

João Tiago C. Semião

**NANOMEDICINAS DE USO ENTÉRICO: APLICAÇÕES
PARA AUTOIMUNIZAÇÃO**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014

João Tiago C. Semião

**NANOMEDICINAS DE USO ENTÉRICO: APLICAÇÕES
PARA AUTOIMUNIZAÇÃO**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde
Porto, 2014

João Tiago C. Semião

**NANOMEDICINAS DE USO ENTÉRICO: APLICAÇÕES
PARA AUTOIMUNIZAÇÃO**

Orientadora: Professora Doutora Eliana Souto

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

As nanopartículas poliméricas, destinadas à administração oral de proteínas e péptidos terapêuticos, são actualmente uma realidade inovadora na área da biotecnologia e predizem uma revolução no campo das ciências farmacêuticas nas suas diferentes abordagens.

Contudo, existem alguns factores condicionantes na vectorização deste tipo de moléculas que dificultam a concepção de fórmulas farmacêuticas viáveis para uso terapêutico generalizado, tais como, baixa permeabilidade na membrana, biodisponibilidade terapêutica diminuída, elevado peso molecular e degradação enzimática ao longo do tracto gastrointestinal.

Todavia, nas últimas décadas têm sido realizados inúmeros esforços pela comunidade científica, emergindo assim a área da nanomedicina como a resposta mais plausível para a concepção de vectores coloidais que permitam ultrapassar as limitações inerentes a este tipo de fármacos.

O presente estudo tem como objectivo dar a conhecer os avanços científicos mais recentes na área das nanopartículas poliméricas, em particular no desenvolvimento de sistemas coloidais que permitam a autoimunização.

Pretende-se assim elucidar o leitor para:

- i. vantagens e dificuldades na concepção de partículas nanométricas
- ii. mecanismos de transporte envolvidos no transporte de nanopartículas
- iii. abordar as principais dificuldades na vectorização de péptidos e proteínas
- iv. expor os vários polímeros naturais e sintéticos disponíveis que apresentam melhores capacidades bioadesivas, imunogénicas e biodegradáveis
- v. dar a conhecer algumas moléculas terapêuticas que futuramente poderão ser vectorizadas através de nanopartículas poliméricas.
- vi. Introduzir o conceito de nanovacina

Palavras-chave: nanopartículas poliméricas; nanomedicina; vectorização; proteínas; péptidos; nanovacinas; autoimunização

Abstract

Polymeric nanoparticles applied for oral delivery of peptides and proteins, are a current innovative area in biotechnology foreseeing changes in pharmaceuticals at different levels.

However, several factors exist defining the drug targeting properties of these molecules, limiting the design of drug formulations for therapeutic application, such as low membrane permeability, low bioavailability, high molecular weight and enzymatic degradation in the gastrointestinal tract.

The scientific community has nevertheless made numerous efforts in the last decade and the emerging of nanomedicine is a promising approach to overcome the inherent limitations of this type of drugs.

The present study aims therefore to ascertain the latest scientific advances in the field of polymeric nanoparticles, in particular in the development of colloidal systems that allow autoimmunity.

It is expected to elucidate the reader about the:

- i. advantages and difficulties in the design of nanometer particles
- ii. transport mechanisms involved in the transport of nanoparticles
- iii. main difficulties in carry of peptides and proteins
- iv. various natural and synthetic polymers available that hold the best bioadhesive, biodegradable and immunogenic abilities
- v. therapeutic molecules that may hereafter can be carry using polymeric nanoparticles.
- vi. concept of nanovaccine

Keywords: polymeric nanoparticles; nanomedicine; drug vectorization; proteins; peptides; nanovaccines; autoimmunization

João Tiago C. Semião

“Veni, vidi, vici.”

Júlio César, 47 a.C

Agradecimentos

Reservo esta página para agradecer a todos aqueles que me acompanharam ao longo destes cinco anos e que de alguma forma me auxiliaram neste longo percurso académico que agora chega ao fim.

Em primeiro lugar, à minha família, aos meus pais e ao meu irmão, que são os três pilares fundamentais da minha vida. Um bem haja por todo o esforço e por me terem possibilitado concluir este mestrado integrado com o qual sempre sonhei.

À minha orientadora, Prof. Doutora Eliana Souto pelas suas críticas construtivas, orientação e tempo despendido. A ela devo parte do meu percurso académico enquanto discente e orientando. Um bem haja.

Aos meus amigos, sem excepção, que me acompanharam nesta jornada, sem dúvida que o vosso companheirismo, carinho e amizade tornaram esta viagem muito mais divertida.

Vorrei ringraziare tutti gli amici che ho avuto il piacere di conoscere durante i nove mesi di erasmus a Parma. Grazie mille, per una delle esperienze più belle della mia vita.

Ao Porto e a Parma pelo acolhimento,

A Mira.

ÍNDICE GERAL

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Agradecimentos.....	7
Índice geral.....	8
Índice de Figuras.....	10
Lista de abreviaturas.....	11
Capítulo I.....	12
1.1 Definição de nanomedicina.....	12
1.2 Nanomedicina na autoimunização.....	13
1.3 A via entérica na administração das nanomedicinas.....	15
1.3.1 A via oral na administração de péptidos e proteínas.....	15
1.3.2 Transporte de nanopartículas através da mucosa gastrointestinal.....	17
1.3.3 Transporte paracelular.....	17
1.3.4 Transporte transcelular.....	18
1.4 Barreiras biológicas que condicionam a absorção de proteínas e péptidos no tracto gastrointestinal.....	19
1.4.1 A barreira gastrointestinal.....	19
1.4.2 A mucosa como barreira na absorção de péptidos.....	20
Capítulo II.....	21
2.1 Nanomedicinas poliméricas.....	22
2.2 Polímeros.....	23
2.2.1 Polímeros Naturais.....	24
2.2.1.1 <i>Albumina</i>	24
2.2.1.2 <i>Alginato</i>	25
2.2.1.3 <i>Caseína</i>	27
2.2.1.4 <i>Gelatina</i>	28
2.2.1.5 <i>Quitosano</i>	28

2.2.1.6 <i>Etilcelulose</i>	30
2.2.2 Polímeros Sintéticos.....	30
2.2.2.1 <i>Ácido poliláctico</i>	30
2.2.2.2 <i>Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)</i>	31
2.3 Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas.....	32
2.4 Parâmetros que influenciam as propriedades das nanopartículas.....	33
Capítulo III	35
3.1 Nanopartículas na administração oral de péptidos e proteínas.....	35
3.1.1 <i>Insulina</i>	35
3.1.2 <i>Calcitonina</i>	37
3.1.3 <i>Ciclosporina</i>	38
3.1.4 <i>AZT</i>	39
3.1.5 <i>Thymopentin</i>	40
3.2 Imunização através do uso de micro e nanopartículas.....	41
3.3 Nanopartículas na administração de vacinas pela via oral.....	42
3.3.1 <i>HIV</i>	43
3.4 Encapsulação de ADN para a administração oral de nanovacinas.....	45
3.5 Perspectivas futuras.....	47
Bibliografia	48

Índice de Figuras

Fig. 1 - Ilustração esquemática dos mecanismos de transporte

Fig. 2 - Estrutura química do Alginato

Fig. 3 - Estrutura química do Quitosano

Fig. 4 - Estrutura química do PLA

Fig. 5 - Estrutura química do PLGA

Lista de abreviaturas	
nm	Nanómetro
ETPN	European Tecnology Platform on Nanomedicine
MHC	Major histocompatibility complex
AARA	American Autoimmune Related Disease
ADN	Ácido desoxirribonucleico
m ²	Metro quadrado
PEG	Polyethylene glycol
Å	Angstrom
kDa	Dalton (unidade de massa atómica)
%	Percentagem ou porcentagem
NH ₂	Grupo funcional amino
COOH	Grupo funcional carboxila
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
HIV ou VIH	Vírus da imunodeficiência humana
Sida	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AZT	Zidovudina
pH	Potencial de hidrogénio
GI	Gastrointestinal
®	Marca Registrada
GRAS	Generally Recognized As Safe
FDA	Food and Drug Administration
UI	Unidade Internacional
RES	Sistema reticuloendotelial
SC	Via subcutânea
IM	Via intramuscular
PI	Ponto isoeléctrico
°C	Graus Celsius
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
NPs	Nanopartículas
TP5	Thymopenti
MET	Microscopia Electrónica de transmissão
O-MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
SIV	Vírus da imunodeficiência Símia

Capítulo I

1.1 Definição de Nanomedicina

A nanomedicina pode ser definida como a ciência que prevê a utilização de materiais em nanoescala ou nanoestruturados nas áreas das ciências biomédicas, que são desenvolvidos com o intuito de exercerem efeitos médicos únicos com base nas suas estruturas. Por conseguinte, são incluídas todas as estruturas com pelo menos uma dimensão característica entre 1 a 100 nm. (*National Nanotechnology Initiative*, 2013).

Segundo o *The European Technology Platform on Nanomedicine* define-se nanomedicina como a aplicação da nanotecnologia na área da saúde que envolve a exploração de novas propriedades químicas, físicas e biológicas dos materiais à escala nanométrica (ETPN, 2014).

A aplicação da nanotecnologia à medicina abrange um amplo espectro de áreas, incluindo a detecção molecular, diagnóstico, vectorização de fármacos, regulação de genes e a produção de proteínas (Campolongo *et alli*, 2010).

A vantagem inerente à utilização da nanomedicina resulta de dois fenómenos gerais que ocorrem à escala nanométrica: transições em propriedades físico-químicas e transições em interações fisiológicas (*National Nanotechnology Initiative*, 2013).

Adicionalmente, muitos dos benefícios da nanomedicina estão relacionadas com as interações fisiológicas intrínsecas que ocorrem na transição entre a escala molecular e microscópica (Van Eerdenbrugh *et alii*, 2008).

As nanopartículas possuem também propriedades físico-químicas que as tornam bastante atractivas no campo das ciências farmacêuticas em detrimento dos materiais comuns, no estado *bulk*, tais como: elevada condutividade, elevada área de superfície e melhores propriedades ópticas. Por conseguinte, as nanomedicinas despertam o interesse de toda a comunidade académica, visto que não só poderão revolucionar a área da saúde na formulação de novos e potentes fármacos, mas também melhorar as formulações já existentes no mercado, aumentando a sua eficácia, diminuindo os efeitos adversos e modificando o perfil de libertação dos fármacos (Thorley e Tetley, 2013).

1.2 Nanomedicina na autoimunização

A autoimunidade abrange todos os mecanismos funcionais do sistema imunológico que estão envolvidos no reconhecimento de todos os componentes do hospedeiro (*o self*), por processos e mecanismos intrínsecos importantes ao funcionamento de toda a imunidade adaptativa e fisiológica.

À luz do conhecimento actual e com a identificação de autoanticorpos que reagem com elementos dos órgãos do hospedeiro descobriu-se que o sistema imunológico pode ser autoagressivo, surgindo assim o conceito de doença autoimune (Arosa, 2012).

As doenças autoimunes, representam um conjunto de patologias crónicas distintas associadas a uma resposta imunológica exacerbada do sistema imunitário (linfócitos T e linfócitos B) de um indivíduo. O sistema imunológico normalmente orientado para a destruição de corpos estranhos e/ou invasores tais como: vírus, bactérias e outras formas de agentes etiológicos, falha e é incapaz de reconhecer antígenos próprios originando uma resposta anormal que leva ao ataque e destruição de células, tecidos e órgãos do doente (Temajo e Howard, 2014).

A etiopatogenia destas doenças é multifatorial, resultando na interacção de factores ambientais e genéticos como genes de MHC, do complemento e de imunorregulação que influenciam na susceptibilidade à doença. Todavia, o catalisador inicial da doença (ambiental ou interno) é determinante para o início e estabelecimento da patologia. Entre estes factores, podem-se enumerar: agentes microbianos, fármacos, químicos, factores nutricionais, factores hormonais entre outros (Arosa, 2012).

Segundo a *American Autoimmune Related Disease Association* actualmente mais de 80 doenças autoimunes são reconhecidas, existindo porem a convicção que adicionalmente 40 outras doenças têm por base o sistema imunológico (AARDA, 2014).

As doenças autoimunes podem ser classificados de acordo com o tipo de agressão, sistémica ou específica de um órgão podendo também distinguir-se doenças em que há uma perturbação da regulação, selecção ou apoptose dos linfócitos, de

outras em que existe uma resposta exacerbada a um antígeno específico (Arosa, 2012).

Nas doenças autoimunes sistêmicas podem-se incluir: artrite reumatoide, lúpus eritematoso, síndrome de Sjögren, que atacam vários órgãos de forma não específica no mesmo período de tempo. A distribuição sistêmica de antígenos próprios determina em larga escala a manifestação clínica da doença.

Na segunda classe, incluem-se doenças como: diabetes do tipo 1, esclerose múltipla, cirrose biliar primária, tireoidite de Hashimoto e doença de Basedow-Graves em que a resposta imune é específica contra antígenos próprios localizados num determinado órgão (Temajo e Howard, 2014).

Os mecanismos patogénicos envolvidos incluem lesão celular directa, quanto existe um ataque pelos anticorpos ou linfócitos que origina lise celular e/ou alterações inflamatórias no órgão envolvido, seguido de reparação e limitação funcional do órgão. Os autoanticorpos podem também intervir originando lesões celulares nos tecidos pela formação de imunocomplexos.

Actualmente, e com o conhecimento dos antígenos alvo e das células envolvidas, têm surgido um interesse no desenvolvimento de imunoterapias direccionadas (as citocinas, linfócitos, receptores e de indução de tolerância ao autoantígeno), cujos resultados revelam-se bastante promissores (Arosa, 2012).

1.3 A via entérica na administração das nanomedicinas

1.3.1 A via oral na administração de péptidos e proteínas

A administração de nanomedicinas na via entérica, em particular através da via oral é amplamente preferível em detrimento de outras vias existentes. As vantagens inerentes à administração oral fundamentam-se pela maior aceitação, conforto e segurança para o doente que se traduz num aumento da eficácia e cumprimento da terapia farmacológica. Uma outra vantagem é a sua natureza não invasiva que evita desconforto e dor associado a outras vias, assim como a não necessidade de um processo de esterilização que se traduz numa redução de custos associados à produção dos medicamentos (Salama *et alli*, 2006).

Todavia, a vectorização de fármacos de natureza péptidica e proteica pela via oral acarreta alguns problemas pois estas moléculas devem resistir ao ambiente gastrointestinal bastante hostil de forma a aderirem a superfície apical e serem facilmente absorvidas pelas células do intestino, os enterócitos. Como tal, a biodisponibilidade destes biopéptidos permanece relativamente baixa quando administrados oralmente devido à sua baixa permeabilidade na mucosa e à diminuta estabilidade no meio, resultando na degradação do composto antes da sua absorção (Steffansen *et alli*, 2004) (Lee, 2002).

A entrega oral de proteínas tornou-se assim um objectivo muito atractivo nos últimos anos devido ao aumento da disponibilidade de novas terapias através do aparecimento da tecnologia de ADN recombinante.

Um dos objectivos primordiais da administração de fármacos pela via oral é o fornecimento de péptidos e proteínas, como a insulina e vacinas com uma eficácia semelhante às formulações administradas pela via parentérica (Adessi *et alii.*, 2002).

A relevância atribuída às proteínas deve-se a três acontecimentos primordiais. Em primeiro lugar, ao aparecimento de métodos analíticos que levaram à descoberta de inúmeras hormonas e peptídeos que têm aplicabilidade como biofármacos. Em segundo lugar, à biologia molecular e à engenharia genética que permitiram a produção em grande escala de polipeptídeos que anteriormente estavam disponíveis

apenas em pequenas quantidades. E por último, à compreensão do papel fulcral das proteínas reguladoras nas patologias humanas (Adessi *et alii.*, 2004).

A administração de péptidos pela via oral constitui também um desafio possibilitando uma nova forma de abordagem na autoimunização. A superfície da mucosa do trato gastrointestinal humano, apresenta uma área de cerca de 300m², que diariamente contacta com uma enorme variedade de antigénios, incluindo proteínas e constituintes de bactérias da flora intestinal. Devido à existência de uma constante pressão de antigénios é natural que o intestino desenvolva mecanismos para revogar as respostas inflamatórias potencialmente prejudiciais, levando ao desenvolvimento de um ambiente de tolerância imunológica.

Todavia, a administração de fármacos bioactivos como peptídeos e proteínas apresenta vários desafios, visto que, o ambiente gastrointestinal é hostil para estas moléculas que devem persistir no lúmen o tempo necessário para aderir a superfície da célula apical, e em seguida, serem transportadas para o interior dos enterócitos. Como tal, os péptidos e as proteínas apresentam baixa biodisponibilidade quando administrados por via oral, devido à sua baixa permeabilidade na mucosa e à sua reduzida estabilidade ao longo do tracto gastrointestinal, resultando na degradação antes de ocorrer a absorção dos compostos (Des Rieux *et alii.*, 2013).

Ao longo de vários anos, inúmeros estudos expressaram uma melhoria acentuada na administração oral de peptídeos e proteínas, tendo várias estratégias sido desenvolvidas no âmbito de melhorar a administração de fármacos e vacinas pela via oral. Uma das mais promissoras perspectivas é a utilização de nanopartículas poliméricas, pois apresentam elevada estabilidade no tracto gastrointestinal, o que não acontece com outros transportadores coloidais.

As nanopartículas poliméricas apresentam elevado interesse no campo da nanomedicina. Em primeiro lugar pela sua alta estabilidade comparativamente a outros transportadores coloidais como os lipossomas. Em segundo lugar; a utilização de vários materiais poliméricos vai permitir a modulação das características físico-químicas (como por exemplo, hidrofobia, potencial zeta), as propriedades de libertação do fármaco (por exemplo, formas farmacêuticas de libertação retardada, prolongada e sequencial) e o comportamento biológico (por exemplo, direccionamento e bioadesão) das nanopartículas (Des Rieux *et alii.*, 2013).

E por último, a superfície da partícula pode ser modificada por adsorção e/ou introdução de cadeias químicas de certas moléculas, tais como polietilenoglicol (PEG), poloxâmeros e moléculas bioactivas (lectinas, invasinas, entre outras). Ademais, o tamanho muito reduzido e a elevada área superficial específica favorece a absorção em comparação com vectores de maiores dimensões. Consequentemente, já foi amplamente demonstrado que a nanoencapsulação de peptídeos e proteínas em transportadores coloidais protege contra o ambiente hostil do tracto gastrointestinal, favorecendo o transporte através da mucosa (Des Rieux *et alii.*, 2013).

1.3.2 Transporte de nanopartículas através da mucosa gastrointestinal

O transporte de nanopartículas através do epitélio intestinal pode ser realizado por dois mecanismos diferentes: transporte paracelular (entre as células), transcelular (através das células). A absorção em cada via depende de inúmeros factores tais como: características físicas da nanopartícula em que se incluem; peso molecular, hidrofobia, constante de ionização, estabilidade da molécula assim como barreiras biológicas que limitem a absorção de compostos proteicos no tracto gastrointestinal. Torna-se assim importante a compreensão destes processos na concepção de sistemas destinados à vectorização de fármacos de origem proteica aplicados à autoimunização (Yun *et alii.*, 2013).

1.3.3 Transporte paracelular

O transporte paracelular é um mecanismo de transporte passivo que se baseia na difusão e passagem de moléculas através das junções intercelulares entre as células epiteliais. Como tal, o tamanho da junção intercelular constitui o principal inconveniente ao transporte de substâncias ocorrendo uma limitação à passagem de certos iões e substâncias de maior tamanho (Madara, 1998).

O espaço paracelular situa-se na ordem dos 10 Å. O tamanho médio dos poros aquosos das junções epiteliais é de aproximadamente 7-9 Å para o jejuno, 3-4 Å para o íleo, e 8-9 Å para o cólon no intestino humano. Como tal, solutos que excedam os 15 Å (aproximadamente 3.5 kDa) não conseguem ultrapassar por esta via. Ademais,

as junções intercelulares compreendem apenas cerca de 0,01% da área de superfície total de absorção do intestino.

Podemos concluir que a entrega de péptidos nas junções intercelulares através do transporte paracelular é severamente restrito. Todavia, várias estratégias têm sido desenvolvidas com vista a melhorar o transporte paracelular, quer seja pela utilização de agentes tensioactivos ou pela introdução de polímeros hidrossolúveis como o quitosano, amido e/ou polímeros contendo grupos tióis (Yun et alli, 2013).

1.3.4 Transporte transcelular

O transporte transcelular de nanopartículas ocorre no epitélio intestinal por um processo denominado por transcitose, que consiste na absorção por endocitose, processo que ocorre na membrana apical das células. Em seguida, as partículas são transportadas através das células e imediatamente libertadas no polo basolateral (Shakweh *et alli*, 2004).

A membrana basolateral apresenta-se mais fina e mais permeável que a membrana apical, visto que a razão entre a proporção proteína-lípido é inferior. O transporte transcelular depende ainda de vários factores inerentes à partícula, tais como: tamanho, carga, hidrofília e lipofília (Florence, 2004).

Os enterócitos e as células M são as células intestinais primárias para o transporte de substâncias. Os enterócitos representam a grande maioria das células existentes, sendo que as células M encontram-se apenas localizadas no epitélio das placas de Peyer representado cerca de 1% da superfície intestinal. As células associadas ao folículo (células M) são especializadas no transporte de antigénios sendo responsáveis pela entrega de proteínas e péptidos desde o lúmen até aos tecidos linfóides subjacentes por forma a induzir tolerância imunológica (Lai e D'Souza, 2008).

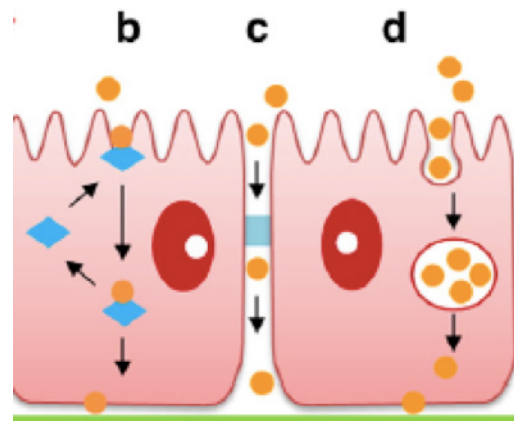


Fig.1: Ilustração esquemática dos mecanismos de transporte. c) Transporte paracelular
d) Transporte transcelular (Yun et alli, 2013)

Apesar do número de partículas com possibilidade de transporte por esta via se apresentar baixo devido à reduzida actividade endocítica dos enterócitos, vários estudiosos reportaram que a maior translocação de partículas ocorre na placa de Peyer como tal a incidência dos estudos desenvolvidos nesta área têm-se direccionado para as células M como potencial para administração oral de péptidos, proteínas e nanopartículas (Florence, 2004).

1.4. Barreiras biológicas que condicionam a absorção de proteínas no tracto gastrointestinal

1.4.1 A barreira gastrointestinal

Uma das dificuldades inerentes à administração de nanomedicinas de natureza peptídea na via oral é o ambiente hostil do tracto gastrointestinal que leva à inactivação ou destruição destas moléculas. A presença de inúmeras enzimas proteolíticas neste local tais como a tripsina, quimotripsina, elastase (endopeptidases) assim como, carboxipeptidases A e aminopeptidases (exopeptidases) dificulta o processo na concepção de novos nanofármacos possíveis de administrar na via oral (Wang, 1996; Woodley, 1994; Patel 2011).

Relativamente às endopeptidases, estas enzimas tem a capacidade de hidrolisar a ligação interna e terminal da cadeia peptídea, enquanto que as exopeptidases hidrolisam a ligação terminal NH₂ e/ou o aminoácido terminal COOH da cadeia peptídea. Ademais, o estômago produz uma série de substâncias que constituem o suco gástrico tais como, ácido clorídrico (HCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) (Langguth *et alli*, 1997).

O ambiente ácido do estômago que se encontra entre os valores de pH de 1.5 e 3.5 induz a proteólise de proteínas e péptidos em aminoácidos, dipéptidos e tripéptidos que os constituem.

O intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) é a principal zona de absorção de compostos, porem é o local no qual se encontra a maior actividade enzimática de protéases, compostos como, sacarases, peptidases, endopeptidases, exopeptidases,

dificultam o processo de entrega de fármacos na circulação sanguínea (Mrsny, 1991; Woodley, 1994).

Sendo assim, as alterações consequentes do pH nos vários locais do sistema GI vem como as enzimas presentes ao longo do tracto gastrointestinal, dificultam a concepção de sistemas coloidais que permitam a vectorização de compostos de natureza peptídea.

1.4.2 A mucosa como barreira anatómica na absorção de péptidos

A mucosa do tracto GI é constituída por 3 componentes que conferem protecção, a camada epitelial compacta existente que se encontra coesa por junções apertadas que repelem substâncias que podem ferir a mucosa, o muco protector segregado pela superfície das células epiteliais que forma uma camada de gel de protecção ao longo de toda a superfície da mucosa gástrica e os iões bicarbonato segregados pelas células epiteliais.

O glicocálix, é um dos principais constituintes da barreira da mucosa que dificultam a vectorização de proteínas e péptidos, este integrante existente na superfície das células epiteliais caracteriza-se por ser um revestimento fibroso, ligeiramente ácido que consiste em mucopolissacarídeos sulfatados.

O muco constituído por água (95%), glicoproteínas (mucina), lipídeos e electrólitos, confere protecção e lubrificação actuando como barreira à difusão de compostos exógenos entre o lúmen e o epitélio. Pode-se concluir que a camada epitelial, as camadas de muco e o glicocálix constituem uma das principais barreiras para a difusão de compostos de natureza proteica (Yun et alli, 2013).

Capítulo II

2. Nanomedicina na vectorização de proteínas.

Os mais recentes avanços na área da biotecnologia levaram à descoberta de inúmeras proteínas terapêuticas, como tal existe um crescente interesse no campo da nanomedicina aplicada á entrega de péptidos tendo o número de estudos na vectorização oral destes compostos aumentado exponencialmente. Como já referido anteriormente, a via oral apresenta-se como a mais vantajosa, não só pela acessibilidade e conforto, mas igualmente porque se apresenta como a mais fisiológica. Como tal, muitos investigadores na área da tecnologia farmacêutica têm-se dedicado à pesquisa de um sistema notável que viabilize a entrega oral destes compostos. A nanomedicina surge assim como a área por excelência com maior potencial para a vectorização de proteínas e péptidos (S.W Maria, 2001).

Um dos principais objectivos na concepção de nanopartículas como sistema de entrega de fármacos, baseia-se no controlo de tamanho de partículas, controlo das propriedades de superfície e controlo da cinética de libertação do fármaco com a finalidade de atingirem o local-alvo com óptima eficácia terapêutica na dose administrada (Soppimath *et alli*, 2001).

Neste segundo capítulo, procura-se assim elucidar o leitor para a utilização de nanopartículas poliméricas como um sistema coloidal em expansão com inúmeras possibilidades no campo da nanomedicina, em especial no ramo da autoimunização, vem como descrever os polímeros e enunciar os métodos de produção das nanopartículas.

2.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais com tamanho entre 10 a 1000nm. São actualmente divididas em duas categorias, nanocápsulas e nanoesferas (Brannon-Peppas, 1995).

Pode-se definir as nanopartículas poliméricas como um sistema sólido que tem por base polímeros que podem ser de natureza sintética, semi-sintética ou natural, de natureza biodegradável ou não, com dimensão na ordem dos nanómetros que tem como finalidade servirem de veículos para fármacos ou outras substâncias de interesse farmacêutico (COUVREUR *et alli*, 1995;Couvreur, 1988)

Relativamente às nanocápsulas, são sistemas vesiculares em que o fármaco, ou a substância de interesse farmacêutico a encapsular, está confinada a um núcleo que pode ser sólido ou líquido limitado por uma membrana polimérica denominada de invólucro. O fármaco pode encontrar-se no núcleo sob a forma dissolvida, adsorvida ou suspensa.

Comparativamente, as nanoesferas são estruturas de interesse farmacêutico que possuem uma estrutura do tipo matriz, em que o fármaco ou a substância de interesse farmacêutico pode ser adsorvida à superfície ou pode estar contida no interior de forma homogénea ou heterogénea.

A utilização de polímeros biodegradáveis têm-se revelado muito útil uma vez que são substâncias ou combinações de substâncias, que são biodegradáveis, biocompatíveis, não tóxicas, não alérgicas bastante úteis no campo da nanomedicina (Pinto Reis *et alli*, 2006;Barratt *et alli*, 2001).

2.2 Polímeros

Actualmente, e com a constante investigação na área dos biomateriais, os investigadores têm inúmeros polímeros e co-polímeros à sua disposição para a criação de sistemas coloidais nanométricos destinados à administração oral.

Os principais critérios de elegibilidade de um polímero destinado à veiculação de substâncias terapêuticas são: a biodisponibilidade, biocompatibilidade, velocidade de degradação e a fácil produção. A natureza do polímero que constitui a formulação vai influenciar o tamanho da nanopartícula, assim como o perfil de libertação do fármaco. Os polímeros naturais em geral proporcionam uma libertação relativamente rápida do fármaco em detrimento dos polímeros sintéticos que apresentam um perfil de libertação mais prolongado da molécula veiculada que se pode estender por longos períodos de tempo, vários dias ou até mesmo semanas. O perfil e o mecanismo de libertação do fármaco irá sempre depender da natureza do polímero, e de todas as propriedades físico-químicas decorrentes deste (Lemoine *et alli*, 1996).

Tecnologicamente existem inúmeros métodos de fabrico de nanopartículas que proporcionam diferentes modulações da sua estrutura, composição e propriedades fisiológicas. A escolha do método para preparar nanopartículas depende essencialmente do polímero e das características de solubilidade do composto activo a ser associado à nanomedicina (Soppimath *et alli*, 2001; Couvreur *et alli*, 2002; Montasser *et alli*, 2000).

Pretende-se de seguida fazer uma breve abordagem aos materiais mais utilizados no âmbito da nanoencapsulação pela via entérica, enunciando as características, vantagens e desvantagens inerentes à sua utilização. Por escolha do autor, efectua-se uma descrição dos polímeros na seguinte ordem, polímeros naturais e polímeros sintéticos, a sucessão no que respeita ao aparecimento dos polímeros de igual natureza tem unicamente em consideração a ordem alfabética não correspondendo a uma maior ou menor importância no contexto da tecnologia farmacêutica das nanomedicinas.

2.2.1 Polímeros Naturais

2.2.1.1 Albumina

A albumina sérica, independentemente da sua origem, humana ou bovina é uma proteína largamente utilizada na preparação de nanopartículas. Trata-se de uma proteína que apresenta características pertinentes que sustentam a sua utilização na área da nanomedicina. É uma proteína biodegradável e biocompatível que se degrada na maioria dos tecidos do organismo (Sharma *et alli*, 2006).

A albumina de origem humana demonstrou menos problemas, geralmente associados às proteínas carregadas positivamente após administração *in vivo* como por exemplo a opsonização pelas proteínas séricas. Como tal, considera-se assim a albumina de origem humana como não antigénica (Roser *et alli*, 1998).

As aplicações terapêuticas desta proteína são numerosas podendo não só ser utilizadas na vectorização de fármacos mas também em transfusões sanguíneas, conjugação directa com fármacos, terapia génica, libertação controlada de fármacos e em testes diagnóstico. No âmbito da indústria farmacêutica, a albumina é utilizada como agente estabilizante em produtos como vacinas e células (Shechter *et alli*, 2005; Rhaese *et alli*, 2003; Orson *et alli*, 2003; Patil, 2003; Chuang *et alli*, 2002; Schneider *et alli*, 2003).

Na vertente da nanomedicina, a albumina tem sido empregue em três áreas distintas, como fármaco modelo a encapsular, como polímero de revestimento de partículas poliméricas ou como polímero principal na encapsulação de outros fármacos (Polk *et alli*, 1994; Crotts e Park, 1997; Lameiro *et alli*, 2006; Kang e Singh, 2003; Anal *et alli*, 2003).

É possível verificar na literatura científica vários fármacos que já foram sujeitos a um processo de encapsulação que envolve albumina, tais como, ADN, plasmídeos, insulina, heparina, progesterona, várias hormonas, riboflavina, diversas vitaminas, piroxicam, loperamida, azidotimidina.

Actualmente é possível encontrar no mercado formulações baseadas em albumina como por exemplo, Albunex[®] e o Abraxane[®].

2.2.1.2 Alginato

O alginato é um dos polímeros mais utilizados na nanoencapsulação pois apresenta características interessantes que lhe conferem propriedades apeteceíveis na área da nanomedicina. Este polissacarídeo ostenta algumas propriedades singulares que tornam possível a sua aplicação como material de matriz para a encapsulação de inúmeras substâncias, tais como: proteínas, células vegetais, leveduras, bactérias, ácidos nucleicos e outros produtos não biológicos. Estruturalmente o ácido algínico consiste em cadeias lineares de resíduos de ácido β -D-manurónico (M) unidos por ligações tipo (1 \rightarrow 4) e resíduos do seu epímero, o ácido α -L-gulurónico (G), em várias proporções. Estes resíduos estão arrançados na forma de blocos de ácidos manurónico (M) ou gulurónico (G), ligados de forma a que a sequência destes resíduos na molécula seja alternada. A

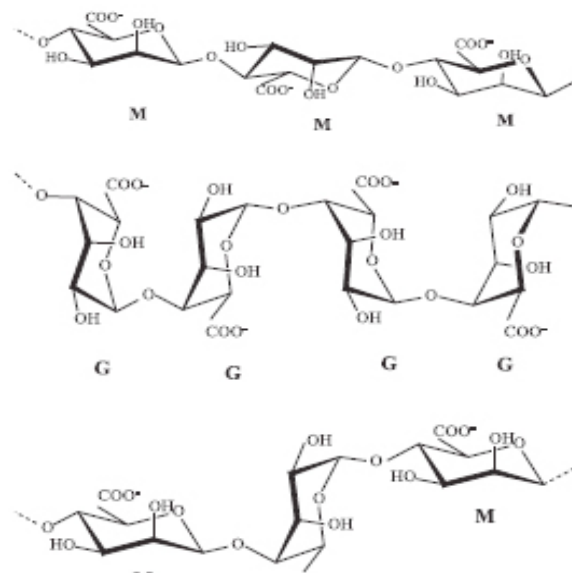


Fig. 2 Estrutura química do alginato (Sosnik *et alli*, 2014)

molécula deste polímero é constituída por blocos homopoliméricos, M- e G-, e por blocos heteropoliméricos MG (de Vos *et alli*, 2002; Higashi *et alli*, 2004; Machado *et alli*, 2013; Young *et alli*, 2006; Goh *et alli*, 2012).

O alginato possui a particularidade de formar um gel na presença de cатиões multivalentes, sob condições não agressivas para o fármaco encapsulado. Porém, as suas vantagens não se cingem apenas à particularidade referida, este polímero para além de ser economicamente vantajoso e acessível, é também um polímero biodegradável, não imunogénico, atóxico e biocompatível. O alginato é considerado uma substância GRAS pela FDA. Para além disso, o alginato é um polímero aniónico

forte e bioadesivo (Wee e Gombotz, 1998; Aggarwal *et alli*, 1999; George e Abraham, 2006).

Relativamente às suas capacidades bioadesivas, este polímero apresenta a capacidade de aderir à mucosa o que constitui uma vantagem na administração de fármacos encapsulados dirigidos a estas estruturas. Por outro lado, o alginato apresenta sensibilidade ao pH do meio, tal característica pode ser outra vantagem da aplicação do polímero quando se pretende uma libertação controlada do fármaco vectorizado (George e Abraham, 2006).

Por fim, existem estudos que enaltecem a capacidade do alginato reduzir a actividade *in vitro* da pepsina dependendo da concentração e mediante um mecanismo não competitivo (Strugala *et alli*, 2005).

O alginato é um polímero natural extraído da *Phaeophyceae*, algas castanhas, sendo o biomaterial marinho mais abundante depois da celulose (Lim e Kennedy, 1997).

Com fins comerciais, as três espécies mais utilizadas para extracção do alginato são *Macrocystis pyrifera*, a *Laminaria hyperborea* e a *Ascophyllum nodosum*. Quimicamente este composto é um polissacarídeo não ramificado composto por 2 tipos de ácido poliurónico, o ácido β -D-manurónico e o ácido alfa(simb)-L-gulurónico ligados por ligações (1,4)-glicosídicas (Strugala *et alli*, 2005).

Na área da nanoencapsulação, a preparação de nanopartículas de alginato teve como primeira experiência a utilização de soluções muito diluídas de alginato e de sais de cálcio, pelo método de gelificação ionotrópica (Rajaonarivony *et alli*, 1993). Os fármacos encapsulados nestas nanomedicinas foram exclusivamente do tipo oligonucleotidos “antisense” (Rajaonarivony *et alli*, 1993; Aynie *et alli*, 1999).

Presentemente, vários fármacos já foram veiculados em polímeros de alginato entre os quais se destacam, rifampicina, a isoniazida, o etambutol, doxorrubicina e outros fármacos como ADN e insulina (Lacerda *et alli*, 2014; Rastogi *et alli*, 2007; Ahmad *et alli*, 2006; Machado *et alli*, 2013; Wong e Sumiran, 2014).

Relativamente à insulina, efectou-se um ensaio em que se encapsulou esta substância em nanopartículas de alginato reforçadas com sulfato de dextrano e

revestidas com quitosano, polietilenoglicol (PEG) e albumina. A redução dos níveis de glicose foi superior a 75%, após a administração oral de nanoesferas contendo 100UI/kg em ratos diabéticos, comparativamente às nanoesferas vazias ou insulina não revestida, que não demonstram nenhuma resposta efectiva nos níveis de glicemia basal (Reis *et alli*, 2008).

2.2.1.3 Caseína

A caseína, presente no leite, é uma fosfoproteína constituída por várias subunidades, que diferem no seu peso molecular, ponto isoelétrico (pI) e no grau de fosforilação (Narambuena *et alli*, 2005).

Este polímero é um composto quimicamente constituído por um número elevado de aminoácidos, mais especificamente de prolina, que não originam interações entre si. A caseína não apresenta pontes dissulfureto como tal possui estruturas secundárias e terciárias ligeiras sendo por isso bastante difícil a sua desnaturação. É um polímero bastante hidrófobo e apresenta reduzida solubilidade em meio aquoso e em soluções neutras de sais, exhibe ainda estabilidade perante o calor e forma micelas através de ligações de cálcio e interações hidrófobas. As micelas resultantes são estruturas estáveis, esféricas com tamanho aproximado de 0,04 a 0,3 μm de diâmetro. Na presença de pH ácido a caseína agrega-se formando micelas, este efeito resultante é o factor determinante pelo efeito protector da formulação encapsulada durante a sua passagem gástrica e consequente absorção intestinal (Ye *et alli*, 2006; Morcol *et alli*, 2004)

A caseína apresenta várias aplicações biotecnológicas nomeadamente na área da bioquímica, indústria farmacêutica como polímero de revestimento e indústria alimentar. A aplicação da caseína na indústria farmacêutica tem sido sustentada com a utilização deste polímero associado e não isoladamente como polímero base. A título de exemplo, uma formulação de insulina desenvolvida por Morcol *et alli*. utilizou este co-polímero no revestimento de uma nanomedicina contendo fosfato de cálcio-PEG-caseína (Morcol *et alli*, 2004).

2.2.1.4 Gelatina

A gelatina é um polímero de natureza proteica, não irritante, biocompatível e biodegradável. É uma proteína derivada da hidrólise parcial do colagénio, em que as ligações moleculares naturais entre fibras separadas de colagénio são quebradas, permitindo o seu rearranjo (Kaul G, 2004).

A gelatina é considerada uma substância GRAS pela FDA devido a sua facilidade de obtenção no seu estado puro isento de pirogénios. A gelatina apresenta a capacidade de fundir com o calor a cerca de 35°C - 40°C. Quando dispersa em água, a gelatina forma um gel coloidal (Yoshioka T, 1981).

Este polímero pode ainda sofrer um processo de reticulação, que vai permitir a encapsulação de fármacos que sejam sensíveis à temperatura. Contudo a gelatina apresenta desvantagens pois pode ocorrer em alguns casos o estabelecimento de ligações covalentes entre polímero-fármaco. Para além disso, devido ao facto de se usarem agentes de reticulação(ex: formaldeído) , a granulometria das nanopartículas resultantes é geralmente superior. Este agente pode condicionar a administração do fármaco devido à sua toxicidade. Existem inúmeros fármacos que tem sido encapsulados com este polímero nomeadamente, ADN, antibióticos, insulina e albumina (Xu *et alli*, 2014;Li *et alli*, 2014;Zhao *et alli*, 2012;Azimi *et alli*, 2014).

2.2.1.5 Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo linear extraído dos crustáceos, derivado da quitina, e designa uma série de polímeros em diferentes graus de desacetilação (70-95%). Este polímero, obtido por N-desacetilação alcalina parcial é facilmente metabolizado pelas enzimas existentes no trato GI, como por exemplo, a lisozima (George e Abraham, 2006;Ravi Kumar, 2000).

O quitosano é um composto constituído por resíduos de D-glucosamina e N-acetilglucosamina ligados por ligações β -(1-4) (Ravi Kumar, 2000).

Este biomaterial apresenta algumas características peculiares que o tornam um polímero especial. Possui propriedades interessantes tratando-se de um polímero com

capacidade de bioadesão (Malaek-Nikouei *et alli*, 2008). Esta propriedade do quitosano aumenta com o seu peso molecular, grau de desacetilação e acidez do meio (George e Abraham, 2006).

Na área da nanomedicina, o quitosano surge como um dos polímeros mais utilizados e promissores como tal tem sido utilizado na encapsulação de anticorpos monoclonais, enzimas, proteínas, plasmídeos, fármacos convencionais (prednisolona, furosemida, ciclosporina) e aplicado na terapia génica com vectores não virais (Maya *et alli*, 2013; Smitha *et alli*, 2014; Nahaei *et alli*, 2013; Vural *et alli*, 2011).

No âmbito da autoimunização, Bugamelli *et al* criaram micropartículas contendo insulina revestida por partículas de quitosano e demonstraram que a encapsulação do péptido foi um sucesso. A administração do fármaco ocorreu durante 80h de forma constante (Bugamelli *et alli*, 1998).

Tozaki *et al.* com cápsulas de quitosano demonstraram uma eficácia farmacológica 3,49% em relação a insulina não encapsulado ou em cápsulas de lactose (Tozaki *et alli*, 1997). Actualmente, vários estudos estão a ser desenvolvidos

com este polímero e não apenas com péptidos como a insulina mas também com compostos citostáticos (Dhiman *et alli*, 2005). Relativamente aos métodos de preparação de nanopartículas de quitosano baseiam-se em formação espontânea de complexos entre polianiões (ex: tripolifosfato, alginato) e o quitosano (Calvo *et alli*, 1997; Sarmiento *et alli*, 2007). A utilização conjunta de alginato e quitosano tem cativado a comunidade científica visto que a sua associação cria complexos polieléctricos com potencial utilidade na administração oral de proteínas (George e Abraham, 2006). Mais recentemente tem surgido derivados do quitosano, tais como tiómeros de quitosano, que se tem demonstrado muito vantajosos na mucoadesão a nível intestinal (Bernkop-Schnurch *et alli*, 2006).

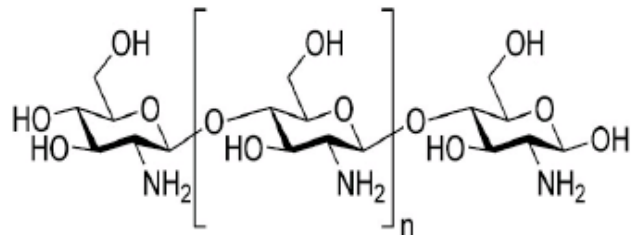


Fig. 3 – Estrutura química do quitosano (Sosnik *et alli*, 2014)

2.2.1.6 Derivado da celulose: Etilcelulose

Os derivados da celulose apresentam um enorme potencial na nanomedicina, tendo sido já aplicados como matéria prima na concepção de membranas para rins artificiais, material para regeneração óssea, vasos sanguíneos e sistemas de libertação controlada de fármacos (Gil MH, 2006; Diamantoglou *et alli*, 1999; Petrauskaite *et alli*, 2013).

A celulose é o polímero natural mais abundante na natureza, sendo comercialmente produzido através do algodão e da madeira. Quimicamente, a unidade funcional da celulose é a D-glucose que se encontra ligada por ligações glicosídeas com configurações β entre o carbono 1 e 4 das unidades adjacentes para formar uma cadeia longa de 1,4-glicanos. A celulose possui um grupo primário de dois grupos hidroxilo por unidade de glucose (Paul W, 2006).

Como polímero de revestimento na indústria farmacêutica são normalmente utilizados os derivados da celulose como acontece com a encapsulação de ranitidina e xantinas em partículas de etilcelulose (Mastiholimath *et alli*, 2008).

2.2.2 Polímeros Sintéticos

2.2.2.1 Ácido poliláctico (PLA)

O ácido poliláctico ou PLA é um polímero muito utilizado na área das ciências biomédicas devido as suas propriedades, tais como biocompatibilidade, ausência de toxicidade e biodegradabilidade. Assim como os outros derivados do ácido hidroxicarboxílico é sintetizado pela abertura do anel de co-polymerização de diésteres do ácido láctico. A forma mais comum para a obtenção de monómeros lácticos cíclicos é através da despolimerização de oligómeros na presença de catalisadores de sais metálicos inorgânicos.

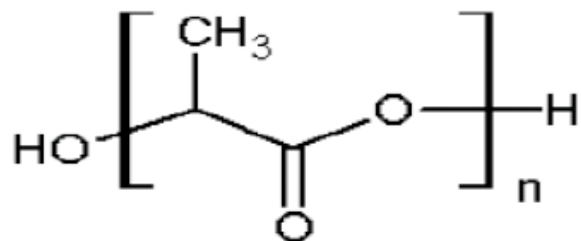


Fig. 4 Estrutura química do PLA (Sosnik *et alli*, 2014)

O PLA é actualmente bastante utilizado em várias aplicações biomédicas, tais como, suturas, implantes médicos e dispositivos para vectorização de fármacos. Por conseguinte inúmeros estudos se têm focado no desenvolvimento de sistemas para entrega e vectorização de fármacos, tais como, nanopartículas poliméricas.

2.2.2.2 Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)

PLGA ou poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) é um polímero biodegradável, atóxico, biocompatível e sintético aprovado pela FDA,

A síntese de PLGA inclui um procedimento de abertura de anel co-polimerização aleatório pela qual diésteres cíclicos de monómeros de ácido glicólico e láctico produzem um poliéster alifático linear. A hidrólise das ligações éster de PLGA origina monómeros iniciais de ácido láctico e ácido glicólico, que são subprodutos comuns do organismo humano como tal a sua toxicidade sistémica é desprezível (Soosan Abdollahi, 2012

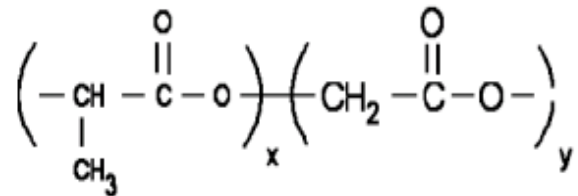


Fig. 5 –Estrutura química do PLGA(Sosnik et alli, 2014)

).

Mais recentemente, o PLGA tem ganho alguma atenção na indústria farmacêutica como transportador coloidal essencialmente na formulação de nanopartículas poliméricas. É possível encontrar na literatura inúmeros estudos que utilizam este polímero como transportador de vários fármacos tais como: tamoxifeno, budesonida e minociclina (Yao *et alli*, 2014; Pandey *et alli*, 2014; Amini *et alli*, 2014).

2.3 Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas

A preparação de nanopartículas baseia-se na criação de vectores que contenham no seu interior ou adsorvidas à superfície fármacos com um tamanho compreendido entre 1 a 1000nm. Como já referido, o termo nanopartícula é um nome colectivo para dois tipos de vectores coloidais, nanocápsulas e nanoesferas.

As nanoesferas possuem uma estrutura do tipo matriz. Os fármacos podem estar contidos na superfície da esfera ou encapsulados dentro da própria partícula, relativamente as nanocápsulas, são sistemas vesiculares, em que o fármaco está confinado no interior, ou seja, o núcleo é líquido e encontra-se rodeado por uma membrana polimérica. Neste caso, as substâncias activas são normalmente dissolvidas no núcleo interno, mas podem também ser adsorvidas na superfície da cápsula.(Couvreur, 1988;Pinto Reis et alli, 2006)

Vários métodos tem surgido com o desenvolvimento da nanomedicina contudo não é de todo o objectivo desta dissertação diferenciar e clarificar as vantagens tecnológicas e/ou desvantagens inerentes a cada método de fabrico.

Como tal, segue uma tabela que identifica os principais métodos de preparação e o respectivo polímero.

Polímeros	Método de preparação
Polímeros Sintéticos	
Poly(alkyl cyanoacrylate)	<i>Polimerização de monómeros</i>
Poly(alkyl methacrylate)	
Poly(styrene)	
Poly(vinylpyridine)	
Poly(ϵ -caprolactone)	<i>Nanoprecipitação</i>
Poly(lactic acid)	
Poly(lactic-co-glycolic acid)	
Poly(methacrylate)	
Poly(ϵ -caprolactone)	<i>Evaporação do Solvente</i>
Poly(lactic acid)	
Poly(lactic-co-glycolic acid)	
Poly(β -hydroxybutyrate)	
Cellulose acetate phthalate	<i>Salting out</i>
Poly(alkyl methacrylate)	
Etilcelulose	

Poly(lactic acid) Poly(lactic-co-glycolic acid)	
Polímero Naturais	<i>Desolvation, denaturation, ionic gelation</i>
Albumina	
Caseína	
Gelatina	
Alginato	
Quitosano	
Etilcelulose	

2.4 Parâmetros que influenciam as propriedades das nanopartículas

Existem alguns parâmetros importante que assumem uma relevância fulcral no comportamento e consequente absorção das NPs pela mucosa. Como já referido, a absorção das nanomedicinas pelas células intestinais depende em larga escala do tamanho da partícula, torna-se assim importante que todos os parâmetros que influenciam a dimensão sejam estritamente controlados. Como tal, inúmeros estudos têm-se concentrado na investigação dos parâmetros da formulação, com o objectivo de verificar a melhor forma de concepção das nanopartículas, com a finalidade de melhorar o comportamento *in vivo*.

Os desenhos metodológicos têm sido a técnica primordial para investigar o efeito dos parâmetros no tamanho das nanopartículas de PLGA. O número de ciclos de homogeneização, a adição de excipientes, a concentração do fármaco a encapsular e a proporção entre a fase aquosa e oleosa exterior são alguns exemplos desses parâmetros que podem influenciar o tamanho destes vectores coloidais (Dillen *et alli*, 2004;Fonseca *et alli*, 2002;Lemoine e Préat, 1998).

A concentração e a natureza do surfactante podem também influenciar o tamanho das nanopartículas (Lemoine e Préat, 1998;Jeffery *et alli*, 1991).

O peso molecular dos polímeros também influencia o tamanho final, quanto maior for o peso do polímero, mais pequenas e menos polidispersas serão as nanopartículas (Zambaux *et alli*, 1998).

A superfície do vector pode também influenciar a absorção pela mucosa intestinal. A hidrofobia e o potencial elétrico da nanopartícula dependem largamente da composição do polímero. Como tal várias técnicas surgiram possibilitando a alteração da superfície das nanopartículas, tais como: revestimento (“coating”) ou por enxertia (“*grafting*”) da molécula que altera as características de superfície do vector.

A integridade do fármaco encapsulado é um factor decisivo na biodisponibilidade e na eficácia farmacológica, como tal, os parâmetros envolvendo a encapsulação também foram estudados em particular pelo método de dupla emulsão. Zambaux e os seus colaboradores demonstraram que o processo de temperatura e a evaporação do solvente não alteravam as propriedades das nanopartículas mas alterava a eficiência da encapsulação. Relativamente as técnicas de nanoprecipitação, a diminuição da solubilidade dos fármacos solúveis em água por alteração do pH da fase aquosa promove uma melhoria relevante na eficiência do processo de encapsulação (Zambaux *et alli*, 1998; Govender *et alli*, 1999).

Capítulo III

3.1 Nanopartículas na administração oral de péptidos e proteínas

3.1.1 Insulina

A insulina é uma hormona polipeptídica de estrutura muito complexa que desempenha um papel fundamental no organismo humano nomeadamente na regulação dos hidratos de carbono, lípidos e metabolismo proteico. Actualmente, cerca de 25% dos doentes diabéticos são insulino dependentes sendo necessário a administração por injeção. Tendo em conta a sua estrutura polipeptídea, a insulina perde a sua actividade no tracto gastrointestinal devido à acção de enzimas gastrointestinais, como tal, é apenas administrada por injeção, normalmente pela via SC. Contudo, vários estudos tem sido desenvolvidos em inúmeras áreas entre as quais destaca-se a nanomedicina, com a finalidade de criar uma terapêutica que permita substituir as injeções diárias bastante desconfortáveis para o doente, por um sistema de administração oral com a mesma eficácia e menor consternação (INFARMED, 2012).

Considerando o número de doentes afectados por esta doença e a sua cronicidade é natural que inúmeros estudos estejam actualmente a ser desenvolvidos nesta área. Couvreur e os seus colaboradores desenvolveram nanocápsulas de poli isobutil cianoacrilato contendo insulina destinadas à administração oral. Os resultados obtidos foram promissores verificando-se que ocorreu uma redução muito significativa da glicemia após a administração em ratos (Damge *et alli*, 1988; Damgé *et alli*, 1990).

Pinto-Alphandary et al. conseguiram demonstrar através da MET que as mesmas nanocápsulas supracitadas conseguiram ser absorvidas a nível do epitélio intestinal. Porém, as nanocápsulas foram largamente degradadas através do transporte pelas células M. Apesar dos resultados bastante entusiastas, Cournarie et al. expressou que existe uma grande variabilidade relativamente à concentração da insulina que efectivamente consegue passar a barreira gastrointestinal (Pinto-Alphandary *et alli*, 2003; Cournarie *et alli*, 2002).

Alonso e os seus colaboradores também experimentaram a eficácia de nanopartículas de quitosano-glucomanan contendo insulina em ratos normais levando à ocorrência de uma hipoglicemia tardia, 14 horas após a administração, mantendo-se por 10 horas. O efeito hipoglicemiante foi atribuído à insulina absorvida a nível intestinal (Kotzé *et alli*, 1997; Pan *et alli*, 2002).

Nanopartículas de quitosano também demonstraram ser eficazes na redução da glicemia em doses 50UI ou 100UI/Kg em ratos diabéticos induzidos através da estreptozocina (Ma *et alli*, 2005).

Mais recentemente, Sun e os seus colaboradores criaram nanopartículas de quitosano e ácido poli(γ -glutâmico) contendo 15% de insulina conseguindo a abertura das junções apertadas entre as células caco-2 (*in vitro*) e a aderência destas nanopartículas à camada de muco do intestino delgado (*in vivo*), o que resultou na diminuição da glucose em ratos diabéticos, assim como uma biodisponibilidade oral de $15.1 \pm 0.9\%$ (Sung *et alli*, 2012).

O aumento da biodisponibilidade oral de insulina encapsulada em nanopartículas e nanocápsulas foi claramente demonstrado em estudos com animais. Contudo a elevada variabilidade da concentração de insulina no sangue, a baixa biodisponibilidade de insulina encapsulada requerendo a administração de doses elevadas, bem como a falta de informação que permita extrapolar estes resultados para seres humanos, representam desvantagens para o desenvolvimento de formulações orais de insulina.

3.1.2 Calcitonina

A calcitonina é uma hormona polipeptídica que intervém no metabolismo do cálcio. Esta hormona actua directamente com a paratiroide na regulação da absorção óssea, manutenção do cálcio e homeostasia corporal. Destina-se a diminuir a concentração plasmática de cálcio(em situações de hipercalcemia) nomeadamente em doentes com hipertiroidismo, metástases ósseas, hipercalcemia idiopática e intoxicação por vitamina D ou osteoporose na prevenção e tratamento. Actualmente encontra-se disponível em Portugal, segundo o prontuário terapêutico, em soluções injetáveis via IM e SC sendo possível encontrar calcitonina de salmão em soluções de pulverização nasal (INFARMED, 2012).

Devido à ineficácia terapêutica deste péptido aquando administrado pela via oral, vários esforços tem sido realizados para permitir a elaboração de uma formulação oral. A nanomedicina surge assim como uma das áreas que se propõem a dar resposta a este problema.

Nanopartículas contendo calcitonina foram administradas em ratos e verificou-se que comparativamente com uma solução oral de calcitonina, as nanopartículas conseguiram baixar os valores de cálcio no sangue.

Nanoesferas de PLGA revestidas com quitosano foram desenvolvidas. Foi observado uma diminuição dos níveis séricos de cálcio durante 12h após administração em ratos. As doses foram 125 IU/Kg e 250 UI/Kg (Jung *et alli*, 2000; Sakuma *et alli*, 1997; Takeuchi *et alli*, 2001).

Mais recentemente, um estudo realizado no departamento de tecnologia farmacêutica da Universidade de Ataturk, promoveu a encapsulação de calcitonina de salmão em nanopartículas de Eudragit® RSPO, Eudragit® L100 e Eudragit®-poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) para avaliação *in vitro* e *in vivo*. O estudo foi um enorme sucesso tendo-se obtido resultados muito positivos. Todas as formulações de nanopartículas foram capazes de exercer o seu efeito farmacológico em ratos tendo-se verificada uma redução bastante significativa de cálcio em comparação com a solução de calcitonina administrada. Devido ao seu efeito mucoadesivo, o Eudragit®

demonstrou um importante efeito hipocalémico, que se manteve durante 24 horas (Cetin *et alli*, 2012).

3.1.3 Ciclosporina

A ciclosporina é um fármaco imunomodulador que por vários mecanismos altera a resposta imune. Este fármaco é utilizado como um potente imunossupressor e pode ser administrado *per os* ou IV. Tem como finalidade terapêutica a prevenção da rejeição de um órgão nomeadamente transplante de rim, fígado, pâncreas, coração, coração-pulmão (INFARMED, 2012).

Contudo, a ciclosporina é um fármaco que apresenta baixa biodisponibilidade quando administrado pela via oral, como tal vários estudos tem sido conduzidos com a finalidade de desenvolver uma formulação mais eficaz.

Nanopartículas de quitosano foram concebidas para verificar se ocorria um incremento na absorção da ciclosporina. Após a administração das nanopartículas oralmente em cães registou-se um aumento significativo da absorção do fármaco comparativamente ao medicamento actualmente disponível no mercado Neoral®(El-Shabouri, 2002;Chen *et alli*, 2004).

Mais recentemente, um estudo elaborado por Park e os seus colaboradores procurou utilizar um método inovador, o SEDDS(Self-microemulsifying drug delivery system) encapsulando o fármaco em nanopartículas poliméricas de poli-DL-láctico (PDLLA) com um núcleo de óleo. Foi observado que com o aumento do teor de óleo no núcleo ocorre uma maior solubilização da ciclosporina contudo pode afectar a permeabilização *in vivo* do fármaco, sendo necessário efectuar mais estudos para verificar se este método é válido para a encapsulação deste fármaco (Park *et alli*, 2013).

3.1.4 AZT

A zidovudina (AZT) é um fármaco indicado para o tratamento de síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Pertence à classe de fármacos antivirais conhecidos como inibidores da transcriptase reversa e actua através da inibição da enzima transcriptase reversa do vírus de imunodeficiência humana (HIV)-1, como tal interfere num passo crítico do ciclo viral.

Porem, a zidovudina apresenta algumas desvantagens, nomeadamente a sua rápida metabolização a nível hepático para a sua forma inactiva, o glucuronido, resultando numa fraca biodisponibilidade oral.

Os efeitos secundários mais graves e frequentemente observados com o uso de continuado de AZT são: toxicidade hematológica, neutropenia anemia e trombocitopenia (INFARMED, 2012).

De forma a contrariar os efeitos secundários, a vectorização do fármaco poderá ser uma das abordagens mais promissoras pois permitirá alcançar a redução da dose, minimização da toxicidade sistêmica e uma terapia mais eficaz no tratamento da SIDA.

O sistema retículo-endotelial (RES), onde se localiza a maior parte dos macrófagos é considerado um dos mais importante reservatório para o HIV. Os macrófagos possuem na superfície vários receptores, tais como a fucose, galactose, e em particular , os receptores de manose. Os receptores de manose estão presentes na superfície de macrófagos, monócitos, macrófagos alveolares, astrócitos no cérebro e nos hepatócitos no fígado. Sendo assim é promissor utilizar sistemas de nanoparticulas vectorizadas especificamente para os receptores de manose que se encontram na superfície dos reservatório do HIV.

Recentemente, Jadhav e os seus colaboradores produziram nanoparticulas de gelatina contendo AZT destinadas a reconhecer os receptores de manose por forma a vectorizar o fármaco directamente no RES. O estudo foi um sucesso tem sido observados resultados promissores *in vitro*. O direccionamento do fármaco poderá assim melhorar a terapêutica e reduzir os efeitos secundários do fármaco, através da redução da posologia (Jadhav *et alli*, 2013).

3.1.5 *Thymopentin*

A thymopentin ou TP5 é um péptido sintético que corresponde aos resíduos de aminoácidos 32-36 da hormona tímica a timopoétina. Este péptido sintético possui toda a actividade biológica da hormona que lhe deu origem. Como tal possui a capacidade de induzir precocemente a diferenciação das células T e regulação da resposta imune. Este pentapéptido tem sido utilizado em inúmeras patologias, tais como, o Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), linfoma cutâneo das células T e artrite reumatoide. Porém devido à sua baixa permeabilidade na membrana do tracto gastrointestinal, tempo de semi-vida muito curto (aproximadamente 30s), injeções repetidas ou infusões intravenosas deste hormona são requeridas.

Por forma a superar estas adversidades inerentes e devido ao elevado valor terapêutico desta hormona, estudos têm sido conduzidos na tentativa de contrariar as desvantagens apresentadas.

Recentemente, Xuefeng Jin e os seus colaboradores conduziram um estudo na tentativa de ultrapassar todas estas limitações tendo encapsulado a TP5 em nanopartículas poliméricas de quitosano-glutationa. Após a encapsulação e respectiva administração das nanopartículas em ratinhos verificou-se a ocorrência de imunossupressão em todos os animais em que se administrou o péptido. Concluiu-se assim que as nanopartículas poliméricas podem ser um futuro e promissor veículo na encapsulação desta hormona sintética (Jin *et alli*, 2011).

3.2 Imunização através do uso de micro e nanopartículas

Segundo Eldridge *et alli*, para que possa ocorrer o transporte pelas células M através dos macrófagos linfáticos eferentes é necessário partículas de tamanho inferior a 5µm, como tal, vários estudos tem surgido com o intuito de criar um sistema micro e/ou nano que permita atingir tais dimensões com a finalidade de tornar possível imunização oral (Eldridge *et alli*, 1989; Foster e Hirst, 2005).

Entre os veículos desenvolvidos durante as últimas décadas as micropartículas biodegradáveis poliméricas têm sido as mais amplamente estudadas, nomeadamente compostos de PLA e PLGA. Um grande número de proteínas tem sido vectorizadas com êxito em micropartículas de PLGA mantendo a sua integridade estrutural e imunológica (Allaoui-Attarki *et alli*, 1997; Allaoui-Attarki *et alli*, 1998).

Mutwiri *et alli* através de vários estudos conseguiu provar que substâncias como proteínas, toxinas bacterianas e plasmídeos de DNA quando vectorizados em micropartículas PLGA conseguem induzir respostas imunes locais e sistémicas após a administração oral ou intragástrica.

Mais recentemente, surgiram dados que sugerem que a utilização de partículas de latex ou PLGA com tamanho entre os 500nm poderão ser mais eficientes que as partículas entre 1-5 µm (Mutwiri *et alli*, 2005; Challacombe *et alli*, 1997; Maloy *et alli*, 1994; Shakweh *et alli*, 2004).

Jungle *et alli* conduziu um ensaio *in vivo* em ratinhos para verificar se ocorria uma resposta imune após a administração oral. Como tal, utilizou nanopartículas de poly(vinyl alcohol)-co-PLGA com o objectivo de atingir uma maior concentração de toxoide tetânico. Após a administração *per os*, Jungle e os seus colaboradores conseguiram obter a indução de IgG e IgA. Relativamente as IgA verificou-se uma maior resposta quando comparada com o controlo (administração intraperitoneal). Verificou-se assim que o tamanho das partículas é importante para obtenção de uma melhor resposta imunológica (Jung *et alli*, 2001).

3.3 Nanopartículas na administração de vacinas pela via oral

A vacinação é reconhecida actualmente como o melhor meio de prevenção do estado de doença nas populações. Como tal, a vectorização de péptidos e proteínas em nanopartículas poliméricas assume-se como uma área importante que não deve ser negligenciada.

Comparativamente à vacinação sistémica, a vacinação na mucosa, mais particularmente a oral, apresenta vantagens nomeadamente; ausência de dor e desconforto, risco de infecção associado à injeção, menor custo e maior facilidade de imunização das populações com menores recursos. A vacinação no local-alvo da infecção é bastante desejável pois permite obter não só uma resposta sistémica mas também local. IgA produzidos localmente constituem 80% de todos os anticorpos originados nos tecidos associados à mucosa e são considerados um dos mais importantes na imunidade humoral sendo largamente reconhecidos como a primeira barreira à passagem de agentes patogénicos (van der Lubben *et alli*, 2001; Borges *et alli*, 2005).

Para além disso, diversos estudos confirmam que a administração de antígenos nas mucosas gera a um fenómeno comumente referido como sistema imune das mucosas, que se baseia na administração de antígenos localmente mas que origina uma resposta não só no local-alvo, mas também nas mais periféricas da mucosa. Por fim, a vacinação através das mucosas apresenta um potencial contra doenças infecciosas para as quais a vacinação parenteral apresenta baixa eficácia, como por exemplo, a vacina contra o HIV e a vacina contra a tuberculose (Regnstrom *et alli*, 2003; Illum *et alli*, 2001).

A indução de uma resposta imune aos antígenos administrados é alcançada principalmente nos tecidos linfóides organizados em placas de Peyer. A tolerância oral é assim obtida após a libertação dos antígenos no lúmen do intestino e transporte pelas células M para os linfócitos, macrófagos e células dendríticas.

No âmbito da nanovacinação oral é particularmente interessante favorecer a absorção nas células M, pois acredita-se que as células M representam a entrada para algumas bactérias, vírus e príões, desempenhando assim um papel fundamental na

gênese da doença. As células M são responsáveis pela entrega de nanopartículas provenientes do lúmen directamente para células linfóides intraepiteliais e para O-MALT sendo responsáveis por processar os antígenos vectorizados e dar início à resposta imune (Brayden e Baird, 2004).

3.3.1 HIV

Para obtenção de uma vacina eficiente contra o vírus do HIV, a resposta imunitária específica nas mucosas humanas assim como a resposta imunitária sistémica são dois objectivos críticos para a imunização eficaz das populações.

A imunização na mucosa assume especial importância nesta vacina devido à forma de propagação do vírus. Cerca de 90% dos seropositivos para o HIV adquirem a infecção através do contacto entre mucosas. Por conseguinte, é importante a imunidade específica de HIV nos locais das mucosas para impedir a propagação da infecção entre indivíduos. A presença de HIV e linfócitos T pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) foi detectada em tecidos da mucosa genital e gastrointestinais após infecção com os vírus patogénicos. Para além disso, a protecção contra a infecção das mucosas em macacos vacinados com estirpes atenuadas do SIV tem sido mais fácil de conseguir do que a protecção através da via intravenosa. No entanto, apesar de uma necessidade urgente de proporcionar uma melhor compreensão da capacidade de respostas imunitárias contra estes vírus de forma a evitar ou conter a replicação do HIV ou SIV nos tecidos da mucosa, a capacidade de diferentes estratégias de vacinas contra a SIDA para induzir respostas imunes nas mucosas ainda não está suficientemente explorada.

A indução de imunidade na mucosa no intestino tem sido demonstrada através de várias formulações de vacinas orais de ADN criadas e encapsuladas em micro e nanopartículas. A encapsulação em polímeros diversos não só protegeu o plasmídeo do ambiente gástrico, mas também aumentou a absorção intracelular do mesmo. Vários estudos tem demonstrado que a administração oral de vacinas recombinantes tem conseguido produzir não só respostas imunes a nível da mucosa mas também a nível sistémico.

Um estudo conduzido por Andrzej Wierzbicki e os seus colaboradores verificou que após a encapsulação em PLG de plasmídeos que codificam para a glicoproteína gp160 e lipossomas associados ao vírus *vaccinia* vPE16, permitiu obter uma potente resposta imune contra a glicoproteína do envelope viral a nível da mucosa e a nível sistémico. O estudo permitiu também verificar que a associação entre micropartículas poliméricas e lipossomas pode ser uma abordagem interessante e eficiente para a criação de novas vacinas e/ou outras abordagens imunoterápicas.

Como já anteriormente referido, a imunidade da mucosa constitui uma importante linha de defesa, como tal o esquema de vacinação oral pode representar uma abordagem eficaz para proteção contra infecções adquiridas através de superfícies mucosas. Ademais, as vacinas orais apresentam uma enorme vantagem pois permitem eliminar a necessidade de agulha, que constitui uma das principais causas de infecções iatrogénicas em países em desenvolvimento (Wierzbicki *et alli*, 2002).

Tabela de nanovacinas orais encapsuladas com sucesso em nanopartículas poliméricas.

Molécula	Polímero	Referência
Toxóide tetânico (TT)	Quitosano	(Barhate <i>et alli</i> , 2014)
Rotavirus	PLA e PLGA	(Nayak <i>et alli</i> , 2009)
Gripe suína	Quitosano	(Zhao <i>et alli</i> , 2011)
Hepatite B	Lectina e PLGA	(Mishra <i>et alli</i> , 2011)
Hepatite B	Quitosano	(Mishra <i>et alli</i> , 2014)
Helicobacter pylori	Poly(D, L-lactide-co-glycolide)	(Kim <i>et alli</i> , 1999)

3.4 Encapsulação de ADN para administração oral de nanovacinas

A área da Nanomedicina veio permitir a abertura de novas áreas inovadoras que outrora seriam impossíveis de concretizar. A encapsulação de plasmídeos de ADN é um desses campos que tem ganho relevância e que promete melhorar assim como curar inúmeras patologias associadas à resposta exacerbada do sistema imunitário.

Como tal, alguns estudos tem procurado utilizar plasmídeos de ADN para induzir tolerância oral.

Os plasmídeos de ADN podem ser encapsulados em nanopartículas poliméricas que retêm a sua função biológica sendo que uma única dose oral de ADN pode induzir uma resposta sistémica e/ou local (na mucosa) de anticorpos contra a proteína codificada (Galindo-Rodriguez *et alli*, 2005).

Um estudo feito por K. Roy e os seus colaboradores demonstrou que a administração oral de nanopartículas de quitosano com ADN que codifica para um alérgeno dominante do amendoim provocou um aumento de IgA e IgG2a no plasma sanguíneo. Este estudo permitiu verificar que a administração oral de NPs pode aumentar a resposta imunitária contra os alérgenos Der p 1 em ratinhos enquanto que na imunização via intramuscular não ocorre o mesmo efeito.

Acredita-se que este resultado surge do uso de nanopartículas, pois estes vectores nanomedicinais facilitam a incorporação do ADN e a mucoadesão pelas células hospedeiras, o que leva a um aumento da eficácia do processo de transfecção (Roy *et alli*, 1999).

Chen e os seus colaboradores também utilizaram nanopartículas de PLGA (500 nm) para encapsular uma nanovacina de DNA VP6 de rotavírus. Após a administração oral única em ratinhos, a nanovacina encapsulada foi suficiente para induzir IgG sérica específica do rotavírus, IgM e IgA, assim como IgA intestinal. Além disso, após o estudo com o rotavírus, foi possível verificar uma diminuição importante de antígeno de rotavírus nas fezes em comparação com os grupos de controlo. Resultados semelhantes foram obtidos quando nanovacinas de DNA VP4 e

VP7 foram encapsuladas em partículas de PLGA e administradas pela via oral a ratinhos (Roy et alli, 1999).

Mais recentemente, uma nanovacina contra a esquistossomose foi criada. A Esquistossomose é uma doença tropical endêmica em alguns países da América do sul causada por parasitas do género *Schistosoma*. Oliveira CR, e os seus colaboradores encapsularam em nanopartículas de quitosano o antigénio Rho1-GTPase da *S. mansoni*, tendo obtido resultados bastante promissores. Todos os ratinhos imunizados com esta vacina apresentaram um redução significativa da carga parasitária após inoculação do parasita, verificando-se assim que as nanopartículas representam uma alternativa à vacinação tradicional (Oliveira *et alli*, 2012).

3.5 Perspectivas futuras

A Medicina precisa de novas abordagens terapêuticas que permitam vectorizar fármacos tais como proteínas e péptidos que exibem elevado valor terapêutico mas que apresentam baixa biodisponibilidade oral. Como tal, a nanomedicina surge como a área por excelência que pode alterar a farmacocinética (LADME) através da encapsulação destes fármacos em nanopartículas poliméricas. Os desafios apresentados são muitos, contudo actualmente é possível verificar o entusiasmo da comunidade científica na procura incessante pela “bala dourada”.

Péptidos como a insulina, calcitonina e ciclosporina futuramente podem conhecer formulações orais que irão permitir evitar o desconforto associada às injeções diárias que são extremamente limitantes para o doente.

A via oral é amplamente preferível em relação a outras vias existentes, pela sua acessibilidade e por ser a mais fisiológica, porem devido ao meio bastante hostil, alguns fármacos não podem ser administrados por esta via.

De forma a aumentar a qualidade de vida do doente e a facilitar a adesão à terapêutica, milhares de cientistas tem-se focado na concepção de sistemas coloidais que permitam a autoimunização num acto tão rudimentar como a toma de um comprimido.

Em suma, anseio que com a leitura desta monografia seja possível ao leitor vislumbrar o futuro promissor das nanopartículas poliméricas que se encontra em forte expansão, prometendo não só alterar a veiculação de fármacos outrora não veiculáveis pela via oral, mas também melhorar formulações já existentes no mercado alterando a sua farmacocinética, permitindo reduzir a dose e consequentemente os efeitos secundários dos medicamentos.

4. Bibliografia

- 1) Aggarwal, N., et alli (1999). Biodegradable alginate microspheres as a delivery system for naked DNA. *Can J Vet Res*, 63, 148-152.
- 2) Ahmad, Z., et alli (2006). Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *Int J Antimicrob Agents*, 27, 409-416.
- 3) Allaoui-Attarki, K., et alli (1998). Mucosal immunogenicity elicited in mice by oral vaccination with phosphorylcholine encapsulated in poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Vaccine*, 16, 685-691.
- 4) Allaoui-Attarki, K., et alli (1997). Protective immunity against *Salmonella typhimurium* elicited in mice by oral vaccination with phosphorylcholine encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infect Immun*, 65, 853-857.
- 5) Amini, M. A., et alli (2014). Production, characterisation, and in vitro nebulisation performance of budesonide-loaded PLA nanoparticles. *J Microencapsul*, 31, 422-429.
- 6) Anal, A. K., et alli (2003). Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. *Drug Dev Ind Pharm*, 29, 713-724.
- 7) Arosa, F. (2012). *Fundamentos de Imunologia*, Lisboa, LIDEL.
- 8) Aynie, I., et alli (1999). Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 9, 301-312.
- 9) Azimi, B., et alli (2014). Producing gelatin nanoparticles as delivery system for bovine serum albumin. *Iran Biomed J*, 18, 34-40.
- 10) Barhate, G., et alli (2014). Enhanced Mucosal Immune Responses Against Tetanus Toxoid Using Novel Delivery System Comprised of Chitosan-Functionalized Gold Nanoparticles and Botanical Adjuvant: Characterization, Immunogenicity, and Stability Assessment. *J Pharm Sci*.
- 11) Barratt, G., et alli (2001). *Polymeric Micro- and Nanoparticles as Drug Carriers. Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*. CRC Press.

- 12) Bernkop-Schnurch, A., et alli (2006). Thiomers: preparation and in vitro evaluation of a mucoadhesive nanoparticulate drug delivery system. *Int J Pharm*, 317, 76-81.
- 13) Borges, O., et alli (2005). Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int J Pharm*, 299, 155-166.
- 14) Brayden, D. J. & Baird, A. W. (2004). Apical membrane receptors on intestinal M cells: potential targets for vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 56, 721-726.
- 15) Bugamelli, F., et alli (1998). Controlled insulin release from chitosan microparticles. *Arch Pharm (Weinheim)*, 331, 133-138.
- 16) Calvo, P., et alli (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res*, 14, 1431-1436.
- 17) Campolongo, M. J., et alli (2010). DNA nanomedicine: Engineering DNA as a polymer for therapeutic and diagnostic applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, 606-616.
- 18) Cetin, M., et alli (2012). Salmon calcitonin-loaded Eudragit(R) and Eudragit(R)-PLGA nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *J Microencapsul*, 29, 156-166.
- 19) Challacombe, S. J., Rahman, D. & O'hagan, D. T. (1997). Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles. *Vaccine*, 15, 169-175.
- 20) Chen, J., et alli (2004). Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium in vivo mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles. *World J Gastroenterol*, 10, 112-116.
- 21) Chuang, V. T., Kragh-Hansen, U. & Otagiri, M. (2002). Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. *Pharm Res*, 19, 569-577.
- 22) Cournarie, F., et alli (2002). Absorption and efficiency of insulin after oral administration of insulin-loaded nanocapsules in diabetic rats. *Int J Pharm*, 242, 325-328.
- 23) Couvreur, et alli (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles : current possibilities and future trends, Amsterdam, PAYS-BAS, Elsevier.

- 24) Couvreur, P. (1988). Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 5, 1-20.
- 25) Couvreur, P., et alli (2002). Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 19, 99-134.
- 26) Crotts, G. & Park, T. G. (1997). Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles. *Journal of Controlled Release*, 44, 123-134.
- 27) Damge, C., et alli (1988). New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes*, 37, 246-251.
- 28) Damgé, C., et alli (1990). Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *Journal of Controlled Release*, 13, 233-239.
- 29) De Vos, P., Hoogmoed, C. G. & Busscher, H. J. (2002). Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. *J Biomed Mater Res*, 60, 252-259.
- 30) Dhiman, H. K., Ray, A. R. & Panda, A. K. (2005). Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials*, 26, 979-986.
- 31) Diamantoglou, M., Platz, J. & Vienken, J. (1999). Cellulose carbamates and derivatives as hemocompatible membrane materials for hemodialysis. *Artif Organs*, 23, 15-22.
- 32) Dillen, K., et alli (2004). Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*, 275, 171-187.
- 33) El-Shabouri, M. H. (2002). Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int J Pharm*, 249, 101-108.
- 34) Eldridge, J. H., et alli (1989). Vaccine-containing biodegradable microspheres specifically enter the gut-associated lymphoid tissue following oral administration and induce a disseminated mucosal immune response. *Adv Exp Med Biol*, 251, 191-202.
- 35) Florence, A. T. (2004). Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting. *J Drug Target*, 12, 65-70.
- 36) Fonseca, C., Simoes, S. & Gaspar, R. (2002). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release*, 83, 273-286.

- 37) Foster, N. & Hirst, B. H. (2005). Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 431-450.
- 38) Galindo-Rodriguez, S. A., et alli (2005). Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 22, 419-464.
- 39) George, M. & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release*, 114, 1-14.
- 40) Gil Mh, F. P. (2006). Polissacarídeos como biomaterais.
- 41) Goh, C. H., Heng, P. W. S. & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88, 1-12.
- 42) Govender, T., et alli (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release*, 57, 171-185.
- 43) Higashi, T., et alli (2004). A novel transfection method for mammalian cells using calcium alginate microbeads. *J Biosci Bioeng*, 97, 191-195.
- 44) Illum, L., et alli (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 51, 81-96.
- 45) Infarmed (2012). *Prontuário Terapêutico*, Lisboa, INFARMED.
- 46) Jadhav, N. R., et alli (2013). Development and characterization of gelatin based nanoparticles for targeted delivery of zidovudine. *Int J Pharm Investig*, 3, 126-130.
- 47) Jeffery, H., Davis, S. S. & O'hagan, D. T. (1991). The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics*, 77, 169-175.
- 48) Jin, X., et alli (2011). Chitosan–glutathione conjugate-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Promising carriers for oral thymopentin delivery. *Carbohydrate Polymers*, 86, 51-57.
- 49) Jung, T., et alli (2001). Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): evaluation

- of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm Res*, 18, 352-360.
- 50) Jung, T., et alli (2000). Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 147-160.
- 51) Kang, F. & Singh, J. (2003). Conformational stability of a model protein (bovine serum albumin) during primary emulsification process of PLGA microspheres synthesis. *Int J Pharm*, 260, 149-156.
- 52) Kaul G, A. M. (2004). Protein nanoparticles for gene delivery in polymeric gene delivery.
- 53) Kim, S. Y., et alli (1999). Oral immunization with *Helicobacter pylori*-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Helicobacter*, 4, 33-39.
- 54) Kotzé, A. F., et alli (1997). Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 159, 243-253.
- 55) Lacerda, L., et alli (2014). Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles containing the antituberculosis drug rifampicin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 39, 161-167.
- 56) Lai, Y. H. & D'souza, M. J. (2008). Microparticle transport in the human intestinal M cell model. *J Drug Target*, 16, 36-42.
- 57) Lameiro, M. H., et alli (2006). Incorporation of a model protein into chitosan-bile salt microparticles. *Int J Pharm*, 312, 119-130.
- 58) Langguth, P., et alli (1997). The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. *Journal of Controlled Release*, 46, 39-57.
- 59) Lee, H. J. (2002). Protein drug oral delivery: the recent progress. *Arch Pharm Res*, 25, 572-584.
- 60) Lemoine, D., et alli (1996). Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 17, 2191-2197.
- 61) Lemoine, D. & Pr at, V. (1998). Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins. *Journal of Controlled Release*, 54, 15-27.
- 62) Li, L. L., et alli (2014). Core-shell supramolecular gelatin nanoparticles for adaptive and "on-demand" antibiotic delivery. *ACS Nano*, 8, 4975-4983.

- 63) Lim, E. B. & Kennedy, R. A. (1997). Studies on diffusion in alginate gels. II. Effect of acid and subsequent re-exposure to calcium on the diffusion of caffeine and theophylline in alginate gel films. *Pharm Dev Technol*, 2, 285-292.
- 64) Ma, Z., Lim, T. M. & Lim, L.-Y. (2005). Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 293, 271-280.
- 65) Machado, A. H., et alli (2013). Encapsulation of DNA in macroscopic and nanosized calcium alginate gel particles. *Langmuir*, 29, 15926-15935.
- 66) Madara, J. L. (1998). Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol*, 60, 143-159.
- 67) Malaekheh-Nikouei, B., Sajadi Tabassi, S. A. & Jaafari, M. R. (2008). Preparation, characterization, and mucoadhesive properties of chitosan-coated microspheres encapsulated with cyclosporine A. *Drug Dev Ind Pharm*, 34, 492-498.
- 68) Maloy, K. J., et alli (1994). Induction of mucosal and systemic immune responses by immunization with ovalbumin entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Immunology*, 81, 661-667.
- 69) Mastiholimath, V. S., et alli (2008). In vitro and in vivo evaluation of ranitidine hydrochloride ethyl cellulose floating microparticles. *J Microencapsul*, 25, 307-314.
- 70) Maya, S., et alli (2013). Cetuximab conjugated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for targeting EGFR overexpressing cancer cells. *Carbohydr Polym*, 93, 661-669.
- 71) Mishra, N., et alli (2014). Development and characterization of LTA-appended chitosan nanoparticles for mucosal immunization against hepatitis B. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 42, 245-255.
- 72) Mishra, N., et alli (2011). Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. *J Drug Target*, 19, 67-78.
- 73) Montasser, I., et alli (2000). [Methods of obtaining and formation mechanisms of polymer nanoparticles]. *J Pharm Belg*, 55, 155-167.
- 74) Morcol, T., et alli (2004). Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin. *Int J Pharm*, 277, 91-97.

- 75) Mrsny, R. (1991). Challenges for the oral delivery of proteins and peptides: theoretical
- 76) and practical approaches to their delivery, Greenwood.
- 77) Mutwiri, G., Bowersock, T. L. & Babiuk, L. A. (2005). Microparticles for oral delivery of vaccines. *Expert Opin Drug Deliv*, 2, 791-806.
- 78) Nahaei, M., et alli (2013). Preparation and characterization of chitosan/beta-cyclodextrin nanoparticles containing plasmid DNA encoding interleukin-12. *Drug Res (Stuttg)*, 63, 7-12.
- 79) Narambuena, C. F., et alli (2005). Aggregation of casein micelles by interactions with chitosans: a study by Monte Carlo simulations. *J Agric Food Chem*, 53, 459-463.
- 80) Nayak, B., et alli (2009). Formulation, characterization and evaluation of rotavirus encapsulated PLA and PLGA particles for oral vaccination. *J Microencapsul*, 26, 154-165.
- 81) Oliveira, C. R., et alli (2012). A new strategy based on SmRho protein loaded chitosan nanoparticles as a candidate oral vaccine against schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1894.
- 82) Orson, F. M., et alli (2003). Targeted delivery of expression plasmids to the lung via macroaggregated polyethylenimine-albumin conjugates. *Methods Mol Med*, 75, 575-590.
- 83) Pan, Y., et alli (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm*, 249, 139-147.
- 84) Pandey, S. K., et alli (2014). Therapeutic efficacy and toxicity of tamoxifen loaded PLA nanoparticles for breast cancer. *Int J Biol Macromol*, 72C, 309-319.
- 85) Park, M. J., Balakrishnan, P. & Yang, S. G. (2013). Polymeric nanocapsules with SEDDS oil-core for the controlled and enhanced oral absorption of cyclosporine. *Int J Pharm*, 441, 757-764.
- 86) Patel, M. (2011). Oral delivery of proteins and peptides: concepts and ap-
- 87) plications, Londres, Elsevier.
- 88) Patil, G. V. (2003). Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Development Research*, 58, 219-247.
- 89) Paul W, S. C. (2006). polysaccharides biomedical applications.

- 90) Petrauskaite, O., et alli (2013). Biomimetic mineralization on a macroporous cellulose-based matrix for bone regeneration. *Biomed Res Int*, 2013, 452750.
- 91) Pinto Reis, C., et alli (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2, 8-21.
- 92) Pinto-Alphandary, H., et alli (2003). Visualization of insulin-loaded nanocapsules: in vitro and in vivo studies after oral administration to rats. *Pharm Res*, 20, 1071-1084.
- 93) Polk, A., et alli (1994). Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *J Pharm Sci*, 83, 178-185.
- 94) Rajaonarivony, M., et alli (1993). Development of a new drug carrier made from alginate. *J Pharm Sci*, 82, 912-917.
- 95) Rastogi, R., et alli (2007). Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. *Int J Pharm*, 334, 71-77.
- 96) Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- 97) Regnstrom, K., et alli (2003). PEI - a potent, but not harmless, mucosal immuno-stimulator of mixed T-helper cell response and FasL-mediated cell death in mice. *Gene Ther*, 10, 1575-1583.
- 98) Reis, C. P., et alli (2008). Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 5290-5305.
- 99) Rhaese, S., et alli (2003). Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. *J Control Release*, 92, 199-208.
- 100) Roser, M., Fischer, D. & Kissel, T. (1998). Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm*, 46, 255-263.
- 101) Roy, K., et alli (1999). Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med*, 5, 387-391.
- 102) Sakuma, S., et alli (1997). Oral peptide delivery using nanoparticles composed of novel graft copolymers having hydrophobic backbone and hydrophilic branches. *International Journal of Pharmaceutics*, 149, 93-106.

- 103) Salama, N. N., Eddington, N. D. & Fasano, A. (2006). Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 58, 15-28.
- 104) Sarmiento, B., et alli (2007). Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm Res*, 24, 2198-2206.
- 105) Schneider, S., et alli (2003). Beneficial effects of human serum albumin on stability and functionality of alginate microcapsules fabricated in different ways. *J Microencapsul*, 20, 627-636.
- 106) Shakweh, M., Ponchel, G. & Fattal, E. (2004). Particle uptake by Peyer's patches: a pathway for drug and vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 1, 141-163.
- 107) Sharma, R. I., et alli (2006). Albumin-derived nanocarriers: substrates for enhanced cell adhesive ligand display and cell motility. *Biomaterials*, 27, 3589-3598.
- 108) Shechter, Y., et alli (2005). Albumin-insulin conjugate releasing insulin slowly under physiological conditions: a new concept for long-acting insulin. *Bioconjug Chem*, 16, 913-920.
- 109) Smitha, K. T., et alli (2014). Amidase encapsulated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for vaccine delivery. *Int J Biol Macromol*, 63, 154-157.
- 110) Soosan Abdollahi, F. L. (2012
- 111)). PLGA- and PLA-Based Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Biomedicine International*.
- 112) Soppimath, K. S., et alli (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 70, 1-20.
- 113) Sosnik, A., Das Neves, J. & Sarmiento, B. (2014). Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Progress in Polymer Science*, 39, 2030-2075.
- 114) Steffansen, B., et alli (2004). Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci*, 21, 3-16.
- 115) Strugala, V., et alli (2005). Inhibition of pepsin activity by alginates in vitro and the effect of epimerization. *International Journal of Pharmaceutics*, 304, 40-50.

- 116) Sung, H. W., et alli (2012). pH-responsive nanoparticles shelled with chitosan for oral delivery of insulin: from mechanism to therapeutic applications. *Acc Chem Res*, 45, 619-629.
- 117) Takeuchi, H., Yamamoto, H. & Kawashima, Y. (2001). Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 47, 39-54.
- 118) Temajo, N. O. & Howard, N. (2014). The mosaic of environment involvement in autoimmunity: The abrogation of viral latency by stress, a non-infectious environmental agent, is an intrinsic prerequisite prelude before viruses can rank as infectious environmental agents that trigger autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*.
- 119) Thorley, A. J. & Tetley, T. D. (2013). New perspectives in nanomedicine. *Pharmacol Ther*, 140, 176-185.
- 120) Tozaki, H., et alli (1997). Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J Pharm Sci*, 86, 1016-1021.
- 121) Van Der Lubben, I. M., et alli (2001). Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev*, 52, 139-144.
- 122) Vural, I., Sarisozen, C. & Olmez, S. S. (2011). Chitosan coated furosemide liposomes for improved bioavailability. *J Biomed Nanotechnol*, 7, 426-430.
- 123) Wang, W. (1996). Oral protein drug delivery. *J Drug Target*, 4, 195-232.
- 124) Wee, S. & Gombotz, W. R. (1998). Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, 31, 267-285.
- 125) Wierzbicki, A., et alli (2002). Immunization strategies to augment oral vaccination with DNA and viral vectors expressing HIV envelope glycoprotein. *Vaccine*, 20, 1295-1307.
- 126) Wong, T. W. & Sumiran, N. (2014). Oral calcium pectinate-insulin nanoparticles: influences of alginate, sodium chloride and Tween 80 on their blood glucose lowering performance. *J Pharm Pharmacol*, 66, 646-657.
- 127) Woodley, J. F. (1994). Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 11, 61-95.

- 128) Xu, J., Singh, A. & Amiji, M. M. (2014). Redox-responsive targeted gelatin nanoparticles for delivery of combination wt-p53 expressing plasmid DNA and gemcitabine in the treatment of pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 14, 75.
- 129) Yao, W., et alli (2014). Local delivery of minocycline-loaded PEG-PLA nanoparticles for the enhanced treatment of periodontitis in dogs. *Int J Nanomedicine*, 9, 3963-3970.
- 130) Ye, A., Flanagan, J. & Singh, H. (2006). Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. *Biopolymers*, 82, 121-133.
- 131) Yoshioka T, H. M., Muranishi S, Sezaki H (1981). Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen and lung: nano- and microspherical carriers of gelatin. *Int J Pharm*, 8:131-141.
- 132) Young, C. C., et alli (2006). Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnol Bioeng*, 95, 76-83.
- 133) Yun, Y., Cho, Y. W. & Park, K. (2013). Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, 822-832.
- 134) Zambaux, M. F., et alli (1998). Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Release*, 50, 31-40.
- 135) Zhao, K., et alli (2011). Preparation and immunological effectiveness of a vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Vaccine*, 29, 8549-8556.
- 136) Zhao, Y. Z., et alli (2012). Experiment on the feasibility of using modified gelatin nanoparticles as insulin pulmonary administration system for diabetes therapy. *Acta Diabetol*, 49, 315-325.