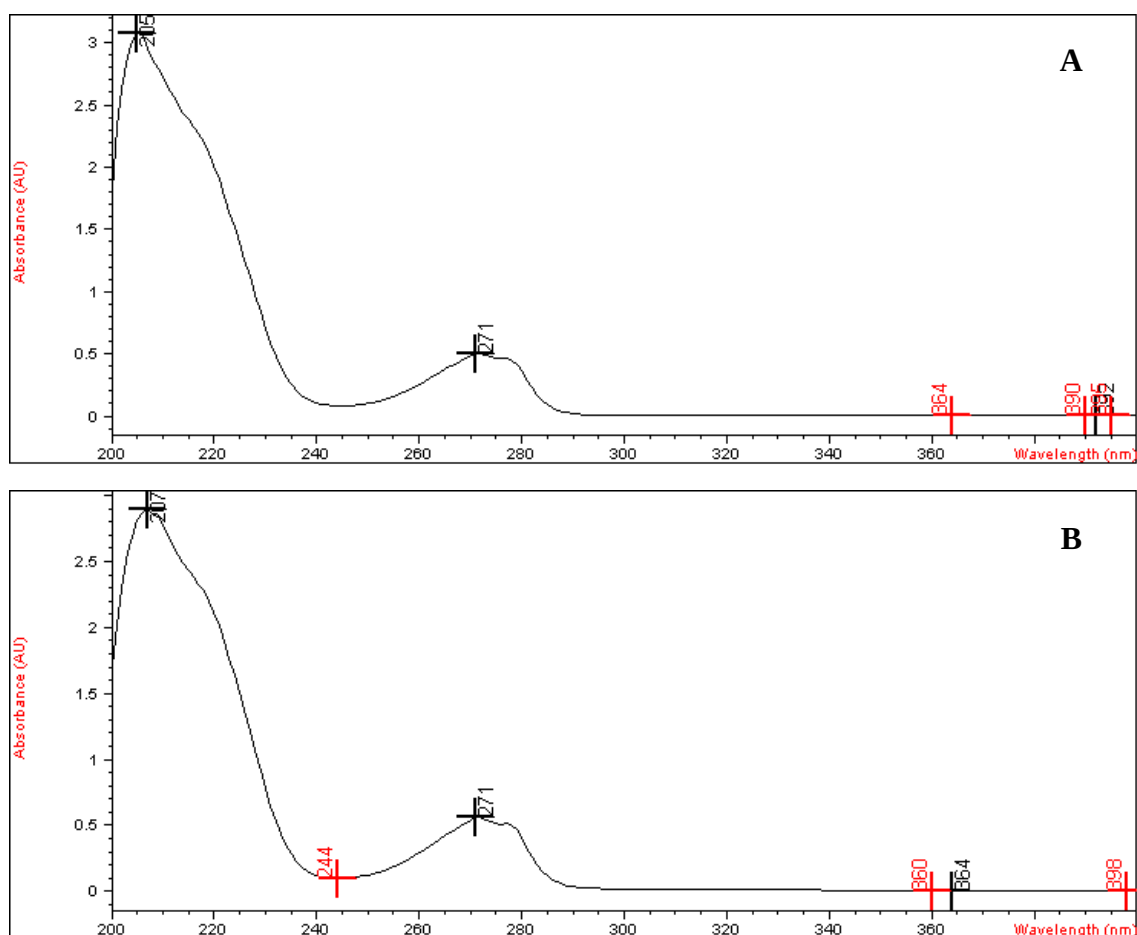
3.4 Validação de metodologia analítica para quantificação de INS por espectrofotometria na região do ultravioleta

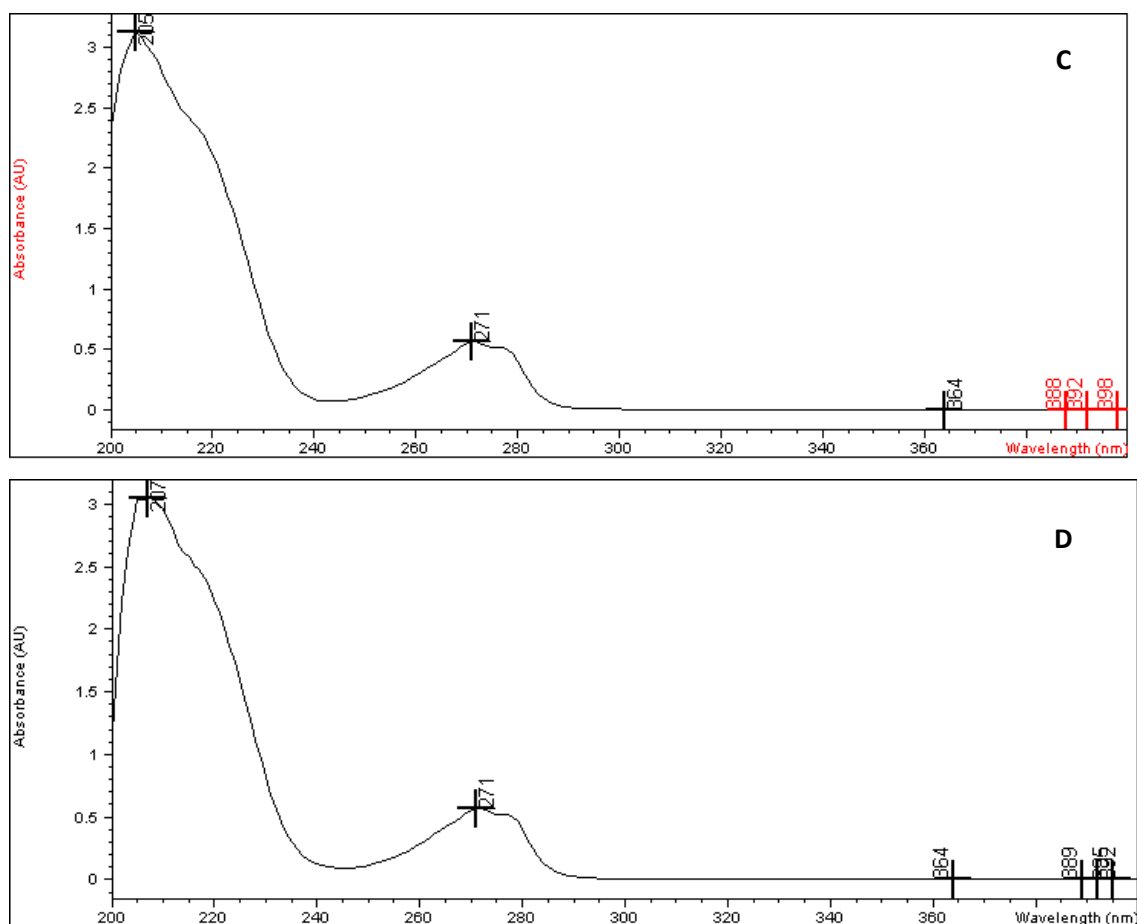
3.4.1 Determinação do espectro de absorção da INS na região do UV

Os espectros de absorção da INS em HCl 0,1N (pH 1,2), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) e tampão TC-199 (pH 7,4) foram obtidos por espectrofotometria na região do UV e o comprimento de onda de máxima absorção apresentou-se em 271 nm.

Os picos de absorção máxima obtidos em 271 nm foram selecionados para a realização das análises quantitativas do fármaco (Fig. 27).

Figura 27 - Espectro da INS em HCl 0,1N (pH 1,2) (A), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) (B), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (C) e em tampão TC-199 (pH 7,4) (D).

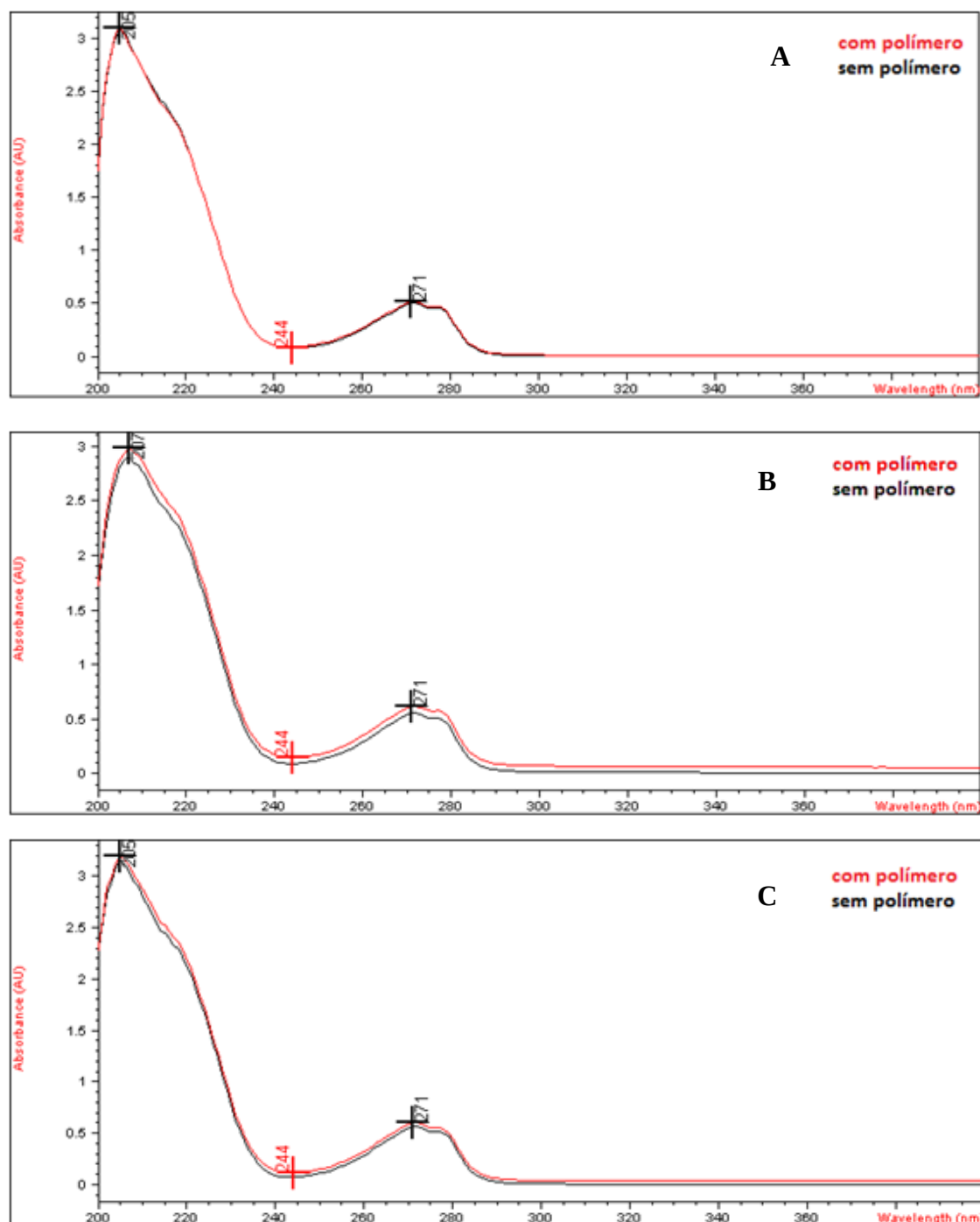


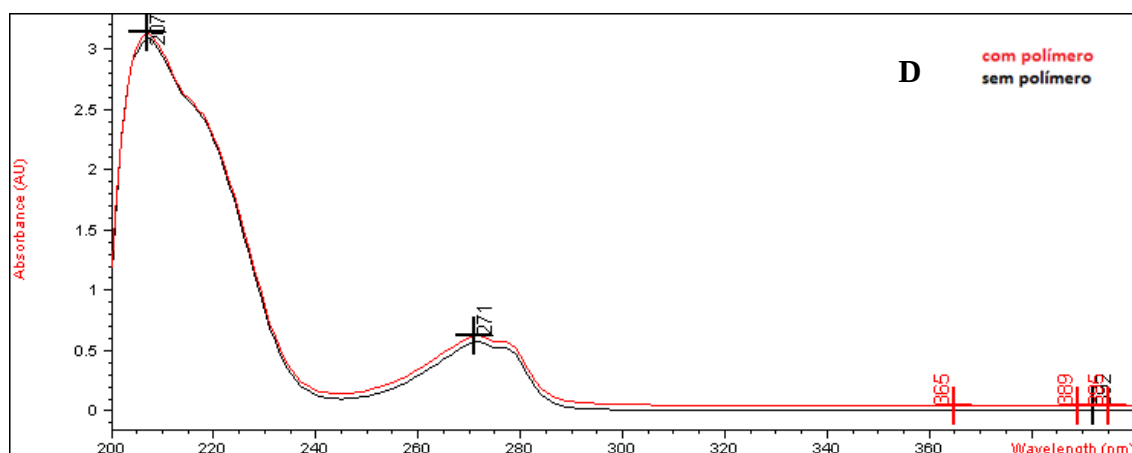


3.4.2 Especificidade

Os resultados demonstraram que o método proposto é seletivo e específico para todos os meios analisados, visto que não se identificou qualquer interferência do polímero no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco (Fig. 28).

Figura 28 - Espectros de absorção da INS na região do UV na presença e ausência de gelana ou amido resistente/pectina em HCl 0,1N (pH 2,0) (A), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) (B), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (C) e em tampão TC-199 (pH 7,4) (D).

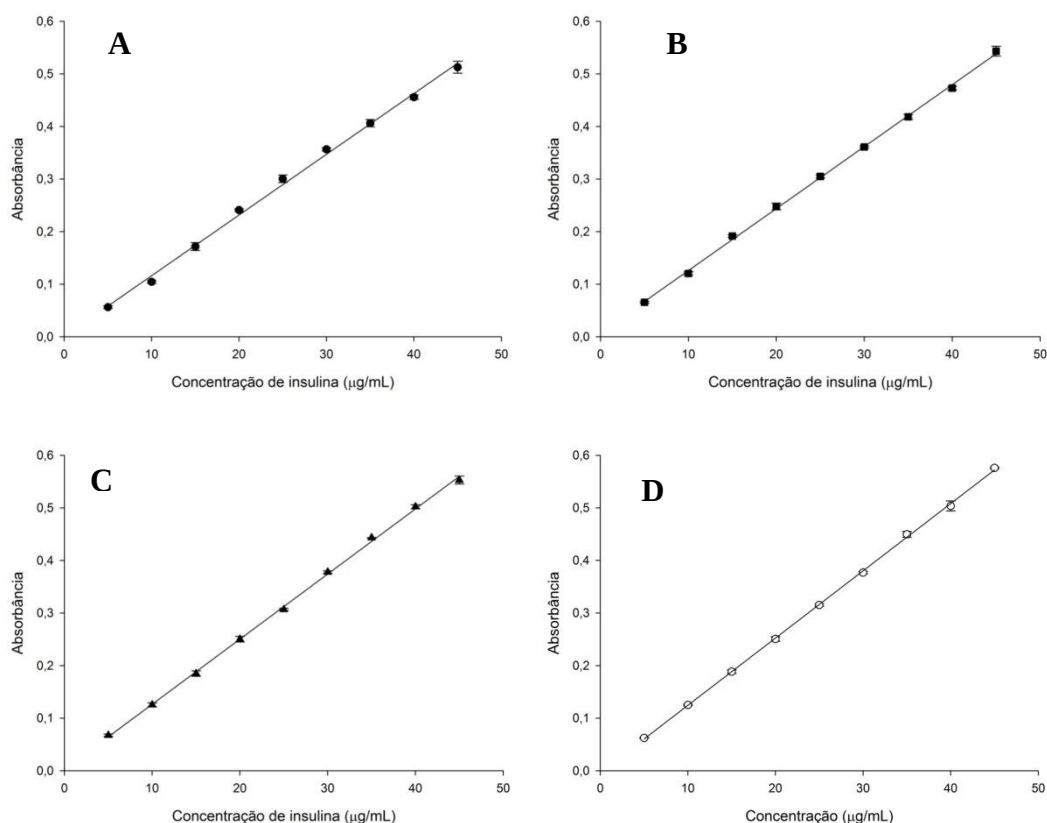




3.4.3 Linearidade

Curvas analíticas da INS foram construídas para diferentes meios para comprovar a linearidade do método de quantificação por espectrofotometria na região do UV (Fig. 29).

Figura 29 - Curva analítica da INS em HCl 0,1N (pH 1,2) (A), tampão fosfato 0,1 M, (pH 7,4) (B), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (C) e em tampão TC-199 (pH 7,4) (D).



Os dados obtidos a partir da regressão linear das curvas analíticas estão apresentados na Tabela 16 e os coeficientes de correlação linear (r) obtidos estão em conformidade com o preconizado pela ANVISA, demonstrando a linearidade do método para o intervalo proposto.

Tabela 16 - Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.

Parâmetros	HCl 0,1 N (pH 1,2)	Tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8)	Tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4)	Tampão TC-199 (pH 7,4)
Coefficiente linear	0,0115	0,0124	0,0118	0,0128
Intercepto	0,007	0,0026	0,0082	0,0034
Coefficiente de correlação	0,9972	0,9992	0,9992	0,9970

3.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada através da análise de três níveis de concentração, baixa (5µg/mL), média (25µg/mL) e alta (45µg/mL) (Tabela 16). Através das análises dos resultados, concluímos que o método proposto é preciso para a quantificação da INS, uma vez que os coeficientes de variação foram sempre menores do que 5% (ANVISA, 2003).

A Tabela 17 mostra os resultados para os testes de repetibilidade e a Tabela 18 para os testes de precisão intermediária.

Tabela 17 - Dados para o teste de precisão intracorridas nos diferentes meios.

Meios	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
HCl 0,1 N (pH 1,2)	5	5,01	0,0706	1,4077
	25	25,56	0,3573	1,3979
	45	45,45	0,1742	0,3832
Tampão fosfato 0,1M (pH 7,4)	5	4,96	0,0662	1,3348
	25	24,96	0,0994	0,3984
	45	45,71	0,1563	0,3421
Tampão fosfato 0,1M (pH 6,8)	5	5,12	0,0715	1,3962
	25	24,99	0,4002	1,6014
	45	45,11	0,3241	0,7186
Tampão TC-199 (pH 7,4)	5	5,12	0,0593	1,1685
	25	25,47	0,3458	1,3578
	45	45,20	0,2097	0,4638

Tabela 18 - Dados para o teste de precisão intercorridas nos diferentes meios.

Meios	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
HCl 0,1 N (pH 1,2)	5	4,92	0,0930	1,88
	25	25,68	0,4079	1,59
	45	45,60	0,1188	0,26
Tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4)	5	5,09	0,1584	3,11
	25	25,08	0,0890	0,35
	45	45,60	0,9016	1,98
Tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8)	5	5,15	0,0925	1,79
	25	25,62	0,6940	2,71
	45	45,84	1,97	4,30
Tampão TC-199 (pH 7,4)	5	5,00	0,0853	1,70
	25	25,11	0,3382	1,35
	45	45,09	0,3050	0,68

3.4.5 Exatidão

Os valores obtidos no teste de exatidão (Tab. 19) demonstram que a metodologia desenvolvida é adequada para a quantificação da INS, já que os valores de exatidão nos diferentes meios ficaram entre 99,20-102,47%.

Tabela 19 - Valores obtidos para o teste de exatidão.

Meios	Concentração Teórica	Exatidão (%)
HCl 0,1 N (pH 1,2)	5 µg/mL	100,34
	25 µg/mL	102,26
	45 µg/mL	101,01
Tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4)	5 µg/mL	99,20
	25 µg/mL	99,85
	45 µg/mL	101,58
Tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8)	5 µg/mL	102,37
	25 µg/mL	99,97
	45 µg/mL	100,24
Tampão TC-199 (pH 7,4)	5 µg/mL	102,47
	25 µg/mL	101,88
	45 µg/mL	100,44

3.4.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ obtidos são apresentados na Tabela 20 e demonstram que a metodologia desenvolvida é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de fármaco nos meios testados.

Tabela 20 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) da INS nos diferentes meios.

Parâmetros	HCl 0,1 M (pH 1,2)	Tampão fosfato (pH 6,8)	Tampão fosfato (pH 7,4)	Tampão TC-199 (pH 7,4)
<i>Desvio padrão médio</i>	0,0026	0,0032	0,0007	0,0056
<i>Inclinação da curva analítica (α)</i>	0,0115	0,0118	0,0123	0,0127
<i>Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)</i>	0,68	0,81	0,17	1,32
<i>Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)</i>	2,26	2,71	0,57	4,41

3.5 Eficiência de encapsulação (EE)

A encapsulação da INS nas MP de gelana foi realizada gotejando-se a dispersão polimérica em solução reticulante contendo INS, seguido por 24 h de imersão nesta mesma solução para maior difusão das moléculas de INS para o interior da matriz polimérica. O pH da solução reticulante contendo INS (pH=4,5) permite a interação eletrostática entre a INS e a gelana, já que quando uma proteína está em solução de pH abaixo do seu ponto isoelétrico ($pI_{\text{INS}}=5,35-5,45$) suas cargas estão carregadas positivamente e, sendo a gelana um polímero aniônico, ocorre uma interação por cargas, a qual deve favorecer a encapsulação (ZHANG et al., 2011a).

Os valores de EE da INS nas MP de gelana são apresentados na Tabela 21. O efeito da concentração de gelana e da concentração de agente reticulante na eficiência de encapsulação foi avaliado.

Entre as MP reticuladas com 3% de Al^{3+} , o aumento da concentração de gelana de 1,5% para 2,0% levou a uma maior EE (aproximadamente 1,5x maior) ($p<0,05$), o que provavelmente está relacionado com o aumento de viscosidade da dispersão e a estrutura polimérica mais compactada, responsáveis por prevenir a lixiviação do fármaco já encapsulado durante o estágio de imersão (NAYAK et al., 2014). Além disso, as MP obtidas com essa maior concentração polimérica apresentam uma maior quantidade de grupos carboxílicos negativamente carregados, os quais devem interagir com uma maior quantidade de moléculas de INS.

No entanto, as MP obtidas com a maior concentração de gelana (2,5%) apresentaram menor EE (~40%) de INS em comparação com as outras amostras reticuladas com 3% de solução de AlCl_3 ($p<0,05$). O comportamento observado indica que para essa concentração mais elevada de polímero, uma rede polimérica muito

compactada deve ser formada, a qual dificultou a difusão da INS para o interior das MP, durante o processo de carregamento por imersão.

Tabela 21 - Eficiência de encapsulação e dosagem de INS (média $\pm$ desvio padrão).

Amostras	EE (%)	(UI/200 mg)
CIN153	58,72 $\pm$ 2,37	36,86 $\pm$ 1,00
CIN203	89,11 $\pm$ 2,27	62,54 $\pm$ 1,69
CIN253	40,62 $\pm$ 2,57	27,34 $\pm$ 0,75
CIN155	54,13 $\pm$ 5,46	32,98 $\pm$ 1,32
CIN205	25,74 $\pm$ 3,88	17,32 $\pm$ 1,47
CIN255	7,79 $\pm$ 2,12	3,98 $\pm$ 0,44

Para as MP reticuladas com 5% de agente reticulante, um comportamento distinto foi observado, em que a diminuição da concentração de polímero promoveu um aumento significativo na EE. Dessa forma, as MP contendo 2% de gelana apresentaram EE 3,3x maior que aquelas com 2,5% desse polímero, enquanto a redução da sua concentração de 2,5% para 1,5% aumentou a eficiência de encapsulação em aproximadamente 6,94x ($p < 0,05$).

O aumento da concentração de reticulante levou a diminuição da eficiência de encapsulação, com exceção das amostras obtidas com 1,5% de polímero (IN153 e IN155), as quais não mostraram diferença significativa para a EE ($p > 0,05$). Esse comportamento pode ser explicado com base na expulsão de água provocada pela reticulação, a qual ocasiona uma perda convectiva das moléculas de fármaco durante o processo de reticulação (MAITI *et al.*, 2011; REDDY; TAMMISHETTI, 2002). Além disso, a mais alta concentração de íons Al^{3+} estabelece uma maior interação com a gelana, gerando uma estrutura mais densa, a qual pode dificultar a incorporação da INS.

A exemplo da análise estabelecida por Tahtat e colaboradores (2013) em relação à dose oral de INS, a quantidade de INS encapsulada foi expressa em UI/200mg de MP (Tab. 21). Sabendo-se que 1 UI equivale a 0,035 mg de INS e que sua dosagem terapêutica corresponde a 0,5-1 UI / kg por dia administrados em 2 ou 3 doses, temos que para um indivíduo de 60 kg, a dosagem necessária para se alcançar os objetivos glicêmicos seria de 30-60 UI/dia, equivalente a 10-20UI/administração. Assim, pode-se concluir que todas as amostras obtidas, com exceção daquela preparada com maiores concentrações de gelana e agente reticulante (IN255) viabilizariam a administração oral da dosagem necessária.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG)

De maneira geral, a variação da concentração polimérica, o carregamento com fármaco e a presença do revestimento são fatores que influenciaram significativamente a forma e a superfície das MP.

As análises de MEV-FEG revelaram que as MP controle 155 (Figs. 30a-d) foram as menos esféricas, o que pode ser atribuído a mais baixa concentração de polímero utilizada (1,5%) que é incapaz de levar à construção de uma rede estrutural mais volumosa e expandida. A incorporação de INS às MP levou à formação de poros na superfície das partículas (Fig. 30e-h), os quais revelam um rearranjo estrutural provocado pelo fármaco, o qual pode ser atribuído a forte interação fármaco-polímero, associado a mais alta concentração de reticulante (5%), que em conjunto, provocam a rápida retração das estruturas, originando irregularidades.

Apesar das dispersões filmógenas de amido resistente/pectina originarem filmes com superfície rugosa (MENEGUIN *et al.*, 2014), observou-se que o revestimento tornou a superfície das MP mais homogênea e lisa em relação às outras amostras. No entanto, este foi depositado sobre as MP de maneira irregular, o que levou à formação de cristas (Fig. 30i). Alguns cristais de amido resistente também puderam ser verificados na superfície da MP CIN155 (Fig. 30i).

As fotomicrografias das MP controle e carregadas com INS, obtidas a partir de dispersão de gelana 2,0% (Fig. 31), apresentaram uma superfície mais lisa em relação às anteriores, contendo algumas ranhuras verticais (Figs. 31 a, b, f) (também observadas nas amostras 155), as quais provavelmente devem estar relacionadas com o impacto da gota durante a imersão na solução reticulante. No entanto, em aumentos maiores (200, 1000 e 10000 x), é possível observar que as superfícies das MP IN205 (Figs. 31f, g, h) apresentam rugosidades diferentes, na forma de projeções a partir da superfície, o que deve estar relacionado com o rearranjo estrutural promovido pela adição de INS.

A deposição irregular de revestimento sobre as MP também foi verificada para a amostra CIN205 (Fig. 31i), com a presença de algumas fissuras superficiais (Figs. 31j, k).

Figura 30 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (aumentos de 50x, 200x, 1000x, 10000x, respectivamente) das superfícies das MP 155 (a), (b), (c), (d). IN155 (e), (f), (g), (h). CIN155 (i), (j), (k), (l). Setas indicam a presença de cristais de amido resistente.

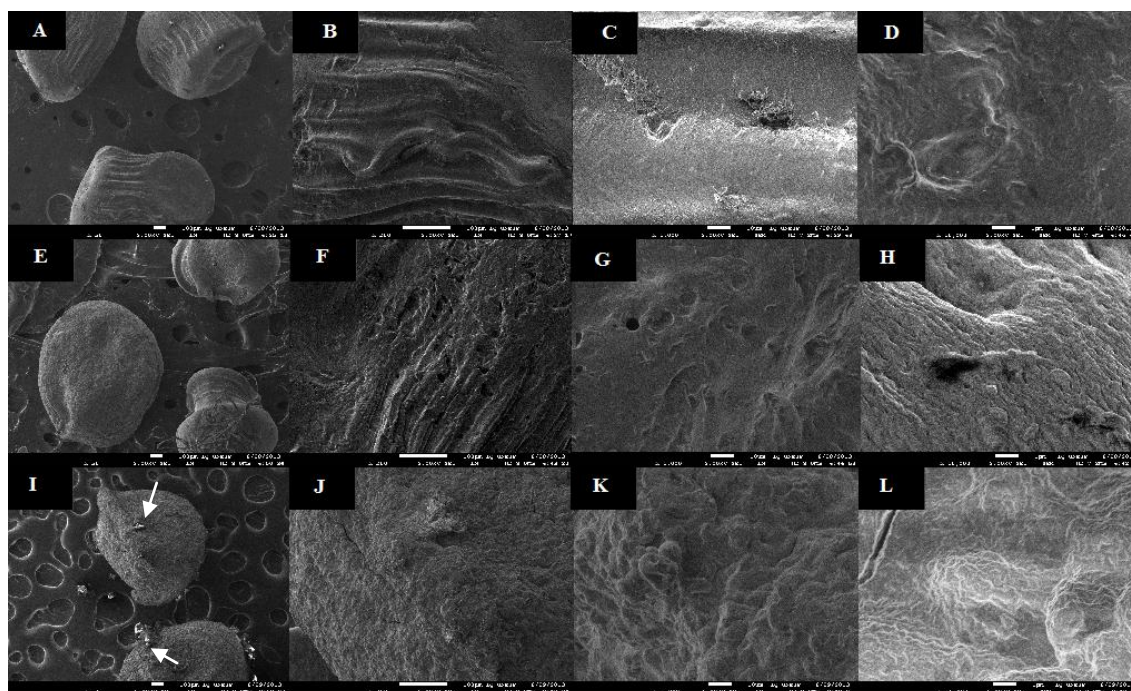
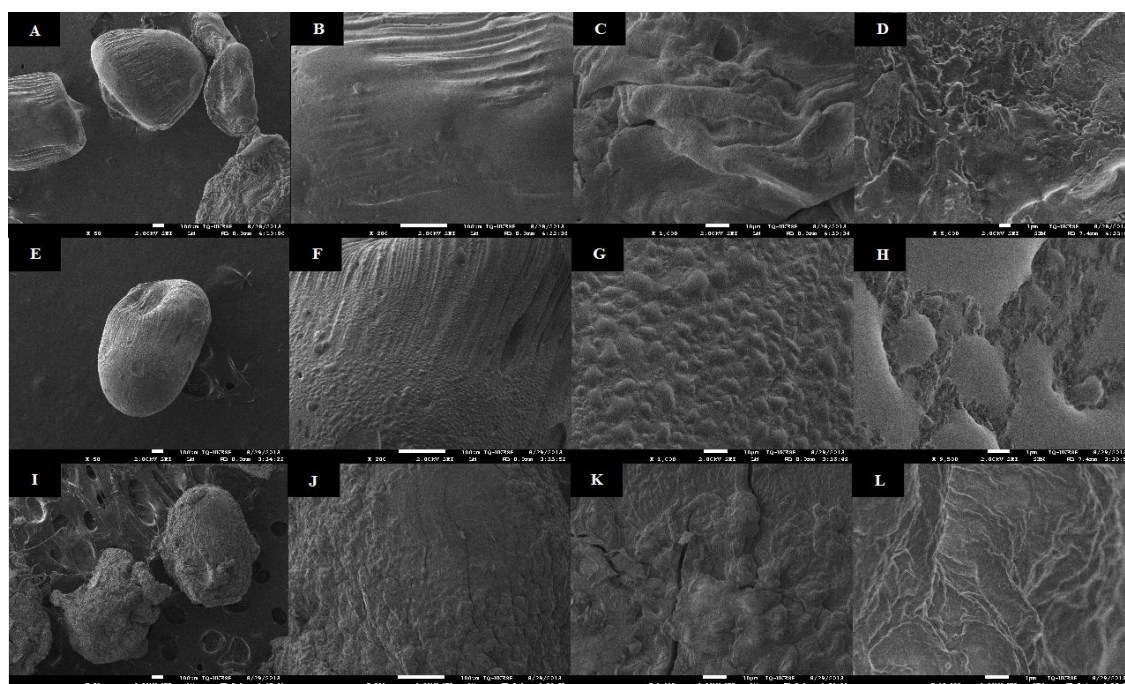
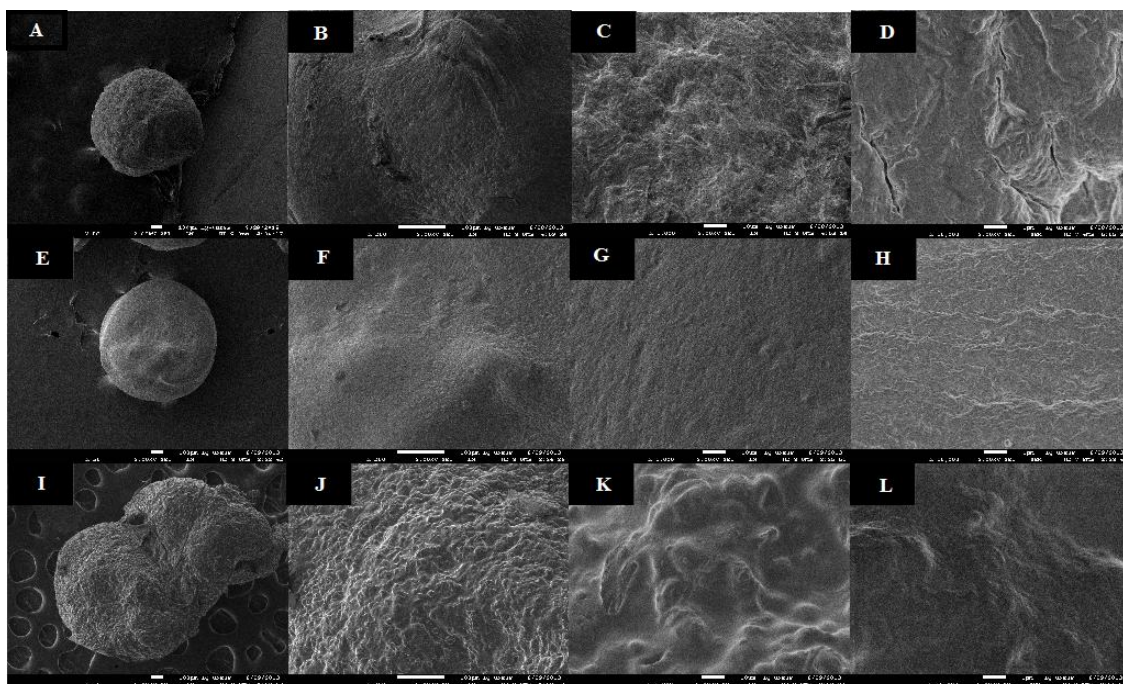


Figura 31 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (aumentos de 50x, 200x, 1000x, 10000x, respectivamente) das superfícies das MP 205 (a), (b), (c), (d). IN205 (e), (f), (g), (h). CIN205 (i), (j), (k), (l).



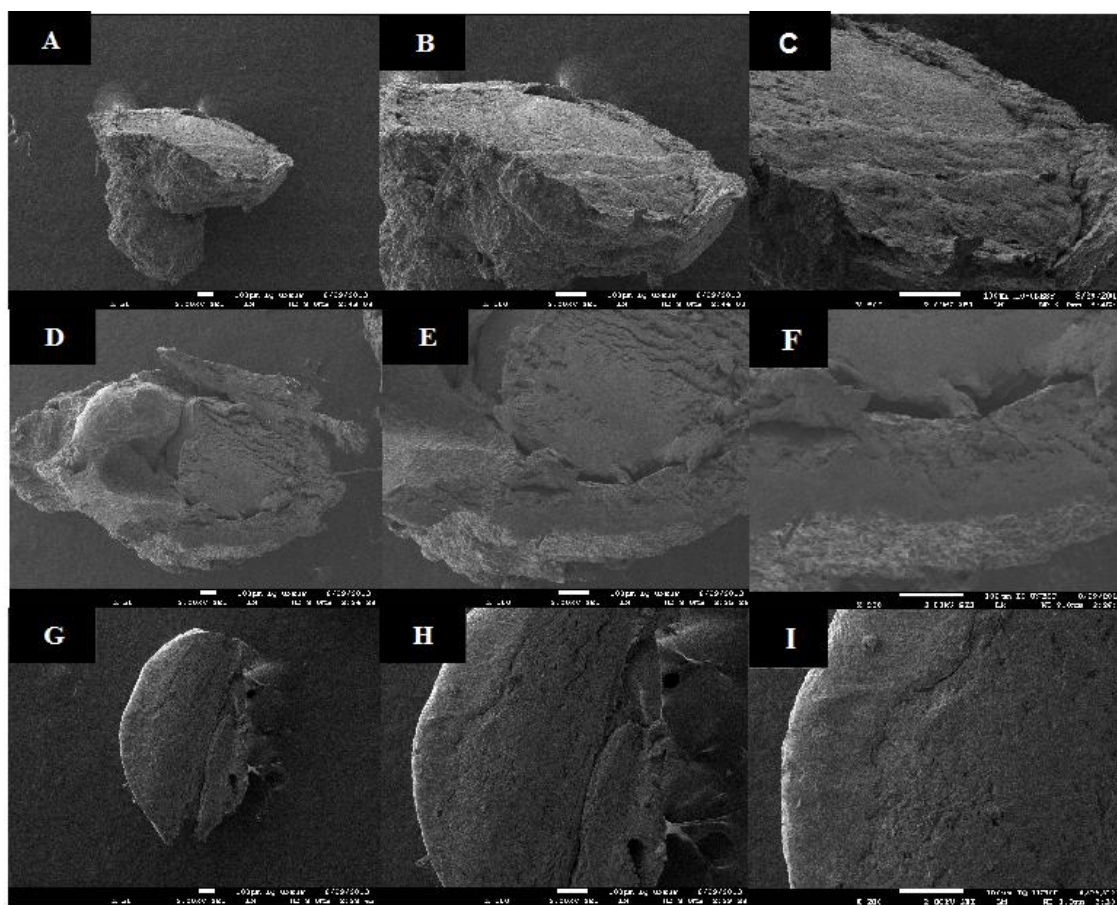
As MP obtidas com maior concentração de gelana (2,5%) foram mais circulares (Fig. 32 a, e), uma vez que essa maior concentração de polímero deve conferir à gota uma maior resistência mecânica contra o impacto sofrido com a solução reticulante, mantendo, portanto, sua forma após a queda e durante o processo de reticulação, dando origem a partículas de rede tridimensional mais compactada e de forma mais definida. A estrutura polimérica muito compactada obtida pelo emprego de altas concentrações de gelana (2,5%) e reticulante (5%) provavelmente deve ter levado a um rearranjo estrutural menos pronunciado pela adição de INS, de maneira que uma superfície lisa foi verificada para a amostra IN255 (Figs. 32 e-h). O revestimento se mostrou intacto para essas MP (Fig. 32i-l), no entanto, com superfície bastante rugosa.

Figura 32 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (aumentos de 50x, 200x, 1000x, 10000x, respectivamente) das superfícies das MP. 255 (a), (b), (c), (d). IN255 (e), (f), (g), (h). CIN255 (i), (j), (k), (l).



As fotomicrografias das seções transversais (Fig. 33) evidenciaram o sucesso do processo de revestimento, uma vez que uma nítida região limite entre a MP e o revestimento é observada, sendo que o revestimento se mostrou como uma membrana íntegra e contínua.

Figura 33 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (aumentos de 50x, 100x, 200x, respectivamente) das seções transversais de MP controle 155 (a), (b), (c), 205 (d), (e), (f) e 255 (g), (h), (i).



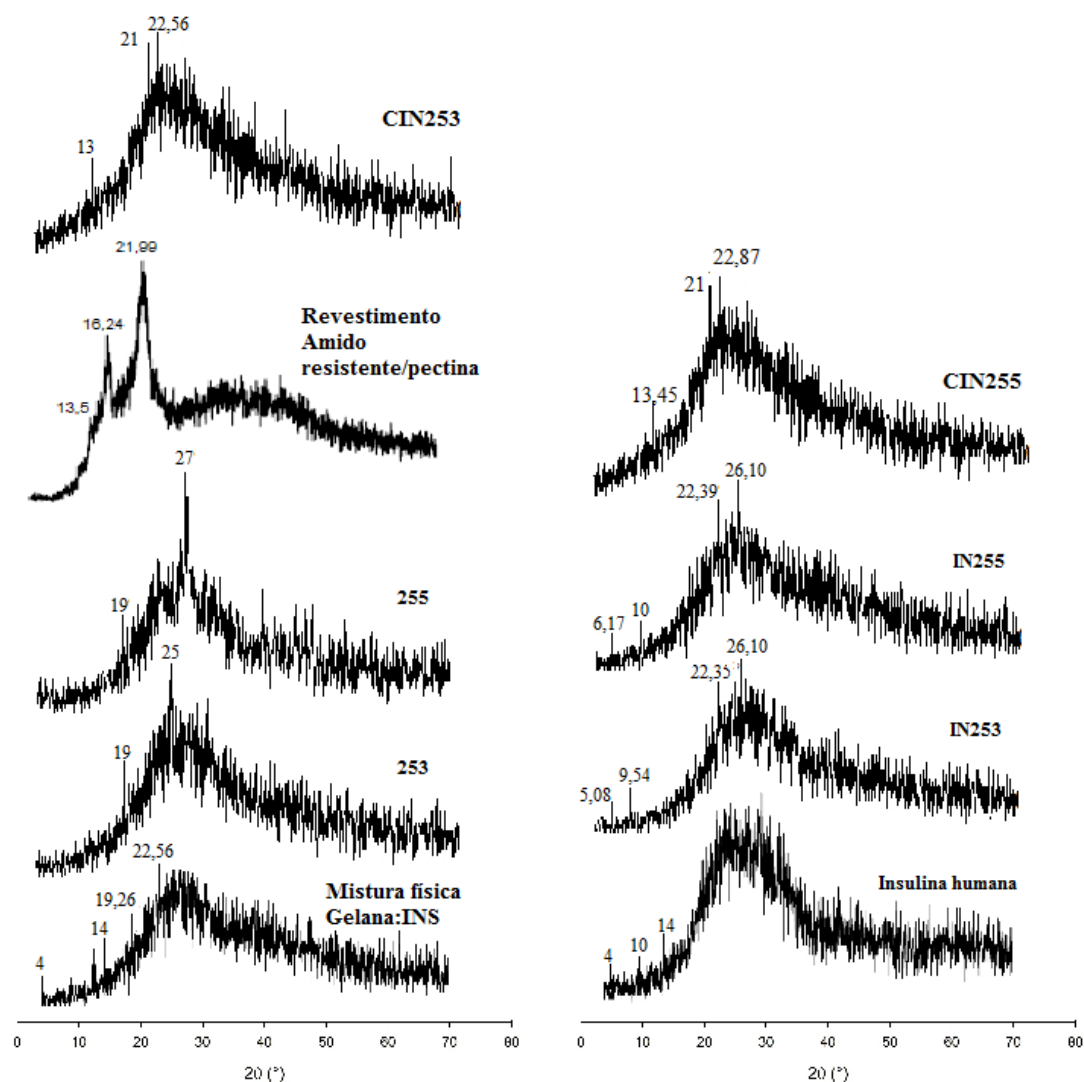
3.7 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas das amostras são exibidos na Figura 34. No difratograma da INS humana em pó, observam-se alguns picos parcialmente cristalinos em aproximadamente 4° , 10° e 14° (2θ) seguido de um halo amorfo. Segundo Cui e colaboradores (2006) e Lu e colaboradores (2012), esses picos cristalinos entre 0 e 14° (2θ) e o considerável halo amorfo são característicos da INS em pó, isto é, de uma macromolécula com alguma cristalinidade.

No difratograma da mistura física é possível observar que alguns picos característicos da INS foram mantidos em 4° e 14° (2θ) e novos picos em aproximadamente $19,16^\circ$ e $22,56^\circ$ (2θ) surgiram, os quais são característicos da gelana (XU *et al.*, 2007). A análise das MP controle obtidas com 2,5% de polímero (253 e 255) indicou um pequeno deslocamento dos picos característicos da gelana, mantendo a parte

cristalina da amostra intacta, ou seja, o processo de obtenção das amostras é eficiente e não altera as propriedades fundamentais do polímero isolado.

Figura 34 - Difratograma do revestimento de amido resistente/pectina, da INS humana em pó, da mistura física de gelana:INS (1:1), das MP controle (253 e 255), das MP carregadas com INS (IN253 e IN255) e MP carregadas com INS e revestidas (CIN253 e CIN255).



Nos difratogramas das MP obtidas com adição de INS (IN253 e IN255) a gelana exibiu seus picos em aproximadamente 22° e $26^\circ(2\theta)$, sendo mantidos dois picos da INS em aproximadamente $5,08^\circ$ e $9,54^\circ(2\theta)$ e $6,17^\circ$ e $10^\circ(2\theta)$, respectivamente. No entanto, após o revestimento dessas MP (CIN253 e CIN255), houve o desaparecimento dos picos característicos da INS entre 0° e 14° (2θ), provavelmente devido a sobreposição com os picos do revestimento. O surgimento de novos picos em 13° e

21°(2 θ) foi detectado e segundo Htoon e colaboradores (2010), estes picos são característicos de estrutura cristalina tipo V (amido resistente), formada após a gelatinização do amido, seguido de ciclos de resfriamento, na qual a estrutura da alta amilose passa de tipo B (duplas hélices) para tipo V (hélices simples).

3.8 DSC

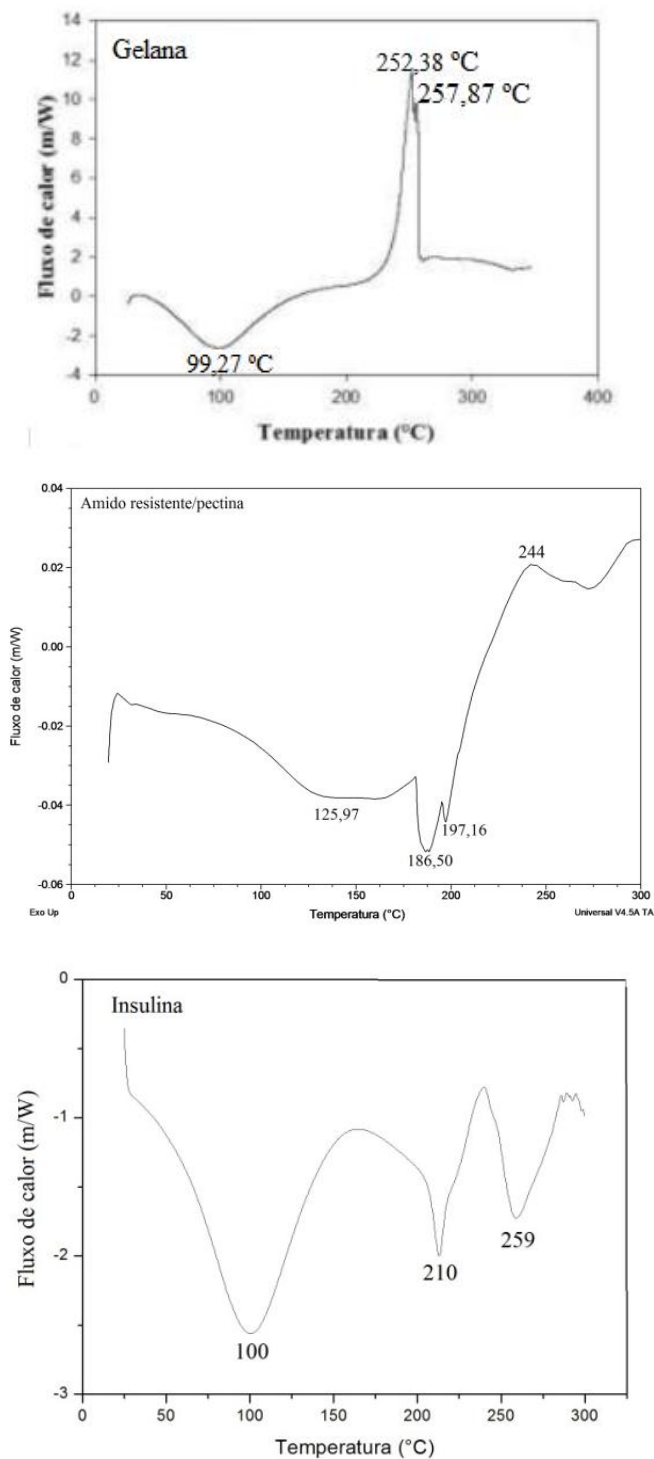
As curvas de DSC obtidas para a INS, polímeros isolados e MP (revestidas e não revestidas) estão apresentadas nas Figura 35 e 36 e Tabela 22.

A curva de DSC da goma gelana revelou um pico endotérmico alargado em 99,21 °C relacionado à evaporação de água quimicamente ligada (Yang et al., 2013) e dois picos exotérmicos em 252,38 e 257,86 °C correspondentes à decomposição deste polissacarídeo (Karthika; Vishalakshi, 2015; Cardoso, 2014; Prezotti et al., 2014).

Para o revestimento baseado em amido resistente/pectina, observou-se uma transição endotérmica trifásica. O primeiro evento apresentou-se como um pico alargado com T_{onset} em 82,26 °C e T_{peak} em 125,97 °C, valores muito próximos ao encontrados por Cardoso (2014) para o amido retrogradado, e que estão relacionados com a desorção de água. O segundo evento endotérmico apresentou dois picos em 186,50 e 197,17 °C, ambos muito próximos à temperatura de despolimerização da pectina (191 °C) encontrado por Soares e colaboradores (2013). Em 244 °C aparece um pico exotérmico que pode ser atribuído à degradação da alta amilose (Massicote et al., 2008).

A INS apresentou um pico endotérmico em 100°C e um segundo evento endotérmico em aproximadamente 210 °C, os mesmo encontrados por Tandy e colaboradores (2016). Segundo Mizuno e Pikal (2013), eventos endotérmicos acima de 100 °C para proteínas no estado sólido refletem sua desnaturação, envolvendo principalmente a quebra de ligações de hidrogênio (LI-CHAN; MA, 2002).

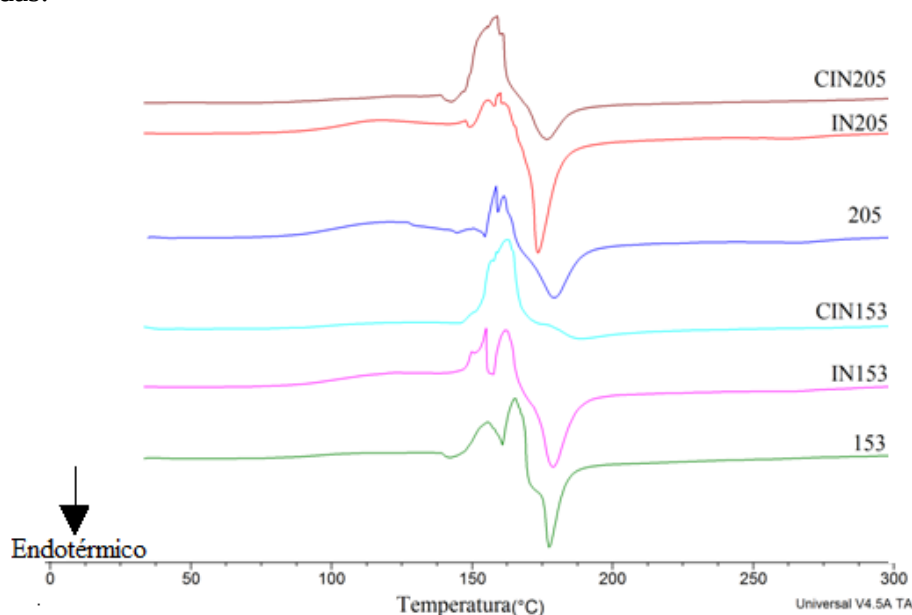
Figura 35 - Curvas de DSC da gelana, do revestimento baseado em amido resistente/pectina e da insulina em pó.



Curvas de DSC bastante semelhantes foram observadas para as MP controle e àquelas contendo INS (Fig. 36). A DSC das MP controle 153 revelou um pequeno pico endotérmico em 142,28 (°C) relacionado à evaporação de água, seguido por dois

eventos exotérmicos em 155,22 e 165,50 (°C), os quais são indicativos da cristalização da gelana e da presença de cristais de diferentes tamanhos. Segundo Gunning e Morris (1990), a adição de cátions (reticulante) pode promover a cristalização lateral das fibrilas da gelana, formadas em razão do aquecimento ou resfriamento, nos quais têm-se a formação de duplas hélices entre as extremidades de moléculas vizinhas. Além disso, os picos exotérmicos podem ser indicativos da presença de zonas juncionais com diferentes energias de ligação ou diferentes liberdades rotacionais (NISHINARI, 1997). Um último evento endotérmico foi evidenciado em 177,55 (°C), o qual deve estar associado à degradação térmica da gelana.

Figura 36- Curvas de DSC das MP controle, carregadas com INS e carregadas com INS e revestidas.



As MP controle 205 apresentaram eventos térmicos muito próximos aos apresentados para MP153 (Fig. 36), com um pequeno deslocamentos dos picos exotérmicos para 158,57 e 161,77(°C), os quais estão relacionados à cristalização da gelana, e do pico endotérmico de degradação da gelana para uma temperatura ligeiramente maior em 179,29(°C). Apesar do pequeno aumento da temperatura de degradação da gelana, menores valores de ΔH (Tab. 22) foram encontrados, razão pela qual não se deve sugerir um aumento de estabilidade térmica provocado pela maior concentração de polímero e reticulante.

As curvas de DSC das MP carregadas com INS (IN153 e IN205) (Fig. 36) revelaram eventos térmicos ocorrendo em temperaturas muito próximas à das MP

controle, sem o aparecimento dos picos característicos da INS, indicando uma forte interação fármaco-polímero e/ou a dispersão molecular da INS na estrutura polimérica.

O revestimento das MP com filmes de amido resistente/pectina alterou o comportamento térmico das amostras, de modo que um único pico foi observado, o qual ocorreu entre 147,87 e 166,08 (°C). Além disso, o evento endotérmico de degradação da gelana foi deslocado para temperaturas superiores (187,82°C para CIN153 e 176,51°C para CIN205), sugerindo que o revestimento das MP deve aumentar a estabilidade térmica das MP.

Tabela 22 - Parâmetros calorimétricos da INS humana, da gelana, do revestimento baseado em amido resistente/pectina e das MP com e sem INS, revestidas e não revestidas.

Amostra	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	T_{endset} (°C)	ΔH (J/g)
Gelana	51,57	99,27	151,37	-151,39
	220	252,38	259	-
	-	257,86	-	-
AR/P	86,53	125,97	181,27	-5,646
	182,33	188,48	192,99	-5,646
	195,92	198,28	202,05	-0,2264
INS	50	100	158	-13,14
	205	210	217	-1,262
	246	258	269	-1,183
153	147,82	155,22	160,76	5,441
	161,06	165,60	169,28	9,511
	170,08	177,55	184,20	-26,28
IN153	151,35	154,95	155,43	5,449
	157,74	162,74	166,08	9,016
	171,72	178,90	183,40	-28,64
CIN153	152,79	162,59	166,08	26,77
	177,43	187,82	199,38	-8,514
205	154,70	158,57	158,89	2,139
	159,33	161,77	164,75	2,401
	173,28	179,29	186,86	-22,06
IN205	150,82	154,48	157,03	1,476
	158,21	160,13	160,76	0,4628
	170,22	173,43	181,80	-37,95
CIN205	147,87	158,90	162,35	28,04
	168,16	176,51	182,60	-16,00

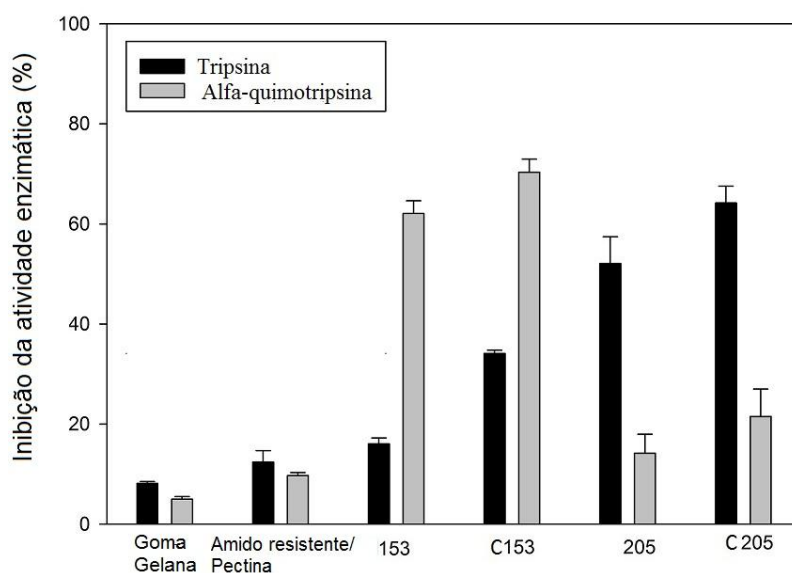
3.9 Atividade inibitória das dispersões poliméricas e das MP contra enzimas proteolíticas

3.9.1 Inibição da tripsina e α -quimotripsina

O estudo do efeito protetor que as dispersões poliméricas (gelana e amido resistente/pectina) e suas MP podem oferecer à INS é fundamental. Essa avaliação foi realizada em duas etapas: i) usando MP e dispersões poliméricas controle (sem o fármaco) para verificar a atividade inibitória dos polímeros e do sistema e ii) usando MP e dispersões carregadas com INS para verificar a quantidade de INS que permanece intacta durante o período de incubação com as referidas enzimas.

A inibição da tripsina e da quimotripsina exercida pelas dispersões poliméricas e MP sem INS é apresentada na Figura 37. Para as dispersões de goma gelana (2,0%) e amido resistente/pectina (5%) os valores de inibição encontraram-se entre 5 a 13%. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre essas amostras ($p>0,05$).

Figura 37 - Efeito inibitório enzimático *in vitro* das dispersões poliméricas e MP sobre a tripsina e a alfa-quimotripsina (n=3)



Uma maior atividade inibitória enzimática foi encontrada para as MP em relação às dispersões poliméricas, revelando a influência da estrutura das MP no efeito de inibição. Entre as diferentes MP, verificou-se que o aumento da concentração de gelana

de 1,5 para 2,0% favoreceu a inibição da tripsina ($p < 0,05$), provavelmente devido à formação de um gel mais viscoso, o qual constitui uma barreira física contra a difusão das enzimas em direção ao substrato BAPNA, além de também bloquear os sítios ativos da enzima (DÉAT-LAINÉ *et al.*, 2012). Além disso, a goma gelana (maior constituinte das MP) é capaz de formar uma matriz reticulada pela presença de ambos amido resistente/pectina (reticulação física) e íon Al^{3+} (reticulação iônica), na qual os substratos podem permanecer embebidos e protegidos da degradação.

Adicionalmente, a concentração mais elevada de gelana pode ter ocasionado uma forte interação polímero-enzima, levando à diminuição da concentração de enzima livre e redução do pH ótimo para atividade enzimática. Uma interação eletrostática mais significativa entre o polímero e enzima também pode ter ocorrido, o que geralmente impede o acesso do sítio ativo da enzima ao substrato (LV *et al.*, 2014).

Segundo Lv e colaboradores (2014), o Ca^{2+} têm um papel fundamental na estabilidade termodinâmica das proteases, as quais possuem sítios de ligação para esse íon. Nesse sentido, a habilidade de alguns polímeros se ligarem ao cálcio é outro mecanismo de inibição de proteases que ocorre pela desnaturação da enzima e é dependente da distância entre os grupos carboxílicos constituintes do polímero (EGUCHI *et al.*, 2004) e do grau de reticulação das cadeias (SAJEESH *et al.*, 2010).

Por outro lado, a amostra preparada usando concentração mais baixa de polímero e reticulante (153 e C153) foi mais eficiente na inibição da quimotripsina. Segundo Zhu e colaboradores (2010), a atividade enzimática depende da estrutura original e polaridade. Dessa maneira, as interações estabelecidas com os polímeros e reticulante pode resultar em alterações na conformação da enzima, diminuindo a atividade catalítica.

O filme de revestimento foi capaz de oferecer um efeito inibidor enzimático adicional para as MP C153 e C205, alcançando valores de até 70% de inibição devido à formação de uma barreira física adicional contra a difusão de enzimas. Adiciona-se a isso o fato de o revestimento baseado em amido resistente/pectina possuir uma estrutura tridimensional mais cristalina e empacotada, com degradabilidade dependente de enzimas produzidas localmente pelas bactérias do cólon, dificultando a degradação exercida pela tripsina e quimotripsina.

Além dos fatos expostos, segundo Mineo e colaboradores (2007), inibidores de quimotripsina tem sido identificados em várias fontes de amido e esses têm mostrado ser estáveis em diferentes condições de temperatura e pH.

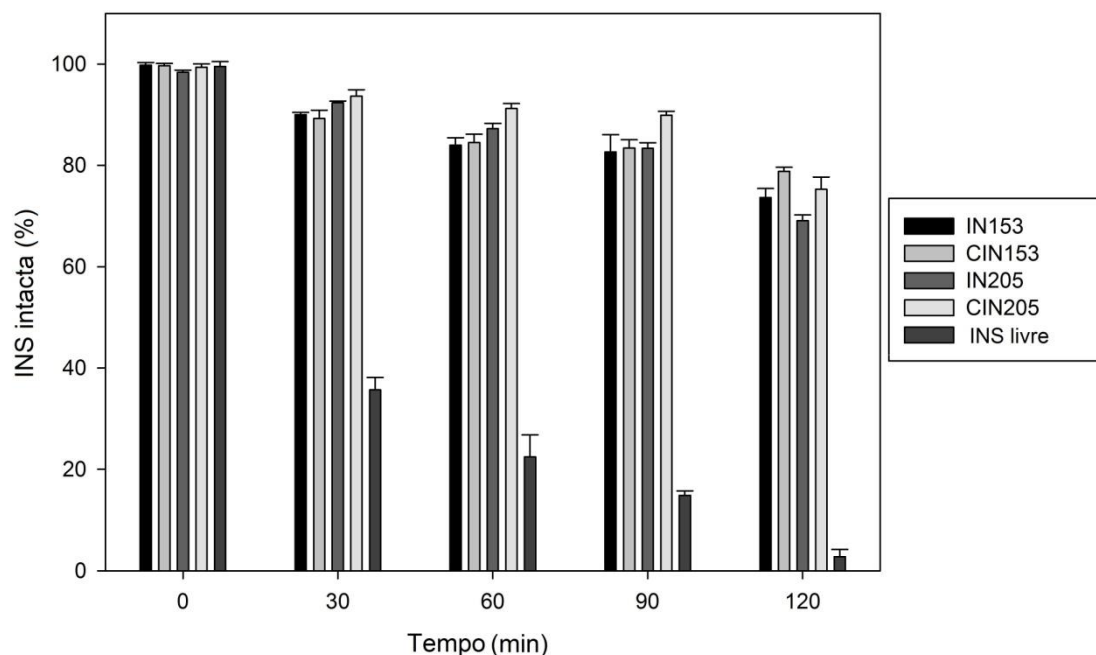
O efeito inibitório das dispersões poliméricas e das MP na atividade enzimática representa uma estratégia promissora para o aumento da biodisponibilidade da INS administrada oralmente.

3.9.2 Avaliação do efeito protetor das MP contra a degradação da INS

A INS livre sofreu extensa degradação pelas enzimas tripsina e quimotripsina (Fig. 38), de maneira que somente 36% de INS permaneceu intacta após 30 min de teste e, este valor, diminuiu para 3% em 120 min.

Contrariamente, o processo de microencapsulação permitiu notável efeito protetor contra a degradação da INS, com 89-94% de INS permanecendo intacta em 30 min de ensaio, e após 120 min de teste, esses valores decaíram para uma faixa entre 70 a 80% de INS não degradada. A camada geleificada construída na superfície das MP (Fig. 39) representa uma barreira física contra o movimento das moléculas de enzima, dificultando o acesso ao substrato (INS). Adiciona-se também o fato dos pontos de reticulação representarem obstáculos adicionais à difusão enzimática.

Figura 38- Quantidade de INS que permaneceu intacta a partir da solução comercial de INS (Novolin®) (INS livre) e MP carregadas com INS (revestidas e não revestidas), durante incubação com tripsina e quimotripsina.

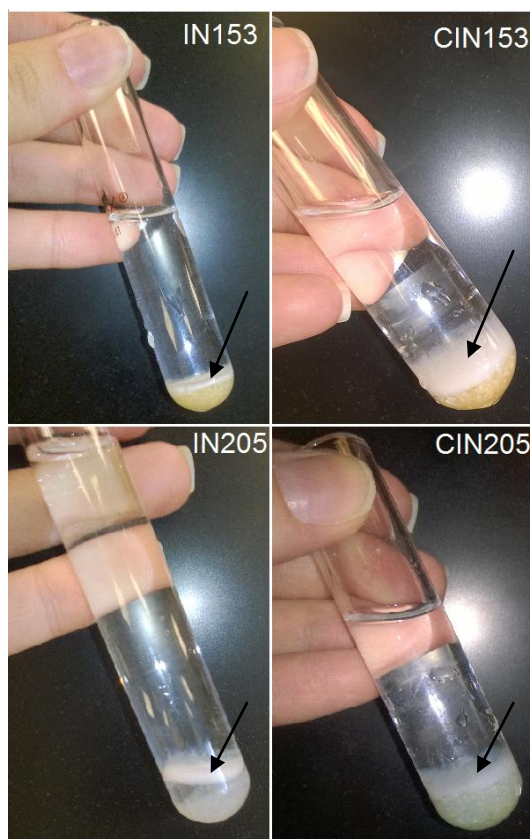


Interessantemente, ao final do ensaio (120 min) o efeito protetor da amostra IN153 e CIN153 foi maior do que aqueles alcançados pelas amostras preparadas com

maior concentração de polímero e reticulante ($p < 0,05$). Nesse sentido, conclui-se que o estado mais flexível das cadeias poliméricas em resposta ao menor grau de reticulação deve tornar os grupos funcionais mais disponíveis para interagir com as enzimas, levando a alterações conformacionais e, consequentemente, diminuição/perda de atividade. Além disso, o estado menos enovelado das cadeias poliméricas favorece a entrada de líquidos, de maneira que a camada geleificada que se forma na superfície das MP (Fig. 39) se origine mais rapidamente, protegendo a INS contra a degradação desde o início do teste, o que deve contribuir para a diminuição da porcentagem final de INS degradada.

O maior efeito protetor da amostra CIN153 em relação à amostra IN153 (aproximadamente 8% maior) pode ser atribuído à resistência adicional do revestimento contra a difusão enzimática, aumentada pela amido resistente que apresenta resistência à digestão enzimática nas porções superiores do TGI devido à sua estrutura mais empacotada e enovelada (HTOON *et al.*, 2009). Adicionalmente, a pectina contribui para a formação de uma camada geleificada mais viscosa (CURY *et al.*, 2014).

Figura 39 - Fotografias do conjunto MP/enzimas após o ensaio de degradação enzimática. (Setas indicam a camada geleificada formada ao redor das MP).





CAPÍTULO IV

Estudos de Liberação *in vitro* da Insulina

Aparato I modificado (reduzido volume)

Aparato IV USP (células de fluxo contínuo)

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação de fármacos são desenvolvidos visando à otimização da eficácia e segurança, através do aumento da biodisponibilidade, da vetorização do fármaco para o local de ação e/ou do prolongamento do efeito terapêutico (NATARAJAN et al., 2014).

A liberação do fármaco a partir de matrizes poliméricas hidrofílicas ocorre através de uma sequência de eventos simultâneos, como o intumescimento, a difusão e erosão (FERRERO et al., 2010). Quando sistemas baseados em polímeros hidrofílicos entram em contato com o meio aquoso, a hidratação ocorre no sentido superfície-interior, levando a formação de uma camada geleificada, a qual se opõe a penetração de fluidos na forma farmacêutica, minimizando, dessa maneira, a difusão das moléculas de fármaco (OSMAŁEK et al., 2014).

Estudos anteriores com comprimidos de gelatina revelaram que baixas concentrações desse polímero estão associadas à rápida liberação do fármaco (EMEJE et al., 2010), enquanto que para uma liberação prolongada se faz necessário o uso de maiores concentrações de gelatina (FRANKLIN-UDE et al., 2007).

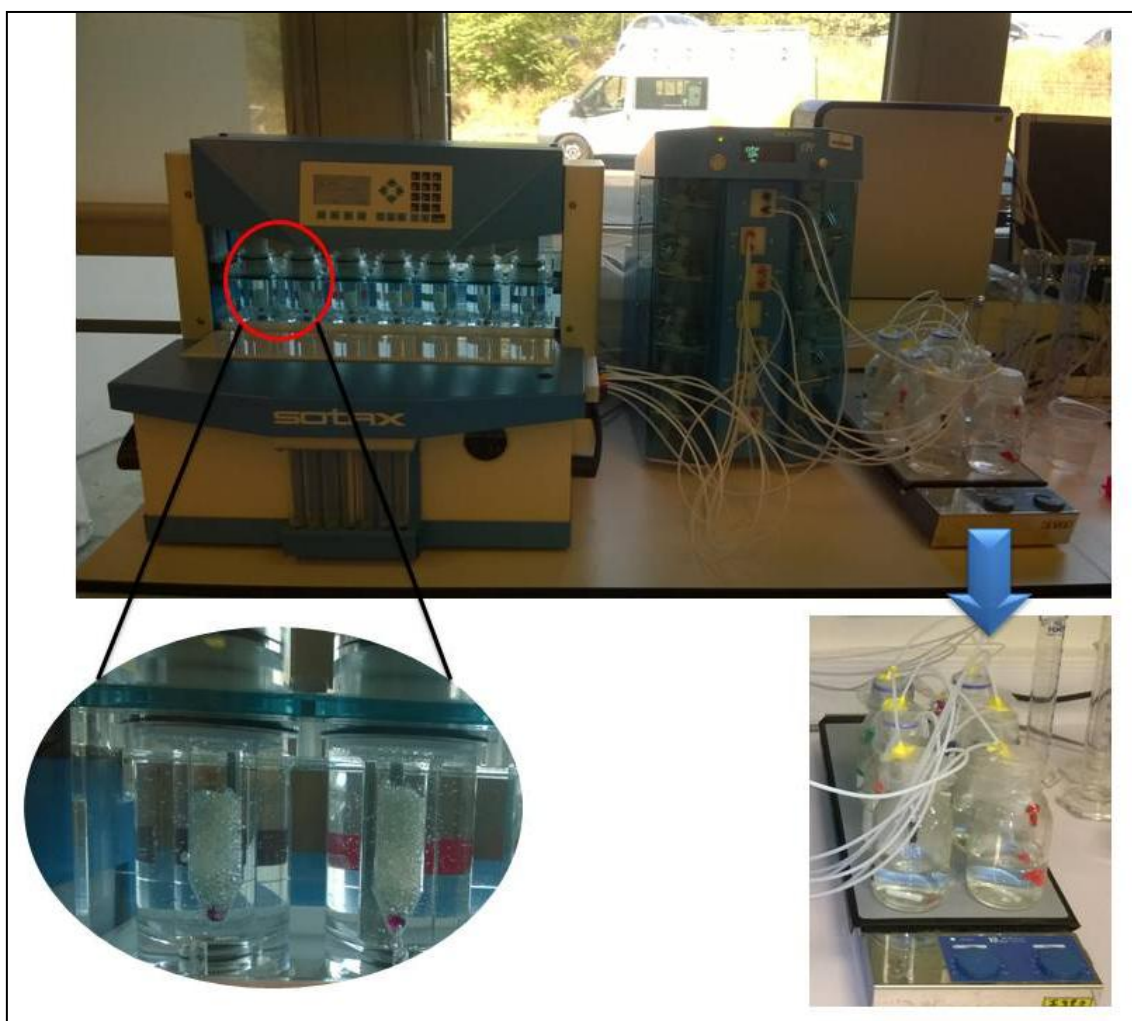
O teste de dissolução tem um importante papel na pesquisa e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, uma vez que constitui uma importante ferramenta para prever o controle espacial e/ou temporal das taxas de liberação de fármacos. Esse teste é amplamente empregado em diferentes estágios do desenvolvimento e produção de muitas formas farmacêuticas para a otimização de formulações, estudos de estabilidade, registro de um novo produto e estabelecimento de uma futura correlação *in vitro-in vivo*. É também considerado uma valiosa ferramenta para detectar desvios de qualidade em processos ou no produto final (TAJIRI et al., 2015; BHARDWAJ; BURGESS, 2010).

Diferentes aparatos são usados para estudar a liberação do fármaco a partir de formas farmacêuticas orais sólidas, como os aparatos 1 e 2 (cesto e pás, respectivamente). No entanto, algumas limitações, tais como o emprego de fármacos escassamente solúveis e sistemas com baixa eficiência de encapsulação, podem tornar necessária a utilização de outros instrumentos.

As células de fluxo contínuo (USP 37-NF 32, 2014) (Fig. 40) têm recebido grande atenção na área farmacêutica, uma vez que possui diversas vantagens por operar em dois modos: i) circuito aberto, com meio fresco passando através das células e ii) circuito fechado, no qual o mesmo volume de meio é reciclado (TAJIRI et al., 2015).

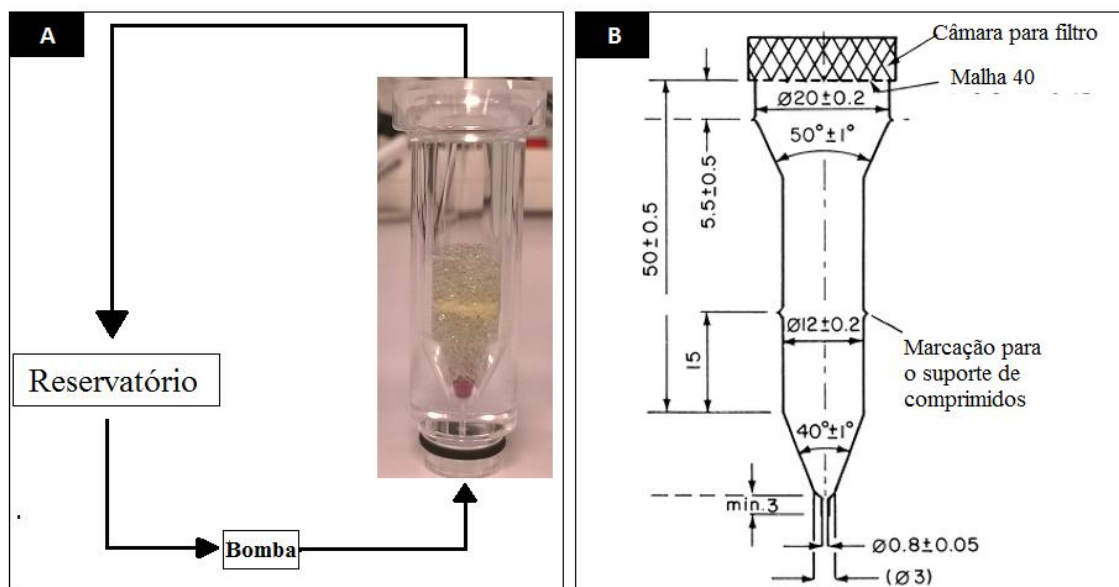
Importante ressaltar que o aparato IV também estabelece condições hidrodinâmicas bem definidas e geometria com melhor correlação com os padrões de fluxo intestinal, além de permitir a alteração de meio, pH e taxas de fluxo mais facilmente do que nos aparatos de cesto e pás. Quando operando em sistema aberto, as *sink conditions* são mantidas por longos períodos de tempo, mesmo para fármacos de baixa solubilidade (USP 26-NF 21, 2003).

Figura 40 - Aparato de dissolução do tipo "células de fluxo contínuo" (USP 4, Sotax, Switzerland).



Neste trabalho, a liberação da INS a partir das MP IN153, CIN153, IN205 e CIN205 em células de fluxo contínuo foi avaliada utilizando a configuração de sistema fechado (Fig. 41A), no qual pequenas quantidades de amostra e células de 12 mm de diâmetro interno para formas farmacêuticas sólidas orais foram utilizados (Fig. 41B)

Figura 41 - Ilustração esquemática da configuração de um sistema fechado para o aparato de células de fluxo contínuo (A) e células de fluxo contínuo (12 mm) para formas farmacêuticas sólidas administradas oralmente (Adaptado de: Copyright 2011 The United States Pharmacopeial Convention) (B).



Diversos fatores podem influenciar o perfil de dissolução de uma amostra, alguns relacionados ao próprio fármaco, como a solubilidade, o tamanho de partícula, a natureza química, o polimorfismo e outros, ou relacionados ao tipo de forma farmacêutica, como as sólidas, líquidas e revestidas. A tecnologia de obtenção também pode afetar significativamente este parâmetro.

O aparato 1 (cesto) apresenta a vantagem de posicionar a forma farmacêutica em um espaço limitado, evitando problemas de flutuação, o que aumenta a reprodutibilidade do método. No entanto, uma limitação importante deste aparato é que com o tempo de análise, as formas farmacêuticas podem intumescer e/ou desintegrar, obstruindo a malha do cesto, além da necessidade de grandes volumes de meio. Já o aparato IV, como discutido anteriormente, mimetiza a dinâmica do TGI e pode operar em condições "sink" durante todo o tempo de ensaio, mesmo para fármacos de escassa solubilidade.

A aplicação dos modelos matemáticos aos dados de liberação tem o objetivo de prever o mecanismo pelo qual um determinado fármaco é liberado de um sistema, bem como os processos físicos e químicos envolvidos no processo de liberação, complementando a análise quantitativa dos dados (COSTA; LOBO, 2001).

É importante ressaltar que a cinética de liberação pode ser influenciada por uma série de fatores, como o tipo de fármaco, sua solubilidade, polimorfismo, tamanho de partícula e quantidade na forma farmacêutica (EL-ARINI; LEUEN-BERGER, 1995; SALOMON; DOELKER, 1980).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Acetato de sódio (Quimis); Acetonitrila (Sigma); Ácido clorídrico teor 37% (Quimis), água destilada; fosfato de sódio (Henrifarma); Hidróxido de sódio (Grupo Química); sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), ácido fosfórico extra puro (H_3PO_4),

2.2 Principais equipamentos

Balança analítica (Bel Engineering); espectrofotômetro ultravioleta (Hewlett Packard-Kayak XA); equipamento para ensaio de dissolução Hanson Research modelo New Hanson SR-8 Plus; RP-HPLC (Merck-Hitachi); equipamento para ensaio de dissolução de células de fluxo contínuo (USP 4, Sotax, Switzerland); peagômetro (Micronal[®]).

2.3 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da INS usando aparato I

Os ensaios de dissolução para a determinação do perfil de liberação *in vitro* da INS foram realizados para as amostras IN153, IN203, IN253, IN155, IN205, CIN153, CIN203, CIN253, CIN155 e CIN205, as quais apresentaram maior eficiência de encapsulação.

O estudo foi realizado em dissolutor SR-8 Plus Hanson Research[®], usando o aparato I modificado com reduzido volume de meio, sob velocidade de agitação de 50 rpm e temperatura de $37 \pm 0,4$ °C, com uma massa precisamente pesada de MP. Foram utilizados como meios de dissolução, soluções com diferentes valores de pH, visando simular a variação que ocorre ao longo do trato gastrointestinal e garantindo-se as condições *sink*.

Inicialmente, o ensaio foi realizado em meio ácido (15 mL de HCl 0,1N – pH 2), durante 2 horas. Em seguida, foi conduzida a etapa do ensaio em 20 mL de tampão fosfato pH 7,4 através da adição de 5 mL de tampão fosfato pH 7,4, durante o tempo de 4h como preconizado pela USP 33 (2010) para teste de formas de liberação controlada. Para a última etapa do ensaio, foi adicionado 1 ML de HCl 2 N para promover a alteração para pH 6,8, a fim de simular o pH do meio colônico e o teste foi conduzido por tempo suficiente para que no mínimo 80% do fármaco fosse liberado. Alíquotas (1

mL) foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados sendo feita a reposição imediata de meio à mesma temperatura. A quantidade de INS liberada foi quantificada em espectrofotômetro UV-Visível, em 271 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da INS usando aparato IV

Os estudos de liberação em células de fluxo contínuo vertical foram realizados utilizando-se as MP revestidas CIN153 e CIN205 e não revestidas IN153 e IN205, no Laboratório de Biofarmácia (ERT-CIDAM) da Universidade D'Auvergne, em Clermont Ferrand, França, sob supervisão do Prof. Dr. Eric Beyssac, durante período de Doutorado sanduíche.

A liberação da INS a partir de MP revestidas e não revestidas foi determinada em células de fluxo contínuo (USP 4, Sotax, Switzerland) com 100 mL de meio a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ operando na configuração de sistema fechado. As células de dissolução de 12 mm de diâmetro interno foram preenchidas com pérolas de vidro de 1 mm e uma pérola de rubi de 5 mm localizada no vértice da célula. O meio de dissolução, composto de ácido clorídrico (0,1 N; pH 1,2; 1 h), tampão acetato (0,1 M; pH 4,5; 1h) e tampão fosfato (0,1 M; pH 6,8; 5h), foi transportado entre as células de dissolução e o reservatório com uma bomba de pistão (CY 7-50, Sotax, Switzerland) com fluxo de 24 mL/min. Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos pré-determinados, com reposição de meio em mesma temperatura. A liberação da INS foi quantificada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* da INS

Os mecanismos envolvidos no processo de liberação do fármaco foram avaliados através dos dados de liberação obtidos nas seções 1.3 e 1.4, os quais foram tratados com diferentes modelos matemáticos (Baker–Londsdale, Primeira-Ordem, Higuchi, Hixson–Crowell, Korsmeyer-Peppas e Weibull).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do perfil de liberação da insulina

Nesse trabalho os estudos de liberação foram realizados para as amostras IN153, IN203, IN253, IN155, IN205, CIN153, CIN203, CIN253, CIN155 e CIN205, baseado nos resultados de eficiência de encapsulação. Os perfis de liberação são apresentados na Figura 42.

Figura 42 - Perfis de liberação da insulina a partir das MP de gelatina revestidas e não revestidas em meios com diferentes valores de pH (de 0 a 120 min pH 1,2; de 120 a 360 min pH 7,4 e de 360 a 720 min pH 6,8).

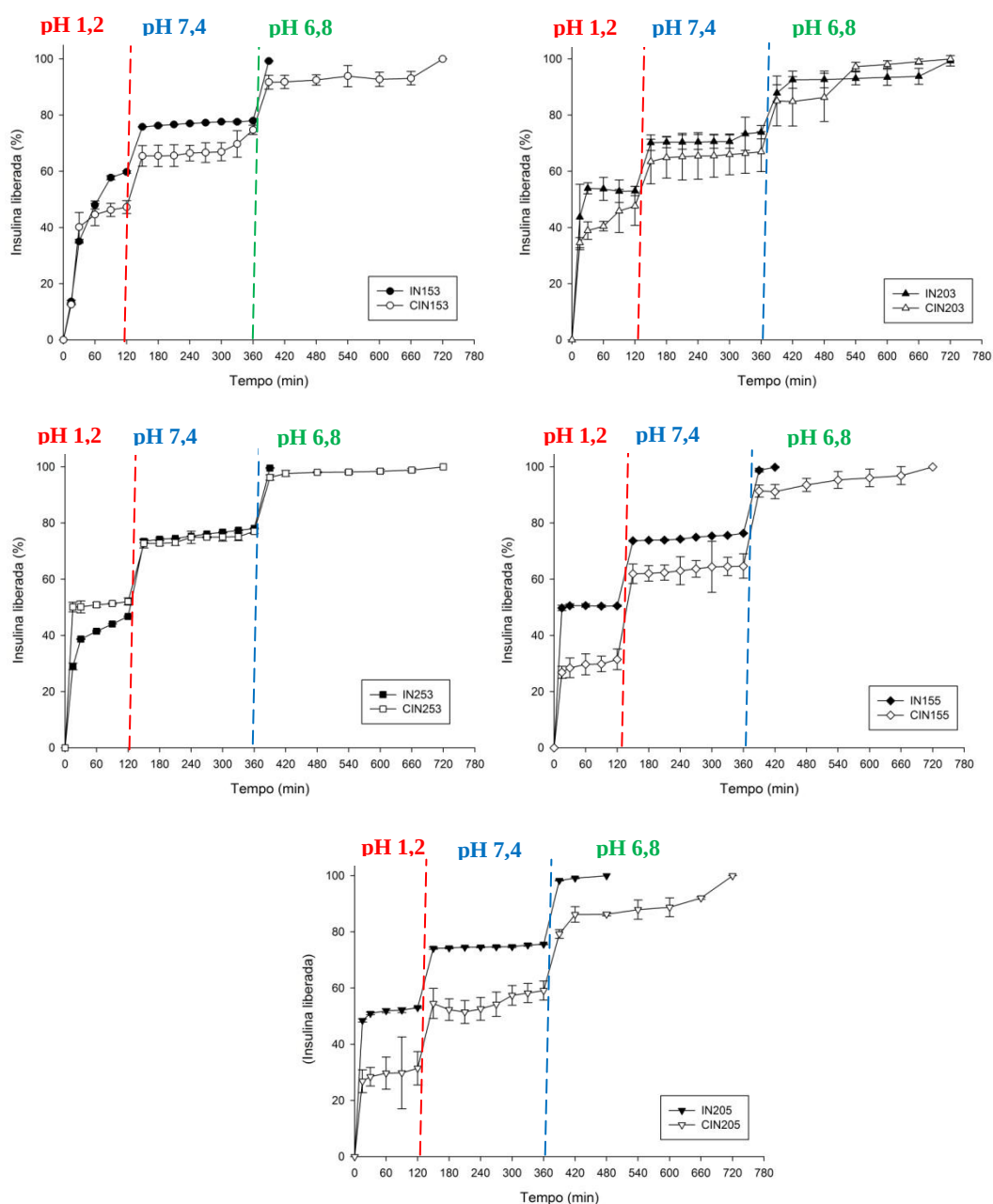


Tabela 23 - Percentual de insulina liberada em meio ácido (pH 1,2) e em tampão fosfato pH 7,4.

Amostras	Meio ácido (pH 1,2)		Tampão Fosfato pH 7,4	
	15 min	120 min	30 min	240 min
IN153	13,63 ± 0,52	59,76 ± 0,40	75,83 ± 0,17	78,02 ± 0,17
CIN153	12,58 ± 0,10	47,25 ± 2,28	65,48 ± 3,67	74,76 ± 1,65
IN203	42,79 ± 11,32	52,31 ± 1,63	70,72 ± 2,73	73,90 ± 2,36
CIN203	34,63 ± 1,78	47,68 ± 6,94	63,46 ± 7,96	66,99 ± 7,11
IN253	28,92 ± 1,18	46,75 ± 0,18	73,52 ± 0,51	78,12 ± 0,12
CIN253	50,39 ± 1,74	52,05 ± 1,30	72,73 ± 1,58	77,04 ± 0,83
IN155	49,77 ± 0,93	50,55 ± 0,27	73,70 ± 0,20	76,38 ± 0,19
CIN155	26,84 ± 2,14	31,45 ± 3,67	62,05 ± 3,47	64,89 ± 4,33
IN205	48,44 ± 0,56	53,81 ± 0,26	74,14 ± 0,35	75,60 ± 0,18
CIN205	26,84 ± 4,09	31,46 ± 5,93	54,55 ± 5,34	59,13 ± 3,39

A avaliação da liberação *in vitro* da INS a partir das MP desenvolvidas mostra o controle das taxas de liberação da INS por 7 a 12 horas (Fig. 42). Esse prolongamento da liberação classifica o sistema desenvolvido como um sistema de liberação sustentada de fármacos, o que implica na liberação lenta e gradual do fármaco e no favorecimento da manutenção da concentração plasmática dentro da janela terapêutica. Esses sistemas apresentam a vantagem de propiciarem menor frequência de administração do medicamento, associado à reduzida incidência de efeitos colaterais e, conseqüentemente, uma maior adesão do paciente ao tratamento (NATARAJAN *et al.*, 2014).

Para os diferentes meios estudados, a taxa de liberação da INS a partir das MP revestidas foi significativamente reduzida (Tab. 24) em comparação com as MP não revestidas, demonstrando que o revestimento promoveu um controle adicional das taxas de liberação do fármaco (com exceção da amostra CIN253). Dentre as diferentes amostras, a CIN205 levou as menores taxas de liberação tanto em meio ácido (pH 1,2) como em tampão fosfato (pH 7,4), com valores de redução atingindo aproximadamente 42 e 22%, respectivamente. Como não foram verificadas diferenças nos valores de AL_{120} entre CIN205 e IN205 ($p > 0,05$) em todos os meios avaliados, acredita-se que a associação do revestimento e a construção de estruturas muito reticuladas obtidas através da concentração intermediária de gelatina (2,0%) e maior concentração de reticulante (5%) devem ter se oposto à difusão das moléculas de INS, diminuindo sua taxa de liberação nos diferentes meios.

Tabela 24 - Redução dos percentuais de liberação da INS a partir de MP de gelana, exercida pela presença do revestimento de amido resistente/pectina, após 120 min em HCL 0,1N (pH 1,2) e 240 min em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4).

Amostras	HCl 0,1 N (pH 1,2)	Tampão fosfato pH 7,4
CIN153	20,93%	4,18%
CIN203	8,85%	9,36%
CIN253	*	1,38%
CIN155	37,78%	15,04%
CIN205	41,55%	21,78%

*A amostra CIN253, em meio ácido (120 min), levou ao aumento (11,34%) da taxa de liberação da INS.

Em meio ácido 0,1 M (pH 1,2), a liberação da INS se mostrou inferior em relação aos outros meios com diferentes valores de pH (pH 7,4 e 6,8) (Tab. 23) e esses resultados estão de acordo com os resultados de absorção de líquidos (Seção 3.3 do capítulo III), demonstrando um comportamento pH-dependente. Esse comportamento pode ser relacionado à influência do pH no grau de ionização da gelana, *i.e.*, sendo a goma gelana um polímero aniônico, ao entrar em contato com meio ácido, os grupos carboxílicos permanecem na forma protonada, levando a interação eletrostática das cadeias poliméricas, as quais se tornam mais unidas e, portanto, dificultam a penetração de líquidos e a consequente dissolução e difusão das moléculas de fármaco (PREZOTTI *et al.*, 2014; FERRARI *et al.*, 2013; MULHBACHER *et al.*, 2004).

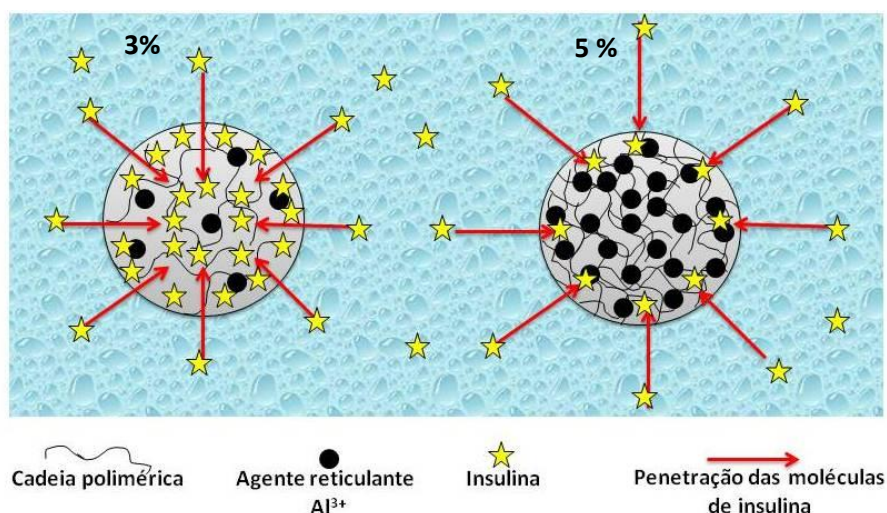
Um efeito *burst* de liberação foi observado para todas as amostras em meio ácido, sendo que nos primeiros 15 minutos de ensaio (Tab. 23) verificou-se uma importante diferença nas taxas de liberação da INS a partir das diferentes amostras. A menor liberação foi observada para as MP 153 (revestidas e não revestidas) (12,58 e 13,63%, respectivamente), enquanto as maiores taxas de INS liberada foram para as amostras obtidas com maior concentração de reticulante (IN155 e IN205).

Além disso, Nayak e colaboradores (2014) relatam em seus estudos que a liberação do fármaco no estágio inicial do ensaio pode estar relacionada ao fármaco que se encontra adsorvido à superfície das MP. Nesse sentido, acredita-se que o comportamento relatado acima, muito provavelmente se deve a uma maior quantidade de INS adsorvida na superfície das partículas reticuladas a 5%, a qual pode ser liberada mais rápida e facilmente em relação às MP com menor grau de reticulação (3% de AlCl_3), para as quais a maior parte da INS deve se encontrar encapsulada no interior da

matriz polimérica, fato que deve ter contribuído para a menor liberação no tempo inicial de 15 min de ensaio.

Acredita-se que a localização da INS na superfície ou no interior das micropartículas tenha relação com o método de carregamento utilizado (método de imersão) e a concentração de agente reticulante empregado. Quando o carregamento ocorreu em associação com 5% de AlCl_3 , a reticulação mais extensa da estrutura polimérica não deve ter possibilitado a penetração das moléculas de INS em regiões mais internas da partícula e uma grande parte do fármaco permaneceu adsorvido à superfície. Contrariamente, a reticulação mais branda ocorrida quando da utilização de 3% de AlCl_3 deve ter permitido uma maior e mais facilitada penetração do fármaco na partícula (Fig. 43).

Figura 43 - Localização da INS em MP reticuladas com diferentes concentrações de cloreto de alumínio (3 e 5%).



FONTE: MENEGUIN, 2015.

Verificou-se, ainda, que as amostras que apresentaram as menores taxas de liberação ao término do estágio em meio ácido (120 min) foram as amostras CIN155 e CIN205 (31,45 e 31,46%, respectivamente) ($p > 0,05$), para as quais o maior controle das taxas de liberação foi atribuído a presença do revestimento, o qual garantiu um controle adicional associado à estrutura polimérica mais reticulada e estável obtida com a mais alta concentração de cátions.

Em tampão fosfato pH 7,4, todas as amostras apresentaram maiores taxas de liberação da INS e, durante os primeiros 30 minutos de ensaio, verificou-se um efeito

burst, o qual pode ser relacionado com a ionização dos grupos carboxílicos de ambos, o núcleo e o revestimento, os quais são compostos por polímeros aniônicos, que promove a repulsão das cadeias e dilatação da rede, favorecendo a entrada de água no sistema (MENEGUIN et al., 2014), a difusão e dissolução das moléculas de fármaco (SOARES, 2011).

Essa expansão da rede polimérica que dá origem a uma estrutura mais frouxa e móvel também está relacionada com o deslocamento e sequestro dos íons Al^{3+} , exercidos pela ação dos íons Na^{+} e fosfato presentes no tampão fosfato (NAYAK et al., 2014).

Além dos fatores citados acima, quando a INS entra em contato com um meio de pH mais elevado que seu ponto isoelétrico ($pI=5,3$) sua carga se torna negativa, havendo repulsão eletrostática com a gelana que é um polímero aniônico, facilitando a sua liberação (ZHANG et al., 2011b).

Interessantemente, após a ocorrência do efeito *burst* em tampão fosfato pH 7,4, as taxas de liberação da INS sofreram pequena alteração durante os 210 min restantes de ensaio, havendo um aumento de INS liberada de, no máximo, 6,26% e 14,15% para as MP revestidas e não revestidas, respectivamente. Uma possível reorganização estrutural do sistema após o contato com o meio entérico simulado pode ter permitido maior controle das taxas de liberação do fármaco, demonstrado pela região de platô no perfil de liberação da INS (Fig. 42).

Nesse mesmo meio, as amostras que tiveram um menor percentual de liberação da INS foram, novamente, a CIN155 e a CIN205 (64,89 e 59,13%, respectivamente).

De maneira geral, as amostras não revestidas liberaram 100% de INS ao entrar em contato com tampão fosfato pH 6,8, verificando-se a ocorrência de um efeito *burst*. No entanto, as amostras revestidas foram capazes de prolongar a liberação por até 720 min (12 h), indicando a eficiência do revestimento desenvolvido.

Para todos os meios estudados, a amostra que ofereceu um maior controle das taxas de liberação da INS foi a CIN205, amostra revestida e reticulada com a concentração mais alta de cloreto de alumínio. Acrescenta-se a isso, que a concentração intermediária de polímero (2,0%) é responsável pela formação de uma camada de difusão espessa que reduz a liberação da INS. Além disso, essa massa de gelana é responsável pela construção de MP de estrutura densa, dificultando a difusão das moléculas de fármaco para o meio.

O comportamento pH-dependente verificado deve contribuir para um maior controle das taxas de liberação ao longo das diferentes porções do TGI (MAIOR *et al.*, 2008).

3.1.1 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* da INS

Os modelos matemáticos de Higuchi, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale, Weibull, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas foram aplicados aos dados de liberação e os coeficientes de correlação ajustado (r^2) foram determinados. Os valores dos coeficientes para os diversos modelos matemáticos estão apresentados nas Tabelas 25-30.

Tabela 25 - Coeficientes de correlação da INS liberada a partir de MP não revestidas obtidos através de diferentes modelos matemáticos para o meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2).

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS				
		IN153	IN203	IN253	IN155	IN205
Baker-Lonsdale	<i>K</i>	0,0007	0,0010	0,0005	0,0009	0,0010
	r^2	0,9542	0,6513	0,8570	0,5144	0,6005
Higuchi	<i>K</i>	5,7745	6,23	5,0016	6,0133	6,2656
	r^2	0,9598	0,5277	0,8011	0,3822	0,4703
Korsmeyer-Peppas	<i>K</i>	5,0574	39,0041	18,1455	49,24	44,6976
	r^2	0,9512	0,9797	0,9884	0,9999	0,9995
	<i>N</i>	0,5305	0,0707	0,1999	0,0059	0,0391
Primeira ordem	<i>K</i>	0,0097	0,0113	0,0076	0,0105	0,0114
	r^2	0,9353	0,1162	0,4154	0,0000	0,0301
Hixson- Crowell	<i>K</i>	0,0028	0,0030	0,0022	0,0028	0,0031
	r^2	0,9007	0,0000	0,3251	0,0000	0,0000
Weibull	<i>K</i>	73,60	53,38	715	50,55	314,2
	r^2	0,9919	0,9996	0,9929	0,9999	0,9992
	<i>B</i>	258	4,26	412,7	1,358	89,97

Tabela 26 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de *MP* revestidas obtidos através de diferentes modelos matemáticos para o meio ácido (HCl 0,1N; pH 1,2).

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS				
		CIN153	CIN203	CIN253	CIN155	CIN205
Baker-Lonsdale	<i>K</i>	0,0005	0,0010	0,0009	0,0003	0,0003
	<i>r</i> ²	0,8740	0,6513	0,5489	0,6052	0,6052
Higuchi	<i>K</i>	4,99	6,23	6,09	3,55	3,54
	<i>r</i> ²	0,8536	0,5277	0,4193	0,5481	0,5481
Korsmeyer-Peppas	<i>K</i>	8,51	39,00	47,45	22,37	22,37
	<i>r</i> ²	0,8455	0,9797	0,9998	0,9989	0,9989
	<i>N</i>	0,3765	0,0707	0,0108	0,0685	0,0685
Primeira ordem	<i>K</i>	0,0077	0,0113	0,0109	0,0045	0,0045
	<i>r</i> ²	0,6958	0,1162	0,0000	0,0000	0,0000
Hixson- Crowell	<i>K</i>	0,0022	0,0030	0,0029	0,0014	0,0014
	<i>r</i> ²	0,6375	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Weibull	<i>k</i>	46,08	53,38	125,7	364	364
	<i>r</i> ²	0,9984	0,9996	0,9991	0,9949	0,9949
	<i>b</i>	88,92	4,26	21,61	246,7	246,7

Tabela 27 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de *MP* não revestidas obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 7,4).

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS				
		IN153	IN203	IN253	IN155	IN205
Baker-Lonsdale	<i>k</i>	0,0014	0,0011	0,0014	0,0013	0,0013
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Higuchi	<i>k</i>	6,3893	5,91	6,3002	6,2047	6,19
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Korsmeyer-Peppas	<i>k</i>	72,2074	64,78	65,9961	69,1752	71,86
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>n</i>	0,0138	0,0201	0,0291	0,0165	0,0083
Primeira ordem	<i>k</i>	0,0216	0,0124	0,0177	0,0166	0,0168
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hixson- Crowell	<i>K</i>	0,0051	0,0030	0,0049	0,0048	0,0049
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Weibull	<i>K</i>	188,5	150,5	311,6	157,8	70,78
	<i>r</i> ²	0,9926	0,9546	0,9846	0,9904	0,9966
	<i>b</i>	255,9	183,8	301,2	139,3	51,40

Tabela 28 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de *MP* revestidas obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 7,4)

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS				
		CIN153	CIN203	CIN253	CIN155	CIN205
Baker-Lonsdale	<i>k</i>	0,0009	0,0011	0,0013	0,0008	0,0005
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Higuchi	<i>k</i>	5,65	5,91	6,19	5,26	4,57
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Korsmeyer-Peppas	<i>k</i>	54,10	64,79	66,10	56,48	36,72
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>n</i>	0,0472	0,0201	0,0252	0,0242	0,0827
Primeira ordem	<i>k</i>	0,0100	0,0124	0,0158	0,0083	0,0058
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hixson- Crowell	<i>k</i>	0,0025	0,0030	0,0046	0,0021	0,0016
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Weibull	<i>k</i>	297,3	153,8	263,7	215,2	485,7
	<i>r</i> ²	0,8562	0,9546	0,9758	0,9927	0,9027
	<i>b</i>	488,6	196,7	401	151,7	570,5

Tabela 29 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de *MP* não revestidas obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 6,8).

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS				
		IN153	IN203	IN253	IN155	IN205
Baker-Lonsdale	<i>k</i>	0,0022	0,0014	0,0034	0,0034	0,0022
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Higuchi	<i>k</i>	7,54	4,86	7,56	7,56	7,52
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Korsmeyer-Peppas	<i>k</i>	98,06	77,12	98,81	97,67	96,43
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>n</i>	0,0032	0,0346	0,0020	0,0043	0,0058
Primeira ordem	<i>k</i>	0,1617	0,0323	0,1752	0,1420	0,1316
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hixson- Crowell	<i>k</i>	0,0053	0,0022	0,0053	0,0053	0,0053
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Weibull	<i>k</i>	39,27	370,4	28,42	23,49	70,91
	<i>r</i> ²	0,9989	0,9350	0,9996	0,9997	0,9984
	<i>b</i>	16,92	392,9	12,15	31,60	32,37

Tabela 30 - Coeficiente de correlação da INS liberada a partir de MP revestidas obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 6,8)

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS				
		CIN153	CIN203	CIN253	CIN155	CIN205
Baker-Lonsdale	<i>k</i>	0,0027	0,0027	0,0018	0,0033	0,0022
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Higuchi	<i>k</i>	6,54	6,53	6,83	7,24	6,27
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Korsmeyer-Peppas	<i>k</i>	84,18	79,08	92,53	79,59	62,42
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>n</i>	0,0216	0,0333	0,0120	0,0361	0,0707
Primeira ordem	<i>k</i>	0,0776	0,0660	0,1074	0,0756	0,0454
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hixson- Crowell	<i>k</i>	0,0044	0,0044	0,0044	0,0052	0,0043
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Weibull	<i>k</i>	272,6	259,7	219,6	509,5	610,9
	<i>r</i> ²	0,8798	0,9255	0,9925	0,9545	0,8892
	<i>b</i>	432,8	238,2	247,2	420,1	411,1

A partir dos valores de coeficiente de correlação (*r*²), os modelos matemáticos que melhor se correlacionaram com os dados de liberação dos sistemas estudados foram o de Korsmeyer-Peppas e Weibull.

O modelo matemático de Weibull relaciona exponencialmente a fração do fármaco liberado, *M_t/M_∞*, em função do tempo *t* (Eq. 9) e deve ser aplicado aos dados dos primeiros 63,2% de liberação do fármaco (MANADAS et al., 2002; COSTA; LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b) \quad \text{Equação 9}$$

Onde *a* é o parâmetro de escala e *b* é o parâmetro de forma.

De acordo com o parâmetro de forma (*b*), as curvas de liberação podem ser classificadas como sigmoidal (*b*>1), exponencial (*b*=1) e parábola (*b*<1) (ARIFIN et al., 2006; COSTA; LOBO, 2001).

O valor de *b* também é um indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica, sendo que para valores de *b* ≤ 0,75 a liberação ocorre através de difusão Fickiana. Quando 0,75 < *b* < 1 têm-se difusão Fickiana associada ao

Caso-II e para $b > 1$, um mecanismo de liberação complexo (PAPADOPOULOU et al., 2006).

Já o modelo de Korsmeyer-Peppas se baseia na Lei das Potências e relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo (Eq. 10).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad \text{Equação 10}$$

Onde M_t representa a quantidade de fármaco liberada no tempo t , M_∞ é a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito, K é uma constante cinética e n é o expoente de liberação.

De acordo com o expoente n para as formas geométricas esféricas, o mecanismo de liberação pode ser caracterizado como:

- $n = 0,43$: Difusão Fickiana (caso-I);
- $0,43 < n < 0,85$: transporte não Fickiano (anômalo);
- $n = 0,85$: transporte caso-II;
- $n > 0,85$: transporte super caso-II

Em meio ácido (pH 1,2), para as amostras reticuladas com 3% de cloreto de alumínio (IN153, IN203, IN253, CIN153, CIN203), o modelo que melhor se correlacionou com os dados de liberação da INS foi o de Weibull (Tabs. 25 e 26). Como os valores de b para essas amostras foram sempre maiores que 1, conclui-se que a liberação ocorreu através de um mecanismo complexo, o qual envolve, simultaneamente, difusão, intumescimento e/ou erosão do polímero durante a liberação do fármaco (CURY et al., 2009; SIEPMANN; PEPPAS, 2000).

Os dados obtidos para as amostras IN205, CIN253, CIN155 e CIN205 se correlacionaram melhor com o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas. Uma vez que os expoentes de liberação (n) foram sempre menores que 0,43 (0,0391, 0,0108, 0,0685 e 0,0685, respectivamente), o mecanismo de liberação pode ser classificado como difusão Fickiana (caso-I), no qual a liberação é controlada pela difusão das moléculas do fármaco segundo um gradiente de potencial químico.

A amostra IN155 apresentou os mesmos coeficientes de correlação ($r^2=0,9999$) para Weibull e Korsmeyer-Peppas. No entanto, devido a liberação da INS a partir da

amostra IN205 (amostra também reticulada com 5% de AlCl_3) ter seguido o modelo de Korsmeyer-Peppas, este também será assumido para a IN155, sendo que o valor de $n=0,0059$ também o classifica como difusão Fickiana (caso-I).

De acordo com os valores da constante cinética de liberação (k) em meio ácido, valores reduzidos de k foram observados para as MP revestidas CIN155 e CIN205, indicando que para essas amostras a velocidade de liberação da INS ocorreu de maneira mais lenta em relação às demais, o que está de acordo com os menores quantidades de INS liberada (%) neste meio após 120 min de ensaio.

Nos outros meios estudados, isto é, em tampão fosfato pH 7,4 e 6,8 (Tabs. 27-30) para todas as amostras, o modelo que retratou mais fielmente a liberação da INS foi o de Weibull, com os valores de b sempre maiores que 1, indicando que a liberação da INS foi controlada pelo intumescimento e/ou erosão do polímero, comportamento que está de acordo com a significativa absorção de líquidos que as MP sofreram em meios com pH elevados, os quais devem contribuir para o relaxamento das cadeias poliméricas e difusão das moléculas de fármaco.

O conjunto de resultados obtidos indica que os diferentes fatores, como o grau de reticulação, o intumescimento, a estrutura polimérica, a presença do revestimento e o pH do meio de dissolução exercem uma influência significativa sobre o controle da liberação do fármaco, de maneira que o maior grau de reticulação (5%), a concentração intermediária de gelana (2,0%) e a presença do revestimento na amostra CIN205 foi a condição que levou ao melhor controle das taxas de liberação da INS.

3.2 Liberação *in vitro* da INS usando células de fluxo contínuo (USP IV)

Os perfis de liberação *in vitro* da INS em células de fluxo contínuo a partir das amostras IN153, IN205, CIN153 e CIN205 são apresentados na Figura 44.

A Figura 44 e a Tabela 31 mostram que as MP CIN153, IN205 e CIN205 liberaram menores quantidades de INS em pH 1,2 (32, 37 e 18%, respectivamente) e pH 4,5 (14, 22 e 14%, respectivamente) do que em tampão fosfato com pH 6,8 (53, 40 e 67%, respectivamente), demonstrando um comportamento pH-dependente.

Esse comportamento está relacionado à influência do pH na ionização dos polímeros aniônicos, de maneira que, em meio ácido, seus grupamentos carboxílicos encontram-se protonados, levando à interação eletrostática das cadeias poliméricas, as quais se tornam mais próximas e dificultam a penetração de líquidos e, a consequente,

dissolução e difusão das moléculas de fármaco (FERRARI et al., 2013; MULHBACHER et al., 2004).

O comportamento acima está em concordância com as taxas de dissolução dos filmes livres de amido resistente/pectina em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (MENEQUIN et al., 2014), em que menores valores de dissolução dos filmes em meio ácido (24%) em relação ao tampão fosfato pH 7,4 (~45%) foram encontrados.

Figura 44 - Perfil de liberação *in vitro* da INS a partir de MP revestidas e não revestidas em meios com diferentes valores de pH (0 a 60 min pH 1,2; de 60 a 120 min pH 4,5 e de 120 a 480 min pH 6,8).

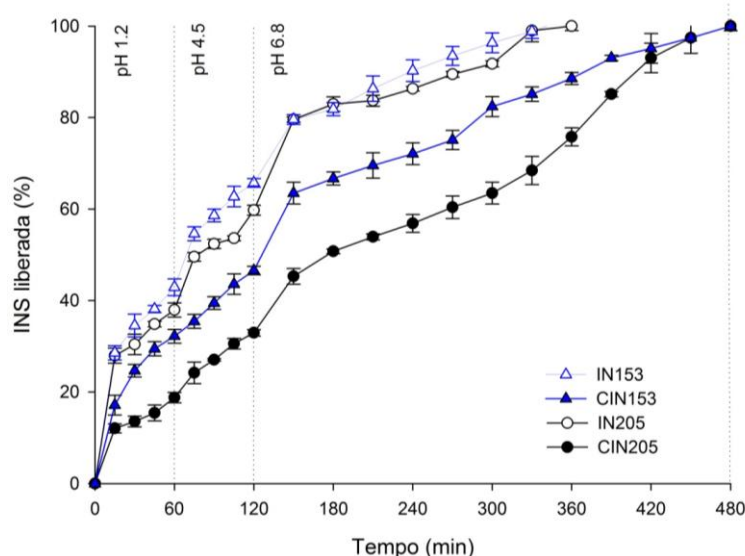


Tabela 31 - Porcentagem de INS liberada em meio ácido (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e tampão fosfato (pH 6,8).

Amostras	HCl (0,1 N; pH 1.2)	Tampão acetato (0,1 M; pH 4.5)	Tampão fosfato (0,1 M; pH 6.8)
IN153	42,92 ± 1,82	21,82 ± 0,93	34,28 ± 0,94
CIN153	32,22 ± 1,51	14,19 ± 2,36	53,44 ± 0,99
IN205	37,93 ± 1,53	22,81 ± 1,53	40,25 ± 1,07
CIN205	18,77 ± 1,13	14,34 ± 1,79	67,04 ± 0,71

Na concentração mais reduzida de goma gelana (1,5%) e Al^{3+} (3%) e na ausência de revestimento, a MP IN153 mostrou maiores taxas de liberação da INS em meio ácido (~42%) em relação aos outros meios, demonstrando que a baixa reticulação (física e iônica) das estruturas poliméricas geralmente está associada à construção de estruturas mais frouxas e com cadeias poliméricas mais flexíveis que facilitam o

processo de difusão das moléculas de fármaco. Maiti e colaboradores (2011) em seus estudos com MP de gelana encontraram comportamento semelhante de mais rápida liberação do fármaco quando menores quantidades de reticulantes foram utilizadas.

O efeito *burst* da INS no início do ensaio está principalmente relacionada à INS que se encontra adsorvida na superfície das MP (NAYAK et al., 2014), e a sua elevada solubilidade em baixos valores de pH. Contudo, esse efeito *burst* de liberação pode ser importante para controlar a glicemia posprandial, na qual se espera um efeito imediato.

A efetividade do revestimento foi evidenciada através das menores taxas de liberação da INS a partir de CIN153 e CIN205 com redução, em meio ácido e tampão acetato, de aproximadamente 25 e 35% para o primeiro e, 50 e 37% para o segundo, respectivamente (Tab. 32). Esses dados refletem a estrutura tridimensional mais cristalina e empacotada e a baixa solubilidade em água do amido resistente (DIMANTOV et al., 2004), em adição à habilidade da pectina formar uma camada viscosa espessa que dificulta a difusão das moléculas de fármaco (CURY et al., 2014).

Tabela 32 - Redução do percentual de INS liberada a partir de MP revestidas em relação às MP não-revestidas.

Amostras	HCl (0,1 N; pH 1.2)	Tampão acetato (0,1 M; pH 4.5)
CIN153	24.91%	34.96%
CIN205	50.51%	37.13%

As taxas de liberação da INS foram sustentadas até 480 min a partir das MP revestidas ($p > 0,05$), enquanto que 100% de INS foi liberada a partir de IN153 e IN205 em 330 e 360 min ($p < 0,05$). Além disso, o $t_{80\%}$ (tempo necessário para que ocorra 80% de liberação do fármaco) para as amostras revestidas CIN153 e CIN205 foi maior em relação às contrapartidas não revestidas, com valores em torno de 300 e 390 min, respectivamente ($p < 0,05$). Sobre essa diferença, acredita-se que a estrutura mais rígida obtida com as maiores concentrações de polímero e reticulante dificulta a saída de fármaco a partir da matriz polimérica. O $t_{80\%}$ das contrapartidas IN153 e IN205 foi o mesmo (aproximadamente 150 min).

3.2.1 Estudo da cinética de liberação da INS

Os modelos matemáticos de Higuchi, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale, Weibull, Primeira Ordem e Korsmeyer-Peppas foram aplicados aos dados de liberação e os coeficientes de correlação (r^2) foram determinados. Os modelos matemáticos e seus coeficientes são apresentados na Tabela 33.

Tabela 33 - Coeficientes de correlação (r^2) dos modelos matemáticos (Baker-Lonsdale, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, First order, Hixson-Crowell and Weibull) a partir de MP revestidas e não revestidas.

Modelos de liberação		Amostras			
		IN153	CIN153	IN205	CIN205
Baker-Lonsdale	<i>K</i>	0,0010	0,0006	0,0009	0,0004
	r^2	0,9756	0,9496	0,9520	0,8563
Higuchi	<i>K</i>	5,7889	4,6327	5,5517	3,9410
	r^2	0,9766	0,9900	0,9742	0,9234
Korsmeyer-Peppas	<i>K</i>	7,0203	2,9845	7,0913	0,8846
	r^2	0,9786	0,9627	0,9716	0,9823
	<i>n</i>	0,4666	0,5881	0,4386	0,7217
Primeira ordem	<i>K</i>	0,0102	0,0060	0,0089	0,0040
	r^2	0,9740	0,9802	0,9652	0,9558
Hixson- Crowell	<i>K</i>	0,0027	0,0016	0,0024	0,0011
	r^2	0,9543	0,9691	0,9516	0,9730
Weibull	<i>K</i>	98,59	99,39	98,58	124,90
	r^2	0,9714	0,9799	0,9678	0,9788
	<i>B</i>	1531	1342	939	678,30

Baseado nos valores de r^2 , verificou-se que as MP IN153 (0,9786) e CIN205 (0,9823) se correlacionaram melhor com o modelo de Korsmeyer-Peppas. Uma vez que os expoentes *n* variaram entre 0,43 a 0,85 para essas amostras, o mecanismo de liberação da INS pode ser classificado como não-Fickiano ou transporte anômalo, no qual os processos de difusão e relaxamento das cadeias poliméricas controlaram a liberação do fármaco.

Para as MP CIN153 (0,9900) e IN205 (0,9742) o modelo de Higuchi foi o que melhor se correlacionou com os dados de liberação, descrevendo a liberação do fármaco a partir de sistemas matriciais como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, no qual a difusão é dirigida pelo gradiente de concentração.

3.3 Comparação da liberação *in vitro* da INS através dos aparatos I e IV USP

Nesse sentido, o ensaio de liberação *in vitro* da INS a partir das MP revestidas e não revestidas foi realizado utilizando-se os aparatos de cesto (I) e de células de fluxo contínuo vertical (IV), a fim de verificar o poder discriminatório do equipamento nas taxas de dissolução *in vitro* da INS e o comportamento nos diferentes aparatos.

A Tabela 34 mostra reduzidas taxas de dissolução da INS após 60 min de ensaio em pH 1,2 em aparato IV em relação ao aparato I (18-42% contra 29-51%, respectivamente). Este comportamento, entre outros fatores, pode estar diretamente relacionado à hidrodinâmica de cada sistema, isto é, as células de fluxo contínuo quando preenchidas com pérolas de vidro e uma peróla de rubi no vértice, tal como executado neste estudo, apresentam um regime de fluxo estritamente laminar que melhor se aproxima do encontrado no TGI. Ao contrário, o aparato cesto apresenta regiões de fluxo turbulento, como ao redor do eixo rotário, ocasionando um intenso cisalhamento através da passagem do solvente sobre a superfície das partículas, o que pode levar ao aumento das taxas de liberação.

O mesmo comportamento foi observado no segundo estágio dos ensaios de liberação, o qual foi conduzido em meio que simula o pH entérico. Contudo, diferentes tampões foram utilizados (aparato I - tampão fosfato 0,1M; pH 7,4 e aparato IV - tampão acetato 0,1M, pH 4,5), e as menores taxas de liberação verificadas através do experimento em aparato IV podem estar relacionadas ao pH mais baixo, o qual deve ter ocasionado uma menor ionização do polímero e mais discreto relaxamento das cadeias, dificultando a liberação da INS.

Tabela 34 - Quantidade (%) de INS liberada após 60 min de ensaio nos aparatos I e IV em diferentes meios que simulam o pH gástrico e entérico.

	INS liberada (%) após 60 min em meio ácido		INS liberada (%) após 60 min em meio entérico	
Amostras	Aparato I	Aparato IV	Aparato I	Aparato IV
IN153	48,12	42,91	76,28	65,72
CIN153	44,62	32,22	72,45	46,56
IN205	51,91	37,93	74,28	59,75
CIN205	29,72	18,77	52,31	32,96

No entanto, um comportamento contraditório foi observado, no qual o aparato do tipo cesto propiciou maiores valores de $t_{80\%}$ (Tab. 35) e prolongou a liberação da INS por até 12 h, contra 8 h em aparato IV. Apesar das reduzidas taxas de liberação da INS

encontradas até 120 min de ensaio em células de fluxo contínuo, o aparato I deu origem a perfis de liberação com platôs, onde as taxas de liberação permaneceram constantes por um período considerável de tempo, ocasionando o seu prolongamento. Importante ressaltar que esse efeito não pode ter sido ocasionado pela saturação do meio, uma vez que ambos os testes foram realizados respeitando-se as "*sink conditions*". Nesse sentido, conclui-se que a diferença de pH dos meios empregados pode ter tido grande influência nesse comportamento.

Além disso, segundo Nicklasson e colaboradores (1991), o aparato IV pode ocasionar a liberação mais rápida do fármaco devido à habilidade do aparato em umedecer uniformemente a forma farmacêutica e criar um maior gradiente de concentração em sua volta. O mesmo autor ainda afirma que, o método de células de fluxo contínuo, pode ser uma valiosa ferramenta para detectar pequenas diferenças nas propriedades de liberação.

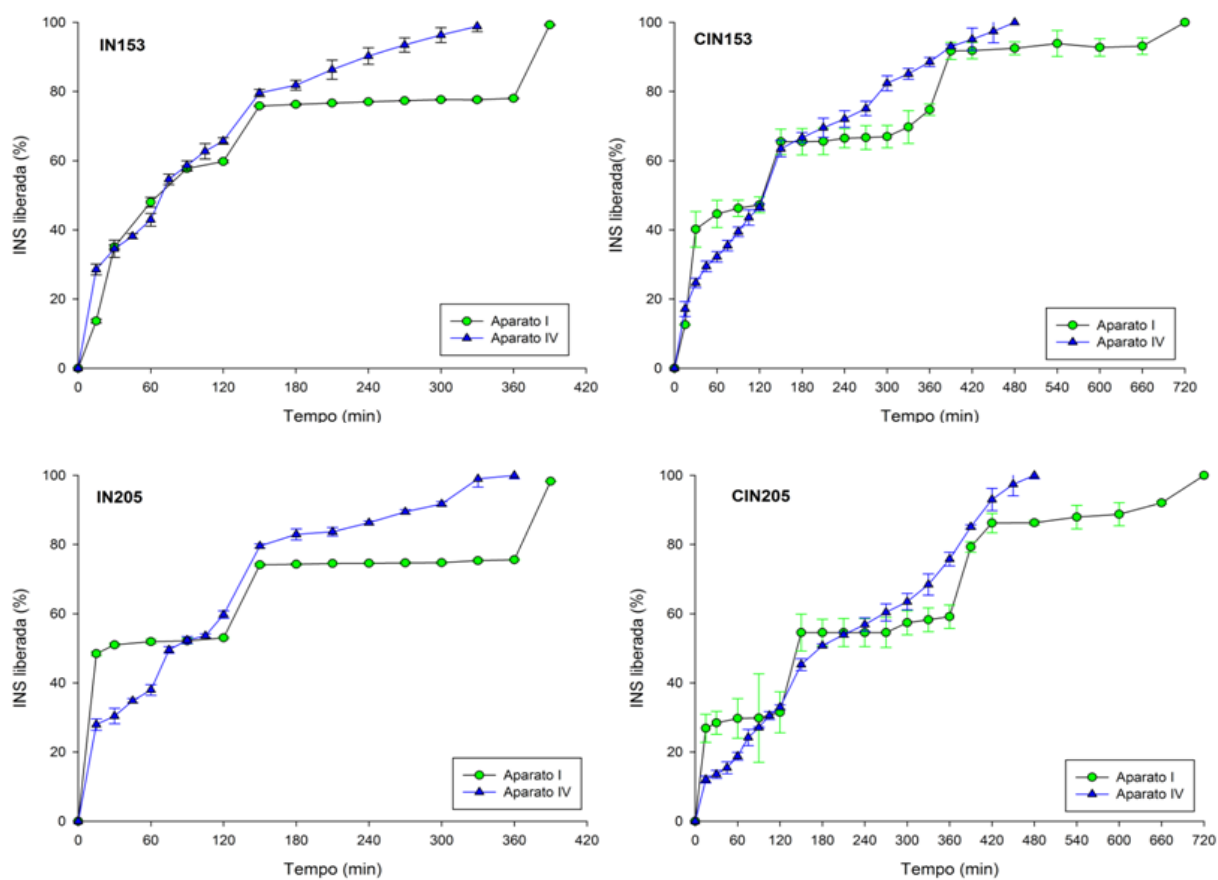
Tabela 35 - Valores do tempo requerido para que 80% da INS seja liberada ($t_{80\%}$) utilizando os aparatos de cesto (I) e células de fluxo contínuo (IV) (min)

Amostras	$t_{80\%}$ (min) Aparato I	$t_{80\%}$ (min) Aparato IV
IN153	360	150
CIN153	360	300
IN205	350	150
CIN205	390	375

Nesse sentido, concluiu-se que as células de fluxo contínuo vertical operando em sistema fechado foi um método mais discriminativo para as amostras em análise, em que menores taxas de liberação da INS puderam ser detectadas com eficiência, revelando um aumento gradativo das taxas de liberação, como evidenciado na Figura 45.

Esse maior poder discriminativo é bastante importante para fins de controle de qualidade, no entanto, o comportamento pH-dependente pode ser observado para ambos os aparatos.

Figura 45 - Comparação dos perfis de liberação *in vitro* da INS a partir de MP revestidas e não revestidas nos aparatos I e IV.





CAPÍTULO V

Estudos de Mucoadesão *ex vivo*

1. INTRODUÇÃO

A bioadesão, em especial a mucoadesão, é uma propriedade de polímeros hidrofílicos que apresentam a capacidade de intumescerem quando em contato com uma solução aquosa, contendo grupamentos químicos específicos capazes de formar numerosas ligações de hidrogênio. Essa estratégia vem sendo muito explorada no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, principalmente naqueles destinados à administração oral, bucal e nasal, já que permite um maior tempo de contato entre a forma farmacêutica e a mucosa, bem como o aumento do gradiente de concentração local e, conseqüentemente, podem melhorar a absorção e a biodisponibilidade (AMEYE *et al.*, 2002).

O processo de mucoadesão ocorre basicamente em duas etapas, sendo que na primeira são formadas ligações hidrofóbicas, eletrostáticas e de hidrogênio entre o polímero e a mucina e, em seguida, ocorre a difusão das cadeias do polímero na camada de muco (TAMBURIC; CRAIG, 1996). Assim, a mucoadesividade de um polímero está relacionada, principalmente, aos seus grupos funcionais polares que interagem com os grupamentos funcionais da mucina e à flexibilidade das suas cadeias. Dessa maneira, a reticulação pode reduzir essa propriedade, já que o número de grupos funcionais livres e a flexibilidade das cadeias são reduzidos (HUANG *et al.*, 2000; WITTAYA-AREEKUL *et al.*, 2006).

Neste trabalho, a mucoadesão foi avaliada a partir de mucosa gastrointestinal de porco em texturômetro, o qual foi programado para medir a força de destacamento entre o tecido animal e as amostras em estudo, correspondente à força mucoadesiva (F_{MA}). A importância deste análise foi avaliar se os sistemas desenvolvidos, baseados em goma gelana, a qual possui importantes mucoadesivas, são capazes de estabelecer interações mucoadesivas com o tecido animal, uma vez que uma das estratégias deste estudo foi o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos a fim de aumentar a permeabilidade da INS através dos enterócitos. Além disso, buscou-se avaliar o impacto dos processos de reticulação e revestimento na F_{MA} .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Cloreto de sódio (Synth); fosfato de sódio (Synth); hidróxido de sódio (Quimis); Tecido intestinal de porco; Fita dupla-face (3M).

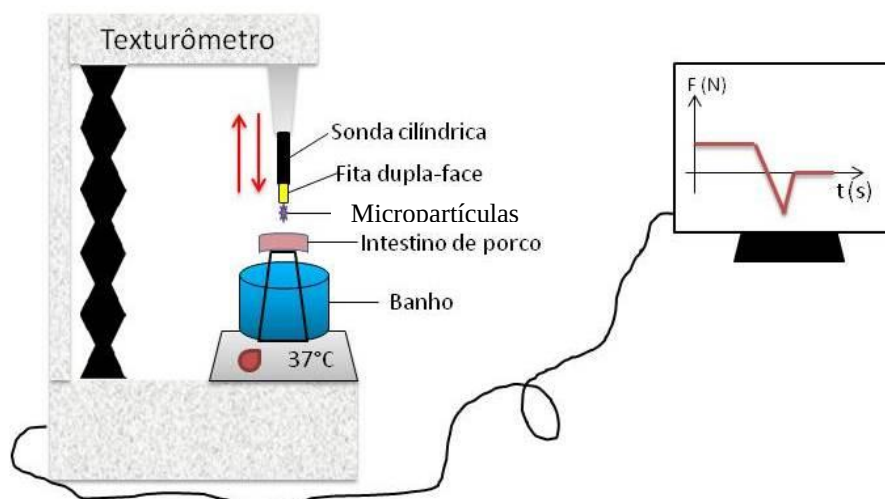
2.2 Principais equipamentos

Agitador magnético (Fanem[®], modelo 258); Analisador Universal de Textura TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems); balança analítica (Bel Engineering).

2.3 Ensaio de mucoadesão

A mucoadesão foi avaliada em um Analisador Universal de Textura TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems). Seções de mucosa gastrintestinal de porco (4cm²) foram colocadas sobre um suporte para teste de mucoadesão e as MP foram cuidadosamente fixadas a uma sonda cilíndrica de 10 mm com fita dupla-face, como ilustrado na Figura 46.

Figura 46 - Representação esquemática do ensaio para determinação da bioadesão *ex vivo*.



FONTE: MENEGUIN, 2014.

A sonda metálica foi movida perpendicularmente em direção à mucosa com velocidade constante de 10 mm min⁻¹ até força de compressão pré-determinada (0,5N). Para garantir o contato com a mucosa, a amostra foi introduzida 1 mm de profundidade

a partir da superfície da mucosa e mantida por 60 s sem a aplicação de força durante a fase de contato.

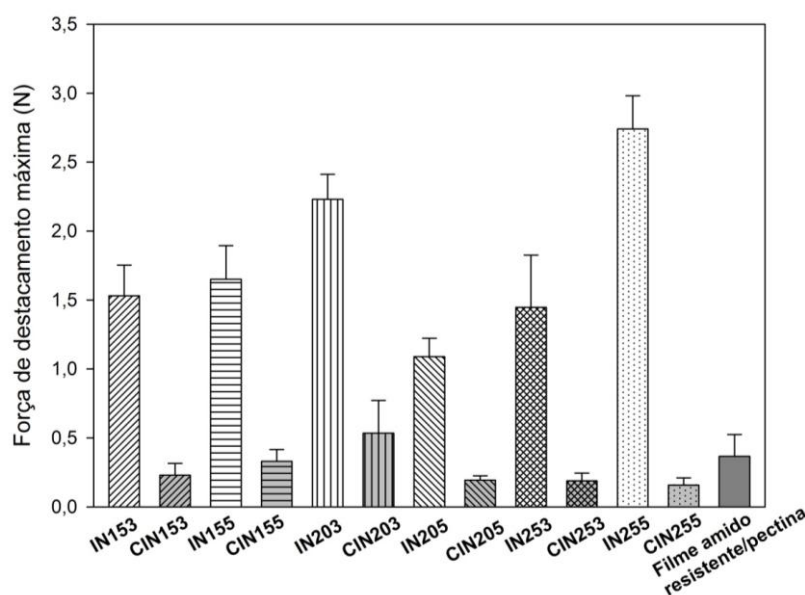
Em seguida, a sonda foi removida com velocidade de 20 mm min^{-1} e a força de mucoadesão (F_{MA}), correspondente à força de destacamento máxima (N) e o trabalho da mucoadesão ($N.s$), dados pela área sob a curva força *versus* tempo, foram determinados para cada amostra. As análises foram realizadas com as MP pré-hidratadas por 1min em tampão fosfato pH 6,8 a 37°C .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio *ex vivo* de bioadesão

O comportamento de mucoadesão das MP, determinado segundo os parâmetros de força de mucoadesão (F_{MA}), correspondente à força de destacamento máxima, e trabalho de mucoadesão (T_{MA}), o qual corresponde à energia total envolvida no processo de destacamento, está apresentado nas Figuras 47 e 48. As MP desenvolvidas neste trabalho exibiram elevados valores de F_{MA} , relativos às importantes propriedades mucoadesivas da goma gelana (PREZOTTI *et al.*, 2014; NARKAR *et al.*, 2010; SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005) e do amido resistente/pectina (CARDOSO, 2014).

Figura 47 - Valores de força mucoadesiva das MP revestidas e não revestidas de gelana e do filme livre de amido resistente/pectina (n=5, média $\pm$ desvio padrão).



Entre as diferentes amostras, verificou-se que as MP não revestidas possuem maior capacidade mucoadesiva do que as MP revestidas, evidenciado pelos maiores valores de F_{MA} ($p < 0,05$), os quais foram de 4 a 17 x maiores. Esse mesmo comportamento foi observado entre as amostras revestidas e o filme livre de amido resistente/pectina ($p < 0,05$) e, apesar das propriedades mucoadesivas do amido retrogradado já terem sido relatadas por Cardoso (2014), acredita-se que a estrutura mais enovelada do revestimento se apresenta como uma barreira contra a interpenetração das cadeias de gelana e mucina.

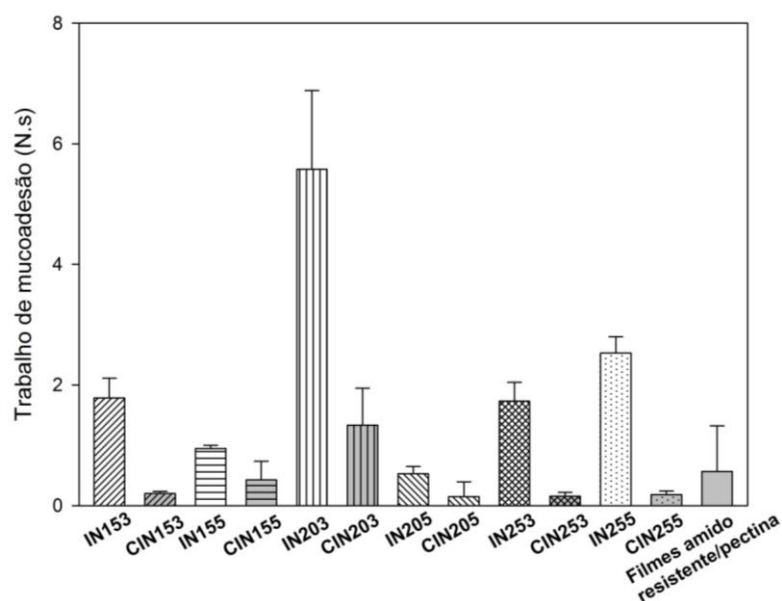
O comportamento acima relatado pode ser corroborado com os resultados dos ensaios *ex vivo* de bioadesão de MP mucoadesivas de amido retrogrado/gelana desenvolvidas por Cardoso (2014), os quais apresentaram menores valores de F_{MA} (0,65 a 1,10 N) do que os encontrados neste trabalho.

Diferenças estatisticamente significativas não foram observadas entre as MP revestidas ($p>0,05$). No entanto, a comparação entre as amostras não revestidas, revelou que entre as MP reticuladas com solução reticulante a 3%, a amostra IN203 foi a que apresentou maior F_{MA} ($p<0,05$), sendo que não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre as amostras IN153 e IN253. Apesar de nas amostras obtidas com 2,5% de gelana haver um maior número de cadeias poliméricas para interação com as cadeias da mucina, o que levaria a uma maior F_{MA} , essas cadeias devem, provavelmente, se encontrar mais enoveladas e consequentemente mais compactadas, restringindo sua mobilidade, ao contrário das amostras obtidas com 2,0% de gelana, em que uma flexibilidade adequada das cadeias deve ter sido alcançada e, consequentemente, uma maior interpenetração com as cadeias de mucina.

Já a F_{MA} das MP obtidas com solução reticulante a 5% foi maior para a amostra IN255, ou seja, aquela com maior concentração de polímero, enquanto que não houve diferença estatisticamente significativa entre as MP 155 e 205 ($p>0,05$). Devido ao maior grau de reticulação nessa série de amostras, possivelmente o número de grupos funcionais que interagem com a mucina foi mais determinante na mucoadesão do que a flexibilidade de suas cadeias.

A concentração da solução reticulante não influenciou a F_{MA} das amostras obtidas com 1,5% de gelana (IN153 e IN155) ($p>0,05$), no entanto, entre as amostras obtidas com 2,0 e 2,5% desse polímero, a F_{MA} foi maior na amostra reticulada com 3% (IN203) e 5% (IN255), respectivamente. Como dito anteriormente, na amostra IN203 ocorreu um efeito combinado entre o número de grupamentos funcionais que interagem com a mucina e a flexibilidade das cadeias poliméricas, enquanto que na amostra IN255 o número de sítios disponíveis para ligação com a proteína do muco devido à maior massa de gelana deve ter sido determinante para a mucoadesão.

Figura 48 - Valores de trabalho de mucoadesão (N.s) das MP revestidas e não revestidas de gelana e filmes livre de amido resistente/pectina (n=5, média $\pm$ desvio padrão).



O trabalho de mucoadesão (T_{MA}) (Figura 48) dado pela área sob a curva a partir do gráfico força *versus* tempo também foi maior para as MP não revestidas IN203 e IN255, significando que houve uma maior energia envolvida no processo de destacamento da amostra a partir da membrana biológica, o que indica que essas MP apresentam maior capacidade de interagir com a camada de muco intestinal.



CAPÍTULO VI

Estudos de Permeação Intestinal *ex vivo*

Técnica do Saco Intestinal Invertido

Técnica do Saco Intestinal Não-Invertido

1 INTRODUÇÃO

A INS desempenha um importante papel no controle da *Diabetes mellitus*. No entanto, devido ao seu alto peso molecular, hidrofília e carga de superfície, sua absorção no intestino é dificultada (LOPES et al., 2014).

Segundo Siccardi e colaboradores (2005), somente os peptídios hidrofílicos menores que 500 Da tem a habilidade de permear a membrana intestinal por difusão passiva paracelular. A INS, por sua vez, é um peptídeo com peso molecular de 5,8 kDa, o que nos permite concluir que sua absorção intestinal é escassa, fazendo-se necessário o desenvolvimento de sistemas que forneçam, ao mesmo tempo, proteção contra degradação enzimática, vetorização para o intestino e o estabelecimento de interações mucoadesivas para otimizar a permeação.

A INS pode permear a mucosa intestinal através de transporte paracelular, o qual envolve o transporte da INS através de complexos juncionais, transcitose através dos enterócitos, transcitose mediada por receptores e por via transcelular mediada pelas células M. Apesar da maioria dos sistemas desenvolvidos até o momento não se difundirem através do transporte celular, vários polímeros e outras substâncias conhecidas como promotores de absorção têm a capacidade de afetar as junções paracelulares, promovendo a sua abertura (LOPES et al., 2014).

Neste trabalho, os estudos de permeação foram realizados a fim de verificar a influência da microencapsulação e do revestimento de amido resistente/pectina na permeabilidade da INS através da mucosa intestinal excisado de ratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Cloreto de sódio (Quimis); cloreto de cálcio (Quimis); fosfato de sódio (Synth); glicose (Synth); tampão Krebs-Henseleit modificado (Sigma).

2.2 Principais equipamentos

Balança analítica (Bel Engineering); Espectrofotômetro UV-Visível (Hewlett Packard-Kayak XA); RP-HPLC (Merck-Hitachi).

2.3 Ensaio de permeabilidade *ex vivo* pelo método do saco intestinal invertido

A avaliação da permeabilidade intestinal da INS, utilizando como modelo a técnica do saco intestinal invertido (CINTO *et al.*, 2009), foi realizada para determinar o efeito das MP na eficiência do transporte de INS através da membrana intestinal. Todos os procedimentos utilizados seguiram os Princípios sobre cuidados e uso de animais de laboratório do "National Institute of Health (NIH)" e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 47/ 2012).

Ratos Wistar machos adultos (210 – 250 g), mantidos em jejum por 8h, foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (40 mg/kg) e o intestino delgado foi imediatamente dissecado, lavado com solução TC-199 a 10 °C e colocado em meio de cultura (TC 199) na mesma temperatura e oxigenado (O₂:CO₂ – 95:5), sendo o tampão TC-199 composto de NaCl (145 mM), KCl (4,56 mM), CaCl₂.2H₂O (1,25 mM), NaHPO₄ (5 mM) e glicose (10 mM).

O intestino foi cuidadosamente com auxílio de uma haste flexível (~ 2,5 mm de diâmetro) com sua extremidade protegida com um fino tecido de seda. Uma das extremidades foi fechada utilizando fio de sutura e o segmento intestinal preenchido com TC 199 contendo glicose. A outra extremidade do segmento intestinal foi então fechada com auxílio de fios de sutura, de forma que o comprimento final do segmento intestinal foi de 6 cm. Ao meio de incubação foram adicionadas as diferentes micropartículas (revestidas e não revestidas) contendo INS. A incubação foi realizada a 37 °C, sob agitação suave do sistema previamente oxigenado. Após o período de 90 min, as amostras presentes no interior do saco intestinal foram filtradas e a quantidade

de INS permeada através da membrana foi determinada por espectrofotometria de UV, em comprimento de onda de 271 nm.

2.4 Estudo de permeabilidade *ex vivo* da INS pelo método do saco intestinal não-invertido

Todos os procedimentos utilizados seguiram os princípios de cuidado e uso de animais de laboratório "National Institute of Health (NIH)" e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEMEA Auvergne (Clermont-Ferrand, França). Ratos Wistar adultos (300 ± 20 g) em jejum por 12-16 h foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (Imalgene 1000, Merial Laboratory, Lyon, France) na dosagem de 0,15 g/kg de peso corpóreo. O cólon de cada rato (10 cm) foi rapidamente removido e o lado serosal foi lavado com 10 mL de 0,9% de NaCl mantido a 37°C. A porção terminal de um dos lados foi fechada usando fio para sutura. A solução de INS (INS-Livre), dispersões de gelana a 1,5 e 2,0% (G1.5-INS e G2.0-INS, respectivamente), a dispersão de amido resistente/pectina a 5% (RS5-INS), e as MP (CIN153, CIN205, IN153 e IN205), todos contendo a mesma quantidade de INS, foram incubadas no interior do saco intestinal. A outra extremidade do intestino foi fechada e os sacos foram incubados em uma câmara para tecidos contendo 12 mL de tampão Krebs-Henseleit modificado, Sigma® (composição em mmol/L: 118,1 NaCl, 4,7 KCl, 2,2 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 MgSO_4 , 1,2 KH_2PO_4 , 25,0 NaHCO_3 , and 11,1 glucose, pH 7,5) a 37 °C e oxigenado (95% O_2 /5% CO_2) por 180 min (viabilidade máxima para tecidos de rato) (GARRAIT *et al.*, 2006). Em tempos pré-determinados, alíquotas foram retiradas com reposição de meio fresco à mesma temperatura. A quantidade de INS absorvida foi quantificada por CLAE. O coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) foi calculado de acordo com a Equação 11:

$$P_{app} (cm.s) = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A.C_0} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde dQ/dt é o fluxo de INS do lado mucosal para o lado serosal; C_0 , a concentração inicial de INS no compartimento luminal e A é a área da membrana, a qual corresponde à $A = \text{extensão} \times \text{diâmetro}$. As taxas de aumento de absorção (R) foram calculadas de acordo com a Equação 12.

$$R = \frac{P_{app}(\text{amostra})}{P_{app}(\text{controle})} \quad \text{Equation 12}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

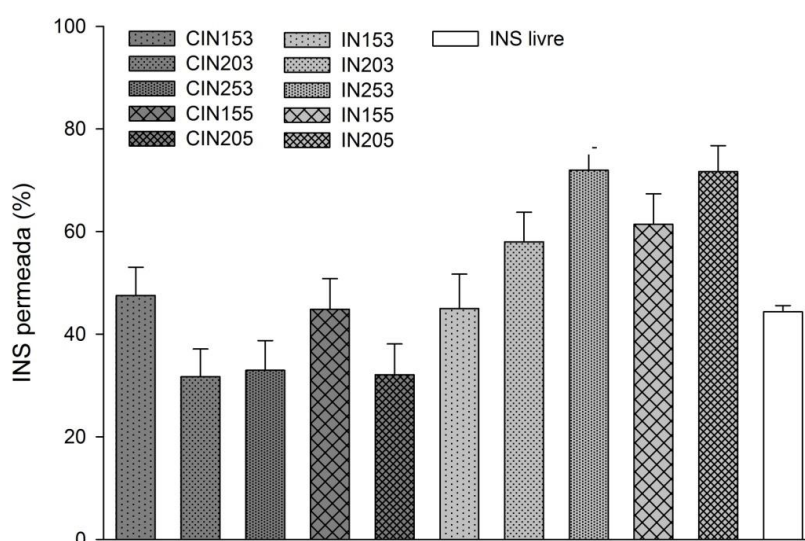
3.1 Ensaio de permeabilidade *ex vivo* pelo método do saco intestinal invertido

A Figura 49 mostra o comportamento de permeabilidade da INS a partir das MP revestidas e não-revestidas, a partir da qual foi possível observar uma expressiva permeação deste fármaco a partir dos sistemas desenvolvidos, podendo ser atingidos valores de até 72% de INS permeada, contra aproximadamente 44% de permeação do fármaco livre.

Entre as diferentes amostras e com exceção da amostra IN153 ($p > 0,05$), verificou-se que as MP não-revestidas promoveram o aumento da permeação da INS em relação ao fármaco livre ($p < 0,05$). No entanto, taxas de permeação semelhantes ou inferiores à da INS livre foram atribuídas à presença do revestimento nas amostras CIN153 e CIN155 ($p > 0,05$) e CIN203, CIN205 e CIN253 ($p < 0,05$), respectivamente.

Segundo Souza e colaboradores (2014) o revestimento representa uma barreira à difusão do fármaco, o qual ocasiona a sua baixa disponibilidade no meio para absorção, levando a menor permeação do fármaco através da mucosa. Os dados obtidos para o ensaio de liberação da INS a partir das MP (capítulo IV) corroboram essa ideia, já que as MP revestidas apresentaram taxas reduzidas de liberação da INS comparadas às amostras não revestidas.

Figura 49 - Valores de permeabilidade intestinal da INS a partir de MP revestidas e não revestidas pelo método do saco intestinal invertido.



Segundo Yadav e colaboradores (2014), as gomas naturais possuem importantes propriedades mucoadesivas, estabelecidas, principalmente, pela presença de alguns grupos funcionais capazes de interagir com a mucina por diferentes mecanismos. Assim, a maior permeação verificada a partir das MP não revestidas, pode estar relacionada não somente à ausência de revestimento controlador da liberação da INS para posterior permeação, mas também ao contato direto da goma gelana com a mucosa intestinal, o qual deve ter estabelecido um contato mais íntimo e por um tempo prolongado, facilitando a permeação do fármaco (Fig. 50). Adicionalmente, os polímeros aniônicos, a exemplo da gelana, possuem a capacidade de abrir reversivelmente as junções paracelulares, otimizando o transporte paracelular (CHEN et al., 2011).

Figura 50 - Fotografia de intestino de rato invertido e preenchido com TC-199 após ensaio *ex vivo* de permeação com micropartículas de gelana não revestidas (A) e revestidas (B).



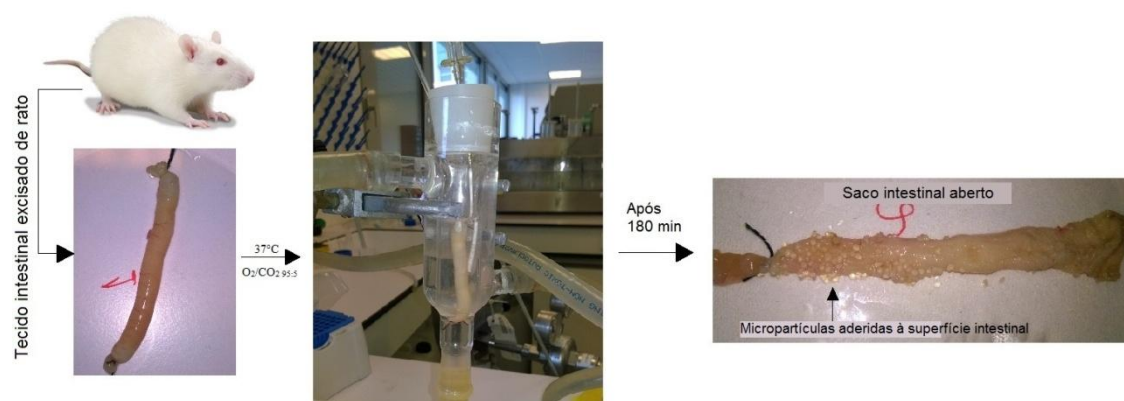
A influência da concentração polimérica na permeação da INS pode ser observada entre as amostras não revestidas e reticuladas com a concentração mais baixa de AlCl_3 (3%), em que a permeação ocorreu na seguinte ordem $\text{IN153} < \text{IN203} < \text{IN253}$ ($p < 0,05$), revelando que a presença de maiores quantidades de polímero em uma amostra disponibiliza uma maior quantidade de grupos funcionais para interação com a mucina ou a mucosa propriamente dita, facilitando a permeação do fármaco. No entanto, diferenças não foram verificadas entre as amostras reticuladas com 5% de AlCl_3 (IN155 e IN205) ($p > 0,05$).

Interessantemente, um comportamento distinto foi observado entre as MP revestidas, em que a quantidade de INS permeada aumentou com a diminuição da concentração de gelana, o que indica que a interpenetração com as cadeias de mucina não ocorre somente a partir dos polímeros presente no revestimento, mas também com aquele que compõe a MP. Nesse sentido, em concentrações reduzidas de gelana, uma flexibilidade adequada das cadeias poliméricas deve ser atingida, permitindo a transposição da camada geleificada formada pelo revestimento e o aumento da capacidade mucoadesiva.

3.2 Ensaio de permeabilidade *ex vivo* pelo método do saco intestinal não-invertido

A influência da microencapsulação e do processo de revestimento no transporte da INS através do epitélio intestinal foi avaliado usando tecido intestinal excisado de ratos (Fig. 51). Interessantemente, no final do ensaio e após a lavagem e abertura do saco intestinal, as MP permaneceram aderidas à mucosa intestinal, evidenciando sua elevada capacidade mucoadesiva, a qual deve contribuir para a permeação da INS devido ao estabelecimento de um contato mais íntimo entre o sistema e a mucosa e por tempo prolongado.

Figura 51 - Esquema ilustrativo do ensaio de permeação usando saco intestinal de rato não-invertido, o qual foi incubado em uma câmara para tecidos contendo tampão Krebs-Henseleit modificado em 37 °C e oxigenado (O₂/CO₂ 95:5) por 180 min.



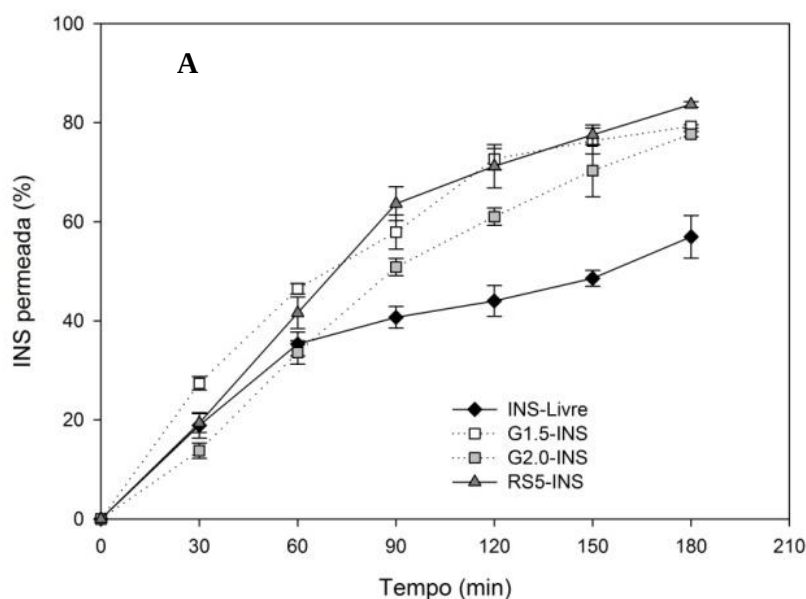
No início do ensaio (até 60 min), o comportamento das dispersões foi bastante semelhante (Fig. 52). Com o decorrer do tempo, a permeação da INS a partir das MP

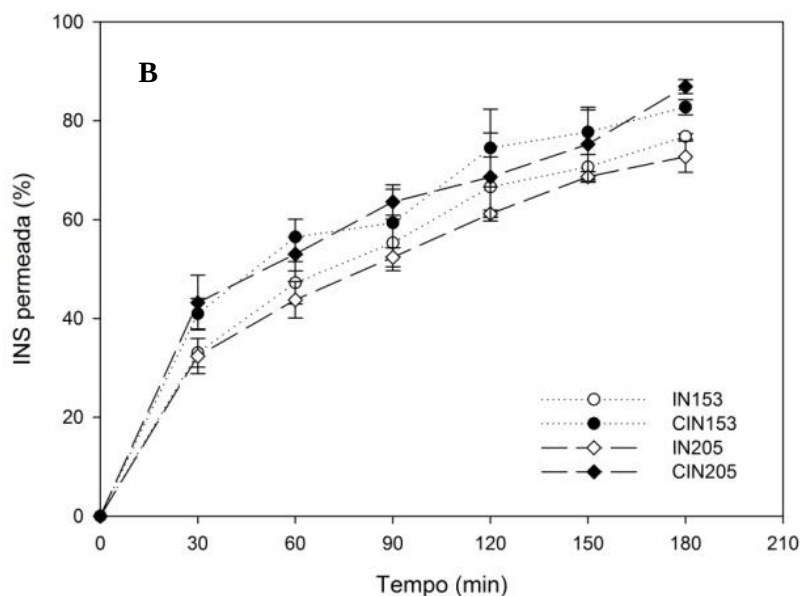
alcançou valores significativamente maiores (73-86%) ($p < 0,05$) do que aquele exibido para a solução de INS (~57%).

Entre as MP, as maiores taxas de INS permeada após 180 min de ensaio foi a partir de CIN153 e CIN205 ($p < 0,05$), possivelmente devido à ação do revestimento de amido resistente/pectina na abertura das junções paracelulares, uma vez que entre as dispersões poliméricas, somente RS5-INS foi capaz de reduzir os valores de resistência transepitelial elétrica (TEER) (Capítulo VII). Além disso, esses polissacarídeos em combinação com a gelana devem ter aumentado a interação do sistema com a mucosa, uma vez que polímeros naturais possuem importantes propriedades mucoadesivas, primeiramente, pela presença de alguns grupo funcionais capazes de interagir com a mucina por diferentes mecanismos (YADAV *et al.*, 2014). Adicionalmente, polímeros aniônicos têm a habilidade de abrir reversivelmente as JP, otimizando o transporte paracelular (CHEN *et al.*, 2011).

As diferentes concentrações de gelana e Al^{3+} usadas na preparação das MP revestidas não influenciaram a permeabilidade ($p > 0,05$), indicando que a presença do revestimento foi decisivo para a maior permeação da INS.

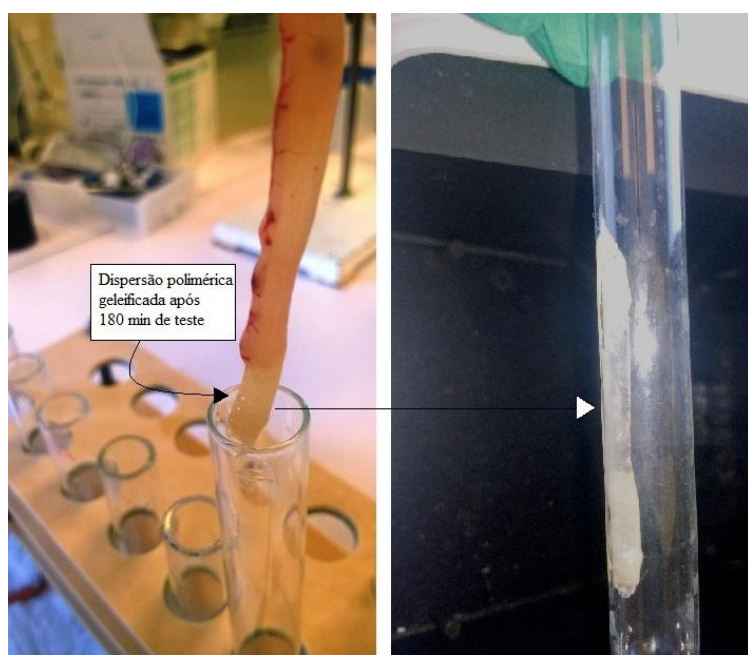
Figura 52 - Perfil de permeação da INS (%) através de tecido intestinal de rato não invertido após a introdução de solução de INS (INS-Livre), dispersões poliméricas (G1.5-INS, G2.0-INS, RS5-INS) (A), MP revestidas (CIN153 e CIN205) ou não revestidas (INS153 e IN205) (B).





Entre as dispersões, a RS5-INS favoreceu a permeação da INS, aumentando-a para aproximadamente 84%. Interessantemente, essas amostras mostraram a habilidade de geleificar quando em contato com o conteúdo luminal do intestino, como evidenciado na Figura 53.

Figura 53 - Fotografias da dispersão RS5-INS geleificada após o ensaio de permeação da INS.



O coeficiente de permeabilidade aparente P_{app} (Tab. 36) foi significativamente aumentado com valor de R atingindo 1,8 para MP, demonstrando que a microencapsulação da INS é eficiente no aumento da permeação intestinal. Os maiores valores de P_{app} e R para G2.0-INS e RS5-INS em relação às MP provavelmente está relacionado a mais rápida liberação da INS a partir dessas amostras, como resultado da formação de estruturas menos rígidas, as quais devem permitir a maior difusão das moléculas de INS. Igualmente, as cadeias poliméricas menos flexíveis das dispersões podem interagir mais facilmente com as cadeias de mucina, aumentando a mucoadesividade.

A relação não-linear entre INS permeada (%) e tempo (min) é um indicativo que a permeação da INS ocorreu por transporte paracelular e transporte transcelular (DÉAT-LAINÉ *et al.*, 2013).

Tabela 36 - Coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) e razão de aumento de permeação (R) da INS através de tecido intestinal excisado de ratos.

Amostras	P_{app} ($\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	R
IN153	46.23 ± 1.22	1.80
CIN153	31.45 ± 1.38	1.22
IN205	39.65 ± 4.61	1.54
CIN205	43.52 ± 4.72	1.69
INS-Livre	25.66 ± 1.49	1.00
G1.5-INS	3.19 ± 1.92	1.49
G2.0-INS	60.60 ± 2.57	2.36
RS5-INS	186.50 ± 28.16	7.26

3.3 Comparação dos ensaios de permeação *ex vivo* através dos métodos do saco intestinal invertido e não invertido

Os ensaios de permeação da INS através de tecido intestinal excisado de rato foram realizados por duas técnicas diferentes. Na técnica do saco intestinal invertido (método 1), o lado mucosal passa a ser o lado externo, o qual entrará em contato direto com as amostras durante incubação em tampão TC199 (20-30 mL), em recipiente de vidro, sob aquecimento e oxigenação específicos. Após 90 min de ensaio (viabilidade máxima para esse protocolo), o meio contido no interior do saco intestinal (lado serosal) é coletado, filtrado e a quantidade de fármaco presente é quantificada. A principal vantagem dessa técnica é a possibilidade de utilizar grandes volumes de meio a fim de

se respeitar as *sink conditions*, possibilitando o ensaio de sistemas contendo fármacos com solubilidade limitada.

Quando se utiliza o saco intestinal sem inversão (método 2), o lado mucosal continua sendo o lado interno do saco, onde as amostras são incubadas em um volume reduzido de tampão Krebs-Henseleit modificado (~1-3 mL). O intestino preenchido de meio e amostras é, então, incubado em câmara especial para tecidos (*Tissue chamber*) que permite a incubação em orientação vertical, contendo apenas 12 mL do mesmo tampão, aquecido e oxigenado. Nesse método, a passagem de fármaco se dá no sentido interior-exterior do saco, motivo pelo qual não há necessidade de rompimento do saco intestinal, o que permite múltiplas amostragens por até 180 min (viabilidade máxima para o protocolo desenvolvido) (Garrait et al., 2006).

A quantificação do fármaco permeado em diferentes tempos permite, ainda, a construção de um perfil de permeação, a partir do qual é possível calcular o coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) e estimar o tipo de transporte envolvido na permeação (difusão passiva, ativa, etc).

A comparação da permeação da INS através das duas técnicas empregadas neste estudo revelou um comportamento distinto, no qual através da técnica do saco intestinal invertido houve uma maior permeação da INS a partir das MP não revestidas, enquanto que através da segunda metodologia as maiores taxas de permeação da INS foram atribuídas às MP revestidas, o que pode ser detectado devido ao maior tempo de ensaio empregado, demonstrando que esta técnica mostra-se mais adequada para a análise de formas farmacêuticas de liberação prolongada.

Além disso, o método 2 revelou a importância do revestimento baseado em amido resistente/pectina no aumento da permeabilidade da INS através do tecido intestinal, podendo este ser atribuído às propriedades mucoadesivas dos polímeros empregados, bem como a sua capacidade de abrir reversivelmente as junções paracelulares.

Em relação à quantidade máxima de INS permeada, valores de aproximadamente 72 e 86% foram encontrados através das técnicas 1 e 2, respectivamente. O aumento de permeabilidade verificado pelo método do saco intestinal não invertido, muito provavelmente, deve-se não somente ao maior tempo de análise aplicado, mas também ao favorecimento do gradiente de concentração encontrado nessa técnica devido ao volume reduzido de meio, o qual acaba sendo

desfavorecido no método do saco intestinal invertido em razão do maior volume de meio utilizado.

Adiciona-se a tudo isso o fato de que a inversão de um tecido na presença de grande quantidade de tampão provoca a diluição do conteúdo luminal intestinal, tal como muco, proteínas, enzimas, microbiota, etc, razão pela qual o meio se torna menos biorelevante.

Em face ao exposto, concluiu-se que o método de permeação sem a inversão do saco intestinal foi mais apropriado para o estudo de permeação *ex vivo* da INS a partir de MP de gelatina revestidas com filmes de amido resistente/pectina.



CAPÍTULO VII

Estudos de Permeabilidade *in vitro* em
monocamadas de células Caco-2

Citotoxicidade

1. INTRODUÇÃO

Apesar da via oral ser mais conveniente em relação à segurança e aceitação do paciente, algumas características do TGI superior, tais como intensa acidez estomacal, elevada atividade enzimática e trânsito mais acelerado, associado ao baixo transporte de fármacos através das células intestinais, interferem na biodisponibilidade dos fármacos (MORISHITA; PEPPAS, 2006).

Na verdade, existem muitos fatores que afetam a biodisponibilidade oral, mas esta é principalmente controlada pela solubilidade do fármaco e as taxas de dissolução e permeabilidade, os quais determinam a velocidade em que o fármaco alcança os fluidos intestinais e atravessa as células epiteliais (AMIDON *et al.*, 1995).

Baseado nisso, Amidon e colaboradores (1995) desenvolveram um sistema, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), para estimar a biodisponibilidade oral *in vivo* de fármacos a partir de dados de solubilidade, os quais são dependentes da dosagem terapêutica e da potência do fármaco, e da permeabilidade. Nesse sistema de classificação, os fármacos podem ser divididos em quatro classes:

- Classe 1: Alta solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 2: Baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 3: Alta solubilidade e baixa permeabilidade e
- Classe 4: Baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

O transporte do fármaco através das células intestinais pode ocorrer por várias vias, incluindo absorção passiva por via transcelular ou paracelular, transporte ativo mediado por carreadores, difusão facilitada, transportadores de membrana, endocitoses mediada por receptor, entre outras. Sabe-se que fármacos lipofílicos são rapidamente absorvidos e distribuídos através das células intestinais, razão pela qual esses fármacos são transportados pela via transcelular. Contudo, fármacos hidrofílicos sofrem pobre e lenta absorção e distribuição nessas células, sendo transportados pela via paracelular através dos poros preenchidos com água (ARTURSSON *et al.*, 2012). Segundo Nellans (1991), devido à área superficial da membrana celular intestinal ser muito maior que o espaço paracelular, fármacos hidrofílicos podem também ser transportados parcialmente via transcelular.

Diferentes modelos têm sido utilizados para avaliar a permeabilidade intestinal de fármacos, entre eles modelos *in vitro*, *ex vivo* (tecidos excisados), *in situ* e físico-químicos. No entanto, o modelo baseado em células de adenocarcinoma colônico

humano (células caco-2) mostra muitas vantagens em relação aos outros, uma vez que essa linhagem celular sofre diferenciação e exibe características morfológicas e funcionais similares às dos enterócitos, como borda em escova bem definida, permitindo identificar o transporte do fármaco, bem como fazer uma predição da absorção do fármaco *in vivo* (DÉAT-LAINÉ et al., 2013; ARTURSSON et al., 2012).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Azul de tripano (Sigma); Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino, vitaminas, aminoácidos não-essenciais, glutamina (Corning); solução de antibiótico (penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 10 mg/mL, and anfotericina B 25 µg/mL), solução salina balanceada de Hanks (HBSS), tampão fosfato salino (PBS), tripsina-EDTA (Fisher Scientific), suportes permeáveis Transwell® (diâmetro 12 mm, 12 poços, tamanho dos poros 0,45 µm, área da membrana 1.12 cm²) (Corning).

2.2 Principais equipamentos

Balança analítica (Bel Engineering); cabine de segurança biológica 1300 series Class II tipo B2; incubadora de CO₂ Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ (Thermo Scientific™); RP-HPLC (Merck-Hitachi); microscópio invertido Leica DM IL LED (Leica Microsystems); voltímetro com eletrodos STX2, EVOMX World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA).

2.3 Cultura celular

Células de adenocarcinoma colônico humano (Caco-2) (ATCC, Rockville, MD) foram mantidas em meio de cultura Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 4,5 g/L de glicose e suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino, 2% (v/v) vitaminas, 2% (v/v) solução de aminoácidos não essenciais, 2% (v/v) L-glutamina e 2% (v/v) de uma solução antimicótica-antibacteriana, a 37°C em atmosfera umidificada de O₂/CO₂ (95:5, v/v). O meio foi trocado a cada 3 dias. Células nas passagens 25-30 foram semeadas com 1 x 10⁵ células/poço em suporte para cultura celular de polycarbonato Transwell® contendo 12 poços e o meio foi alterado diariamente. Todos os experimentos foram realizados após 21 dias após semeadura quando as células Caco-2 exibiram máxima diferenciação. Anteriormente a cada teste, o meio foi removido e as monocamadas de células foram lavadas com PBS (3x).

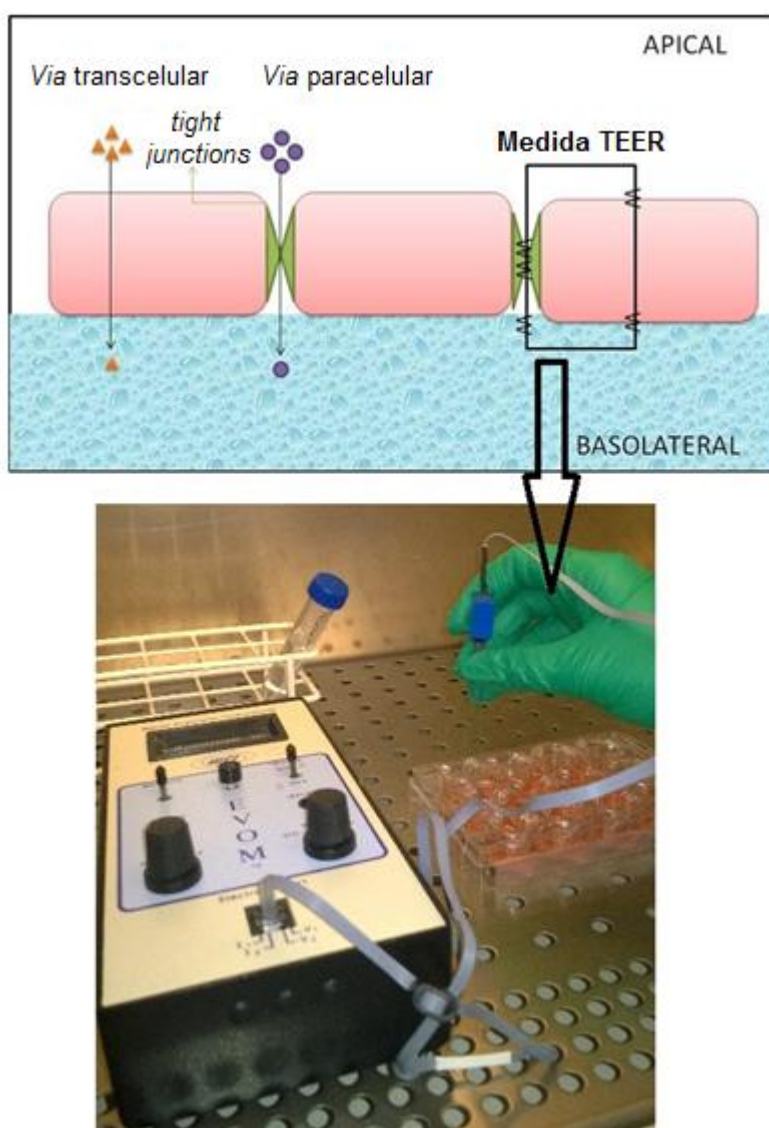
2.3.1 Resistência elétrica transepitelial (TEER)

As monocamadas de células Caco-2 foram lavadas com PBS (3 x) e, então, incubadas com solução balanceada de Hank's (HBSS), as quais mantiveram-se em

repouso em atmosfera de 95% O₂/5% CO₂ a 37 °C por 1 h, a fim de atingir o equilíbrio. A integridade das monocamadas foi avaliada através da medida de TEER em membranas de polycarbonato (tamanho do poro 0,45 µm e área do filtro de 1,12 cm²) de placas plásticas contendo 12 poços, com o auxílio de eletrodo STX2, EVOMX World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA). Para realização da medida, um eletrodo foi colocado no compartimento basolateral e outro no compartimento apical, de acordo com o ilustrado na Figura 54. As monocamadas celulares com TEER > 800 Ω.cm² foram utilizadas para os estudos de permeação.

Os valores de TEER foram verificados durante o estudo de permeabilidade por 120 min.

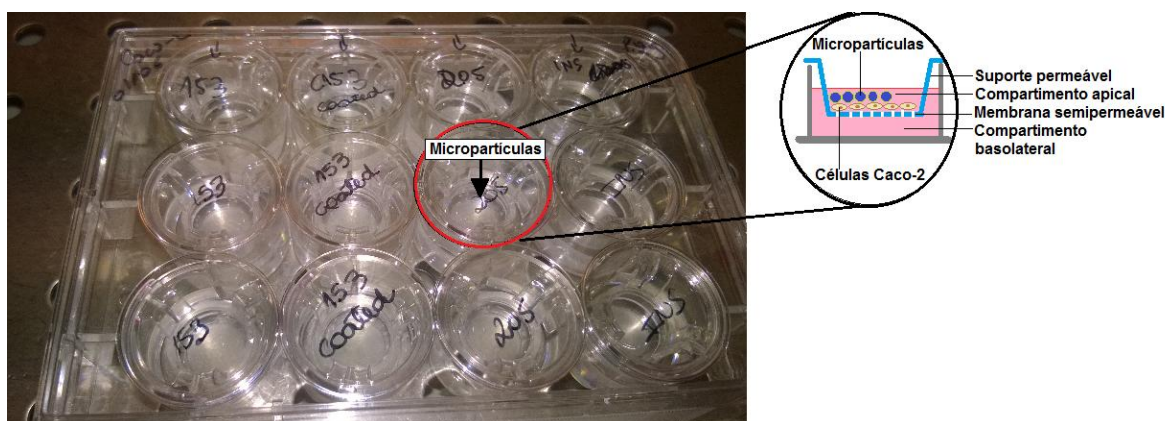
Figura 54 - Esquema da medida de TEER em estudos de permeabilidade utilizando monocamadas de células Caco-2.



2.3.2 Permeabilidade da INS em monocamadas de células Caco-2

Os estudos de permeabilidade em células Caco-2 foram realizados com solução de INS (INS-Livre), dispersões de gelana à 1,5 e 2,0% (p/p) (G1.5-INS e G2.0-INS, respectivamente), dispersão de amido resistente/pectina à 5% (p/p) (RS5-INS), MP revestidas (CIN153 e CIN205) e não revestidas (IN153 e IN205) contendo aproximadamente 1000 µg de INS. As amostras foram adicionadas ao compartimento apical contendo 500 µL de HBSS e as células foram incubadas a 37 °C por 120 min e (Fig. 55), em tempos pré-determinados, a passagem da INS para o compartimento basolateral foi detectada por CLAE. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 55 - Estudos de permeabilidade da INS a partir de MP incubadas em solução balanceada de Hank's (HBSS) usando monocamada de células Caco-2 em 12 suportes de cultura celular de polycarbonato Transwell®.



Os resultados foram expressos como coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) e taxa de aumento de absorção (R), calculados de acordo com as Equações 11 e 12 do capítulo VI, onde dQ/dt é o fluxo da amostra através da monocamada (µg/s), C_0 é a concentração inicial de INS no compartimento apical (µg/mL), e A é a área de superfície da monocamada (1,12 cm²).

Após 120 min de incubação, as amostras foram removidas do compartimento apical e as células foram lavadas com PBS (3x). Adicionou-se meio fresco a 37 °C a cada poço e as monocamadas permaneceram em repouso em atmosfera de 5% O₂ e 5% CO₂, em umidade relativa de 90%, por 48 h. Os valores de TEER foram monitorados nesse intervalo de tempo para avaliar a capacidade regenerativa das monocamadas.

2.3.3 Citotoxicidade dos polímeros e MP

O teste de exclusão do corante azul de tripano foi realizado a fim de determinar a citotoxicidade após aplicação das amostras em análise. Para isso, as células foram mantidas em contato com solução de INS (INS-Livre), dispersões de gelana a 1,5 e 2,0% (p/p) (G1.5-INS e G2.0-INS, respectivamente), dispersão de amido resistente/pectina a 5% (p/p) (RS5-INS), e MP revestidas (CIN153 e CIN205) e não revestidas (IN153 e IN205). Após 120 min, as amostras foram cuidadosamente removidas e as monocamadas lavadas com PBS 2 vezes. As células foram tripsinizadas e a suspensão celular obtida foi misturada com azul de tripano (0,1%; v/v, em PBS) e analisadas em microscópio invertido. As células que incorporaram o corante foram consideradas inviáveis, enquanto que àquelas que excluíram-no foram consideradas viáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudos de permeabilidade da INS utilizando monocamadas de células Caco-2

Nesse trabalho, a veiculação da INS - um fármaco classe III segundo a SCB (PATIL; DEVARAJAN, 2014) - em MP revestidas e com propriedades mucoadesivas foi explorada como estratégia para aumentar a permeação intestinal da INS e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. Nesse sentido, a determinação das propriedades de permeação da INS a partir das MP de gelana (revestidas e não revestidas) é fundamental para predizer o desempenho *in vivo*.

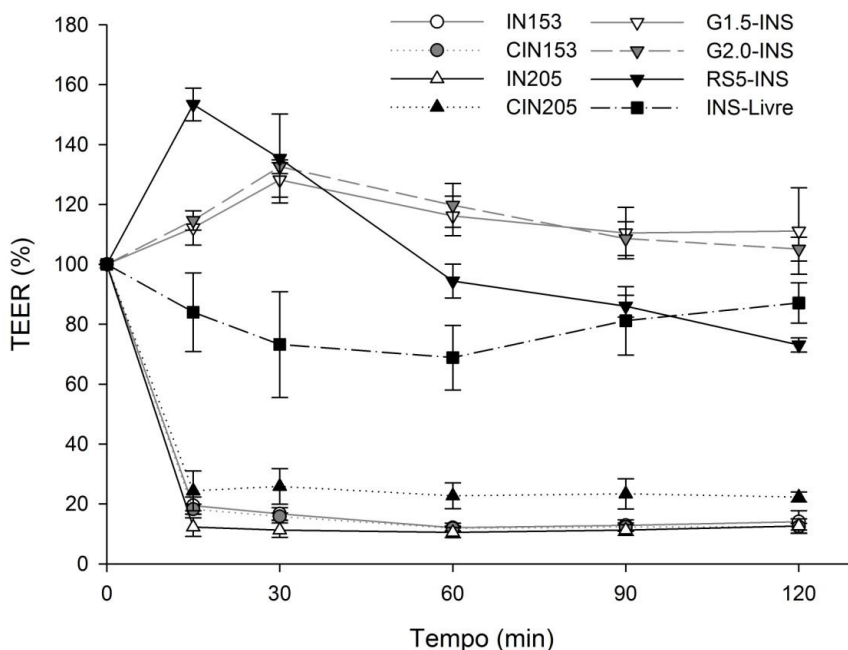
3.2 Medida da resistência elétrica transepitelial (TEER)

A medida de TEER é uma técnica bioelétrica valiosa para avaliar a integridade das monocamadas celulares, uma vez que expressa o quão unidas estão as junções paracelulares (*JP*) localizadas entre as células epiteliais. Assim, essa técnica fornece importantes informações sobre o estado da monocamada celular e, também, sobre o transporte paracelular de alguns fármacos (HILGENDORF et al., 2000).

Anteriormente ao início dos ensaios de permeabilidade, a TEER das monocamadas foi avaliada e valores acima de $800 \Omega \text{ cm}^2$ foram encontrados, indicando a integridade juncional das células caco-2 (DÉAT-LAINE et al., 2013).

A Figura 56 mostra o perfil da TEER das células incubadas com MP ou dispersões poliméricas durante o ensaio de permeação. Entre as dispersões, a RS5-INS reduziu significativamente os valores de TEER (aproximadamente 27%) após 120 min de teste, enquanto que nenhuma diminuição foi observada para G1.5-INS e G2.0-INS ($p > 0,05$) no mesmo tempo. Na verdade, a mistura de amido resistente/pectina deve formar uma rede polimérica mais empacotada e rígida, resultando em uma configuração que pode aumentar a interação com as proteínas e/ou receptores das *JP*, favorecendo sua abertura, como demonstrado para outros polímeros, como a quitosana (SANDRI et al., 2010). Essa abertura reversível das *JP* é uma abordagem promissora para o aumento do transporte paracelular.

Figura 56 - Perfil da TEER para o teste de permeabilidade para amostras IN153, CIN153, IN205 and CIN205, dispersões de goma gelana a 1,5 e 2,0% carregadas com INS (G1.5-INS e G2.0-INS, respectivamente), dispersão de amido resistente/pectina carregada com INS (RS5-INS) e solução de INS (INS livre).



Sabe-se que a abertura das *JP* pode ser alcançada de duas maneiras, *i.e.*, utilizando polímeros que interagem com as proteínas das *JP* ou receptores de superfície, causando sua separação, ou através da ação de quelantes de cálcio que ativam a quinase-C e, então, levam à ruptura das junções aderentes (outro tipo de adesão célula-célula) e das *JP* (SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005).

Uma significativa redução dos valores de TEER (78-88%) foi observada nos primeiros 15 min de ensaio de teste utilizando MP. Após esse período, os valores mantiveram-se constantes até o final do ensaio (120 min), demonstrando que o aprisionamento da INS nas MP poliméricas promoveu uma rápida e duradoura abertura das *JP*. Diferenças estatisticamente significativas não foram observadas entre as MP ($p > 0,05$), indicando que as diferentes concentrações de gelana e Al^{3+} utilizados na obtenção das MP não afetaram a funcionalidade das *JP*.

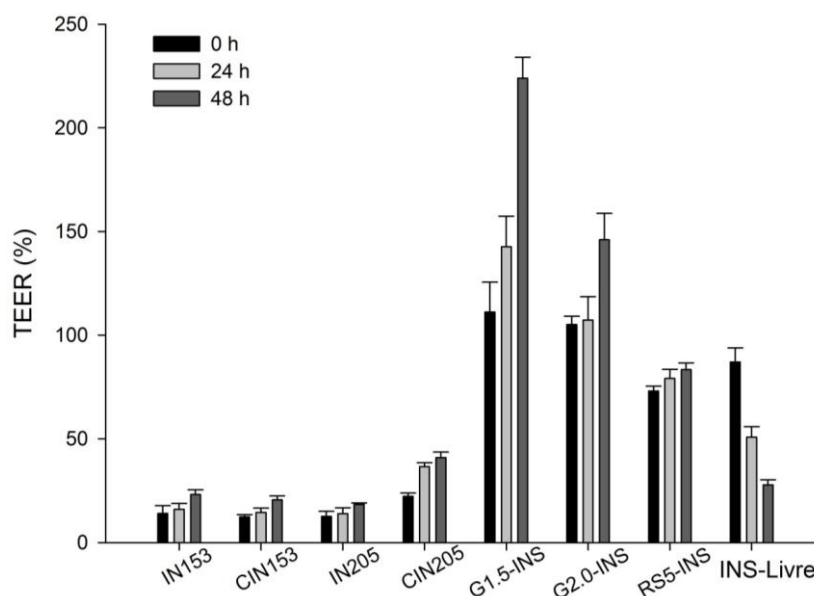
A maior influência das MP na abertura das *JP* em relação às dispersões poliméricas deve estar relacionada a fatores estruturais, como a estrutura tridimensional reticulada das MP, a qual deve originar padrões diferentes de interação com as proteínas juncionais, promovendo sua abertura. A possível atividade quelante de Ca^{2+} das MP de gelana previamente mencionada é outro mecanismo importante de abertura das *JP*, uma

vez que o cálcio é essencial para manter o contato intercelular e sua remoção torna a interação célula-célula mais frouxa com destruição das organizações multicelulares (LACAZ-VIEIRA, 1997).

As medidas de TEER também foram realizadas após 24 e 48 h do término do ensaio de permeabilidade a fim de verificar a capacidade regenerativa das células. A Figura 57 mostra uma tendência geral do aumento dos valores de TEER ao longo do tempo, o que revela que as amostras aplicadas não causam alterações permanentes de funcionalidade das células.

Para as MP IN153, CIN153, IN205 e CIN205 os valores de recuperação após 48 h foram de 64, 67, 50 e 86%, respectivamente, enquanto que para a dispersão RS5-INS esse valor alcançou somente 13%. Apesar das dispersões de gelana (G1.5-INS e G2.0-INS) não terem promovido a redução dos valores de TEER, observou-se seu aumento após 48 h, os quais foram de 95 e 43%, respectivamente, indicando o fechamento das *JP* com o tempo.

Figura 57 - Medidas de TEER (%) após 24 e 48 h após a remoção apical das seguintes amostras: IN153, CIN153, IN205, CIN205 (MP), G1.5-INS, G2.0-INS, RS5-INS (dispersões poliméricas) e INS-Livre (solução de INS).

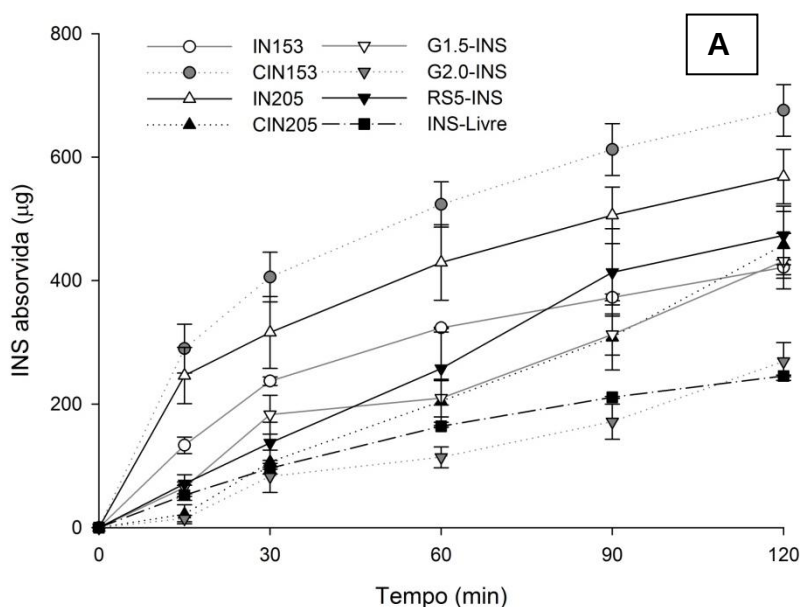


3.3 Permeabilidade da INS através das células Caco-2

A passagem apical-basolateral foi significativamente aumentada quando a INS foi transportada a partir das MP poliméricas, de maneira que as taxas de permeabilidade variaram de 42 a 67% (Fig. 58) contra apenas 25% da INS-Livre, e os valores de P_{app} (Tab. 37) alcançaram o valor de $48 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, o qual é considerado bastante elevado em comparação com o manitol, substância mais utilizada como marcadora do transporte paracelular, com valores de P_{app} de $0,12 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ em células Caco-2 (HILGENDORF et al., 2000). Esses dados estão de acordo com os reduzidos valores de TEER obtidos para MP.

As dispersões poliméricas G1.5-INS e RS5-INS também promoveram o aumento de permeabilidade da INS em aproximadamente 42 e 47%, e o maior transporte de INS verificado a partir da amostra RS5-INS ($p < 0,05$) pode estar relacionado ao fato dessa dispersão ter sido a única que promoveu a redução de TEER. No entanto, não foram observadas diferenças entre a dispersão G2.0-INS e a INS-Livre ($p > 0,05$).

Figura 58 - Permeabilidade da INS em μg (A) e % (B) após tratamento com as MP IN153, CIN153, IN205, CIN205 e as dispersões G1.5-INS, G2.0-INS e RS5-INS e a solução de INS (INS-Livre).



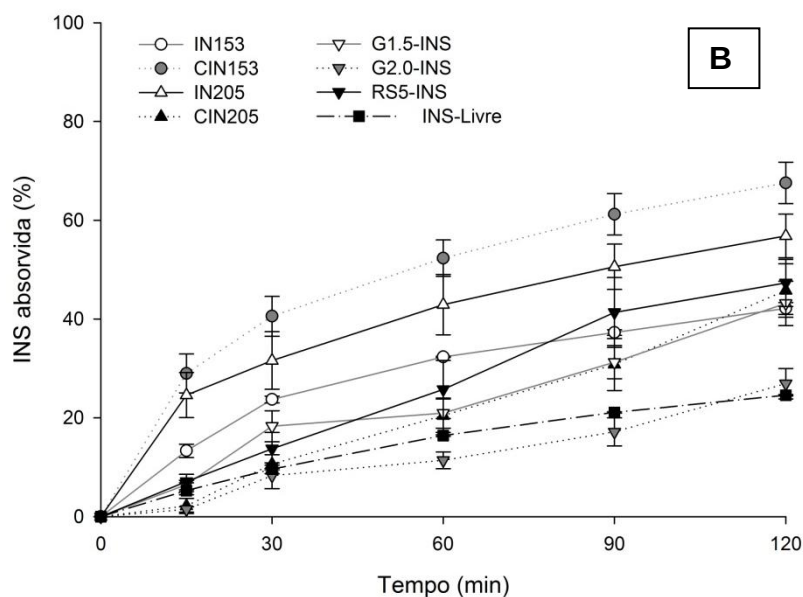


Tabela 37 - Valores de coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) da INS e razão de aumento de permeabilidade (R) a partir das MP IN153, CIN153, IN205 e CIN205, das dispersões poliméricas G1.5-INS, G2.0-INS e RS5-INS e da solução de INS (INS-Livre).

Amostras	P_{app} ($\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	(R)
IN153	32.60 ± 1.72	1.39
CIN153	46.45 ± 0.83	1.99
IN205	43.23 ± 3.83	1.85
CIN205	48.08 ± 7.32	2.06
G1.5-INS	38.52 ± 3.23	1.65
G2.0-INS	27.29 ± 2.48	1.19
RS5-INS	50.30 ± 5.97	2.15
INS-Livre	23.34 ± 0.09	1.00

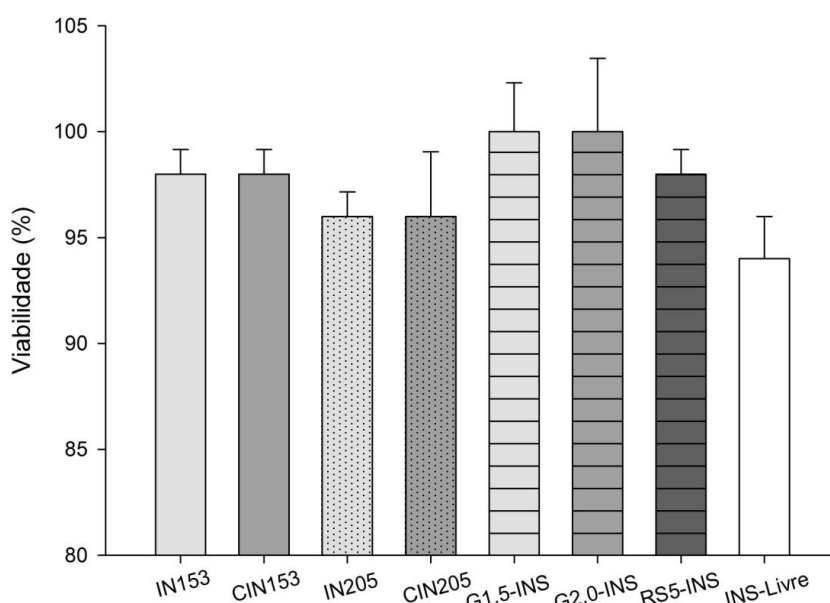
Entre as MP, verificou-se que para as amostras preparadas com 1,5% de gelana, a presença do revestimento (CIN153) favoreceu a permeação da INS (~67%) em relação a amostra não revestida (IN153) (~42%) ($p < 0,05$), mas a mesma tendência não foi observada para as amostras obtidas com a mais alta concentração de polímero, para as quais a amostra IN205 propiciou uma maior permeação da INS em relação a CIN205. Provavelmente, a associação de ambos o revestimento e a alta concentração de goma gelana e reticulante na amostra CIN205 pode ter dificultado a liberação da INS após 120 min de teste, levando a menor quantidade de INS disponível no compartimento apical para permear a monocamada de células Caco-2. Esses dados estão em acordo com os resultados do ensaio de liberação da INS *in vitro* (capítulo IV) no qual a MP CIN205 promoveu o maior controle das taxas de liberação da INS em ambos aparatos I e IV.

3.4 Citotoxicidade dos polímeros e MP

O teste de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul de tripano foi utilizado para analisar a citotoxicidade dos polímeros e MP. O ensaio revelou que as células Caco-2 apresentaram viabilidade acima de 95 % após 2 h de contato com as amostras (Fig. 59), indicando que ambos MP e dispersões poliméricas podem ser considerados biocompatíveis (DÉAT-LAINÉ *et al.*, 2013).

O menor valor de viabilidade celular encontrado foi para INS-Livre (~93%), e este pode ser corroborado com os dados de TEER após 48 h de remoção da amostra (Fig. 57), no qual as células que foram tratadas com a solução de INS tiveram uma queda progressiva nos valores de TEER, sugerindo o não fechamento das *JP* e/ou a não recuperação das células. Nesse sentido, os dados demonstram que o processo de microencapsulação permitiu a redução da citotoxicidade da INS.

Figura 59 - Valores de citotoxicidade (% viabilidade) após incubação das células Caco-2 com as MP IN153, CIN153, IN205 and CIN205 MP, dispersões G1.5-INS, G2.0-INS e RS5-INS or solução de INS (INS-Livre) por 2 h e avaliadas pela técnica de exclusão do azul de tripano.





CAPÍTULO VIII

Estudos de Atividade Hipoglicemiante Oral

in vivo da Insulina Veiculada em

Micropartículas

1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho, a *DM* foi induzida através de injeção intraperitoneal de aloxano (140 mg/kg) dissolvido em solução salina após jejum de 24 h, uma vez que nessa condição os animais ficam mais sensíveis ao aloxano (BOQUIST, 1977). O mecanismo de ação desta substância está relacionado com a formação de espécies de oxigênio reativo (ROS), os quais atacam principalmente o DNA das células beta-pancreáticas que são sensíveis ao estresse oxidativo (SAKURAI; OGISO, 1994). Após o ataque do DNA, ocorre a ribosilação de ADP, depleção de NAD^+ celular, resultando em dano das células beta (PARK et al., 1995). Após a indução da *DM*, os animais receberam solução de glicose 30% por 24 h com o intuito de evitar as complicações da hipoglicemia aloxânica (LENZEN, 1988).

O quadro diabético aloxânico sofre importantes alterações nas primeiras 24 h pós-indução, sendo considerado um processo tetrafásico. Nos primeiros 30 min, ocorre um grande estímulo da secreção insulínica que provoca uma hipoglicemia acentuada. Em seguida, é verificado um aumento da glicemia devido ao aprisionamento da INS nas células beta-pancreáticas, a qual dura até 4 h após a administração do fármaco. A terceira fase compreende a ruptura da membrana celular seguida de insulinemia severa, motivo pelo qual se faz necessária a administração de glicose ao animal visando contornar a hipoglicemia gerada. Na última fase, a lise celular é completada de maneira permanente, na qual são verificadas a hipoinsulinemia e hiperglicemia (DORNAS et al., 2006).

Dessa maneira, a efetividade das MP de INS preparadas com goma gelana e revestidas com amido resistente/pectina foi avaliada, baseado na sua eficiência em reduzir a glicose sanguínea de ratos diabéticos após a administração oral dos sistemas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Água destilada; aloxano (Sigma); cloreto de sódio (Synth); solução injetável de Insulina Novolin[®] R (Novo Nordisk).

2.2 Principais equipamentos

Balança analítica (Bel Engineering); glicosímetro de sangue Accu-Check[®].

2.2.1 Efeito *in vivo* da administração oral de micropartículas contendo INS

Baseado nos estudos de liberação *in vitro* e permeabilidade *ex vivo*, as MP CIN153, IN153, CIN155, IN155, CIN205 e IN205 foram utilizadas para estudos de liberação *in vivo*, de acordo com Kumar e colaboradores (2006) com pequenas alterações. Todos os procedimentos utilizados seguiram os Princípios sobre cuidados e uso de animais de laboratório do "National Institute of Health (NIH)" e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" (protocolo CEUA/FCF/CAr nº 47/ 2012).

Diabetes mellitus foi induzida experimentalmente em ratos Wistar machos (200-250g) pela injeção intraperitoneal de aloxano (140mg/kg) dissolvido em solução salina 0,9% após jejum de 24 h. Os níveis de glicose foram checados após 48h e os animais que apresentaram nível de glicose ≥ 300 mg/dL foram utilizados para as análises.

Assim, 48 ratos diabéticos foram selecionados e divididos aleatoriamente em 8 grupos de 6 ratos cada. Os animais diabéticos foram mantidos em jejum durante a noite anterior à administrações das formulações. Os animais do grupo controle negativo receberam MP sem INS, enquanto que o grupo controle positivo recebeu injeção subcutânea de solução de INS (Novolin R[®]) na dose de 100 UI kg⁻¹.

As MP carregadas com INS (grupo teste) na mesma dose do grupo controle positivo foram suspensas em água destilada e administradas através de uma adaptação da técnica de gavagem oral com o auxílio de tubo de polietileno (diâmetro 1,5 mm).

O nível de glicose no sangue foi verificado em intervalos pré-determinados durante 7 h, usando um glicosímetro de sangue ONETOUCH[®] Select Simple. A redução na concentração de glicose foi obtida da curva concentração de glicose no sangue *versus* tempo usando a Equação 13:

$$\% \text{ Reduzida} = \left(\frac{F - Pt}{F} \right) \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

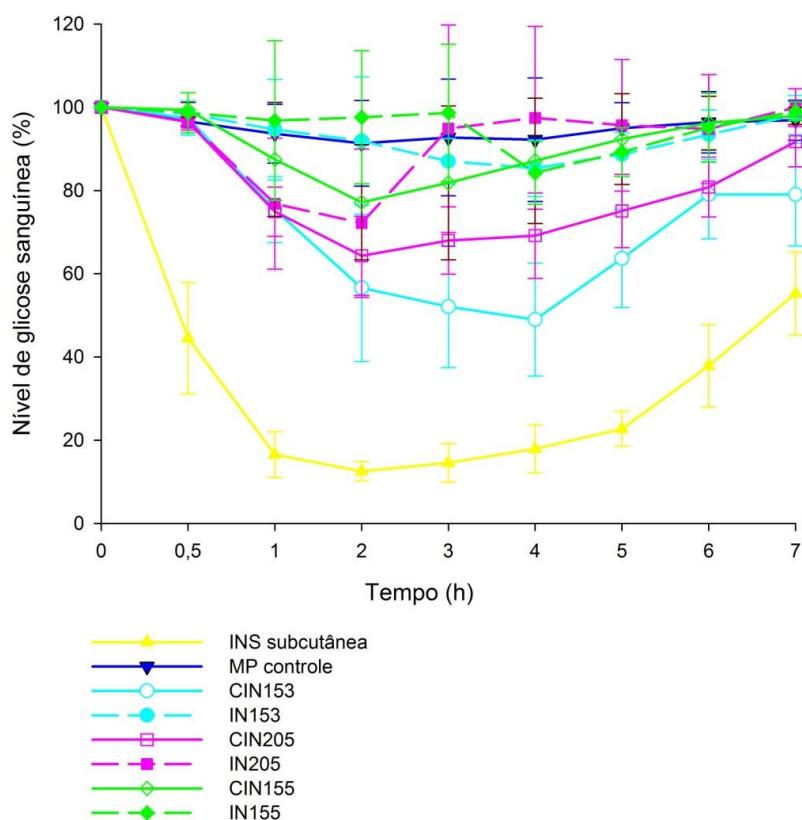
Onde F é o nível de glicose em jejum e P_t é o nível de glicose no sangue num tempo t depois da administração oral de micropartículas carregadas de INS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito *in vivo* da administração oral de micropartículas contendo insulina

A eficiência *in vivo* da INS carregada em MP de gelana e revestidas com filmes de amido resistente/pectina foi avaliada utilizando ratos machos Wistar diabéticos, através da medida do efeito hipoglicemiante produzido após administração oral do sistema. A resposta farmacológica foi monitorada durante 7 horas e a redução dos níveis de glicose (%) no sangue foi calculada para cada grupo em cada intervalo de tempo. Os dados são apresentados na Figura 60. O valor da linha base de glicose no sangue (nível inicial de glicose) foi assumido como 100% e todos os outros dados de níveis de glicose sanguínea *versus* tempo foram calculados como uma porcentagem da linha base.

Figura 60 - Efeito hipoglicemiante após administração oral de MP de gelana contendo INS (revestidas e não revestidas), MP de gelana controle (sem INS) e injeção subcutânea de solução de INS (100 UI/mL) em ratos diabéticos (n=6).



Um discreto aumento dos níveis de glicose sanguínea (aproximadamente 3%) foi verificado após a administração das MP controle (sem INS) e devido à baixa magnitude

desses valores em relação às amostras contendo INS, este foi atribuído ao estresse animal associado à administração das MP e sucessivas coletas de sangue (BUILDERS *et al.*, 2008; CELEK *et al.*, 2005).

Após 0,5 h da injeção de INS subcutânea, administrada como controle positivo, a porcentagem de redução de glicose no sangue foi de aproximadamente 55,49%, alcançando 87,48% após 2h. O efeito hipoglicemiante se manteve até o final do teste (44,73% em 7 h).

Os resultados indicaram que todas as MP carregadas com INS foram capazes de induzir e prolongar o efeito hipoglicemiante, em diferentes graus e alcançando o efeito máximo em diferentes tempos. Assim, as MP administradas oralmente, apresentaram uma significativa redução da glicemia, a qual ocorreu de forma gradual, alcançando o efeito máximo após 2h para as amostras CIN205 (35,70%), IN205 (27,85%) e CIN155 (22,86%) e após 4h para as amostras CIN153 (51,02%), IN153 (14,65%) e IN155 (15,76%).

Após 1 h da administração oral das MP, um importante efeito hipoglicemiante foi verificado para as amostras CIN153, CIN205, IN205, CIN155 (24,61, 25,08, 23,18 e 12,72%, respectivamente). Segundo Beals e Kovach (1997) esse comportamento pode ser atribuído ao esvaziamento gástrico precoce do fármaco para o intestino delgado e à mucoadesividade efetiva dos polímeros empregados.

Segundo Meyerovitch e colaboradores (1991), um efeito hipoglicemiante de 25% é considerado significativo e valores superiores a este foram alcançados pelas amostras CIN153, CIN205 e IN205, as quais foram consideradas as mais promissoras. Entre elas, pode-se notar que as MP revestidas promoveram maior redução dos níveis de glicose que as MP não revestidas. Contudo, a amostra IN205 também apresentou um efeito terapêutico importante, o que indica que a matriz polimérica protegeu a INS contra a degradação, controlando a sua liberação, o que favoreceu a biodisponibilidade. Além disso, quando em associação com o revestimento desenvolvido, um efeito sinérgico deve ter ocorrido, responsável pelo aumento de aproximadamente 22% do efeito terapêutico.

A amostra CIN153 foi a que reduziu a glicose sanguínea de maneira mais acentuada. Este fato pode ser explicado com base no mais baixo percentual de INS liberada nos primeiros 15 min de ensaio em meio ácido (aproximadamente 53,13% menor) (Capítulo IV) relacionado a maior preservação da INS contra degradação (Capítulo III).

A análise entre as amostras revestidas e não revestidas indicou que a amostra CIN153 causou um efeito hipoglicêmico de 39,09 a 81,91% maior que IN153, enquanto que para a amostra CIN205 o valor foi de 7,54 a 98,99% maior que IN205. Para a amostra CIN155 a redução da glicemia foi 22,33 a 92,54% maior que para IN155.

O comportamento acima relatado pode ser atribuído à presença do revestimento de amido resistente/pectina, o qual é capaz de oferecer uma proteção adicional à INS encapsulada na matriz polimérica contra ataques enzimáticos e ambientes com valores de pHs extremos (como o ambiente gástrico), já que o amido resistente é digerido somente pelas enzimas bacterianas produzidas na porção terminal do intestino (HTOON *et al.*, 2010).

Além disso, o revestimento desenvolvido foi responsável por reduzir o percentual de INS liberada nos diferentes meios (capítulo IV), especialmente em meio ácido, no qual essa redução foi 8,85 a 41,55%, o que deve ter contribuído para a proteção da INS neste meio e otimização da resposta terapêutica.

Estudos precedentes de digestão enzimática *in vitro* de filmes livres de amido resistente/pectina confirmaram a baixa suscetibilidade à digestão pela enzima α -amilase pancreática (3,90%) devido ao alto teor de amido resistente no filme retrogradado (96,10%) (MENEQUIN *et al.*, 2014).

Ao término do ensaio (após 7 horas), ainda foi possível observar algum efeito hipoglicemiante, sendo que para a amostra CIN153 esse valor ainda foi de 10,27%.



CAPÍTULO VII

Conclusão Geral

1. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de MP baseadas em goma gelana reticulada e revestidas com filmes de amido resistente/pectina permitiu a modulação das propriedades físico-químicas e de liberação, bem como da interação biológica da INS, de modo que o sistema desenvolvido representa uma estratégia promissora para a administração oral dessa proteína.

O processo de obtenção das MP através do processo de geleificação ionotrópica utilizando polissacarídeos naturais provenientes de fontes renováveis e evitando o uso de solventes orgânicos (*eco-friendly*) permitiu a obtenção de MP esféricas, com distribuição homogênea de tamanho e elevado teor de encapsulação (até 89%). A habilidade das MP inibirem a atividade enzimática da tripsina e quimotripsina foi demonstrada, de maneira que aproximadamente 80% da INS foi mantida intacta ao final de 120 min de experimento.

A elevada mucoadesividade dos sistemas foi demonstrada, de maneira que a menor capacidade mucoadesiva (de 4 a 17 x menor) das MP revestidas em relação às MP não-revestidas mostra-se favorável ao objetivo pretendido, uma vez que deve minimizar a adesão das MP nas porções superiores do TGI e permitir a mucoadesão na região colônica, após a biodegradação do revestimento através de enzimas produzidas pela microbiota colônica, contribuindo para o aumento da permeabilidade da INS nesse órgão.

O processo de revestimento permitiu a formação de um filme contínuo, sem formação de poros e/ou fissuras, dando origem a sistemas com maior estabilidade térmica. A eficiência do revestimento desenvolvido foi evidenciada através da mais efetiva proteção contra a atividade de enzimas proteolíticas, da redução do efeito *burst* de liberação em meio ácido e do prolongamento das taxas de liberação em tampão fosfato com diferentes valores de pH, adicionalmente a um importante efeito na abertura das junções paracelulares e otimização da permeabilidade da INS. Esses resultados indicam que o revestimento baseado em amido resistente/pectina pode ser explorado como uma importante estratégia tecnológica para o delineamento de sistemas de liberação cólon específica, particularmente para a veiculação de fármacos instáveis nas porções superiores do TGI e/ou de baixa permeabilidade.

O significativo aumento da permeabilidade da INS (30-43%) foi demonstrado através dos ensaios de permeação *ex vivo* em intestino de rato e *in vitro* em monocamadas de células Caco-2, o qual deve ser atribuído às propriedades

mucoadesivas dos polímeros empregados e à sua influência na abertura das junções paracelulares, otimizando o transporte paracelular. Além disso, os estudos de citotoxicidade demonstraram a biocompatibilidade dos sistemas estudados.

A elevada inibição enzimática e o aumento da permeabilidade indicam que os políssacarídeos empregados nesse estudo representam uma alternativa aos inibidores enzimáticos e promotores de absorção convencionais, os quais são tóxicos e atuam de forma inespecífica.

O estudo *in vivo* demonstrou a atividade hipoglicemiante por um período de até 7h e valores de até 50% de redução da glicemia em ratos diabéticos foram alcançados. Considerando que os testes foram realizados com a dose indicada para a via subcutânea, um ajuste de dose para a via oral pode permitir a melhoria do efeito terapêutico, aproximando-se ao atingido pela via subcutânea. Dessa forma, a veiculação oral de INS através do sistema proposto poderia representar senão uma alternativa terapêutica isolada, a possibilidade de uma terapia combinada, reduzindo a frequência de administração parenteral de INS e contribuindo significativamente para a qualidade de vida do paciente.

Baseado no conjunto de dados apresentados, os sistemas desenvolvidos podem ser considerados como uma nova plataforma tecnológica para administração oral de INS e de outras proteínas/peptídeos terapêuticos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTABROUCHAD, C.; DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. **STP Pharma Sci.**, v. 2, p. 365-380, 1992.

AGARWAL, V.; REDDY, I.K.; KHAN, M.A. Polymethacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: Preparation and in vitro dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 31-39, 2001.

AGNIHOTRI, S.A.; JAWALKAR, S.S.; AMINABHAVI, T.M. Controlled release of cephalixin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 249-261, 2006.

AKHGARI, A.; FARAHMAND, F.; GAREKANI, H.A.; SADEGHI, F.; VANDAMME, T.F. Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 307-314, 2006.

ALEXANDER, K. Dosage forms and their routes of administration. IN: HACKER, M.; BACHMANN, K.; MESSER, W. **Pharmacologie: Principles and Practice**. Elsevier, 2009, p. 9-28.

AMEYE, D.; VOORSPOELS, J.; REMON, J.P.; DEMEESTER, J.; DE SMEDT, S.C. Optimization of an in vitro procedure for the determination of the enzymatic inhibition potency of multifunctional polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 413-417, 2000.

AMEYE, D.; VOORSPOELS, J.; FOREMAN, P.; TSAI, J.; RICHARDSON, P.; GERESH, S.; REMON, J.P. Ex vivo bioadhesion and in vivo testosterone bioavailability study of different bioadhesive formulations based on starch-g-poly(acrylic acid) copolymers and starch/poly(acrylic acid) mixtures. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 173-182, 2002.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of "in vitro" drug product dissolution and "in vivo" bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, p. 413-420, 1995.

ANDERSON, J.M.; VAN ITALLIE, C.M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. **American Journal of Physiology**, v. 269, p. G467-G475, 1995.

ANDREO-FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, v.9, p.18-21, 1999.

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

ANGADI, C.S.; MANJESHWAR, L.S.; AMINABHAVI, T.M. Coated Interpenetrating Blend Microparticles of Chitosan and Guar Gum for Controlled Release of Isoniazid. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 52, p. 6399-6409, 2013.

ARBIT, E. The physiological rationale for oral insulin administration. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 6, p. 510–517, 2004.

ARBIT, E.; KIDRON, M. Oral insulin: the rationale for this approach and current developments. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 3, p. 562–567, 2009.

ARIFIN, D. Y.; LEE, L. Y.; WANG, C. H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1274–1325, 2006.

ARRANJA, A.; SCHRODER, A.P.; SCHMUTZ, M.; WATON, G.; SCHOSSELER, F.; MENDES, E. Cytotoxicity and internalization of Pluronic micelles stabilized by core cross-linking. **Journal of Controlled Release**, v. 196, p. 87-95, 2014.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p. 280-289, 2012.

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.

BABIKER, A.; DATTA, V. Lipoatrophy with insulin analogues in type I diabetes, **Archives of Diseases in Childhood**, v. 96, p. 101–102, 2010.

BABU, V.R.; PATEL, P.; MUNDARGI, R.C.; RANGASWAMY, V.; AMINABHAVI, T.M. Developments in polymeric devices for oral insulin delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, p. 403–415, 2008.

BABU, R.J.; SATHIGARI, S.; KUMAR, M.T.; PANDIT, J.K. Formulation of controlled release gellan gum macro beads of amoxicillin. **Current Drug Delivery**, v. 7, p. 36–43, 2010.

BAJAJ, I.B.; SURVASE, S.A.; SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S. Gellan gum: fermentative production, downstream processing and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, p.341–354, 2007.

BANERJEE, S.; SIDDIQUI, L.; BHATTACHARYA, S.S.; KAITY, S.; GHOSH, A.; CHATTOPADHYAY, P.; PANDEY, A.; SINGH, L. Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 198-206, 2012.

BANSODE, S.S.; BANARJEE, S.K.; GAIKWAD, D.D.; JADHAV, S.L.; THORAT, R.M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.1, p.38–43, 2010.

BANTING, F.G., BEST, C.H. The internal secretion of the pancreas. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 7, p. 251–266, 1922.

BARROSO, R.C.; ANJOS, M.J.; LOPES, R.T.; JESUS, E.F.O.; BRAZ, D.; CASTRO, C.R.F.; UHL, A. Analysis of matrix characterization by X-ray diffraction and synchrotron radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 65, p. 501-505, 2002.

BAVEC, A. (Poly)peptide-based therapy for diabetes mellitus: Insulins versus incretins. **Life Sciences**, v. 99, p. 7–13, 2014.

BEALS, J.M.; KOVACH, P. **Insulin**, in: D.J.A. Crommelin, R.D. Sindelar (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 10, Harwood Academic Publishers, Netherlands, 1997, p. 229–239.

BERNKOP-SCHNURCH, A. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins. *Journal of Controlled Release*, v. 52, p. 1-16, 1998.

BERNKOP-SCHÜRCH, A.; PINTER, Y.; GUGGI, D.; KAHLBACHER, H.; SCHÖFFMANN, G.; SCHUH, M.; SCHMEROLD, I.; DEL CURTO, M.D.; D'ANTONIO, M.; ESPOSITO, P.; HUCK, C. The use of thiolated polymers as carrier matrix in oral peptide delivery—Proof of concept. **Journal of Controlled Release**, v. 106, p. 26-33, 2005.

BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p. 287-294, 2010.

BHARVADA, E.; SHAH, V.; MISRA, M. Exploring mixing uniformity of a pharmaceutical blend in a high shear mixture granulator using enthalpy values obtained from DSC. **Powder Technology**, v. 276, p. 103–111, 2015.

BHATTACHARYA, S.S.; BANERJEE, S.; GHOSH, A.K.; CHATTOPADHYAY P.; VERMA, A.; GHOSH, A. A RP-HPLC method for quantification of diclofenac sodium released from biological macromolecules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.58, p.354-359, 2013.

BLANCHETTE, J.; KAVIMANDAN, N.; PEPPAS, N.A. Principles of transmucosal delivery of therapeutic agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 142–151, 2004.

BODMEIER, R.; CHEN, H.; PAERATAKUL, O. A Novel Approach to the Oral Delivery of Micro- or Nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 6, n. 5, p. 413-417, 1989/05/01 1989.

BONI, F.I.; PREZOTTI, F.G.; CURY, B.S.F. Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: Effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 29, p. 1-29, 2015.

BORDENAVE, N.; JANASWAMY, S.; YAO, Y. Influence of glucan structure on the swelling and leaching properties of starch microparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 103, p. 234–243, 2014.

BOQUIST, L. The endocrine pancreas in early alloxan diabetes. Including study of the alloxan inhibitory effect of feeding and some hexoses. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 219-29, 1977.

BRANGE, J.; SKELBAEK-PEDERSEN, B.; LANGKJAER, L.; DAMGAARD, U.; EGE, H.; HAVELUND, S.; HEDING, L.G.; JOGENSEN, H.K.; LYKKEBERG, J.; MARKUSSEN, J.; PINGEL, M.; RASMUSSEN, E. **Galenics of insulin: the physico-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1987.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 2003.

BROMER, W.W.; CHANCE, R.E. Preparation and characterization of desooctapeptide-insulin. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 133, p. 219-223, 1967.

BUILDERS, F.F.; KUNLE, O.O.; OKPAKU, L.C.; BUILDERS, M.I.; ATTAMA, A.A.; Adikwu, M.U. Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 70, p. 777–783, 2008.

CALVERT, P. Biopolymers: The structure of starch. *Nature*, v. 389, p. 338–339, 1997.

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

CANEVAROLO Jr, S.V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004.

CARBINATTO, F.M.; CASTRO, A.D.; EVANGESLITA, R.C.; CURY, B.S.F. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 9, p. 27-34, 2014.

CARDOSO, V.M.O. **Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista – UNESP “Júlio de Mesquita Filho. 2014. 198p.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da INS. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v. 46, p. 419-425, 2003.

CASTELLANOS GIL, E.; COLARTE, A.I.; BATAILLE, B.; BROUILLET, F.; CARABALLO, I. Estimation of the percolation thresholds in ternary lobenzarit disodium–dextran–HPMP hydrophilic matrices tablets: Effects of initial porosity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 312–319, 2009.

CELEK, A.; CELEBI, N.; TIRNAKSIZ, F.; TAY, A. A lecithin-based microemulsion of Rhinsulin with aprotinin for oral administration: investigation of hypoglycemic effects in nondiabetic and STZ-induced diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, p. 176–185, 2005.

CERNEA, S.; RAZ, I. Noninjectable methods of insulin administration. **Drugs Today**, v. 42, p. 405-24, 2006.

CHAKRABORTYA, S.; JANAA, S.; GANDHI, A.; SENA, K.K.; ZHIANG, W.; KOKARE, C. Gellan gum microspheres containing a novel α -amylase from marine *Nocardiopsis* sp. strain B2 for immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 292–299, 2014.

CHAN, E.S.; LEE, B.B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, p. 63-72, 2009.

CHANDRASEKARAN, R.P.L.C., JOYCE, K.L., ARNOTT, S. Cation interaction in gellan: an X-ray study of the potassium salt. **Carbohydrate Research**, v. 181, p. 23–40, 1988.

CHANDRASEKARAN, R.; RADHA, A.; THAILAMBAL, V.G. Roles of potassium ions acetyl and L-glyceryl groups in native gellan double helix: an X-ray study. **Carbohydrate Research**, v. 224, p. 1–17, 1992.

CHEN, M.C.; SONAJE, K.; CHEN, K.J.; SUNG, H.W. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 32, p. 9826–38, 2011.

CHICKERING, D.E.; MATHIOWITZ, E. Definitions mechanisms, and theories of bioadhesion. In: Mathiowitz, E., Chickering, D.E., Lehr, C.M. (Eds.), *Bioadhesive Drug Delivery Systems: Fundamentals, Novel Approaches, and Development*. Marcel Dekker, New York, pp. 1–10, 1999.

CHIEN, Y.W. Human insulin: basic sciences to therapeutic uses. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 22, p. 753-789, 1996.

CHONO, S.; FUKUCHI, R.; SEKI, T.; MORIMOTO, K. Aerosolized liposomes with dipalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary insulin delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 137, p. 104–109, 2009.

CHUNG, H.J.; LIU, Q.; HOOVER, R. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 436–447, 2009.

CINTO, P.; SOUZA, A. L. R.; LIMA, A. C.; CHAUD, M. V.; GREMIÃO, M. P. D. LC evaluation of intestinal transport of praziquantel. **Chromatographia**, v. 69, p. 213-217, 2009.

COIMBRA, P.M.A. **Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. 242f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2010.

COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 10, n. 2–3, p. 141-162, 1993.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, p.99–134, 2002.

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

CREUTZFELDT, W. The entero-insular axis in type 2 diabetes: incretins as therapeutic agents. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 109, p. S288–303, 2001.

CUI, R.; OATES, C.G. The effect of retrogradation on enzyme susceptibility of sago starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, p. 65–72, 1997.

CUI, F.; SHI, K.; ZHANG, L.; TAO, A.; KAWASHIMA, Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin–phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 242-250, 2006.

CURY, B. S. F; CASTRO, A. D; KLEIN, S. I; EVANGELISTA, R. C. Influence of phosphated cross-linked high amylose on *in vitro* release of different drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 789-793, 2009.

CURY, B. S. F. ; MENEGUIM, A. B. ; CARDOSO, V. M. O ; PREZOTTI, F. G. **Pectin: Chemical Properties, Uses and Health Benefits**. Chapter 5: Oral drug release systems based on pectin. 1ed.Nova York: Nova Science Publishers, 2014, v. 1, p. 1-268.

DAI, L.; LIU, X.; TONG, Z. Critical behavior at sol–gel transition in gellan gum aqueous solutions with KCl and CaCl₂ of different concentrations. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 207–212, 2010.

DAMGÉ, C.; REIS, C.P.; MAINCENT, P. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 5, p. 1–24, 2008.

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

DANCKWERTS, M.; FASSIHI, A. Implantable controlled release drug delivery systems: a review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 17, p. 1465–1502, 1991.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. (1996). Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed, 1996. New-York: MPGraw-Hill; 1487–1517.151, 7ed. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G.

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, p. 136– 144, 2012.

DÉAT-LAINÉ, E.; HOFFART, V.; GARRAIT, G.; BEYSSAC, E. Whey protein and alginate hydrogel microparticles for insulin intestinal absorption. Evaluation of permeability enhancement properties on Caco-2 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453, p. 336-342, 2013.

DEL SINDACO, P.; CIOFETTA, M.; LALLI, C.; PERRIELLO, G.; PAMPANELLI, S.; TORLONE, E.; BRUNETTI, P.; BOLLI, G.B. Use of the short-acting insulin analog Lispro in intensive treatment of type 1 diabetes mellitus: importance of appropriate replacement of basal insulin and time-interval injection-meal. **Diabetic Medicine**, v. 15, p. 592–600, 1998.

DICHEVA, B.M.; TEN HAGEN, T.L.; SCHIPPER, D.; SEYNHAEVE, A.L.; VAN RHOON, G.C.; EGGERMONT, A.M.; KONING, G.A.Targeted and heat-triggered doxorubicin delivery to tumors by dual targeted cationic thermosensitive liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 195, p.37-48, 2014.

DIMANTOV, A.; GREEBERG, M.; KESSELMAN, E.; SHIMONI, E. Study of high amylase corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. **Innovate Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 93-100, 2003.

DIMANTOV, A.; KESSELMAN, E.; SHIMONI, E. Surface characterization and dissolution properties of high amylose corn starch–pectin coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 29–37, 2004.

DONBROW, M. Introduction and overview. In: DONBROW, M., ed. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and Pharmacy**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 1-14.

DORNAS, W.C.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T.; CONTELLI, R. Aloxano e diabetes. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 19, p. 81-87, 2006.

DUARTE, R. (1997) INS. In: Duarte, R. (ed.) **Diabetologia Clínica**. Lidel-Edições Técnicas, Lda., Lisboa, p. 139-151.

EBERLY COLLEGE OF SCIENCE OFFICE OF ONLINE EDUCATION. **Structure of Starches**. Disponível em: <https://online.science.psu.edu/chem005_wd/node/7882> Acesso em 30 de Janeiro de 2015.

EGUCHI, M.; OOYA, T.; YUI, N. Controlling the mechanism of trypsin inhibition by the numbers of α -cyclodextrins and carboxyl groups in carboxyethylester-polyrotaxanes. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 301-307, 2004.

EL-ARINI, S.K.; LEUENBERGER, H. Modeling of drug release from polymer matrices: effect of drug loading. **Internation Journal of Pharmaceutics**, v.121. p.141-148, 1995.

EL-KAMEL A.; EL-KHATIB M. Thermally reversible in situ gelling carbamazepine liquid suppository. *Drug delivery*, v. 13, p. 143-148, 2006.

EMEJE, M.O.; FRANKLIN-UDE, P.I.; OFOEFULE, S.I. Evaluation of the fluid uptake kinetics and drug release from gellan gum tablets containing metronidazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 158-163, 2010.

FADDA, H.M.; BASIT, A.W. Gastrointestinal tract: obstacles or opportunities in drug targeting? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 1, p. 52-59, 2005.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation techniques for food ingredient systems, in: B. Bhandari, Y.H. Roos (Eds.), **FoodMaterials Science and Engineering**, Wiley-Blackwell, Oxford, 2012, pp. 320–344.

FERRARI, P.C.; SOUZA, F.M.; GIORGETTI, L.; OLIVEIRA, G.F.; FERRAZ, H.G.; M.V.C.;EVANGELISTA, R.C. Development and in vitro evaluation of coated pellets containing chitosan to potential colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 244-252, 2013.

FERRERO, C., MASSUELLE, D., DOELKER, E. Towards elucidation of the drug release mechanism from compressed hydrophilic matrices made of cellulose ethers. II. Evaluation of a possible swelling-controlled drug release mechanism using dimensionless analysis. **Journal of Controlled Release**, v.141, p. 223–233, 2010.

FESKENS, E.J.; KROMHOUT, D. Hyperinsulinemia, risk factors, and coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, 14, 1641–1647, 1994.

FISHMAN, M.L.; COFFIN, D.R.; UNRUH, J.J.; LY, T. Pectin, starch, glycerol films: blends or composites. **Journal of Macromolecular Science**, Part A: Pure and Applied Chemistry, v.33, p.639–654, 1996.

FRANKLIN-UDE, P.I.; EMEJE, M.O.; OFOEFULE, S.I. Evaluation of gellan gum as a mini-matrix for sustained release of ephedrine hydrochloride granules. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 2, p. 646–652, 2007.

FREEMAN, J.S. Role of the incretin pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 76, p. S12–S19, 2009.

FU, Z.Q.; WANG, LI J.; LI, DONG; WEI, Q.; ADHIKARI, BENU. Effects of high pressure homogenization on the properties of starch-plasticizer dispersions and their films. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 202-207, 2011.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, v. 20, p. 1427-1435, 1999.

GARG, S.K.; CARMAIN, J.A.; BRADDY, K.C.; ANDERSON, J.H.; VIGNATI, L.; JENNINGS, M.K.; CHASE, H.P. Pre-meal insulin analogue insulin lispro vs Humulin R insulin treatment in young subjects with type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 13, p. 47-52, 1996.

GARRAIT, G.; JARRIGE, J.F.; BLANQUET, S.; BEYSSAC, E.; CARDOT, J.M.; ALRIC, M. Gastrointestinal absorption and urinary excretion of trans-cinnamic and p-coumaric acids in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 2944-50, 2006.

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.

GILL, P.; MOGHADAM, T.T.; RANJBAR, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, p. 167-193, 2010.

GRASDALEN, H., SMIDSRØD, O. Gelation of gellan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 7, p. 371-393, 1987.

GRIBBLE, F.; ASHCROFT, F.M. New windows on the mechanism of action of potassium channel openers – review. **Trends in Pharmacology Science**, v.21, p. 439-445, 2000.

GUNNING, A. P.; MORRIS, V. J. Light scattering studies of tetramethyl ammonium gellan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.12, p. 338-341, 1990.

GUPTA, K.C.; KUMAR, R. Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan. **Biomaterials**, v. 21, p. 1115-1119, 2000.

HARALAMPU, S.G. Resistant starch - a review of the physical properties and biological impact of RS3. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 285-292, 2000.

HE, W.; GU, X.; LIU, S. Surfactant-free one-step synthesis of dual-functional polyurea microcapsules: contact infection control and drug delivery. **Advanced Functional Materials**, v.22, p.4023-4021, 2012.

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

HEIZEN, C.; BERGER, A.; MARISON, I. (2004) In: Nedovic, V.; Willaert, R. **Use of Vibration Technology for Jet Break-Up for Encapsulation of Cells and Liquids in Monodisperse Microcapsules** (Eds.), Kluwer Academic Publishers., London, UK, , p. 262.

HELMERHORST, E.; STOKES, G.B. Self-association of insulin. Its pH dependence and effect of plasma. **Diabetes**, v. 36, 261-264, 1987.

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.

HILGENDORF, C.; SPAHN-LANGGUTH, H.; REGÅRDH, C.G.; LIPKA, E.; AMIDON, G.L.; LANGGUTH, P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 63-75, 2000.

HIRSCH, I.B. Insulin analogues. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 174-183, 2005.

HORINAKA, J.I.; KANI, K.; HORI, Y.; MAEDA, S. Effect of pH on the conformation of gellan chains in aqueous systems. **Biophysical Chemistry**, v. 111, p. 223–227, 2004.

HSEIN, H.; GARRAIT, G.; BEYSSAC, E.; HOFFART, V. Whey protein mucoadhesive properties for oral drug delivery: Mucin–whey protein interaction and mucoadhesive bond strength. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 799–808, 2015.

HTOON, A.K.; SHRESTHA, A.K.; FLANAGAN, B.M.; LOPEZ-RUBIO, A.; BIRD, A.R.; GILBERT, E.P.; GIDLEY, M.J. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 236–245, 2009.

HTOON, A.K.; UTHAYAKUMARAN, S.; PIYASIRI, U.; APPELQVIST, A.M.; LÓPEZ-RUBIO, A.; GILBERT, E.P.; MULDER, R.J. The effect of acid dextrinisation on enzyme-resistant starch content in extruded maize starch. **Food Chemistry**, v. 120, p. 140-149, 2010.

HUANG, Y.; LEOBANDUNG, W.; FOSS, A.; PEPPAS, N.A. Molecular aspects of muco- and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 63–71, 2000.

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

IDF. International Diabetes Federation. **About Diabetes**. Disponível em: <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts_figures>, Acesso em 23 de Outubro de 2013.

IKEDA, S.; NITTA, Y.; TEMSIRIPONG, T.; PONGSAWATMANIT, R.; NISHINARI, K. Atomic force microscopy studies on cation-induced network formation of gellan. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.727–735, 2004.

IKESUE, K.; KOPECKOVA, P.; KOPECEK, J. Degradation of proteins by guinea pig intestinal enzymes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 30, p. 171–179, 1993.

JIN, H.Y.; XIA, F.; ZHAO, Y.P. Preparation of hydroxypropyl methyl cellulose phthalate nanoparticles with mixed solvent using supercritical antisolvent process and its application in co-precipitation of insulin. **Advanced Powder Technology**, v. 23, p. 157–163, 2012.

JOSE, S.; FANGUEIRO, J.F.; SMITHA, J.; CINU, T.A.; CHACKO, A.J.; PREMALETHA, K.; SOUTO, E.B. Cross-linked chitosan microspheres for oral delivery of insulin: Taguchi design and in vivo testing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 175–179, 2012.

JUHL, C.B.; SCHMITZ, O.; PINCUS, S.; HOLST, J.J.; VELDHUIS, J.; PØRKSEN, N. Short-term treatment with GLP-1 increases pulsatile insulin secretion in Type II diabetes with no effect on orderliness. **Diabetologia**, v. 43, p. 583–588, 2000.

KAMIONKA, MARIUSZ. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 268-274, 2011.

KANDADI, P.; SYED, M.A.; GOPARABOINA, S.; VEERABRAHMA, K. Albumin coupled lipid nanoemulsions of diclofenac for targeted delivery to inflammation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.8, p. 1162-1171, 2012.

KANESAKA, S., WATANABE, T., MATSUKAWA, S. Binding effect of Cu^{2+} as a trigger on the sol-to-gel and the coil-to-helix transition processes of polysaccharide, gellan gum. **Biomacromolecules**, n. 5, p. 863–868, 2004.

KANG, K.S., VEEDER, G.T., MIRRASOUL, P.J., KANEKO, T., COTTRELL, I.W. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1086–1091, 1982.

KARTHIKA, J.S.; VISHALAKSHI, B. Novel stimuli responsive gellan gum-graft-poly(DMAEMA) hydrogel as adsorbent for anionic dye. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 648–655, 2015.

KAS, H. S.; ONER, L. Microencapsulation using coacervation/phase separation: an overview of the technique and applications. In: WISE, D. L., ed. **Handbook of Pharmaceutical controlled release technology**. New York: Marcel-Dekker, 2000. p. 301-328.

KEDZIEREWICZ, F.; LOMBRY, C.; RIOS, R.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Effect of the formulation on the in vitro release of propranolol from gellan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 178, p. 129–136, 1999.

KHAFAGY, E.S.; MORISHITA, M.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K. Current challenges in noninvasive insulin delivery systems: a comparative review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1521–1546, 2007.

KHAN, S. A.; AHMAD, M.; MURTAZA, G.; AAMIR, M. N.; AKHTAR, N.; KOUSAR, R. Formulation of two-drug controlled release non-biodegradable microparticles for potential treatment of muscles pain and spasm and their simultaneous spectrophotometric estimation. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 299-306, May-Jun 2010.

KIM, B.Y.; JEONG, J.H.; PARK, K. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 525–538, 2005a.

KIM, S.J.; WINTER, K.; NIAN, C.; TSUNEOKA, M.; KODA, Y.; MPINTOSH, C.H. Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of Bax expression. **Journal of Biological Chemistry**, 280, 22297–22307, 2005b.

KJEMS, L.L.; HOLST, J.J.; VØLUND, A.; MADSBAD, S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion effects on cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. **Diabetes**, v. 52, p. 380–386, 2003.

KRISHNAMURTHY, S.; NG, V.W.L.; GAO, S.; TAN, M.H.; YANG, Y.Y. Phenformin-loaded polymeric micelles for targeting both cancer cells and cancer stem cells in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v.35, p. 9177-9186, 2014.

KRIWET, B.; KISSEL, T. Poly(acrylic acid) microparticles widen the intercellular spaces of Caco-2 cell monolayers: an examination by confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 233–240, 1996.

KUBO, W., MIYAZAKI, S., ATTWOOD, D. Oral sustained delivery of paracetamol from in situ-gelling gellan and sodium alginate formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, p. 55–64, 2003.

KULKARNI R.V.; BOPPANA, S.C.M.; KALYANE, N.V. Carboxymethylcellulose-aluminum hydrogel microbeads for prolonged release of simvastatin. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 52, p. 137-143, 2010.

KULKARNI, R.V.; NAGATHAN, V.V.; BIRADAR, P.; NAIKAWADI, A.A. Simvastatin loaded composite polyspheres of gellan gum and carrageenan: *In vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 238-244, 2013.

KUMAR, A.; LAHIRI, S.S.; SINGH, H. Development of PEGDMA: MAA based hydrogel microparticles for oral insulin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 117–124, 2006.

LACAZ-VIEIRA, F. 1997. Calcium site specificity - early Ca^{2+} -related tight junction events. *The Journal of General Physiology*, v. 110, p. 727–740, 1997.

LANGGATH, P.; BOHNER, V.; HEIZMANN, J.; MERKLE, H.P.; WOLFFRAM, S.; AMIDON, G.L.; YAMASHITA, S. The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 46, p. 39–57, 1997.

LAM, P.L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of Controlled Release**, v. 178, p. 25–45, 2014.

LAM, P.L.; WONG, R.S.M.; YUEN, M.C.W.; LAM, K.H.; GAMBARI, R.; CHUI, C.H. Biomedical textiles with therapeutic effects: development of berberine containing chitosan microcapsules. **Minerva Biotecnologica**, v.24, p.62–69, 2012.

LENZEN S, TIEDGE M, PANTEN U. Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with sugar-binding site of the enzyme. **Molecular Pharmacology**, v. 34, p. 395–400, 1988

LI-CHAN; E.C.Y.; MA, C.Y. Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 77, p. 495–502, 2002.

LIU, H.; TANG, R.; PAN, W.S.; ZHANG, Y.; LIU, H. Potential utility of various protease inhibitors for improving the intestinal absorption of insulin in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p. 1523–1529, 2003.

LIU, M.; ZHANG, J.; ZHU, X.; SHAN, W.; LI, L.; ZHONG, J.; ZHANG, Z.; HUANG, Y. Efficient mucus permeation and tight junction opening by dissociable “mucus-inert” agent coated trimethyl chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 222, p. 67–77, 2016.

LIU, Y., LIU, J., ZHANG, X., ZHANG, R., HUANG, Y., WU, C. In situ gelling gelrite/alginate formulations as vehicles for ophthalmic drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 610–620, 2010.

LOPES, M.A.; Abrahim, B.A.; Cabral, L.M.; Rodrigues, C.R.; Seica, R.M.F.; Veiga, F.J.B. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.10, p.1139–1151, 2014.

LOUGHEED, W.D.; FISCHER, U.; PERLMAN, K.; ALBISSER, A.M. A physiological solvent for crystalline insulin. **Diabetologia**, v. 20, p. 51–53, 1981.

LU, X.; GAO, H.; LI, C.; YANG, Y.W.; WANG, Y.; FAN, Y.; WU, G.; MA, J. Polyelectrolyte complex nanoparticles of amino poly(glycerol methacrylate)s and insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 195–201, 2012.

LUO, Y.; ZHUB, J.; MAB, Y.; ZHANG, H. Dry coating, a novel coating technology for solid pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 16–22, 2008.

LV, Y.; ZHANG, J.; SONG, Y.; WANG, B.; WANG, S.; ZHAO, S.; LV, G.; MA, X. Natural Anionic Polymer Acts as Highly Efficient Trypsin Inhibitor Based on an Electrostatic Interaction Mechanism. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 35, p. 1606-1610, 2014.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MA, Z.H.; YU, D.G.; BRANFORD-WHITE, C.J.; NIE, H.L.; FAN, Z.X.; ZHU, L.M. Microencapsulation of tamoxifen: application to cotton fabric. **Colloids Surface B: Biointerfaces**, v. 69, p. 85–90, 2009.

MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2008.

MAIOR, J.; REIS, A.V.; MUNIZ, E.C.; CAVALCANTI, A.O. Reaction of pectil and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 184–194, 2008.

MAITI, S.; RANJIT, S.; MONDOL, R.; RAY, S.; SA, B. Al^{+3} ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 164–172, 2011.

MA, G. Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: Strategy, preparation, and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 324-340, 2014.

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, out/dez, 2002.

MARRAS-MARQUEZ, T.; PEÑA, J.; VEIGA-OCHO, M.D. Robust and versatile pectin-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 265-276, 2015.

MARONI, A.; ZEMA, L.; DEL CURTO, M.D.; FOPPOLI, A.; GAZZANIGA, A. Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 540–556, 2012.

MASSICOTTE, L. P.; BAILE, W. E.; MATEESCU, M. A. Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients Structural insights and formulation of pancreatic enzymes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 212-223, 2008.

MCCAFFREY, G.; JAMIESON, J.C. Evidence for the role of a cathepsin D-like activity in the release of Gal beta 1-4GlcNAc alpha 2-6sialyltransferase from rat and mouse liver in whole-cell systems. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 104, p. 91-94, 1993.

MENEGUIN, A.B. **Obtenção e caracterização de filmes de misturas de amido resistente e pectina como estratégia para liberação cólon específica de fármacos.** 2012. 96f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2012.

MENEGUIN, A.B.; CURY, B.S.F.; EVANGELISTA, R.C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 140-149, 2014.

MENNINI, N.; FURLANETTO, S.; CIRRI, M.; MURA, P. Quality by design approach for developing chitosan-Ca-alginate microspheres for colon delivery of celecoxib-hydroxypropyl-b-cyclodextrin-PVP complex. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 67–75, 2012.

MESIHA, M.; PLAKOGIANNIS, F.; VEJOSOTH, S. Enhanced oral absorption of insulin from desolvated fatty acid-sodium glycocholate emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 111, p. 213–216, 1994.

MEYEROVITCH, J.; ROTHENBERG, P.; SHECHTER, Y.; BONNER-WEIR, S.; KAHN, C.R. Vanadate normalizes hyperglycemia in two mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 1286-1294, 1991.

MIKLI, V.; KAERDI, H.; KULU, P.; BESTERCI, M. Characterization of powder particle morphology. **Estonian Journal of Engineering**, v. 7, n. 1, p. 22-34, 2001.

MILAS, M., SHI, X., RINAUDO, M. On the physicochemical properties of gellan gum. **Biopolymers**, v. 30, p. 451–464, 1990.

MILLOTTI, G.; LAFFLEUR, F.; PERERA, G.; VIGL, C.; PICKL, K.; SINNER, F.; BERNKOP-SCHNURCH, A. In Vivo Evaluation of Thiolated Chitosan Tablets for Oral Insulin Delivery. **Pharmaceutics, Drug Delivery and Pharmaceutical Technology**, v. 103, p. 3165-3170, 2014.

MINEO, H.; ISHIDA, K.; MORIKAWA, N.; OHMI, S.; MACHIDA, A.; NODA, T.; FUKUSHIMA, M.; CHIJI, H. Ingestion of potato starch decreases chymotrypsin but does not affect trypsin, amylase, or lipase activity in the pancreas in rats. **Nutrition Research**, v. 27, p. 113-118, 2007.

MIZUNO, M.; PIKAL, M.J. Is the pre-Tg DSC endotherm observed with solid state proteins associated with the protein internal dynamics? Investigation of bovine serum albumin by solid state hydrogen/deuterium exchange. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 170–176, 2014.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Effects of salts on the gel-sol transition of gellan gum by differential scanning calorimetry and thermal scanning rheology. **Thermochimica Acta**, v. 267, n. 0, p. 269-287, 1995.

MOLLMANN, S.H.; JORGENSEN, L.; BUKRINSKY, J.T.; ELOFSSON, U.; NORDE, W.; FROKJAER, S. Interfacial adsorption of insulin conformational changes and reversibility of adsorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 194–204, 2006.

MOORADIAN, A.D.; BERNBAUM, M.; ALBERT, S.G. Narrative review: a rational approach to starting insulin therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 145, p. 125–134, 2006.

MORA, M. J.; LONGHI, M. R.; GRANERO, G. E. Synthesis and characterization of binary and ternary complexes of diclofenac with a methyl- β -CD and monoethanolamine and in vitro transdermal evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4079–4088, 2010.

MORISHITA, M.; PEPPAS, N.A. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 905–910, 2006.

MORRIS, E.R., GOTHARD, M.G.E., HEMBER, M.W.N., MANNING, C.E., ROBINSON, G. Conformational and rheological transitions of welan, rhamsan and acylated gellan. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, p.165–175, 1996.

MORRIS, E.R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. Gelation of gellan – a review. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 373–411, 2012.

MULHBACHER, J.; ISPAS-SZABO, P.; MATEESCU, M.A. Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release: II. Swelling properties and mechanistic study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 231–238, 2004.

NARKAR, M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-specific controlled release gellan beads of acid-soluble drug Prepared by ionotropic gelation method. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 267–277, 2010.

NATARAJAN, J.V.; NUGRAHA, C.; NG, X.W.; VENKATRAMAN, S. Sustained-release from nanocarriers: a review. **Journal of Controlled Release**, v.193, p. 122–138, 2014.

NAYAK, A.K.; PAL, D.; SANTRA, K. Ispaghula mucilage-gellan mucoadhesive beads of metformin HCl:Development by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p.41–50, 2014.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v.2, p.182–186, 2012.

NELLANS, H.N. B) Mechanisms of peptide and protein absorption: (1) Paracellular intestinal transport: modulation of absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.7, p. 339–364, 1991.

NICKLASSON, M.; ORBE, A.; LINDBERG, J.; BORGH, B.; MAGNUSSON, A.; NILSSON, G.; AHLGREN, R.; JACOBSEN, L. A collaborative study of the "in vitro"

dissolution of phenacetin crystals comparing the flow through method with the USP Paddle method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 53, p. 35–41, 1991.

NIELSEN, E.J.B.; YOSHIDA, S.; KAMEI, N.; IWAMAE, R.; KHAFAGY, E-S.; OLSEN, J.; RAHBEK, U.L.; PEDERSEN, B.T.; TAKAYAMA, K.; 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.

NOLAN, C.; MARGOLIASH, E.; PETERSON, J.D.; STEINER, D.F. Chemistry and metabolism of macromolecules. **Journal of Biological Chemistry**, v.246, p. 2780-2795, 1971.

OLIVEIRA, G.F.; FERRARI, P.C.; CARVALHO, L.Q.; EVANGELISTA, R.C. Chitosan-pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 1004-1009, 2010.

OKAWARA, M.; HASHIMOTO, F.; TODO, H.; SUGIBAYASHI, K.; TOKUDOME, Y. Effect of liquid crystals with cyclodextrin on the bioavailability of a poorly water-soluble compound, diosgenin, after its oral administration to rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, p. 257-261, 2014.

ONUKE, Y.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; TOKIWA, S.; CHIBA, Y.; ISOWA, K.; NAGAI, T. In vivo effects of highly purified docosahexaenoic acid on rectal insulin absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 198, p. 147–156, 2000.

OSMAŁEK, T.; FROELICH, A.; TASAREK, S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.466, p. 328-340, 2014.

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

PARK, B.H.; RHO, H.W.; PARK, J.W.; CHO, C.G.; KIM, J.S.; CHUNG, H.T. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 210, p. 1-6, 1995.

PARK, K.; ROBINSON, J.R. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 19, p. 107–127, 1984.

PARK, K.; KWON, I.C.; PARK, K. Oral protein delivery: current status and future prospect. *Reactive and Functional Polymers*, v. 71, P. 280–287, 2011.

PATIL, N.H.; DEVARAJAN, P.V. **Colloidal carriers for noninvasive delivery of insulin**. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*. Eds: Ohshima, H.; Makino, K. Elsevier publisher, 2014. 532 p.

PATIL, S.; SHARMA, S.; NIMBALKAR, A.; PAWAR, A. Study of formulation variables on properties of drug-gellan beads by factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.32, p. 315–326, 2006.

PEPPAS, N.A. Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, p. 11–17, 2004.

PEPPAS, N.A.; KAVIMANDAN, N.J. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: Insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 183–197, 2006.

PERERA, G.; BARTHELMES, J.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Novel pectin–4-aminothiophenole conjugate microparticles for colon-specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 145, p. 240–246, 2010.

PICONE, C.S.F.; CUNHA, R.L. Influence of pH on formation and properties of gellan gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 662–668, 2011.

PILGRIM, G.W.; WALTER, R.H.; OAKENFULL, D.G. The chemistry of highmethoxyl pectins. In: WALTER, R.H. **The Chemistry and Technology of Pectin**. San Diego: Academic Press; 1991. p. 24.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Insulin therapies – past, present and future. **Drug Discovery Today**, v. 6, p. 1056-1061, 2001.

PORNSAK, S.; SRISAGUL, S.; SATIT, P. Use of pectin as a carrier for intragastric floating drug delivery: Carbonate salt contained beads, Use of pectin as a carrier for intragastric floating drug delivery: Carbonate salt contained beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 436-445, 2007.

PREISIG, D.; HAID, D.; VARUM, F.J.O.; BRAVO, R.; ALLES, R.; HUWYLER, J.; PUCHKOV, M. Drug loading into porous calcium carbonate microparticles by solvent evaporation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, p. 548-558, 2014.

PREZOTTI, F.G.; MENEGUIN, A.B.; EVANGELISTA, R.C.; CURY, B.S.F. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, p. 1–6, 2012.

PREZOTTI, F.G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista – UNESP “Júlio de Mesquita Filho. 2013. 111p.

PREZOTTI, F.G.; CURY, B.S.F.; EVANGELISTA, R.C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v.113, p. 286-295, 2014.

RAJINIKANTH, P.S.; MISHRA, B. Preparation and in vitro characterization of gellan based floating beads of acetohydroxamic acid for eradication of H. pylori. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, p. 413–427, 2007.

RANA, V.; RAI, P.; TIWARY, A.K.; SINGH, R.S.; KENNEDY, J.F.; KNILL, C.J. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1031–1047, 2011.

RASHID, I.; AL-REMAWY, M.; LEHARNE, S.A.; CHOWDHRY, B.Z.; BADWAN, A. A novel multifunctional pharmaceutical excipient: Modification of the permeability of starch by processing with magnesium silicate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 18-26, 2011.

RASKIN, P.; GUTHRIE, R.A.; LEITER, L.; RIIS, A.; JOVANOVIĆ, L. Use of insulin aspart, a fast-acting insulin analog, as the mealtime insulin in the management of patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, v. 23, p. 583-588, 2000.

REDDY, T.; TAMMISHETTI, S. Gastric resistant microbeads of metal ion cross-linked carboxymethyl guar gum for oral drug delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, p. 311–318, 2002.

REIS, C.P.; DAMGÉ, C. Nanotechnology as a Promising Strategy for Alternative Routes of Insulin Delivery. IN: DÜZGÜNEŞ, N. **Methods in Enzymology**, Elsevier, 2012, v. 508, p. 271-294.

REIS, C.P.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F.; NEUFELD, R.J.; DAMGÉ, C. Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery. **Drug Delivery**, v. 15, p. 127–139, 2008.

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

RENUKUNTLA, J.; VADLAPUDI, A.D.; PATEL, A.; BODDU, S.H.S.; MITRA, A.K. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v.447, p.75–93, 2013.

RICCI-JUNIOR, E.; MARCHETTI, J.M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p.187-195, 2006.

RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.

ROBINSON, D.M.; WELLINGTON, K. Insulin glulisine. **Drugs**, v. 66, p. 861-869, 2006.

SAJEESH, S.; BOUCHEMAL, K.; MARSAUD, V.; VAUTHIER, C.; SHARMA, C.P. Cyclodextrin complexed insulin encapsulated hydrogel microparticles: An oral delivery system for insulin. *Journal of Controlled Release*, v. 147, p. 377-384, 2010.

SAJEESH, S.; SHARMA, C.P. Mucoadhesive hydrogel microparticles based on poly (methacrylic acid-vinyl pyrrolidone)-chitosan for oral drug delivery. **Drug delivery**, v. 18, p. 227-235, 2011.

SAKURAI K, OGISO T. Generation of alloxan radical in rat islet cells participation of NADPH cytochromo P-450 reductase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 17, p. 1451-1455, 1994.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1666 – 1691, 2005.

SALOMON, J.L.; DOELKER, E. Formulation des comprimés à libération prolongée. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.55, p.174-182, 1980.

SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BOSELLI, C.; CAMELLA, C. Insulinloaded nanoparticles based on N-trimethyl chitosan: in vitro (caco-2 model) and ex vivo (excised rat jejunum, duodenum, and ileum) evaluation of penetration enhancement properties. **AAPS Pharm. Sci. Tech**, v. 11, p. 362–371, 2010.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v.23, p.302-315, 2007.

SCHILLING, R.J.; MITRA, A.K. Degradation of insulin by trypsin and alpha-chymotrypsin. *Pharmaceutical Research*, v. 8; p. 721-727, 1991.

SDB. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diabetes na prática clínica**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>>, Acesso em 04 de Abril de 2013.

SDB. Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e Acompanhamento do *Diabetes mellitus*. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes de 2006. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>>, Acesso em 23 de Março de 2013.

SEIFERT, S.B.; PHILIPS, J.A. Production of small , monodispersed, alginate beads for cell immobilization. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 562-568, 1997.

SHAH, S.M.; GOEL, P.N.; JAIN, A.S.; PATHAK, P.O.; PADHYE, S.G.; GOVINDARAJAN, S.; GHOSH, S.S.; CHAUDHARI, P.R.; GUDE, R.P.; GOPAL, V.; NAGARSENKER, M.S. Liposomes for targeting hepatocellular carcinoma: Use of conjugated arabinogalactan as targeting ligand. **International Journal of Pharmaceutics**, v.477, p.128-139, 2014.

SHAH, D.; SHEN, W.C. Transcellular delivery of an insulin-transferrin conjugates in enterocyte-like Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 1306–1311, 1996.

SICCARDI, D.; TURNER, J.R.; MRSNY, R.J. Regulation of intestinal epithelial function: a link between opportunities for macromolecular drug delivery and inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 219-235, 2005.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: an improved mathematical model to predict the resulting drug delivery kinetics (the "sequential layer" model). **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 1290-1298, 2000.

SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.J.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, p.1-20, 2003.

SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.J.; FIGUEIREDO, I.V.; GONÇALVES, A.R.; VEIGA, F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, p. 1-10, 2006.

SINGH, M.N.; HEMANT, K.S.Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H.G. Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.5, p.65–77, 2010.

SINHA, V.R.; KUMRIA, R. Review: Microbially triggered drug delivery to the colon. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 3-18, 2003.

SKYLER, J.S. **Insulin treatment**. Therapy for Diabetes Mellitus and Related Disorders. 3rd ed. American Diabetes Association; 1998.

SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1556 – 1568, 2005.

SMITH, S.M.; DENYER, K. Primary products starch. In T. Brian (Ed.), Encyclopedia of applied plant sciences. Oxford: Elsevier., 2003.pp. 896–905.

SOARES, G.A. **Estudo dos mecanismos de liberação do diclofenaco de sódio incorporado em matrizes de alta amilose/pectina reticuladas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista – UNESP, “Júlio Mesquita Filho. 2011, 118p.

SOARES, G.A.; CASTRO, A.D.; CURY, B.S.F.; EVANGELISTA, R.C. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 135-142, 2013.

SONIA, T.A.; SHARMA, C.P. An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discovery Today*, v. 17, p. 784-792, 2012.

SOUZA, A.L.R.; Andreani, T.; OLIVEIRA, R.N.; KILL, C.P.; SANTOS, F.K.; ALLEGRETTI, S.M.; CHAUD, M.V.; SOUTO, E.; SILVA, A.M.; GREMIÃO, M.P.D. In vitro evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to improve efficacy

of the schistosomiasis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 31– 37, 2014.

STANIFORTH, J.N. Analise do tamanho de particula. In: AUTON, M.E., **Delineamento de formas farmacêuticas**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.163-176.

STILL, J.G. Development of oral insulin: progress and current status. **Diabetes/Metabolism Research Review**, v. 18, p. S29-S37, 2002.

SU, F.Y.; LIN, K.J.; SONAJE, K.; WEY, S.P.; YEN, T.C.; HO, Y.C.; PANDA, N.; CHUANG, E.Y.; MAITI, B.; SUNG, H.W. Protease inhibition and absorption enhancement by functional nanoparticles for effective oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 33, p. 2801–2811, 2012.

TAHTAT, D.; MAHLOUS, M.; BENAMER, S.; KHODJA, A.N.; OUSSEDIK-OUMEHDI, H.; LARABA-DJEBARI, F. Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 160-168, 2013.

TAJIRI, T.; MORITA, S.; SAKAMOTO, R.; MIMURA, H.; OZAKI, Y.; REPPAS, C.; KITAMURA, S. Developing dissolution testing methodologies for extended-release oral dosage forms with supersaturating properties. Case example: Solid dispersion matrix of indomethacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, p. 368-374, 2015.

TAMBURIC, S.; CRAIG, D.Q.M. The effects of ageing on the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly- (acrylic acid) gel systems. **Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 279–283, 1996.

TANDYA, A.; ZHUANG, H.Q.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N.R. Supercritical fluid micronization techniques for gastroresistant insulin formulations. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 9–16, 2016.

THANKI, K.; GANGWAL, R.P.; SANGAMWAR, A.T.; JAIN, S. Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, v.170, p.15–40, 2013.

UBAIDULLA, U.; KHAR, R.K.; AHMAD, F.J.; TRIPATHI, P. Optimization of chitosan succinate and chitosan phthalate microspheres for oral delivery of insulin using response surface methodology. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 14, p. 96–105., 2009.

UNITED STATES PHARMACOPEIA & NATIONAL FORMULARY, 26th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPEIA & NATIONAL FORMULARY, 33th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP 34–NF 29) **Chapter <1225> Validation of compendial procedures**, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA & NATIONAL FORMULARY, 37th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2014.

VILLANOVA, J.C.O.; AYRES, E.; ORÉFICE, R.L. Design, characterization and preliminary in vitro evaluation of amucoadhesive polymer based on modified pectin and acrylicmonomers with potential use as a pharmaceutical excipient. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 372–381, 2015.

VOIGT, R. Pharmazeutische technologie: für Studium und Beruf. 9. ed. **Stuttgart:Deutscher Apotheker**, p. 161, 2000.

VRIESMANN, L. C. **Extração, caracterização e aspectos reológicos de polissacarídeos da polpa dos frutos de *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçu)**.2008, 118f Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

WALTER, M.; SILVA, L.P.; DENARDIN, C.C. Rice and resistant starch: Different content depending on chosen methodology. **Journal of Food Composition and Analytical**, v. 18, p. 279–285, 2005.

WITTAYA-AREEKUL, S.; KRUEENATE, J.; PRAHSARN, C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. **Internation Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 113–118, 2006.

WOITISKI, C.B.; CARVALHO, R.A.; RIBEIRO, A.J.; NEUFELD, R.J.; VEIGA, F. Strategies toward the improved oral delivery of insulin nanoparticles via gastrointestinal uptake and translocation. **BioDrugs**, v. 22, p. 223–237, 2008.

WOITISKI, C.B.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A.; NEUFELD, R. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics**, v. 73, p. 25–33, 2009.

XU, X.; LI, B.; KENNEDY, J.F.; XIE, B.J.; HUANG, M. Characterization of konjac glucomannan–gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 192–197, 2007.

XU, Y.; WANG, L.; LI, Y.K.; WANG, C.Q. Oxidation and pH responsive nanoparticles based on ferrocene-modified chitosan oligosaccharide for 5-fluorouracil delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 27–35, 2014.

YADAV, S.; AHUJA, M.; KUMAR, A.; KAUR, H. Gellan–thioglycolic acid conjugate: Synthesis, characterization and evaluation as mucoadhesive polymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p.601– 607, 2014.

YANG, F.; XIA, S.; TAN, C.; ZHANG, X. Preparation and evaluation of chitosan–calcium gellan gums beads for controlled release of protein. **European Food Research andTechnology**, v. 237, p. 467–479, 2013.

YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.6, p.213–230, 2001.

YERRAMSETTY, K.M.; RACHAKONDA, V.K.; NEELY, B.J.; MADIHALLY, S.V.; GASEM, K.A.M. Effect of different enhancers on the transdermal permeation of insulin analog. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, p. 83–92, 2010.

YOON, H.S.; LEE, J.H.; LIM, S.T. Utilization of retrograded waxy maize starch gels as tablet matrix for controlled release of theophylline. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 449–453, 2009.

YU, J.G.; KRUSZYNSKA, Y.T.; MULFORD, M.I.; OLEFSKY, J.M.A. Comparison of troglitazone and metformin on insulin requirements in euglycemic intensively insulin-treated type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 48, p. 2414–2421, 1999.

YU, F.; LI, Y.; LIU, C.S.; CHEN, Q.; WANG, G.H.; GUO, W.; WU, X.E.; LI, D.H.; WU, W.D.; CHEN, X.D. Enteric-coated capsules filled with mono-disperse micro-particles containing PLGA-lipid-PEG nanoparticles for oral delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 484, p. 181–191, 2015.

ZAVAREZE, E.R.; DIAS, A.R.G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 317–328, 2011.

ZERBINI, A. P. N. D. A. **Desenvolvimento e avaliação de minicomprimidos contendo atorvastatina cálcica**. 2010. 104f (Dissertação de Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

ZHANG, H.; ALSARRA, I. A.; NEAU, S. H. An in vitro evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, n. 1–2, p. 197–205, 2002.

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, p.11–19, 2011a.

ZHANG, X.; ZHANG, 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, p. 1419–1425, 2011b.

ANEXO

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 47/ 2012

Pesquisador: ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN

Orientador: Prof. Dr. Raul César Evangelista

Projeto: Microcápsulas de goma gelana revestidas com filmes de amido resistente/ pectina como estratégia para administração via oral de insulina.

Parecer nº 05/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 20 de Fevereiro de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Microcápsulas de goma gelana revestidas com filmes de amido resistente/ pectina como estratégia para administração via oral de insulina", apresentado pela pós-graduanda Andréia Bagliotti Meneguini, sob orientação do Prof. Dr. Raul César Evangelista, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JULHO de 2014, em formulário para este fim.

Araraquara, 21 de Fevereiro de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA