

## **PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SUBSTÂNCIAS ACTIVAS**

### **Joana Fangueiro**

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

### **Ana Sofia Gonçalves**

Aluda do Doutoramento em Biotecnologia e Saúde  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal  
anita\_goncalves123@hotmail.com

### **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**

O potencial terapêutico de diferentes sistemas de transporte de substâncias activas tem sido explorado para uma grande variedade de substâncias activas, preenchendo assim vários requisitos, como a prevenção da sua eliminação rápida do organismo, a redução da toxicidade sistémica, a estabilização e a optimização do seu metabolismo, a cedência efectiva no local alvo, e permitem ainda ultrapassar o transporte limitado e os mecanismos de defesa. No entanto, têm sido reconhecidos vários outros desafios associados à cedência específica da substância activa ao local alvo, pelo que, para ultrapassar os obstáculos químicos e biológicos, a selecção do polímero utilizado para a preparação do sistema de transporte adquire especial importância. O presente artigo visa uma apresentação de alguns exemplos de polímeros naturais, nomeadamente proteínas e polissacarídeos, utilizados actualmente para a produção de micropartículas poliméricas biodegradáveis.

**PALAVRAS CHAVE**

Micropartículas, proteínas, polissacarídeos, albumina, gelatina, caseína, celulose, alginato, quitosano

**ABSTRACT**

The therapeutic potential of different drug delivery systems has been exploited for a wide variety of drugs, fulfilling several requisites, such as avoidance of a fast body clearance, reduction of systemic toxicity, stabilization and optimization of drug metabolism, effective site-specific delivery, allowing as well overcoming the limited and self-defence mechanisms. Nevertheless, several other challenges associated to site-specific drug delivery have been pointed out, thus selection of the best and most appropriate polymer to overcome the chemical and biological shortcomings is of major relevance. The present review focuses on examples of some natural polymers, namely proteins and polysaccharides, currently in use for the production of biodegradable microparticles.

**KEYWORDS**

Microparticles, proteins, polysaccharides, albumin, gelatine, casein, cellulose, alginate, chitosan.

## 1. INTRODUÇÃO

Para a preparação dos sistemas poliméricos de transporte, pode recorrer-se ao uso de polímeros naturais, sintéticos ou semi-sintéticos (Khandare e Haag; Kim et al., "Engineered"). Um polímero é um composto formado por várias unidades moleculares, denominadas por monómeros, que se encontram associadas uma a uma.

Um polímero pode ser constituído apenas por monómeros de um único tipo, designando-se por homo-polímero. Se for constituído por duas ou mais unidades monoméricas diferentes designa-se por co-polímero. Os co-polímeros podem ser do tipo: (i) aleatório, quando os monómeros não apresentam uma sequência específica na cadeia polimérica, (ii) em blocos, quando existem sequências específicas de dois ou três blocos do mesmo monómero na cadeia polimérica e (iii) reticulados, quando são formados por uma cadeia principal de um tipo de monómero, que se encontra ramificada com cadeias poliméricas de um outro tipo de monómero.

A selecção do polímero está condicionada, em grande medida pela natureza da substância activa que se pretende incorporar no sistema. Assim, quando esta é de natureza hidrófila recorre-se, em regra, a polímeros de natureza apolar e a preparação do sistema deve proceder-se em meio não aquoso. Quando se trata de substâncias activas lipófilas, deve seleccionar-se um método de preparação em meio aquoso e, para isso, recorre-se a polímeros de natureza hidrófila.

Os sistemas poliméricos de transporte destinam-se a disponibilizar a substância activa ao organismo do doente após a sua administração (Paudel et al.). O mecanismo de difusão é responsável pela libertação da substância activa seguida da hidrólise do polímero, sendo ideal quando se trata de moléculas relativamente pequenas. Para moléculas de peso molecular (PM) elevado, o mecanismo de difusão torna-se muito lento, pelo que, nessas circunstâncias é requerido um mecanismo de erosão para a cedência das moléculas de substância activa.

O presente artigo ocupa-se da revisão dos principais tipos de polímeros naturais a que se recorre, com maior frequência, para a preparação de sistemas de transporte de substâncias activas *in vivo*, em especial, para a preparação de micropartículas.

## 2. POLÍMEROS NATURAIS

Na literatura é encontrada uma grande variedade de polímeros naturais a que se pode recorrer para a preparação de sistemas poliméricos de transporte. Dos vários polímeros biodegradáveis de origem natural, usados na preparação de sistemas de transporte, destacam-se as proteínas e os polissacarídeos (Janes, Calvo e Alonso; Maham et al.; De Jong e Borm). A sua principal vantagem reside no facto de serem abundantes e económicos e na possibilidade de serem modificados quimicamente.

### 2.1. PROTEÍNAS

As proteínas são macromoléculas formadas por condensação de um número elevado de unidades (entre 50 e vários milhares), designadas por aminoácidos, que comportam uma função ácida e uma função amina primária. As suas longas cadeias polipeptídicas resultam

de uma ligação peptídica ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ), estabelecida entre o grupo ( $-\text{COOH}$ ) de um aminoácido e o grupo ( $-\text{NH}_2$ ) de outro aminoácido. Para além das ligações peptídicas, que estabelecem a sequência dos aminoácidos, definindo a estrutura primária da proteína, outras interações intervêm para formar as estruturas secundária, terciária e, em certos casos, quaternária, que definem a conformação tridimensional ou espacial da macromolécula proteica.

A conformação tridimensional é característica das proteínas nativas. Esta conformação pode ser alterada, sem ocorrer a quebra de qualquer ligação peptídica, mas, unicamente, por ruptura das ligações que permitem à macromolécula manter a sua conformação espacial. Este processo denomina-se desnaturação, podendo ser provocado quer por agentes físicos quer por agentes químicos. Destacam-se os agentes como o calor, as radiações ultravioleta e ionizantes, as variações de pH, os detergentes, os solventes orgânicos e a agitação mecânica. A desnaturação das proteínas conduz à sua precipitação, podendo, por isso, ser utilizadas como polímeros para incorporar substâncias activas.

Em relação à preparação dos sistemas de transporte de substâncias activas, as proteínas particularmente importantes são a albumina, a gelatina e a caseína.

A albumina é uma proteína de origem animal, obtida a partir do soro humano ou bovino. É solúvel em água e tem um  $\text{pK}_a$  de 5,3, que lhe confere um carácter ácido. É uma macromolécula muito utilizada para preparar micropartículas por coacervação<sup>1</sup> e por desnaturação e/ou reticulação<sup>2</sup> a temperaturas elevadas, devido à sua disponibilidade no estado puro, biodegradabilidade, ausência de toxicidade e de imunogenicidade.

Um grande número de estudos tem demonstrado que esta proteína se acumula em tumores sólidos (Minigo et al.; Vinogradov et al.; Egilmez et al.), tornando-se num transportador macromolecular útil para o direccionamento específico de substâncias activas antitumorais.

Estudos reportam a preparação de microsferas de albumina, por reticulação da proteína com formaldeído na ausência de agente tensioactivo, usando óleo de parafina como fase externa de uma emulsão A/O (Davis et al.; Mehta et al.). As microsferas apresentaram-se esféricas e com dimensões compreendidas entre 50 e 400  $\mu\text{m}$ . Os estudos de cinética de libertação, demonstraram a que a substância activa é cedida para o meio através de um mecanismo de difusão.

A gelatina é uma proteína obtida pelo tratamento ácido ou básico do colagénio. O tipo de tratamento influencia a sua carga eléctrica final, originando macromoléculas de gelatina

**1** Denomina-se coacervação o fenómeno que envolve a dessolvatação de um polímero e a sua separação da respectiva solução polimérica, em duas fases líquidas imiscíveis entre si. Neste processo, uma das fases torna-se mais densa, já que fica relativamente concentrada em polímero, enquanto que a outra fase está praticamente isenta de polímero. A coacervação pode ser induzida por alteração da temperatura, por modificação do pH, por adição de um sal, de um "não-solvente" do polímero ou de um polímero incompatível com a solução polimérica.

**2** Denomina-se desnaturação e/ou reticulação de macromoléculas naturais ao método que envolve a preparação e a exposição de uma emulsão A/O a temperaturas elevadas, as quais provocam a desnaturação da proteína, adicionando-se, em seguida, um agente de reticulação, como, por exemplo, o glutaraldeído ou o formaldeído.

com diferentes pontos isoeléctricos<sup>3</sup> (pI), sendo possível obter sistemas de transporte com carga de superfície positiva ou negativa. Em comparação com a albumina, a gelatina possui menor imunogenicidade e os métodos de preparação requerem temperaturas menores (Li, Wang e Wu). Esta macromolécula é utilizada para preparar micro e nanopartículas biodegradáveis por coacervação e por desnaturação e/ou reticulação (Giannola et al.; Nadian e Lindblom). No entanto, devido à sua natureza hidrófila, há dificuldade em obter sistemas individualizados, tornando difícil a transposição de escala. Por esta razão, os sistemas obtidos são tratados com agentes de endurecimento (e.g., isopropanol, etanol), ou com soluções de agentes de reticulação (e.g., formaldeído, glutaraldeído, sulfato de zinco), que provocam, igualmente, o endurecimento da proteína por estabelecimento de ligações cruzadas com grupos reactivos presentes à superfície dos sistemas. A gelatina tem sido utilizada para veicular antineoplásicos (e.g., 5-fluorouracilo) (Hao et al.), factores de crescimento (Hashimoto et al.; Craft et al.), assim como probióticos (Borza et al.).

A caseína é constituída por um conjunto de proteínas do leite, formando complexos estáveis na presença de iões cálcio (Bulgarelli Forni e Bernabei; Cuilliere et al.; Santinho et al.; Bayomi et al.). Esta proteína precipita pelo calor, pelos sais neutros a um valor de pH próximo do seu pI e por certas enzimas, podendo ser utilizada para preparar micropartículas por coacervação (Cara et al.). Na literatura são encontrados vários exemplos da utilização desta proteína para veicular hormonas (e.g. progesterona) (Latha et al.), loratadina (Mishra, Philip e Pathak), cloridrato de diltiazem (al-Suwayeh et al.), entre outros.

## 2.2. POLISSACARÍDEOS

No que respeita aos polissacarídeos, estes são formados pela condensação de um número elevado de moléculas monossacarídicas (oses), que podem ser do mesmo ou de diferentes tipos. As oses apresentam simultaneamente várias funções alcoólicas e uma função redutora (aldeídica ou cetónica). A sua classificação baseia-se, por um lado, no número de átomos de carbono que incluem nas suas moléculas (trioses, tetroses, pentoses, hexoses, heptoses, etc) e, por outro, na natureza da função redutora (aldoses e cetoses).

Os polissacarídeos utilizados para a preparação de sistemas de transporte de substâncias activas são de origem vegetal (e.g., derivados da celulose, alginatos, amido), ou de origem animal (e.g., quitosano).

A celulose é a substância maioritariamente responsável pela estrutura da parede celular dos vegetais. É um polissacarídeo linear, formado por cadeias longas de moléculas de D-glucose, unidas entre si por ligações  $\beta$ -1,4. Estas cadeias encontram-se fortemente associadas por pontes de hidrogénio ou do tipo van der Waals, formando estruturas fibrosas compactas e insolúveis em água. Por esta razão, são, em regra, utilizados os seus derivados, nos quais é possível incorporar um número elevado de substâncias activas (Arias et al.; Bee et al.; Ghouchi-Eskandar et al.).

<sup>3</sup> O ponto isoeléctrico (pI) define-se como o valor de pH ao qual a carga global da proteína é nula. Para um valor de pH superior ao pI a proteína encontra-se carregada negativamente, enquanto que para um valor de pH inferior ao pI a proteína encontra-se carregada positivamente.

Os derivados da celulose apresentam várias aplicações em tecnologia farmacêutica, das quais se destacam a preparação de micropartículas pelos métodos que envolvem a preparação de emulsões do tipo O/A, por reticulação do polissacarídeo e por *spray-drying*<sup>4</sup>. Têm sido utilizados para veicular substâncias activas, como por exemplo, itraconazol (Overhoff et al.), retinol (Ghouchi-Eskandar et al.), assim como proteínas (Song et al.).

No que se refere aos alginatos, estes polissacarídeos são formados por unidades de ácido **a-L-glucurónico** e ácido  **$\beta$ -D-manúrico**. Os grupos carboxilo do ácido **a-L-glucurónico** conferem carga negativa ao polímero. A sua hidrossolubilidade depende dos cátions associados ao alginato. Assim, o alginato de sódio é hidrossolúvel, enquanto o alginato de cálcio origina um gel, quanto colocado em contacto com a água. Este polímero é conhecido pela sua hemocompatibilidade e por não sofrer acumulação em qualquer órgão após a administração. Na literatura são encontradas diferentes micropartículas de alginato de cálcio, usadas como sistemas de libertação modificada. Têm sido utilizadas para veicular tamoxifeno (Coppi e Iannuccelli), 5-fluorouracilo (Glavas-Dodov et al.), budesonida (Crcarevska et al.), ácido mefenâmico (Sevgi et al.), assim como factores de crescimento (Ciofani et al.; Jay e Saltzman) e proteínas (Kim et al., "Investigation").

O amido é um polissacarídeo formado, na maior parte dos casos, por dois constituintes, a amilose e a amilopectina. O primeiro é um polissacarídeo de cadeia linear, formada por unidades de D-glucose ligadas entre si por ligações **a-1,4** glucosídicas, com um PM que varia entre 150 000 a 600 000. Estas cadeias apresentam um comprimento variável e podem associar-se por intermédio de ligações de hidrogénio que se estabelecem entre os hidroxilos, formando assim estruturas bastante compactas. O segundo é formado por cadeias principais idênticas às da amilose, mas às quais se ligam mediante ligações **a-1,6** glucosídicas às cadeias laterais, cujo comprimento varia entre 20 a 25 unidades de D-glucose. O PM da amilopectina pode atingir milhões de Dalton.

As micropartículas de amido são normalmente preparadas por polimerização no seio de uma emulsão A/O, após a modificação química do amido pela introdução de grupos acrílicos. Os sistemas de transporte assim preparados são metabolizados muito lentamente. O uso de micropartículas baseadas em amido foi sugerido como adjuvantes de vacinação (Larhed et al.; Rydell e Sjöholm), assim como para administração parenteral (Lacoeuille et al.) e administração nasal (Osth et al.; Jug e Becirevic-Lacan) de diferentes substâncias activas.

O quitosano é um polímero hidrófilo, obtido pela hidrólise alcalina dos grupos *N*-acetilglucosamina da quitina, que é abundante nos exo-esqueletos de insectos e de crustáceos. É um polímero semelhante à celulose, apresentando grupos amina na posição  $C_2$  em vez dos grupos hidroxilo. Os grupos amina conferem ao polímero uma densidade de carga eléctrica elevada, tornando-o disponível para reacções químicas e formação de sais. Podem preparar-se micropartículas utilizando unicamente o quitosano como polímero ou complexado com polianións. O quitosano pode ainda ser utilizado como agente de reticulação das micropartículas de alginato de cálcio recém-preparadas (Aelenei et al.; Li et al.). São encontrados na literatura exemplos da aplicação do quitosano como substância activa no tratamento da hipercolestolemia

<sup>4</sup> O *spray-drying* é um método de preparação de micropartículas, que consiste na atomização da solução polimérica numa câmara de secagem, mediante a utilização de dispositivos injectores, estacionários ou giratórios.

e hiperbilirrubinemia. Este polímero hidrófilo tem sido igualmente utilizado como transportador de substâncias antineoplásicas, destinadas à libertação controlada (Aelenei et al.; Yu et al., "Sustained"). Diferentes tipos de substâncias activas - como, por exemplo, polimixina B, ácido tânico, budenusida e tamoxifeno têm sido incorporadas em partículas de quitosano sensíveis ao pH (Coppi e Iannucelli).

### 3. CONCLUSÕES

A actividade terapêutica das substâncias activas utilizadas na prática clínica está directamente relacionada com a sua concentração no local alvo. No entanto, a eficácia de muitas substâncias é geralmente inferior às expectativas, uma vez que apenas uma pequena quantidade da dose administrada atinge o local de acção, tornando-se necessária a administração de doses elevadas, de modo a obter uma resposta farmacológica adequada. A administração de elevadas quantidades de substância activa está normalmente associada a efeitos secundários indesejáveis e à manifestação de efeitos tóxicos em áreas do organismo não envolvidas no processo patológico. Para ultrapassar estas limitações, pode recorrer-se ao direccionamento específico da substância activa apenas para os locais de acção.

Para além da necessidade do direccionamento das substâncias activas, estas podem atingir o alvo em quantidades insuficientes para se observar o efeito terapêutico, devido aos inúmeros obstáculos químicos e biológicos, designadamente os componentes plasmáticos, as células do sistema fagocítico mononuclear e os mediadores dos processos inflamatórios.

Numa tentativa de otimizar as características terapêuticas das substâncias activas com vista a uma melhor especificidade de acção, penetração celular, aumento da actividade terapêutica e redução da toxicidade têm sido desenvolvidos, nas últimas décadas, diversos sistemas poliméricos para o transporte de substâncias activas.

A concepção de um determinado sistema polimérico de transporte destinado a uma determinada via de administração – oral, parenteral ou tópica – envolve a análise de diversos parâmetros, como, por exemplo, o PM do polímero, as suas dimensões, a hidrofília, a carga electrostática e a cristalinidade, sendo propriedades que afectam a cinética de libertação da substância activa incorporada no sistema.

Os avanços realizados na tecnologia farmacêutica são de elevado interesse tanto para a comunidade científica como para a própria indústria farmacêutica. A introdução no mercado de novos sistemas terapêuticos deverá responder, numa primeira medida, às necessidades do doente, bem como fornecer um meio para aumentar a eficácia de várias substâncias activas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aelenei, N., et al. "Tannic Acid Incorporation in Chitosan-Based Microparticles and In Vitro Controlled Release." *J Mater Sci Mater Med* 20.5 (2009): 1095-102.

al-Suwayeh, S. A., et al. "In Vitro--In Vivo Evaluation of Tableted Caseinchitosan Microspheres Containing Diltiazem Hydrochloride." *Boll Chim Farm* 142.1 (2003): 14-20.

Arias, J. L., et al. "Development of Carbonyl Iron/Ethylcellulose Core/Shell Nanoparticles for Biomedical Applications." *Int J Pharm* 339.1-2 (2007): 237-45.

Bayomi, M. A., et al. "Preparation of Casein-Chitosan Microspheres Containing Diltiazem Hydrochloride by an Aqueous Coacervation Technique." *Pharm Acta Helv* 73.4 (1998): 187-92.

Bee, J. S., et al. "Monoclonal Antibody Interactions with Micro- and Nanoparticles: Adsorption, Aggregation, and Accelerated Stress Studies." *J Pharm Sci* 98.0 (2009): 3218-38.

Borza, A. D., et al. "Microencapsulation in Genipin Cross-Linked Gelatine-Maltodextrin Improves Survival of Bifidobacterium Adolescentis During Exposure to In Vitro Gastrointestinal Conditions." *J Microencapsul* 27.5 (2010): 387-99.

Bulgarelli, E., F. Forni, e M. T. Bernabei. "Casein/Gelatin Beads: I. Cross-Linker Solution Composition Effect on Cross-Linking Degree." *Int J Pharm* 190.2 (1999): 175-82.

Cara, B., et al. "Development of a Novel Casein-Protamine Based Microparticles for Early Feeding of Fish Larvae: In Vitro Evaluation." *J Microencapsul* 24.6 (2007): 505-14.

Ciofani, G., et al. "Magnetic Alginate Microspheres: System for the Position Controlled Delivery of Nerve Growth Factor." *Biomed Microdevices* 11.2 (2009): 517-27.

Coppi, G., e V. Iannuccelli. "Alginate/Chitosan Microparticles for Tamoxifen Delivery to the Lymphatic System." *Int J Pharm* 367.1-2 (2009): 127-32.

Coppi, G., et al. "Cellular Uptake and Toxicity of Microparticles in a Perspective of Polymyxin B Oral Administration." *Int J Pharm* 385.1-2 (2009): 42-6.

Craft, R. O., et al. "Effect of Local, Long-Term Delivery of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) on Injected Fat Graft Survival in Severe Combined Immunodeficient (SCID) Mice." *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62.2 (2009): 235-43.

Crcarevska, M. S., et al. «Bioefficacy of Budesonide Loaded Crosslinked Polyeleetrolyte Microparticles in Rat Model of Induced Colitis.» *J Drug Target* (2009): ahead of print.

Cuilliere, M. L., et al. "Changes in The Kappa-Casein and Beta-Casein Concentrations in Human Milk During Lactation." *J Clin Lab Anal* 13.5 (1999): 213-8.

Davis, S. S., et al. "Recent Advances in the Use of Microspheres for Targeted Therapy." *Drugs Exp Clin Res* 119 (1985): 633-40.

De Jong, W. H., e P. J. Borm. "Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards." *Int J Nanomedicine* 3.2 (2008): 133-49.

Egilmaz, N. K., et al. "Cytokine Immunotherapy of Cancer with Controlled Release Biodegradable Microspheres in a Human Tumor Xenograft/SCID Mouse Model." *Cancer Immunol Immunother* 46.1 (1998): 21-4.

Ghouchi-Eskandar, N., S. Simovic, e C. A. Prestidge. "Nanoparticle Coated Submicron Emulsions: Sustained In-Vitro Release and Improved Dermal Delivery of All-Trans-Retinol." *Pharm Res* 26.7 (2009): 1764-75.

Giannola, L. I., et al. "Ocular Gelling Microspheres: In Vitro Precorneal Retention Time and Drug Permeation through Reconstituted Corneal Epithelium." *J Ocul Pharmacol Ther* 24.2 (2008): 186-96.

Glavas-Dodov, M., et al. "Wheat Germ Agglutinin-Conjugated Chitosan-Ca-Alginate Microparticles for Local Colon Delivery Of 5-Fu: Development and In Vitro Characterization." *Int J Pharm* 381.2 (2009): 166-75.

Hao, X., et al. "Organ Distribution of 5-Fluorouracil Loaded Gelatine Microspheres in Mice." *Pharmazie* 59.9 (2004): 709-12.

Hashimoto, T., et al. "Selective and Sustained Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) for Treatment of Peripheral Arterial Disease: Results of a Phase I Trial." *Eur J Vasc Endovasc Surg* 38.1 (2009): 71-75.

Janes, K. A., P. Calvo, e M. J. Alonso. "Polysaccharide Colloidal Particles as Delivery Systems for Macromolecules." *Adv Drug Deliv Rev* 47.1 (2001): 83-97.

Jay, S. M., e W. M. Saltzman "Controlled Delivery of Vegf Via Modulation of Alginate Microparticle Ionic Crosslinking." *J Control Release* 134.1 (2009): 26-34.

Jug, M., e M. Becirevic-Lacan. "Screening of Mucoadhesive Microparticles Containing Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin for the Nasal Delivery of Risperidone." *Comb Chem High Throughput Screen* 10.5 (2007): 358-67.

Khandare, J., e R. Haag. "Pharmaceutically Used Polymers: Principles, Structures, and Applications of Pharmaceutical Delivery Systems." *Handb Exp Pharmacol* .197 (2010): 221-50.

Kim, K., et al. "Investigation of Mechanical Properties of Soft Hydrogel Microcapsules in Relation to Protein Delivery Using a Mems Force Sensor." *J Biomed Mater Res A* 92.1 (2010): 103-13.

Kim, S., et al. "Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery." *Eur J Pharm Biopharm* 71.3 (2009): 420-30.

Lacoeuille, F., et al. "New Starch-Based Radiotracer for Lung Perfusion Scintigraphy." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37.1 (2010): 146-55.

Larhed, A., et al. "Starch Microparticles as Oral Vaccine Adjuvant: Antigen-Dependent Uptake in Mouse Intestinal Mucosa." *J Drug Target* 12.5 (2004): 289-96.

Latha, M. S., et al. «Progesterone Release from Glutaraldehyde Cross-Linked Casein Microspheres: In Vitro Studies and In Vivo Response In Rabbits.» *Contraception* 61.5 (2000): 329-34.

Li, J. K., N. Wang, e X. S. Wu. "A Novel Biodegradable System Based on Gelatin Nanoparticles and Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres for Protein and Peptide Drug Delivery." *J Pharm Sci* 86.8 (1997): 891-95.

- Li, X., et al. "Preparation of Alginate Coated Chitosan Microparticles for Vaccine Delivery." *BMC Biotechnol* 8.89 (2008): s.p.
- Maham, A., et al. "Protein-Based Nanomedicine Platforms for Drug Delivery." *Small* 5.15 (2009): 1706-21.
- Mehta, R. C., et al. "Chromatographic Studies of Mitomycin C Degradation in Albumin Microspheres." *J Chromatogr* 430.2 (1988): 341-49.
- Minigo, G., et al. "Poly-L-Lysine-Coated Nanoparticles: a Potent Delivery System to Enhance DNA Vaccine Efficacy." *Vaccine* 25.7 (2007): 1316-27.
- Mishra, S. K., A. K. Philip, e K. Pathak. "Passage-Delaying Microbeads for Controlled Delivery of Loratadine." *PDA J Pharm Sci Technol* 62 (2008):421-28.
- Nadian, A., e L. Lindblom. "Studies on the Development of a Microencapsulated Delivery System for Norbormide, a Species-Specific Acute Rodenticide." *Int J Pharm* 242.1-2 (2002): 63-68.
- Osth, K., et al. "Uptake of Ovalbumin-Conjugated Starch Microparticles by Pig Respiratory Nasal Mucosa In Vitro." *J Drug Target* 11.1 (2003): 75-82.
- Overhoff, K. A., et al. "Solid Dispersions of Itraconazole and Enteric Polymers Made by Ultra-Rapid Freezing." *Int J Pharm* 336.1 (2007): 122-32.
- Paudel, K. R., et al. "Recent Advancement in Drug Delivery System." *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 6.2 (2008): 262-67.
- Rydell, N., e I. Sjöholm. "Oral Vaccination Against Diphtheria Using Polyacryl Starch Microparticles as Adjuvant." *Vaccine* 22.9-10 (2004): 1265-74.
- Santinho, A. J., et al. "Influence of Formulation on the Physicochemical Properties of Casein Microparticles." *Int J Pharm* 186.2 (1999): 191-98.
- Sevgi, F., et al. "Studies on Mefenamic Acid Microparticles: Formulation, In Vitro Release, and In Situ Studies in Rats." *AAPS PharmSciTech* 10.1 (2009): 104-12.
- Song, Y., et al. "Preparation and Characterization of Novel Quaternized Cellulose Nanoparticles as Protein Carriers." *Macromol Biosci* 9.9 (2009): 857-63.
- Vinogradov, S., et al. "Polyion Complex Micelles with Protein-Modified Corona for Receptor-Mediated Delivery of Oligonucleotides Into Cells." *Bioconjug Chem* 10.5 (1999): 851-60.
- Yu, C. Y., et al. "Composite Microparticle Drug Delivery Systems Based on Chitosan, Alginate and Pectin with Improved Ph-Sensitive Drug Release Property." *Colloids Surf B Biointerfaces* 68.2 (2009): 245-49.
- Yu, C. Y., et al. "Sustained Release of Antineoplastic Drugs from Chitosan-Reinforced Alginate Microparticle Drug Delivery Systems." *Int J Pharm* 357.1-2 (2008): 15-21.