RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 29/08/2021.

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

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

Eliete de Souza Von Zuben

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

Araraquara-SP
2019

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

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

Eliete de Souza Von Zuben

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

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

Araraquara-SP
2019

V945l

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

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

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

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

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Á Profª Drª Amanda Martins Baviera pelo apoio, momentos de descontração, pela parceria em todos os resultados dos ensaios *in vivo* e principalmente pelo carinho e amizade. Muito obrigada por tudo!

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

Á Profª Drª Leila Aparecida Chiavacci Favorin por permitir a utilização do rotaevaporador, a Profª Drª Rosangela Gonçalves Peccinini, a Prof.ª Drª Herida Regina Nunes Salgado e a farmacêutica Kelly Pestana Biava pela utilização e auxilio no CLAE.

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

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

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

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

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

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

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

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

São Francisco de Assis

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

Autor desconhecido

“A informação é cumulativa já o conhecimento é seletivo"

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 2. Secreção de insulina pelas células beta pancreáticas promovida pela glicose e sulfoniluréias. Fonte: KATZUNG; TREVOR, 2017 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3. Mecanismo de transdução do sinal da insulina. Fonte: CARVALHEIRA *et al*., 2002. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4. Farmacocinética dos diferentes tipos de insulina. Fonte: CAMPOS, 2011. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 5. Anatomia da cavidade nasal humana. Adaptado de PIRES *et al*., 2009.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 6. Tipos de transporte através das células epiteliais. Fonte: SILVA *et al*., 2002. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 7. Representação de um lipossoma (esquerda) e uma bicamada lipídica (direita). Fonte: BOZZUTO; MOLINARI, 2015. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 8. Mecanismos de internalização celular de CPPs . Adaptado de GUIDOTTI *et al*., 2017. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 9. (A) Rotaevaporador RV10 digital (IKA); (B) Homogeneizador a alta pressão, EmulsiFlex-C3 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 10. Reômetro, modelo RS-1 – Haake Rheostress..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 11. Imagem dos discos de mucina aderidos horizontalmente em prova cilíndrica em contato com formulação..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 12. Corte longitudinal de septo nasal suíno. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 13. Fotografia do dispositivo adaptado utilizado para determinação da seringabilidade.**Erro! Indicador não definido.**

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

Figura 15. Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e PZ. (A) Formulação A, obtida pelo método HFL; (B) Formulação B, obtida pelo método HFL; (C) Formulação C, obtida pelo método HFL; (D) Formulação D, obtida pelo método HFL. ..... **Erro! Indicador não definido.**

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

Figura 17. Cromatograma típico de insulina (50 μg/mL-1) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: Acetonitrila: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (60:40, v/v); Coluna C18-Luna® Phenomenex, dimensões 4,6mm x 250mm, 5 μm; Vazão de 1,0 mL/min; λ: 214 nm; Injeção: 20μL; 25ºC. ..... **Erro! Indicador não definido.**

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

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

Figura 20. Curva de calibração de insulina obtida por CLAE. ..... **Erro! Indicador não definido.**

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

Figura 22. Estabilidade da EE% das formulações funcionalizadas com CPPs.**Erro! Indicador não definido.**

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

Figura 24. Espectros de DC de estruturas do tipo α-hélices, folhas-β e estruturas irregulares. Fonte: Verli, 2014 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25. Espectros de DC das amostras analisadas antes do ensaio de liberação *in vitro*. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26. Espectros de DC das amostras analisadas depois do ensaio de liberação *in vitro.* ... **Erro! Indicador não definido.**

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

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

Figura 29. Reogramas de fluxo das formulações a temperatura de 32 ± 0,5ºC (A) e 37 ± 0,5ºC (B). Curvas ascendentes (símbolos cheios) e as curvas descendentes (símbolos vazios) (n=3). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 30. Viscosidades das formulações a temperatura de 32 ± 0,5ºC (A) e 37 ± 0,5ºC (B) (n=3). **.....** Erro! Indicador não definido.

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

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

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

Figura 34. Perfil de liberação *in vitro* das formulações em 8 h. Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32ºC. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 35. Perfil de liberação *in vitro* das formulações em 24 h. Condições do experimento: meio de Tampão PBS, pH 7.4; 300 rpm; 32ºC. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 36. Perfil de permeação cumulativa em porcentagem das formulações em 8 h..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 37. Perfil de permeação cumulativa em porcentagem das formulações em 24 h..... **Erro! Indicador não definido.**

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

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

Figura 40. Níveis de fosforilação de AKT (Ser-473) em músculos tibialis anterior de ratos diabéticos 360 minutos após a administração nasal de formulações de 1.HLB; 2.SSnasal; 3.Ins. nasal; 4.Ins. sub; 5.HI; 6.HLI; 7.HLIpnt; 8.HLItat contendo 2 U de insulina.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Característica epitélio nasal. Fonte: PIRES *et al*., 2009..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2. Avanços tecnológicos para aplicação intranasal de insulina. Fonte: SONIA; SHARMA, 2014..... **Erro! Indicador não definido.**

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

Tabela 4. Formulações lipossomais em ensaios clínicos. Adaptado de BULBAKE et al., 2017. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 5 Razão molar dos componentes da formulação A, B, C e D.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6. Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7. Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 8. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise da insulina. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 9. Análise de variância dos valores das áreas determinadas para a obtenção da curva analítica de insulina por CLAE. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 10. Determinação da precisão intracorrida (repetibilidade) de insulina por CLAE. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 11. Determinação da precisão intermediária de insulina por CLAE.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 12. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de insulina. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 13. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de insulina na mucosa nasal suína. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 14. Determinação da robustez do método por CLAE. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 15. Porcentagem de Eficiência de encapsulação (EE%) das formulações quantificadas por BCA. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 16. Porcentagem de Eficiência de encapsulação (EE%) das formulações quantificadas por CLAE. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 17. Resultados das leituras de DHM, Ipd e PZ nas amostras funcionalizadas com concentrações de TAT de 0,1mM a 0,7 mM..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 18. Resultados obtidos para as medidas de DHM, Ipd e PZ nas amostras preparadas com e sem a funcionalização. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 19. Parâmetros calorimétricos das amostras testadas. Temperaturas de pico (Tmax) e variações de entalpia (ΔH) nos termogramas de nano DSC coletados.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 20. Valores de índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) e regressão linear (R) a temperatura de 32 ± 0,5°C e 37 ± 0,5°C (n=3). ..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 21. Valores de G' e G'' da análise oscilatória para as formulações a temperatura de 32 ± 0,5°C e 37 ± 0,5°C (n=3). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 22. Trabalho de seringabilidade das formulações à 25ºC. ..... **Erro! Indicador não definido.**

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

Tabela 24. Coeficientes de determinação (R^2) da insulina liberada a partir das formulações obtidas através de diferentes modelos matemáticos. ..... **Erro! Indicador não definido.**

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

Tabela 26. Fluxo de permeação (J) e coeficiente de permeabilidade (Kp) obtidos para 300 μL das formulações contendo insulina a 214μg/mL, dispostas numa área de 1,77cm^2 de mucosa nasal suína em contato com o meio receptor tampão fosfato (PBS,pH 7,4). ..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN: Acetonitrila

ADA: Associação americana de diabetes

ANOVA: Análise de variância

AKT: Proteína quinase B

CLAE: Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

CPPs: Cell penetratin peptides

DHM: Diâmetro hidrodinâmico médio

DC: Dicroismo circular

DM: Diabetes Mellitus

DPR: Desvio padrão relativo

DP: Dicetil fosfato

EE%: Eficiência de encapsulação em porcentagem

EPM: Erro padrão da média

FDA: Food and Drug Administration

FNS: Fluído nasal simulado

GAGs: Glicosaminoglicanos

G': Modulo elástico

G'': Modulo viscoso

GUV: Vesículas unilamelares gigantes

HA: Ácido hialurônico

HCl: Ácido clorídrico

HEC: Hidroxieticelulose

HFL: Hidratação do filme lipídico

HI: Hidrogel de hidroxietilcelulose + insulina

HIV: Vírus da imunodeficiência adquirida

HLI: Hidrogel de hidroxietilcelulose+lipossoma + insulina

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

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

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

IDF: Federação internacional de diabetes

Idp: Índice de polidispersão

J: Fluxo de fármaco no estado de equilíbrio (μg/min.cm)

K: Índice de consistência

Kp: Coeficiente de permeabilidade aparente de difusão (cm/min)

kDa: Kilodalton

ŋ: Índice de escoamento

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

LUV: Vesículas unilamelares grandes

MLV: Vesículas multilamelares

O/A : Óleo : Água

OAM: Oleilamina

OMS: Organização Mundial da Saúde

Pa: Pascal

PNT: Penetratin

PTDs: Domínios de transdução de proteínas

PZ: Potencial zeta

r: Coeficiente de correlação

r2: Coeficiente de determinação

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

REV: Evaporação de fase reversa

SBD: Sociedade brasileira de diabetes

SNC: Sistema nervoso central

SUV: Vesículas unilamelares pequenas

STZ : Estreptozotocina

TAT: Proteína trans-ativadora da transcrição do HIV-1

TFA: Ácido trifluoroacético

Tm: temperatura de transição térmica

t1/2: tempo de meia vida

ULV: Vesículas unilamelares

WHO: Organização mundial de saúde

ΔH: entalpia

SUMÁRIO

RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....20

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.1 *Diabetes mellitus* (DM)..... **Erro! Indicador não definido.**

2.1.1 Classificação ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.1.2 Tratamentos para o DM ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.2 Insulina..... **Erro! Indicador não definido.**

2.2.1 Secreção, ações e degradação da insulina ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.2.2 Sinalização da insulina e controle de eventos metabólicos**Erro! Indicador não definido.**

2.2.3 Tipos de insulina ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.3 Administração intranasal..... **Erro! Indicador não definido.**

2.3.1 Transporte paracelular e transcelular ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.4 Lipossomas..... **Erro! Indicador não definido.**

2.4.1 Classificação, métodos de preparo e caracterização de lipossomas**Erro! Indicador não definido.**

2.4.2 Mecanismos de interação entre lipossomas e célula-alvo**Erro! Indicador não definido.**

2.4.3 Formulações lipossomais comerciais, ensaios clínicos e estudos científicos .. **Erro! Indicador não definido.**

2.5 Peptídeos de transdução de membrana (CPPs)..... **Erro! Indicador não definido.**

2.5.1 Mecanismos de internalização ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.5.2 Ensaios clínicos e pré-clínicos ..... **Erro! Indicador não definido.**

3. OBJETIVOS ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.1. Objetivo Geral..... **Erro! Indicador não definido.**

3.2. Objetivos Específicos..... **Erro! Indicador não definido.**

4. MATERIAL E MÉTODOS ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1 . Materiais, Solventes e Reagentes..... **Erro! Indicador não definido.**

4.2 . Equipamentos..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3 . Métodos..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.1 Preparação dos lipossomas incorporados com insulina**Erro! Indicador não definido.**

4.3.2 Funcionalização dos lipossomas com CPPs **Erro! Indicador não definido.**

4.3.3 Preparação do Hidrogel..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.4 Caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos**Erro! Indicador não definido.**

4.3.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**Erro! Indicador não definido.**

4.3.4.2 Diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e potencial zeta**Erro! Indicador não definido.**

4.3.4.3 Dicroismo circular (DC)..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.4.4 Microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC)**Erro! Indicador não definido.**

4.3.4.5 Estabilidade das formulações ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação da insulina utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.1 Parâmetros para validação de metodologia analítica**Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.2 Adequabilidade do sistema cromatográfico **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.3 Linearidade..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.4 Seletividade ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.5 Precisão ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.6 Exatidão..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.7 Limite de detecção..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.8 Limite de quantificação ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.5.9 Robustez ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.6 Avalição da eficiência da encapsulação da insulina**Erro! Indicador não definido.**

4.3.6.1 Eficiência de encapsulação medida por BCA**Erro! Indicador não definido.**

4.3.6.2 Eficiência de encapsulação medida por CLAE**Erro! Indicador não definido.**

4.3.7 Análises reológicas ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.7.1 Ensaio reológico contínuo ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.7.2 Ensaio reológico oscilatório ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.8 Avaliação da força mucoadesiva ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.9 Determinação da seringabilidade ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.10 Ensaios de liberação *in vitro* ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.10.1 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* da insulina**Erro! Indicador não definido.**

4.3.11 Ensaios de permeação em mucosa nasal suína**Erro! Indicador não definido.**

4.3.12 Ensaios biológicos *in vivo* ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.12.1 Ensaios de análise temporal da presença de insulina na circulação sistêmica em ratos não diabéticos ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.12.1.1 Animais ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.12.1.2 Desenho experimental e tratamento ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.12.2 Ensaios das respostas anti-hiperglicêmicas em ratos diabéticos ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.12.2.1 Animais ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.12.2.2 Indução do diabetes mellitus experimental . **Erro! Indicador não definido.**

4.3.12.2.3 Desenho experimental e tratamento ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.12.2.4 Alterações na ativação da sinalização da insulina na musculatura esquelética de ratos diabéticos ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3.13 Análise estatística ..... **Erro! Indicador não definido.**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.1. Preparação dos lipossomas incorporados com insulina**Erro! Indicador não definido.**

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

.....**Erro! Indicador não definido.**

5.3. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação da insulina utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**Erro! Indicador não definido.**

5.3.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico**Erro! Indicador não definido.**

5.3.2 Seletividade..... **Erro! Indicador não definido.**

5.3.3 Linearidade..... **Erro! Indicador não definido.**

5.3.4 Precisão ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.3.5 Exatidão ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.3.6 Limites de detecção e de quantificação..... **Erro! Indicador não definido.**

5.3.7 Robustez..... **Erro! Indicador não definido.**

5.4 Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.5 Funcionalização dos lipossomas com CPPs..... **Erro! Indicador não definido.**

5.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.7 Preparação do Hidrogel..... **Erro! Indicador não definido.**

5.8 Dicroismo circular (DC) ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.9 Microcalorimetria exploratória diferencial (nano DSC)**Erro! Indicador não definido.**

5.10 Análises reológicas ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.10.1 Ensaio reológico contínuo..... **Erro! Indicador não definido.**

5.10.2 Ensaio reológico oscilatório..... **Erro! Indicador não definido.**

5.11 Avaliação da força mucoadesiva..... **Erro! Indicador não definido.**

5.12 Determinação da seringabilidade ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.13 Ensaios de liberação in vitro ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.14 Ensaios de permeação em mucosa nasal suína ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.15 Ensaios biológicos in vivo ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.15.1 Ensaios de análise temporal da presença de insulina na circulação sistêmica em ratos não diabéticos ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.15.2 Ensaios das respostas anti-hiperglicêmicas em ratos diabéticos..... **Erro! Indicador não definido.**

5.15.2.1 Alterações na ativação da sinalização da insulina na musculatura esquelética de atos diabéticos ..... **Erro! Indicador não definido.**

6. CONCLUSÕES.....26

7. CONCLUSÃO FINAL 124

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....29

9. ANEXO.....56

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A capacidade de absorção por unidade de área é relativamente elevado pela via nasal. Apesar do volume da cavidade nasal ser pequeno, entre 15 a 20 cm^3, a sua área de absorção é relativamente grande, 150 cm^2, com uma camada epitelial coberta por numerosas microvilosidades. Além disso, a camada sub-epitelial é altamente vascularizada, o que permite que sejam atingidos níveis terapêuticos rapidamente, com um início de ação do fármaco mais rápido, pois o sangue venoso passa diretamente para a circulação sistêmica. Todos esses fatores podem favorecer a redução da dose, a diminuição de efeitos adversos e a adesão ao tratamento em pacientes que dependem do uso contínuo de insulina (OWENS *et al*., 2003; LASSMANN-VAGUE; RACCAH, 2006; KHAFAGY *et al*., 2007; SHAH *et al*., 2010; RITTHIDEJ, 2011).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

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

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

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

3. PERSPECTIVAS

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

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

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n° 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. ANEXO

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

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

C E R T I F I C A D O

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

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

Araraquara, 18 de abril de 2018.

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
Coordenadora da CEUA