

VECTORIZAÇÃO DE PÉPTIDOS E PROTEÍNAS EM SISTEMAS COLOIDAIS LIPÍDICOS

Joana Fangueiro

Aluna do Doutoramento em Biotecnologia e Saúde
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal
14224@ufp.edu.pt

Eliana B. Souto

Professora Auxiliar
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal
Investigadora
Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal
eliana@ufp.edu.pt

RESUMO

Os sistemas coloidais lipídicos, em particular as designadas nanopartículas de lipídeos sólidos (SLN – *Solid Lipid Nanoparticles*) são uma alternativa eficaz e versátil às demais formas farmacêuticas actualmente exploradas, uma vez que permitem a incorporação de substâncias activas sem características físico-químicas para exercerem a sua acção terapêutica, tal como a insulina. Este péptido é utilizado no tratamento da *Diabetes mellitus* tipo 1, que é uma doença actual e de preocupação global devido à sua elevada taxa de prevalência e incidência. Actualmente este péptido apenas pode ser administrado por via subcutânea. Neste estudo desenvolveu-se uma formulação de SLN através do método da dupla emulsão descrito por Garcia-Fuentes, que se baseia na incorporação de moléculas hidrófilas, como a insulina e evita qualquer stress térmico e químico nas proteínas incorporadas. Após a sua preparação, mediou-se o seu tamanho através de espectrofotometria de correlação fotónica a 25 °C para verificar se os tamanhos de partícula estariam adequados. Neste contexto, observou-se a existência de duas populações, em que aproximadamente 22% apresentou um tamanho de partícula de 100 nm e outra, aproximadamente 78% com 750 nm. A análise por HPLC permitiu quantificar uma eficácia de encapsulação próxima dos 50%. Os resultados apresentados parecem confirmar as expectativas futuras conducentes ao desenvolvimento de formulações orais de insulina.

PALAVRAS-CHAVE

Nanopartículas de lipídeos sólidos, insulina, diabetes mellitus, lipossomas, microemulsões, formas farmacêuticas de libertação modificada.

ABSTRACT

Lipid based colloidal systems, in particular the so-called Solid Lipid Nanoparticles (SLN) are an effective and versatile alternative to other pharmaceutical forms existing, since they allow the incorporation of drugs without chemical and physical characteristics to perform its therapeutic action, such as insulin. This peptide is used to treat Type 1 *Diabetes mellitus*, a disease that is current and global concern because of its high prevalence and incidence. Currently, this peptide can only be administered subcutaneously. In this study a formulation of SLN was developed by the double emulsion method described by Garcia-Fuentes, which is based on the incorporation of hydrophilic molecules, such as insulin and avoid any thermal and chemical stress into the proteins incorporated. After preparation, the particle size was measured by photonic correlation spectroscopy at 25 °C to evaluate if the particle size was adequate. In this context, it was observed that there are two populations, in which approximately 22% had a particle size of 100 nm and another 78% with approximately 750 nm. HPLC analysis allowed quantifying an encapsulation efficiency nearly 50%. These results confirm the current expectations in developing novel oral delivery systems for insulin.

KEYWORDS

Solid lipid nanoparticles, insulin, diabetes mellitus, liposomes, microemulsions, modified drug delivery systems.

1. INTRODUÇÃO

A insulina é um peptídeo constituído por 51 aminoácidos (Figura 1) usado no tratamento da *Diabetes mellitus* (Carino and Mathiowitz). A insulina exerce múltiplas funções imediatas e a longo prazo no organismo, sendo considerada o agente anabólico fisiológico mais potente que se conhece. Quando ocorre falta de insulina, instala-se um desequilíbrio metabólico glicídico, lipídico e proteico conduzindo à hiperglicemia, hiperlipidemia, cetonemia e azotúria. A hiperglicemia resulta de uma utilização reduzida e uma produção aumentada de glicose. A insulina facilita o transporte de glicose para o interior das células, nomeadamente para as musculares e adiposas, onde será transformada em glicogénio ou gordura, ou em alternativa, oxidada de forma a produzir energia. Este transporte é mediado por receptores específicos presentes nas membranas, i.e. glicoproteínas transmembranares, compostas de 2 subunidades α (extracelulares, locais de ligação da insulina) e 2 subunidades β (transmembranares, cinases da tirosina). Após a ligação da insulina, os receptores agregam-se e são rapidamente internalizados, transportando a proteína. Após a internalização, o receptor pode ser degradado ou reciclado para a membrana celular. Para além de facilitar a entrada de glicose nas células, a insulina estimula a enzima que converte a glicose em glicogénio no músculo esquelético, no fígado e no tecido adiposo (Guimarães et. al. e referenciar Guimarães S, Moura D, Soares da Silva P. Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: Porto Editora 2006).

A insulina é empregue no tratamento da *Diabetes mellitus* que caracteriza-se por uma doença auto-imune que leva à destruição das células β no pâncreas (Carino and Mathiowitz). A *Diabetes mellitus* é uma síndrome complexa, que pode ter várias etiopatogenias. Traduz-se por um quadro clínico com hiperglicemia, glicosúria, poliúria e polidipsia. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que sejam diagnosticados anualmente em Portugal, entre 500 a 700 novos casos de diabetes por 100 000 habitantes e que cada vez mais existe uma maior predisposição para o desenvolvimento desta doença (Sociedade Portuguesa Diabetologia).

Existem dois tipos de diabetes. Na diabetes tipo 1, ocorre uma redução do volume das células β dos ilhéus de Langerhans, que ficam incapacitadas de produzir insulina. Este tipo de diabetes manifesta-se na idade jovem, podendo estar associado a factores genéticos e ambientais, tendo também sido atribuídas causas de etiologia vírica e de auto-imunidade para a destruição das células β . Os doentes com este tipo de diabetes apresentam perda de peso e cetonúria. A diabetes está associada a várias complicações, tais como a retinopatia (originando em muitos casos, cegueira), neuropatia, nefropatia (ocorrendo também insuficiência renal), doenças cardiovasculares, doença vascular periférica, tornando, por isso, os doentes mais susceptíveis a infecções (Martins et al.; Sarmento et al.; Carino e Mathiowitz; Carino et al.).

A diabetes tipo 2 está relacionada com factores genéticos, podendo ser igualmente atribuída a factores ambientais (hiperfagia, obesidade visceral e sedentarismo). Ao contrário do tipo 1, neste tipo de diabetes não existe uma dependência estrita da administração exógena de insulina e também não há atrofia das células β dos ilhéus de Langerhans. Contudo, existem alterações funcionais nas células β , que não respondem devidamente à estimulação da glicose ocorrendo assim, resistência à insulina. Surge um aumento da massa de células α , células responsáveis pela produção da hormona glicagina, estimuladora da secreção de insulina. Este tipo de diabetes afecta sobretudo indivíduos adultos e está frequentemente associada a hipertensão arterial, hiperlipidemia e aterosclerose. Em associação à terapêutica farmacológica, os doentes devem adoptar medidas de prevenção adicionais, tais como alterações benéficas no estilo de vida, nomeadamente na alimentação e na prática de exercício físico (Carino et al.; Carino and Mathiowitz).

2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SUBSTÂNCIAS ACTIVAS

O desenvolvimento de sistemas de transporte coloidais para a administração de substâncias activas tem atraído bastante atenção como uma estratégia inovadora para a existência de muitas falências da terapêutica convencional. Tais falências estão associadas à baixa disponibilidade de substâncias activas quando administradas por vias tradicionais e ao uso de formas farmacêuticas convencionais (Gallarate et al.). As microemulsões, as nanopartículas de lipídeos sólidos (SLN - *solid lipid nanoparticles*), os lipossomas e os vectores lipídicos nanoestruturados (NLC - *nanostructured lipid carriers*) são os tipos de sistema de transporte passíveis de serem utilizados para veicular diversas substâncias activas (Martins et al.; Gallarate et al.). O recurso a estes sistemas permite: (i) uma libertação modificada da substância activa ao longo do tempo que por sua vez, diminui a frequência de administração (muitas vezes dolorosa e incómoda para os doentes); (ii) protege a substância activa da degradação *in vivo* e *in vitro*; (iii) confere uma tolerância elevada devido ao uso de lipídeos fisiológicos; (iv) permite uma produção à escala industrial; (v) permite a cedência da substância activa directamente no local de acção e por conseguinte, aumenta consideravelmente a sua biodisponibilidade.

As microemulsões são dispersões isotrópicas termodinamicamente estáveis, transparentes, apresentam baixa viscosidade e consistem numa fase constituída por água e outra fase por gotículas de óleo estabilizadas por um agente tensoactivo. Em regra, a fase interna tanto aquosa (emulsões A/O) como oleosa (emulsões O/A) tem tamanho entre 5 a 100 nm. As microemulsões (A/O ou O/A) foram propostas para aumentar a biodisponibilidade da via oral a várias substâncias, incluindo aos peptídeos. Desta forma, substâncias activas hidrófilas podem ser incorporadas na fase aquosa dispersa das microemulsões A/O, a qual confere alguma protecção contra a degradação enzimática quando administradas oralmente (Martins et al.).

Os lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais camadas de fosfolipídeos (em alguns casos, fosfatidilcolina). As substâncias activas lipófilas podem ser incorporadas entre as camadas lipídicas, enquanto as substâncias activas hidrófilas são solubilizados na fase interna aquosa (Torchilin; Chiu et al.). A libertação da substância activa, a estabilidade *in vivo* e a biodistribuição são determinadas pelo tamanho das vesículas, da carga à superfície, da superfície lipófila e da fluidez da membrana. A permeabilidade da membrana pode ser adoptada pela selecção da composição dos fosfolipídeos e da presença de aditivos, como por exemplo, moléculas de colesterol. É possível evitar a captação rápida pelo sistema retículoendotelial nos lipossomas, por incorporação de compostos naturais (por exemplo, gangliósidos) ou pelo uso de polietilenoglicóis (PÉGs) modificados. A utilização destes sistemas termodinamicamente estáveis e versáteis permite o desenvolvimento de estratégias para a cedência de substâncias activas por exemplo, por incorporação de anticorpos específicos na estrutura do lipossoma. Os lipossomas também permitem a administração intravenosa de substâncias activas lipófilas com baixa solubilidade em água, reduzindo a toxicidade destas moléculas. Contudo, foram descritos problemas de estabilidade química e física que levam à agregação do lipossoma e à degradação da substância activa durante armazenamento, comprometendo, deste modo, o desempenho deste sistema de transporte para ser administrado por via intravenosa (Martins et al.).

As nanopartículas de lipídeos sólidas ("*Solid lipid nanoparticles*", SLN) foram desenvolvidas no início dos anos 90 (Mehnert and Mader). A primeira abordagem à microencapsulação de insulina para administração oral foi feita em 1982, por Oppenheimer e colaboradores, que prepararam nanopartículas de insulina (Oppenheimer and Czech). Estas são elaboradas apenas a partir de lipídeos sólidos à temperatura ambiente assim como à temperatura corporal,

e são estabilizadas por agentes tensioactivos. Os diâmetros destas partículas podem oscilar entre 50-1000 nm (Wissing et al.; Sarmiento et al.; Muchow et al.). Por definição, os lipídeos podem ser triacilgliceróis puros, misturas complexas de triacilgliceróis ou mesmo ceramidas (Wissing et al.). Quando preparadas a partir de lipídeos altamente puros, pode ocorrer a formação de uma estrutura cristalina perfeita, que deixa pouco espaço para a incorporação de substância activa. Habitualmente, as substâncias activas são incorporadas entre as cadeias dos ácidos gordos; alternativamente entre as camadas de lipídeos ou na estrutura amorfa do cristal. Contudo, quanto mais perfeita for a estrutura do cristal formado, menos substância activa será incorporada. As SLN conseguem incorporar eficientemente moléculas lipófilas, e quanto a moléculas hidrófilas, estas podem ser incorporadas numa fase lipídica previamente fundida (Wissing et al.; Mehnert and Mader; Muchow et al.).

Os vectores lipídicos nanoestruturados (NLC - *Nanostructured Lipid Carriers*) são conhecidos como a segunda geração de nanopartículas. Estas partículas não são totalmente preparadas a partir de lipídeos sólidos, mas por uma quantidade de lipídeo sólido com lipídeo líquido (óleos), numa proporção que permita que a mistura seja sólida a uma temperatura de pelo menos 40 °C (Wissing et al.).

A vantagem deste sistema relativamente às SLN, inclui a possibilidade de incorporação de maior quantidade de substância activa devido à menor formação de estruturas cristalinas sendo, por isso, o objectivo essencial na preparação destas partículas a criação de uma matriz tão imperfeita quanto possível (Muchow et al.). A matriz lipídica oferece maior flexibilidade e modulação na libertação da substância activa, reduzindo a capacidade desta ser expulsa da matriz durante o armazenamento devido a fenómenos de recristalização, prevenindo consequentemente a sua perda (Martins et al.). À semelhança das nanopartículas poliméricas, a matriz sólida das SLN e NLC protege as substâncias activas da degradação química, permitindo modular os perfis de libertação (Martins et al.).

Quando se administra as SLN pode ocorrer degradação dos lipídeos por enzimas localizadas no intestino, ocorrendo formação de mono e diacilgliceróis activos que podem solubilizar uma substância activa pouco solúvel. Subsequentemente, ocorre a interacção com os sais biliares, levando à formação de micelas constituídas por substâncias activas e lipídeos. Estas micelas promovem a absorção da substância activa. Os lipídeos retomam simultaneamente à medida que a substância activa é absorvida por um "mecanismo de promoção da absorção". Para uma biodisponibilidade máxima, a substância activa deve ser intimamente associada ao lipídeo. Isto significa que quando o lipídeo é decomposto, a substância activa deve estar presente de modo a ser solubilizada. A substância activa deve estar totalmente dissolvida (molecularmente dispersa) no lipídeo para ser digerida. Os movimentos do tracto gastrointestinal em associação com a presença de moléculas bioactivas na superfície, tais como os sais biliares, formam uma emulsão de óleos e gorduras, sendo as gotículas da emulsão destabilizadas no local de absorção. A destabilização, e subsequente solubilização das substâncias activas, é mais rápida se as gotículas forem mais pequenas, preferencialmente de tamanho nanométrico em vez de micrométrico. Ambos os princípios, a associação íntima da substância activa com o lipídeo e formação de uma dispersão ultrafina de tamanho nanométrico caracterizam a particularidade das SLN para a administração oral (Muller et al.). Geralmente, as nanopartículas possuem propriedades de adesão principalmente à parede intestinal. A substância activa é assim libertada exactamente no local de absorção, levando a uma maior concentração entre o sangue e a parede intestinal. Adicionalmente, as SLN são degradadas por lipases. A degradação é relativamente rápida devido à grande área de

superfície das partículas. No caso da substância activa estar molecularmente dispersa na matriz lipídica sólida (solução sólida) durante a formação *in situ* dos mono e diacilgliceróis, a substância activa é dissolvida nas micelas de acilgliceróis. Subsequentemente, as micelas de acilgliceróis podem levar directamente à absorção. Alternativamente, podem interagir com os sais biliares levando à formação de micelas mistas antes da absorção (Muller et al.).

3. VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS SLN

Os sistemas de transporte coloidais preparados com lipídeos sólidos à temperatura corporal e ambiental, tais com as SLN, apresentam inúmeras vantagens (Gallarate et al.; Martins et al.; Wissing et al.), das quais se destacam: (i) serem compostas por lipídeos fisiológicos, reduzindo os riscos de toxicidade; (ii) permitirem uma libertação controlada da substância activa; (iii) serem de produção fácil e eficaz, podendo ser produzidas a uma larga escala; (iv) possibilitarem a produção de suspensões/emulsões lipídicas altamente concentradas; (v) possibilitarem a administração da substância activa em associação com excipientes (promotores da absorção, inibidor de proteases); (vi) protegerem as substâncias activas sensíveis da degradação química e enzimática; (vii) proporcionarem uma maior biodisponibilidade, devido à entrega da substância activa directamente no local de acção, necessitando assim de uma dose menor de substância activa. Contudo, estes sistemas também apresentam certas desvantagens, tais como: (i) baixa capacidade de incorporação de substâncias activas, que se deve à transição para o estado polimórfico; (ii) possibilidade de ocorrer efeitos tóxicos, em particular, do uso de agentes tensoactivos e conservantes; (iii) a existência de uma certa complexidade do estado físico do lipídeo (transformação entre diferentes formas polimórficas, possibilidade de sobreaquecimento) que causa problemas aquando da sua administração (por exemplo, gelificação, aumento do tamanho da partícula, expulsão da substância activa); (iv) a necessidade de diluir a amostra ou de remover a água, podendo afectar significativamente o equilíbrio do sistema coloidal e o estado físico do lipídeo; (vii) possibilidade de serem internalizadas (fagocitadas) por células, podendo a degradação intracelular provocar efeitos tóxicos.

4. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE SLN

Existem actualmente vários métodos de incorporação de substâncias activas em nanopartículas. A literatura descreve essencialmente quatro métodos para a incorporação de peptídeos e proteínas em SLN (Souto e Muller; Souto e Doktorovova). A sua escolha baseia-se na natureza da substância activa a ser incorporada e dos lipídeos que figuram na matriz. O método mais vulgarmente usado é o da homogeneização a alta pressão. Este método pode ser realizado a quente e a frio. Na homogeneização a alta pressão a quente, o lipídeo é derretido e a substância activa é dissolvida neste. Trabalha-se a temperatura acima de 5-10 °C do ponto de fusão do lipídeo. Em seguida, esta mistura é dispersa numa solução aquosa contendo um agente tensoactivo que deve encontrar-se à mesma temperatura para evitar que o lipídeo solidifique usando para isso, um homogeneizador de alta velocidade, isto é, o Ultra-Turrax. É obtida uma pré-emulsão com um diâmetro de partícula entre 2-5 µm. Seguidamente, esta pré-emulsão é submetida ao homogeneizador, onde a pressão ronda os 250-500 bar e passa por três a cinco ciclos (Wissing et al.; Martins et al.; Fundaro et al.).

No que respeita à homogeneização a alta pressão a frio, a mistura contendo a substância activa e o lipídeo derretido é arrefecida e solidifica, obtendo-se micropartículas, que são

suspensas por uma solução fria de agente tensoactivo. Neste caso, a suspensão é homogeneizada, isto é, as micropartículas lipídicas serão reduzidas a nanopartículas lipídicas no estado sólido, através da homogeneização a temperaturas reduzidas. As condições de homogeneização são geralmente cinco ciclos a uma pressão compreendida entre 500 a 800 bar. Este método é mais utilizado para se obterem matrizes homogêneas com a substância activa molecularmente dispersa (Wissing et al.; Martins et al.). No método de difusão do solvente, o lipídeo é primeiramente dissolvido numa fase orgânica (e.g. tolueno, etanol, acetona ou clorofórmio), num banho de água com uma temperatura de aproximadamente 50 °C. Durante a evaporação do solvente, ocorre precipitação do lipídeo que leva à formação das SLN. É necessária uma solução ácida aquosa para ajustar o potencial zeta de modo a induzir a precipitação do lipídeo. As partículas são depois facilmente separadas por centrifugação. Uma importante vantagem deste método reside em evitar o calor durante a preparação, o que o torna preferível para a incorporação de substâncias activas termolábeis. Os problemas deste método podem inserir-se sobretudo no uso de solventes orgânicos, que podem ainda existir no final da etapa de evaporação, que podem ser tóxicos para o organismo em elevadas quantidades. De igual modo, as dispersões obtidas são diluídas, devido à solubilidade limitada do lipídeo no solvente orgânico (Hu et al.). O método de preparação pela dupla emulsão A/O/A foi descrito por Garcia-Fuentes, Torres e Alonso, no qual se adiciona um estabilizador (agente tensoactivo) para prevenir que a substância activa passe da fase interna aquosa para a fase externa aquosa durante a evaporação do solvente. Este método é apropriado para substâncias activas sensíveis, tais como as proteínas, pois evita qualquer choque químico e térmico.

5. UTILIZAÇÃO DE SLN PARA A INCORPORAÇÃO DE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS

Muitas proteínas e peptídeos utilizados na prática clínica são considerados novas biomoléculas terapêuticas e apresentam algumas dificuldades para serem veiculadas e administradas (Almeida e Souto; Joshi e Muller): (i) tamanho relativamente grande; (ii) tempo de semi-vida plasmático reduzido e (iii) eliminação elevada devido à facilidade de sofrer degradação enzimática a nível do tracto gastrointestinal (transformarem-se em aminoácidos e não conseguirem ter acção terapêutica) e por fluidos corporais, probabilidade de originar efeitos antigénicos, fusão com imunoglobulinas ou aumento do tempo de semi-vida da albumina. Independentemente da via de administração, muitas proteínas terapêuticas não possuem características físico-químicas para serem absorvidas ou para atingir e penetrar as células-alvo, precisam que se ultrapasse as limitações para a sua entrega e aumentar o desempenho da substância activa. A fim de satisfazer esta condição, vários estudos relatam a incorporação de peptídeos e proteínas em nanopartículas. A estabilidade proteica deve-se ao balanço resultante das forças destabilizantes e estabilizantes. A formação e a estabilização das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas são suportadas por interacções não-covalentes fracas, interacções electrostáticas, pontes de hidrogénio, forças de Van der Waals e interacções hidrófobas. A ruptura de alguma destas interacções irá afectar a estrutura e estabilidade das proteínas. Além disso, a estabilidade fisicoquímica das proteínas pode ser comprometida por factores como o pH, força iónica, temperatura, pressão elevada, solventes não-aquosos, iões metálicos, detergentes, adsorção e agitação.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. MATERIAIS

A insulina Insuman Comb 25* (Insulin Crystalline Protamine; Insulin Soluble Human 40 IU/ml) foi obtida pela Sanofi-Aventis e o Softisan 100 (mistura de triacilgliceróis constituídos exclusivamente por ácidos gordos saturados de origem vegetal com comprimento de cadeia de C_{10} - C_{18}) foi uma amostra cedida pela Sasol (Witten, Alemanha). Os tensoactivos Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano) e Poloxâmero 188 (co-polímero de polioxietileno-polioxipropileno) foram adquiridos à BASF (Rhineland-Palatinate, Alemanha). Todos os outros químicos foram obtidos pela Merck* (Darmstadt, Alemanha).

6.2. PREPARAÇÃO DAS SLN

A preparação das SLN foi realizada através do método da dupla emulsão descrito por Garcia-Fuentes, Torres e Alonso, modificado ligeiramente. Retirou-se 1,0 mL de insulina (Insuman Comb 25*) e adicionou-se, a quente (≈ 38 °C), à fase oleosa composta por 500 mg de Softisan 100, 5,0 mL de acetato de etilo e 50,0 mg de lecitina de soja. Na preparação da formulação placebo, substituiu-se a fase proteica do sistema por 1,0 mL de uma solução de 10 μ g/mL de Tween 80 em HCl 0,01M. Quando ambas as soluções atingiram a mesma temperatura (≈ 40 °C) com as gorduras devidamente fundidas, a fase aquosa foi adicionada à oleosa, seguindo-se homogeneização no Ultra Turrax T25 durante 10 minutos. Seguidamente, esta primeira emulsão foi dispersa por uma solução aquosa de 4 μ g/mL poloxâmero 188 em água ultra pura. Homogeneizou-se por mais 5 minutos, seguindo-se o arrefecimento sob agitação magnética até que a temperatura da emulsão atingisse cerca dos 23 °C. Em seguida, transferiu-se para um balão de fundo redondo, que foi colocado no rotavapor durante 30 minutos a uma temperatura de 25 °C. Este processo permite a solidificação da matriz lipídica e o aprisionamento da proteína no interior das SLN (Figura 2). Após a sua preparação, retirou-se 5,0 μ L da amostra para visualização no microscópio óptico.

6.3. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO E DO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

O tamanho das partículas obtidas foi medido por espectroscopia de correlação fotónica a 25 °C (PCS Malvern Zetasizer Nanoseries, Malvern Zetasizer - Nano ZS90, UK). As amostras foram diluídas com água ultra-pura para a análise ocorrer em concentrações aceitáveis. A carga eléctrica de superfície, dada pelo potencial zeta, foi determinada no mesmo equipamento através da análise da mobilidade electroforética das partículas sob a acção de um campo eléctrico de 20 mV. Previamente à determinação do potencial zeta, as dispersões aquosas foram diluídas em solução KCl 0,9% (m/V). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

6.4. DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA INSULINA EM SLN

Cerca de 10 mg de SLN foram rigorosamente pesadas e centrifugadas (UL 80 ultracentrifuge, rotor type 80Ti, Beckman Instruments, Alemanha) por 2 horas a 45000 rpm (correspondendo a aproximadamente 190000 x g). A eficácia de encapsulação (E.E.) foi determinada indirectamente. A quantidade de proteína encapsulada em SLN foi calculada pela diferença entre a total e a determinada por HPLC no sobrenadante, aplicando a seguinte equação:

$$E.E. = \frac{\text{Massa total de proteína} - \text{Massa de proteína no sobrenadante}}{\text{Massa total de proteína}} \times 100$$

O ensaio de HPLC foi realizado utilizando uma coluna de fase reversa C18, fase móvel constituída por acetonitrilo e solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,1%, 1 mL/min. A identificação da proteína foi realizada por detecção no UV a 214 nm.

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho a fase oleosa das formulações desenvolvidas era constituída por 5.0 mL de acetato de etilo, 500 mg de Softisan e 50 mg de lecitina de soja, enquanto a fase aquosa constituiu-se de 400 mg de poloxâmico 188 e água ultra-pura qbp 40 mL. Após a preparação das SLN a aparência macroscópica das amostras era de aspecto leitoso sem a ocorrência de aglomerados lipídicos visíveis a olho nu. A análise por PCS permitiu concluir que se prepararam SLN de dimensões relativamente homogêneas, tanto na formulação placebo como na formulação contendo a insulina. Contudo, verificou-se um aumento significativo (aproximadamente, 100 nm) do diâmetro médio das SLN ao fim de uma semana de armazenamento a 4 °C, tanto nas SLN contendo insulina como nas formulações placebo. Através desta análise, identificaram-se duas populações de SLN. Visualizou-se que aproximadamente 22% apresentaram tamanho de partícula de 100 nm, enquanto a restante, aproximadamente 78% apresentaram tamanho de partícula correspondente a 750 nm. O potencial zeta obtido aproximou-se dos [15 mV]. Não obstante o baixo valor de carga eléctrica à superfície das partículas, as SLN apresentaram-se relativamente estáveis durante um período de 6 dias, para proceder-se à caracterização físico-química das mesmas.

Por HPLC observou-se uma eficácia de encapsulação de 45,6%. Este resultado permitiu concluir que grande parte da insulina se encontrava dispersa no seio da fase aquosa da dispersão lipídica, possivelmente solubilizada pelas moléculas de agente tensoactivo. Não obstante o seu carácter hidrófilo, os resultados aqui demonstrados são de certa forma promissores visto que a matriz das SLN é altamente lipófila. O método de produção de SLN pela dupla emulsão deve, contudo, ser optimizado com o objectivo último para aumentar os parâmetros de encapsulação de biomacromoléculas hidrófilas.

Apesar da via de administração para a insulina mais frequentemente aplicada ser a via subcutânea ou a via endovenosa, a investigação científica visa outras vias alternativas como as vias oral e nasal (Yang et al.; Dandekar et al.; Bi et al.). No presente caso, o objectivo das SLN preparadas com Softisan é a sua potencial utilização para a via oral. A via oral, é sem dúvida, a via de eleição quer para a administração de proteínas e peptídeos como para qualquer tipo de substância activa no tratamento de patologias crónicas, como a *Diabetes mellitus*. Contudo, a baixa disponibilidade (1-2%) associada a factores físicos e fisiológicos oferecida por esta via, torna-a pouco fiável (Carino et al.; Carino e Mathiowitz). A principal barreira associada à via oral é o tracto gastrointestinal, responsável pela destruição da actividade fisiológica dos peptídeos e proteínas. Existem essencialmente três aspectos que constituem as principais barreiras para a administração de peptídeos e proteínas por via oral (Carino and Mathiowitz; Almeida e Souto; Carino et al.; Muchow et al.):

(i) A barreira física: as células do epitélio gastrointestinal encontram-se muito próximas, unidas pelas junções intercelulares que inibem a passagem das substâncias entre elas (transporte paracelular). Para além disso, existem vilosidades e microvilosidades na superfície apical das células epiteliais que aumentam a área de absorção, mas que por outro lado, atrasam a absorção de proteínas e peptídeos devido à presença de enzimas digestivas que contribuem para a degradação das substâncias activas. Adicionalmente a estas barreiras, também o glucocalix, uma camada de muco constituído por glicoproteínas, enzimas, electrólitos e água provoca a degradação de substâncias activas proteicas e peptídicas.

(ii) A barreira enzimática: a digestão de proteínas por proteases inicia-se no estômago e continua à medida que se percorre o tracto gastrintestinal. As pepsinas situadas no estômago como a tripsina, quimotripsina e as carboxipeptidases produzidas pelo pâncreas e que se situam no lúmen do intestino delgado são responsáveis por 20% da degradação das proteínas e peptídeos administrados. Contudo, a maioria da degradação ocorre sobretudo pelas peptidases que se encontram no interior dos enterócitos no tracto intestinal. No que respeita à insulina, também existe uma enzima citosólica específica para a sua degradação denominada de enzima de degradação da insulina ou *insulin-degrading enzyme*, IDE.

(iii) Estabilidade das proteínas: este aspecto está fortemente associado aos métodos de preparação das substâncias activas. Apesar da maioria das proteínas e peptídeos serem compostos de baixo peso molecular, têm uma estrutura complexa interna que define a sua actividade fisiológica. Qualquer ruptura que ocorra nas suas estruturas primária, secundária, terciária ou quaternária assim como variações no pH, temperatura e o uso de determinados solventes pode resultar na inactivação da proteína/peptido.

Deste modo, é comum o uso de promotores de absorção, como agentes tensioactivos, ácidos gordos ou sais biliares que são susceptíveis de permeabilizar o muco e as camadas epiteliais (Carino e Mathiowitz). Estas substâncias podem ser usadas como agentes tensioactivos, figurando à superfície das SLN e contribuindo em simultâneo para o aumento da biodisponibilidade das proteínas incorporadas na matriz lipídica.

8. CONCLUSÕES

A administração oral de insulina que abrange maioritariamente doentes não-insulino dependentes, não tem só desvantagens devido às múltiplas barreiras que apresenta. Para além de ser um método não-invasivo, ao contrário da via subcutânea, mimetiza a falta psicológica de insulina e pode promover uma melhor homeostasia da glicose (Siekmeier e Scheuch). As tentativas de desenvolver uma formulação de SLN contendo insulina têm tido algum sucesso. No presente caso, foram produzidas SLN com dimensões apropriadas para a administração oral, e com uma eficácia de encapsulação aceitável, a julgar pelo carácter hidrófilo e pelo peso molecular da proteína.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Almeida, A. J., e E. Souto. "Solid Lipid Nanoparticles as a Drug Delivery System for Peptides and Proteins." *Adv Drug Deliv Rev* 59.6 (2007): 478-90.

Bi, R., et al. "Solid Lipid Nanoparticles as Insulin Inhalation Carriers for Enhanced Pulmonary Delivery." *J Biomed Nanotechnol* 5.1 (2009): 84-92.

Carino, G. P., J. S. Jacob, e E. Mathiowitz. "Nanosphere Based Oral Insulin Delivery." *J Control Release* 65.1-2 (2000): 261-69.

Carino, G. P., e E. Mathiowitz. "Oral Insulin Delivery." *Adv Drug Deliv Rev* 35.2-3 (1999): 249-57.

Chiu, G. N., et al. «Lipid-Based Nanoparticulate Systems for the Delivery of Anti-Cancer Drug Cocktails: Implications on Pharmacokinetics and Drug Toxicities.» *Curr Drug Metab* 10.8 (2009): 861-74.

Dandekar, P., C. Venkataraman, e A. Mehra. "Pulmonary Targeting of Nanoparticle Drug Matrices." *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23.6 (2010):343-53.

Fundarò, A., et al. «Non-Stealth and Stealth Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Carrying Doxorubicin: Pharmacokinetics and Tissue Distribution after I.V. Administration to Rats.» *Pharmacol Res* 42.4 (2000): 337-43.

García-Fuentes, M., D. Torres e M. J. Alonso. "Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27.2-3 (2003): 159-68

Hu, F. Q., et al. "Preparation of Solid Lipid Nanoparticles with Clobetasol Propionate by a Novel Solvent Diffusion Method in Aqueous System and Physicochemical Characterization." *Int J Pharm* 239. 1-2 (2002): 121-28.

Joshi, M. D., e R. H. Muller "Lipid Nanoparticles for Parenteral Delivery of Actives." *Eur J Pharm Biopharm* 71.2 (2009): 161-72.

Martins, S., et al. "Lipid-Based Colloidal Carriers for Peptide and Protein Delivery—Liposomes Versus Lipid Nanoparticles." *Int J Nanomedicine* 2.4 (2007): 595-607.

Mehnert, W., e K. Mader. "Solid Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Applications." *Adv Drug Deliv Rev* 47.2-3 (2001): 165-96.

Muchow, M., P. Maincent, e R. H. Muller. "Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN, NLC, LDC) for Oral Drug Delivery." *Drug Dev Ind Pharm* 34.12 (2008): 1394-405.

Muller, R. H., et al. "Oral Bioavailability of Cyclosporine: Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Versus Drug Nanocrystals." *Int J Pharm* 317.1 (2006): 82-89.

Oppenheimer, C. L., e M. P. Czech. "Purification of the Type II Insulin-Like Growth Factor Receptor from Rat Placenta." *J Biol Chem* 258.14 (1983): 8539-42.

Sociedade Portuguesa Diabetologia. *Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes em Portugal*. 2009. Internet. 19 Jan. 2010. <<http://www.spd.pt/images/ond%20-%20relatorio%20anual%20diabetes%202010.pdf>>.

Sarmento, B., et al. «Oral Insulin Delivery by Means of Solid Lipid Nanoparticles.» *Int J Nanomedicine* 2.4 (2007): 743-49.

Siekmeier, R., e G. Scheuch. "Systemic Treatment by Inhalation of Macromolecules--Principles, Problems, and Examples." *J Physiol Pharmacol* 59.Suppl 6 (2008): 53-79.

Souto, E. B., e S. Doktorovova. "Chapter 6 - Solid Lipid Nanoparticle Formulations Pharmacokinetic and Biopharmaceutical Aspects in Drug Delivery." *Methods Enzymol* 464 (2009): 105-29.

Souto, E. B., e R. H. Muller. "Lipid Nanoparticles: Effect on Bioavailability and Pharmacokinetic Changes." *Handb Exp Pharmacol*.197 (2010): 115-41.

Torchilin, V. P. "Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example." *Handb Exp Pharmacol*.197 (2010): 3-53.

Wissing, S. A., O. Kayser, e R. H. Muller "Solid Lipid Nanoparticles for Parenteral Drug Delivery." *Adv Drug Deliv Rev* 56.9 (2004): 1257-72.

Yang, R., et al. "The Influence of Lipid Characteristics on The Formation, In Vitro Release, and In Vivo Absorption of Protein-Loaded SLN Prepared by the Double Emulsion Process." *Drug Dev Ind Pharm* [ahead of print] (2010).