

**Joana Filipa Peixoto Fangueiro**

**Vectorização de péptidos e  
proteínas em sistemas  
coloidais lipídicos**



*Universidade Fernando Pessoa*

*Faculdade Ciências da Saúde*

*Licenciatura em Ciências Farmacêuticas*

*Porto, 2010*

## **Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos**

**Joana Filipa Peixoto Fangueiro**

# **Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos**



*Universidade Fernando Pessoa*

*Faculdade Ciências da Saúde*

*Licenciatura em Ciências Farmacêuticas*

*Porto, 2010*

*Autor:*

*Joana Filipa Peixoto Figueiro*

**Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais  
lipídicos**

---

*(assinatura)*

*Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte de requisitos para a  
obtenção de grau de licenciada em Ciências Farmacêuticas*

## Resumo da Monografia

*O objectivo deste estudo é a compreensão do uso de sistemas coloidais lipídicos num contexto da tecnologia farmacêutica referente a péptidos e proteínas tendo como base o desenvolvimento de uma forma farmacêutica de libertação prolongada para administração oral contendo a hormona peptídica insulina, a avaliação da sua farmacocinética através da análise do tamanho de partícula por espectrofotometria de correlação fotónica e avaliação da sua toxicidade sobre *Drosophila melanogaster*.*

*As nanopartículas de lipídeos sólidos (SLN) oferecem diversas vantagens, tais como serem uma alternativa não tóxica devido ao uso de lipídeos fisiológicos, são um eficiente transporte de sistemas coloidais lipídicos, o seu processo de produção é rápido e eficaz e pode produzir-se a uma larga escala sendo também possível a produção de suspensões lipídicas altamente concentradas, uma vez que vão ser entregues especificamente ao órgão-alvo. 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 do fármaco. A fim de satisfazer esta condição, desenvolveu-se uma formulação de SLN neste estudo através do método da dupla emulsão descrito por Garcia-Fuentes (Garcia-Fuentes et al., 2002), 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, mediu-se o seu tamanho através de espectrofotometria de correlação fotónica a 25°C (PCS Malvern Zetasizer Nanoseries) para verificar se os tamanhos de partícula estariam adequados. Neste contexto, observou-se a existência de duas populações, em que aproximadamente 30% apresentou um tamanho de partícula de  $1,0 \times 10^3$  nm e outra, aproximadamente 70% com  $1,0 \times 10^4$  nm.*

*Considerando as SLN como uma futura aposta para a administração de péptidos e proteínas, a tolerância in vivo e in vitro, são parâmetros essenciais. Deste modo, avaliou-se a toxicidade das formulações através de testes realizados em *Drosophila*. Os estudos efectuados não revelaram toxicidade significativa para as concentrações de insulina e placebo testados.*

## Agradecimentos

*Reservo esta página da minha monografia para agradecer a várias pessoas que me auxiliaram na elaboração deste trabalho e sem as quais não seria possível realizar várias etapas ao longo deste último percurso para concluir a licenciatura.*

*Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, a Prof. Dra. Eliana Souto por toda a dedicação, carinho e empenho que demonstrou comigo. O seu optimismo, as suas críticas construtivas e toda a sua disponibilidade tornaram sem dúvida mais fácil a elaboração deste trabalho.*

*À Prof. Dra. Carla Martins, que sempre com a sua boa disposição esteve presente para qualquer dúvida e ajuda.*

*À minha colega de curso, Ana Janeiro, pela sua irreverente personalidade e carinho, pela sua companhia nas idas a Vila Real, e acima de tudo pelo seu companheirismo, amizade e carinho, um muito obrigado.*

*À Slavka, pelo seu conhecimento e amizade, e pela sua orientação vezes sem conta no laboratório, sem a sua ajuda nada disto seria possível.*

*À Universidade de Trás-os-Montes (UTAD), um muito obrigada pela cedência de todo o material e equipamento necessário para realizar os testes toxicológicos, da qual queria agradecer especificamente à Prof. Dra. Paula Martins Lopes e à D. Isabel por todo o apoio, paciência e boa disposição que me receberam durante o tempo que estive lá presente.*

*Finalmente, quero também agradecer à minha família, que é a coisa mais importante da minha vida, que sem eles não seria possível a elaboração e conclusão desta monografia e também da licenciatura. Obrigada por todo o vosso apoio, amor e por sempre acreditarem em mim.*

## Índice geral

	<i>Página</i>
<i>Resumo da monografia</i>	5
<i>Agradecimentos</i>	6
<i>Índice geral</i>	8
<i>Índice de figuras</i>	11
<i>Índice de tabelas</i>	13

## Capítulo I - Introdução geral

1.1.	<i>Insulina e Diabetes mellitus</i>	14
1.2.	<i>Sistemas de transporte de substâncias activas</i>	20
1.3.	<i>Modo de acção das nanopartículas de lipídeos sólidas</i>	24
1.4.	<i>Vantagens e desvantagens das SLN</i>	26
1.5.	<i>Métodos de preparação das SLN</i>	28
1.6.	<i>Uso de SLN como meio de transporte para substâncias activas peptídicas e proteicas</i>	31
1.7.	<i>Vias de administração das SLN</i>	33
	1.7.1. <i>Via oral</i>	33
	1.7.2. <i>Via intranasal</i>	34
1.8.	<i>Técnicas para aumentar o desempenho e a entrega de substâncias activas usando vectores lipídicos</i>	38

**Capítulo II** – *Obtenção de nanopartículas de insulina: métodos de preparação, análise da estabilidade física e estudos toxicológicos*

2.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	40
2.2. <i>Procedimento experimental</i>	43
2.2.1. <i>Formulação das SLN de insulina preparadas</i>	44
2.2.2. <i>Seleção e preparação das SLN</i>	45
2.2.3. <i>Medição do tamanho de partícula</i>	45
2.2.4. <i>Testes toxicológicos em Drosophila melanogaster</i>	46
2.2.4.1. <i>Preparação do meio de crescimento (drosophila padrão)</i>	47
2.2.4.2. <i>Preparação dos frascos com as amostras (placebo e insulina)</i>	47
2.2.4.3. <i>Preparação dos frascos com o lipídeo</i>	49
2.2.4.4. <i>Ensaio de toxicidade e género sexual das moscas adultas</i>	49

**Capítulo III – Apresentação e discussão dos resultados obtidos**

3.1. *Obtenção das SLN* 51

3.2. *Representação gráfica do tamanho de partícula* 52

3.3. *Resultados dos testes de toxicidade* 55

**Capítulo IV – Conclusão geral** 58

**Capítulo V – Referências bibliográficas** 59

## Índice de figuras

**Figura 1:** *da hormona insulina, demonstrando as duas cadeias ( $\beta$  e  $\alpha$ ), os aminoácidos que a constituem e as ligações dissulfureto que as unem.*

**Figura 2:** *Dados relativos à prevalência da diabetes em Portugal em 2009 por grupos etários*

**Figura 3:** *Representação esquemática de microemulsões A/O e O/A.*

**Figura 4:** *Estrutura de um lipossoma ilustrando a localização da incorporação das substâncias activas lipófilas e hidrófilas*

**Figura 5:** *Representação esquemática de uma nanopartícula caracterizada por um núcleo sólido e estabilizada por moléculas de agente tensioactivo*

**Figura 6:** *Representação esquemática da formação de vectores lipídicos nanoestruturados tendo como ponto de partida a substância activa a ser incorporada e a mistura lipídica previamente fundida.*

**Figura 7:** *Mecanismos de absorção evidenciando o efeito dos lipídeos formulados nas nanopartículas. As partículas aderem à mucosa da parede do intestino e as moléculas de substância activa são libertadas exactamente no local de absorção. Simultaneamente, as SLN são degradadas pelas lipases levando à formação de uma superfície activa contendo mono e diacilgliceróis que solubilizam a substância activa. São formadas as micelas mistas pela interacção com os sais biliares levando finalmente à libertação da substância activa.*

**Figura 8:** *Representação esquemática de um homogeneizador de alta pressão com respectiva legenda*

**Figura 9:** *Representação esquemática de uma emulsão tipo A/O/A*

**Figura 10:** *Ciclo de vida de Drosophila melanogaster*

**Figura 11:** *Drosophila melanogaster macho (A) e fêmea (B)*

**Figura 12:** *Nanopartículas de lipídeos sólidas obtidas a partir de uma emulsão O/A/O do placebo*

**Figura 13:** *Nanopartículas de lipídeos sólidas obtidas a partir de uma emulsão O/A/O de insulina*

**Figura 14:** *Análise por espectrofotometria de correlação fotónica da formulação de SLN contendo insulina, ao fim de uma semana de armazenamento à temperatura de 4°C.*

**Figura 15:** *Análise por espectrofotometria de correlação fotónica da formulação de SLN contendo insulina, ao fim de um dia de armazenamento à temperatura de 4°C*

**Figura 16:** *Análise por espectrofotometria de correlação fotónica da formulação de SLN contendo placebo, ao fim de uma semana de armazenamento à temperatura de 4°C.*

**Figura 17:** *Análise por espectrofotometria de correlação fotónica da formulação de SLN contendo placebo, ao fim de um dia de armazenamento à temperatura de 4°C.*

## Índice de tabelas

**Tabela 1:** *Valores de diagnóstico de diabetes e o valor normal acreditados pela OMS*

**Tabela 2:** *Comparação entre as vias de administração oral e nasal*

**Tabela 3:** *Descrição dos materiais utilizados no protocolo experimental para a preparação das nanopartículas de lipídeos sólidas.*

**Tabela 4:** *Descrição dos materiais utilizados no protocolo experimental para os testes toxicológicos*

**Tabela 5:** *Volumes medidos dos vários constituintes e a respectiva concentração de insulina*

**Tabela 6:** *Sobrevivência da descendência relativamente à formulação de SLN contendo insulina*

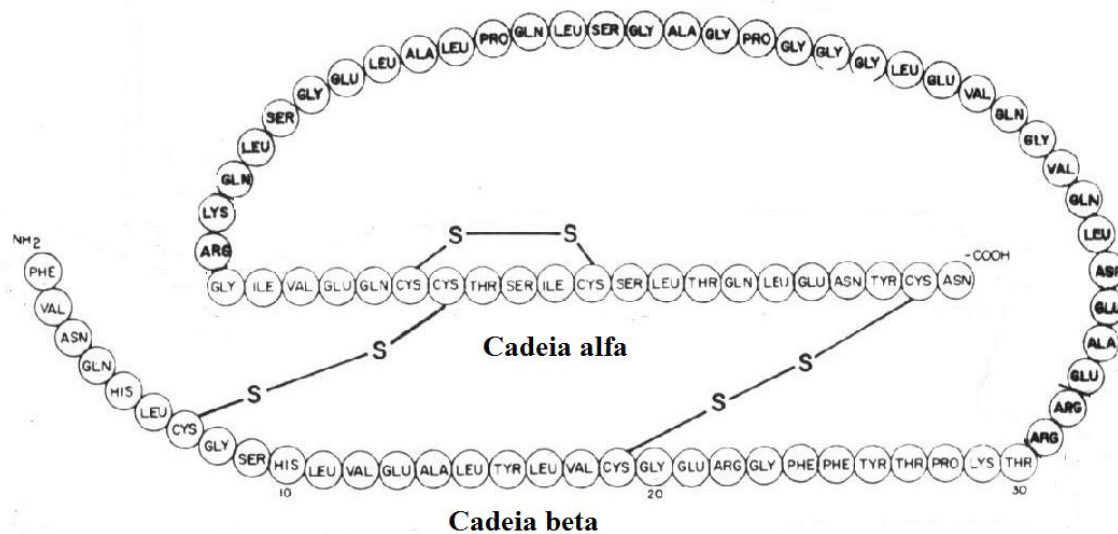
**Tabela 7:** *Sobrevivência da descendência relativamente à formulação placebo de SLN*

**Tabela 8:** *Sobrevivência da descendência relativamente ao lipídeo incorporado na formulação*

## Capítulo I - Introdução geral

### 1.1. Insulina e *Diabetes mellitus*

A insulina é um peptídeo constituído por 51 aminoácidos usado no tratamento da *Diabetes mellitus* (Sarmiento, Martins et al., 2007). Consiste em duas cadeias de aminoácidos ( $\beta$  e  $\alpha$ ) unidas por ligações dissulfureto, tal como ilustrada na figura 1. Foi isolada pela primeira vez em 1921 por Banting e Best e foi utilizada para tratamento clínico em 1922 (Siekmeier and Scheuch, 2008). Estes cientistas extraíram do pâncreas a substância activa, a insulina, demonstrando o seu efeito terapêutico em cães pancreatectomizados e em doentes diabéticos (Guimarães S., 2006).



**Figura 1** – Estrutura da hormona insulina, demonstrando as duas cadeias ( $\beta$  e  $\alpha$ ), os aminoácidos que a constituem e as ligações dissulfureto que as unem (adaptado de Geocities)

A insulina tem um peso molecular de aproximadamente 5 800 Da. A sua estrutura básica, dotada de actividade metabólica, é comum a muitas espécies animais. Actualmente, produz-se insulina humana com relativa facilidade, quer por semi-síntese a partir da insulina

*porcina, quer pela introdução artificial do gene de insulina em Escherichia coli. As células  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans produzem a insulina a partir de um precursor de maior peso molecular, a pró-insulina. Esta resulta por sua vez de uma molécula ainda maior, a pré-pró-insulina, substância cuja síntese está codificada, na espécie humana, num único gene (Guimarães S., 2006).*

*Normalmente, a insulina é segregada no pâncreas para a circulação portal de uma forma pulsátil, sendo a secreção contínua e regulada através das concentrações de vários constituintes (glicose, aminoácidos, ácidos gordos e corpos cetónicos), hormonas gastrintestinais e outras hormonas, e também por estímulos nervosos. O hipotálamo exerce uma influência elevada na medida em que controla as aferências simpáticas e parassimpáticas para os ilhéus pancreáticos, controlando também o apetite e a alimentação. Os ilhéus pancreáticos são fortemente inervados pelo sistema simpático e parassimpático e controlam deste modo, a secreção basal de insulina e a reacção à ansiedade. Desta forma, a estimulação dos adenoreceptores  $\alpha$  inibe a secreção de insulina e a estimulação dos adenoreceptores  $\beta$  e parassimpática estimula a sua secreção (Guimarães S., 2006; Singh and Chauhan, 2008).*

*Quanto à farmacocinética da insulina, pode afirmar-se que esta possui na forma livre um volume de distribuição igual ao do líquido extracelular cuja concentração periférica em condições basais é de 500 pg/mL (12  $\mu$ U/mL). A semi-vida plasmática da insulina injectada por via endovenosa é usualmente de 6 minutos sendo inactivada principalmente no fígado, cerca de 50% da proteína que chega ao fígado pela via veia porta é inactivada pelo fenómeno de primeira passagem. A insulina é também inactivada no rim através da acção de uma enzima proteolítica específica, a insulinoprotease ou insulinase. Esta enzima não se encontra exclusivamente no rim, encontrando-se também em outros tecidos que podem inactivar também a insulina. A biotransformação proteolítica da insulina pode iniciar-se à superfície da célula, sendo que a maior parte ocorre intracelularmente, após a internalização do complexo existente entre a insulina e o receptor (Guimarães S., 2006).*

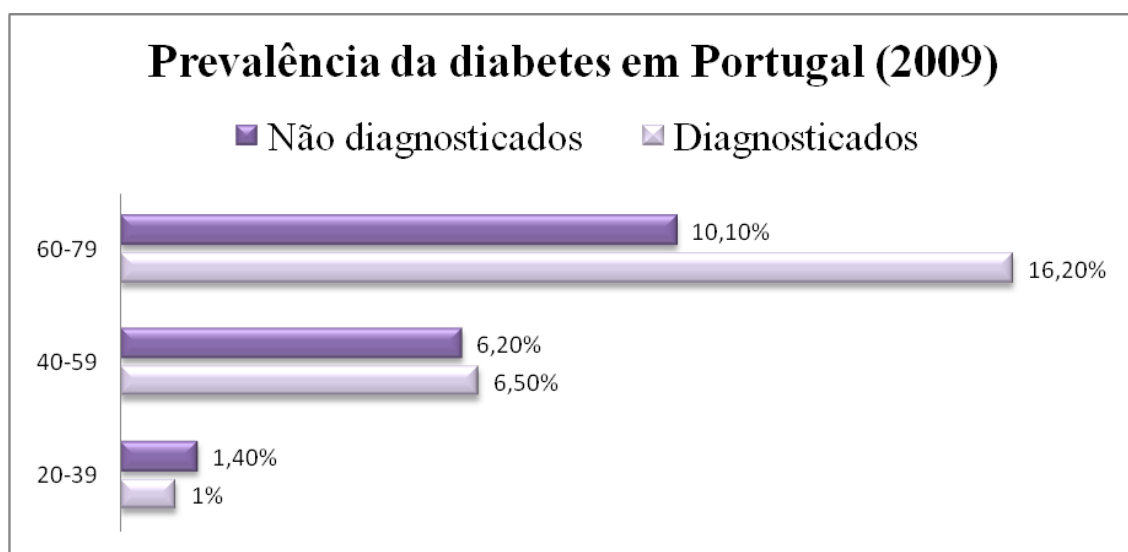
*A insulina exerce múltiplas funções imediatas e a longo prazo no organismo, sendo considerada o agente anabólico fisiológico mais potente que se conhece. Quando ocorre falta*

*de insulina, instala-se um desequilíbrio metabólico glicídico, lipídico e proteico com 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 dentro das células, nomeadamente para as células musculares e adiposas, onde será transformada em glicogénio ou gordura ou então oxidada de forma a produzir energia. É de salientar que o transporte de glicose para o cérebro e fígado não requer a presença de insulina. Praticamente todas as células dos mamíferos têm receptores específicos presentes nas membranas para a insulina. O receptor da insulina é uma glicoproteína transmembranar, composta de 2 subunidades  $\alpha$  (extracelulares, locais de ligação da insulina) e 2 subunidades  $\beta$  (transmembranares, cinases da tirosina). A estimulação do transporte de glicose para o músculo e tecido adiposo pela insulina deve-se em parte, à translocação dos sistemas de transporte da glicose de vesículas intracelulares para a membrana citoplasmática. Esta translocação acontece rapidamente e requer adenosinatrifosfato (ATP). Para além disso, a insulina pode estimular a actividade intrínseca do sistema de transporte e, a longo prazo, regular a síntese dos mesmos sistemas de transporte. Após a ligação da insulina, os receptores agregam-se e são rapidamente internalizados, transportando a proteína. Este processo pode levar a insulina até locais de acção intracelulares, nomeadamente nucleares. 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. A insulina estimula também a captação de aminoácidos e a sua incorporação em proteínas, no músculo esquelético e eventualmente em outras células. Quando há falta de insulina, o metabolismo proteico desenvolve-se no sentido do catabolismo, ocorrendo libertação dos aminoácidos pelos tecidos convertidos no fígado em glicose (neoglicogénese), com produção concomitante de ureia e amónia. A insulina actua também como agente antilipolítico, pois na sua ausência ocorre mobilização de ácidos gordos para o sangue a partir dos depósitos de gordura. Este excesso de ácidos gordos constitui substrato para a produção de corpos cetónicos no fígado, que são responsáveis pela acidose diabética. A insulina estimula também a lipase das lipoproteínas do endotélio capilar, enzima que hidrolisa os triacilgliceróis nas lipoproteínas de muita baixa densidade (“ Very-Low-Density-Lipoproteins”). Por esta razão, os diabéticos podem apresentar hipertrigliceridemia (Guimarães S., 2006; Sarmiento, Martins et al., 2007).*

## Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos

A insulina é empregue no tratamento da Diabetes mellitus que se caracteriza por uma doença auto-imune que leva à destruição das células  $\beta$  no pâncreas (Carino and Mathiowitz, 1999). A Diabetes mellitus é uma síndrome complexa, que pode ter várias etiopatogenias. Traduz-se por um quadro clínico com hiperglicemia, glicosúria, poliúria e polidipsia (Guimarães S., 2006).

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. Os dados de 2009 referem que um terço da população portuguesa compreendida entre os 20 e 79 anos ou tem diabetes ou tem uma maior predisposição para o desenvolvimento desta doença, denominada de pré-diabetes (Relatório anual do observatório nacional da diabetes em Portugal, 2009)



**Figura 2:** Dados relativos à prevalência da diabetes em Portugal em 2009 por grupos etários (adaptado de PREVADIAB/SPD)

Através da interpretação da figura 2, constata-se que existe uma correlação entre o aumento da prevalência de diabetes e o envelhecimento da população. A diabetes é portanto

uma doença de preocupação global e actual na qual é imperativo a necessidade de diminuir a sua incidência e prevalência. Os critérios de diagnóstico de diabetes de acordo com a OMS são os seguintes:

**Tabela 1 :** Valores de diagnóstico de diabetes e o valor normal acreditados pela OMS (Relatório anual do observatório nacional da diabetes em Portugal, 2009)

Normal	Diabetes
<b>Glicemia &lt; 110 mg/dL</b>	Glicemia em jejum $\geq 110$ mg/dL e $< 126$ mg/dL (em duas ocasiões)
	Glicemia a qualquer hora $\geq 200$ mg/dL (em duas ocasiões)
	Glicemia 2 horas após a ingestão de 75 gr de glicose $\geq 140$ mg/dl e $< 200$ mg/dl

Esta patologia pode ser classificada de dois tipos: tipo 1 (insulino-dependentes) e tipo 2 (não insulino-dependentes).

Na diabetes tipo 1, ocorre uma redução do volume das células  $\beta$  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  $\beta$ . Os doentes com este tipo de diabetes apresentam perda de peso, cetonúria e cetomia. Nestes doentes, a via mais adequada é a via subcutânea, não sendo certamente a mais conveniente, uma vez que com a administração crónica podem surgir lipoatrofias ou lipohipertrofias nos locais de aplicação. Deste modo, o controlo da glucose sanguínea é complexo nestes doentes, pois é necessária a administração de várias doses diárias, em

*média 2 a 4 injeções para promover um controlo efectivo. 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 (Carino and Mathiowitz, 1999; Guimarães S., 2006; Martins, Sarmiento et al., 2007).*

*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  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans. Contudo existem alterações funcionais nas células  $\beta$ , que não respondem devidamente à estimulação da glicose ocorrendo assim, resistência à insulina. Surge um aumento da massa de células  $\alpha$ , 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 (Guimarães S., 2006). Os doentes não-insulino dependentes podem optar por uma via menos dolorosa e desconfortável, como a via oral (Carino and Mathiowitz, 1999).*

*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 and Mathiowitz, 1999; Liu, Gong et al., 2007).*

*Como já foi referido anteriormente, principalmente em doentes insulino-dependentes, no tratamento da diabetes são necessárias várias injeções por dia, sendo estas por vezes dolorosas, inconvenientes e dispendiosas, sem falar nos condicionamentos sociais muitas vezes associados à sua aplicação. Convencionalmente, a insulina é administrada através de uma injeção subcutânea, de que resulta uma absorção lenta com o consequente atraso na manutenção dos níveis sanguíneos da glicose. Nos últimos anos, desenvolveram-se tentativas no sentido de veicular a insulina em comprimidos, contudo, verificou-se que a absorção deste peptídeo era demasiado rápida, o que consequentemente provocava uma redução acentuada da glicose sanguínea, ocorrendo situações de hipoglicemia. Desta forma, desde os anos 90*

*tem-se tentado desenvolver outro tipo de sistemas de transporte para veicular substâncias activas como a insulina, que para além de aumentarem a biodisponibilidade destes, também permite uma absorção gradual da substância activa ao longo do tempo. A libertação modificada de substâncias activas como a insulina é uma solução viável, para evitar a administração diária exaustivamente repetitiva (Joshi and Muller, 2009).*

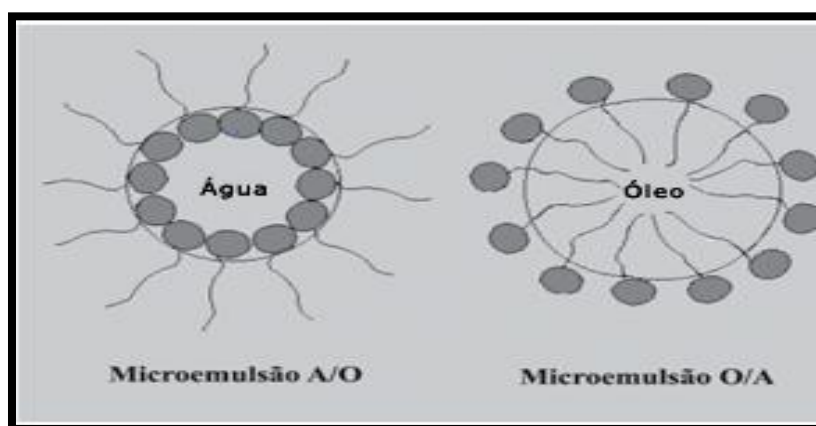
### 1.2. Sistemas de transporte de substâncias activas

*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, Trotta et al., 2008).*

*O uso de sistemas de transporte é actualmente uma alternativa eficaz às demais formas farmacêuticas presentes no mercado. As microemulsões, as nanopartículas de lipídeos sólidos, os lipossomas e os vectores lipídicos nanoestruturados (NLC) são os tipos de sistema de transporte para substâncias activas existentes (Martins, Sarmiento et al., 2007; Gallarate, Trotta et al., 2008). O recurso a estes sistemas permite (Hu et al., 2004; Garcia-Fuentes et al., 2002; Muller et al., 2002; Souto and Muller, 2006; Zhang et al., 2006): (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 entrega 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 tensioactivo. Normalmente, a*

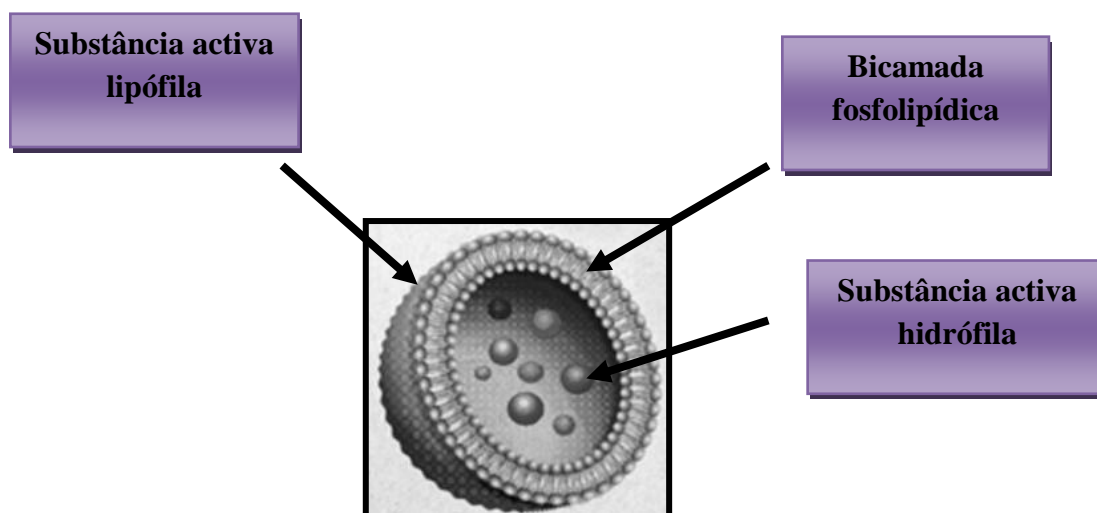
fase interna tanto aquosa (emulsões A/O) ou oleosa (emulsões O/A) tem tamanho entre 5 a 100 nm, tal como ilustrado na figura 3. As microemulsões (A/O ou O/A) foram propostas para aumentar a biodisponibilidade da via oral, incluindo peptídeos. Desta forma, substâncias activas hidrófilas podem ser incorporadas na fase aquosa dispersa das microemulsões A/O, na qual confere alguma protecção contra a degradação enzimática quando administrados oralmente (Bangham, 1993; Graf, Rades et al., 2009; Martins, Sarmiento et al., 2007).



**Figura 3:** Representação esquemática de microemulsões A/O e O/A (adaptado de Scielo)

Os lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais camadas de fosfolípídeos (em alguns casos, fosfatidilcolina). Tal como ilustrado na figura 4, as substâncias activas lipófilas podem ser incorporadas entre as camadas lipídicas enquanto as substâncias activas hidrófilas são solubilizados na fase interna aquosa (Gregoriades et al., 1993). A libertação da substância activa, a estabilidade in vivo e a biodistribuição são determinadas pelo tamanho das vesículas, da carga à superfície, da superfície hidrófoba e da fluidez da membrana (Senior, 1987). A permeabilidade da membrana pode ser adoptada pela selecção da composição dos fosfolípídeos 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, gangliosidos) ou pelo uso de polietilenoglicóis (PEG's) modificados (Gabizon et al., 1994). A utilização destes sistemas termodinamicamente estáveis e versáteis permite o desenvolvimento de estratégias para a entrega de substâncias activas (por exemplo, por incorporação de anticorpos específicos na estrutura do lipossoma) (Martin and Papahadjopoulos, 1982). 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, Sarmiento et al., 2007).

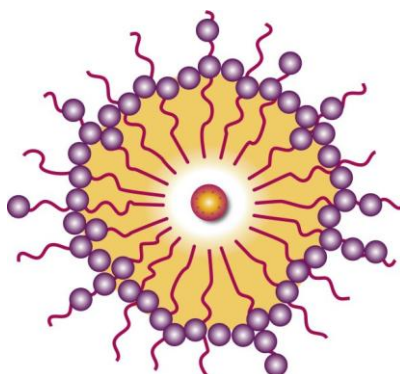


**Figura 4:** Estrutura de um lipossoma ilustrando a localização da incorporação das substâncias activas lipófilas e hidrófilas (adaptado de Unicamp)

As nanopartículas de lipídeos sólidas ("Solid lipid nanoparticles", SLN) foram desenvolvidas no início dos anos 90 (Gasco, 1993; Muchow, Maincent et al., 2008). A primeira abordagem à microencapsulação de insulina para administração oral foi feita em 1982, por Oppenheim e colaboradores, que prepararam nanopartículas de insulina (Oppenheimer, Pessin et al., 1983).

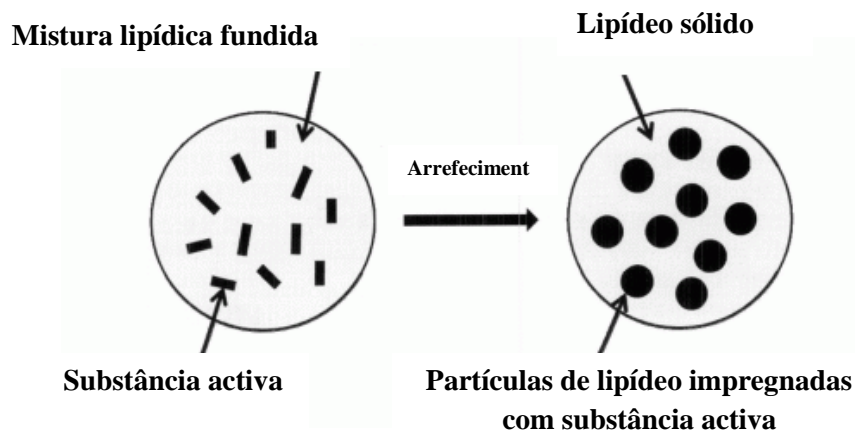
A sua propriedade característica é serem elaboradas apenas a partir de lipídeos sólidos à temperatura ambiente assim como à temperatura corporal, e são estabilizadas por agentes tensioactivos, um exemplo encontra-se representado na figura 5. Os agentes tensioactivos têm como função (Martins, Sarmiento et al., 2007): (I) diminuir o efluxo da substância activa do sistema durante o armazenamento; (II) aumentar a permeabilidade membranar (nomeadamente do epitélio intestinal após administração oral), assim como a

fracção de substância activa a ser absorvida e por último (III) aumentar a dissolução da substância activa. Os agentes tensioactivos mais vulgarmente aplicados são os diacilgliceróis de cadeia média (Muller et al., 2005). Os diâmetros destas partículas podem oscilar entre 50-1000 nm (Wissing, Kayser et al., 2004; Sarmiento, Martins et al., 2007; Muchow, Maincent et al., 2008). Por definição, os lipídeos podem ser triacilgliceróis puros, misturas complexas de triacilgliceróis ou mesmo ceramidas (Wissing, Kayser et al., 2004). 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, Kayser et al., 2004).



**Figura 5:** Representação esquemática de uma nanopartícula caracterizada por um núcleo sólido e estabilizada por moléculas de agente tensioactivo (adaptado de PNL)

Os vectores lipídicos nanoestruturados (“Nanostructured Lipid Carriers”, NLC) 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, tal como ilustrado na figura 6 (Wissing, Kayser et al., 2004).



**Figura 6:** Representação esquemática da formação de vetores lipídicos nanoestruturados tendo como ponto de partida a substância activa a ser incorporada e a mistura lipídica previamente fundida (adaptado de ReportWorld)

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, Maincent et al., 2008). 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, Sarmiento et al., 2007).

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, Sarmiento et al., 2007).

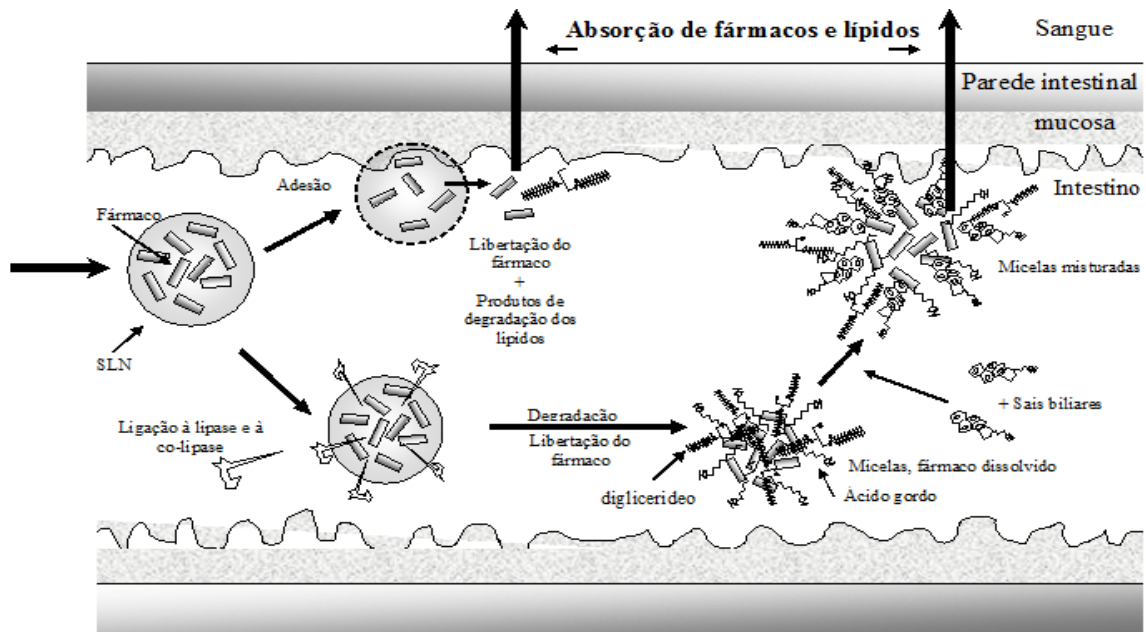
### 1.3. Modo de acção das nanopartículas de lipídeos sólidos

O modo de acção das SLN após administração oral encontra-se esquematicamente representado na figura 7. Como se pode visualizar 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 absorção de promoção de efeito”. 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 gastrintestinal em associação com a presença de moléculas bioactivas na superfície, tais como os sais biliares, transferem os óleos e gorduras para uma emulsão, sendo as gotículas da emulsão degradadas. A degradação, 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 (Muller, Runge et al., 2006).*

*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 de a 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 como indica a figura 7. Alternativamente, podem interagir com os sais biliares levando à formação de micelas mistas antes da absorção (Muller, Runge et al., 2006).*

## Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos



**Figura 7:** Mecanismos de absorção evidenciando o efeito dos lipídeos formulados nas nanopartículas. As partículas aderem à mucosa da parede do intestino e as moléculas de substância activa são libertadas exactamente no local de absorção.

Simultaneamente, as SLN são degradadas pelas lipases levando à formação de uma superfície activa contendo mono e diacilgliceróis que solubilizam a substância activa. São formadas as micelas mistas pela interacção com os sais biliares levando finalmente à libertação da substância activa. (adaptado de Muller, Runge et al., 2006)

### 1.4. 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 (Martins, Sarmiento et al., 2007; Gallarate, Trotta et al., 2008; Liu, Gong et al., 2008; Siekmeier and Scheuch, 2008; Siekmeier and Scheuch, 2008; Wissing, Kayser et al., 2004) das quais se destacam:

- serem compostas por lipídeos fisiológicos, reduzindo os riscos de toxicidade;

## Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos

- *permitirem uma libertação controlada da substância activa;*
- *serem de produção fácil e eficaz, podendo ser produzidas a uma larga escala;*
- *possibilitarem a produção de suspensões/emulsões lipídicas altamente concentradas;*
- *possibilitarem a administração da substância activa em associação com excipientes (promotores da absorção, inibidor de proteases);*
- *protegerem as substâncias activas sensíveis da degradação química e enzimática;*
- *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 (Martins, Sarmiento et al. 2007; Gallarate, Trotta et al., 2008):*

- *baixa capacidade de incorporação de substância activas, que se deve à transição para o estado polimórfico;*
- *possibilidade de ocorrer efeitos tóxicos, em particular, do uso de agentes tensioactivos e conservantes;*
- *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);*
- *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;*

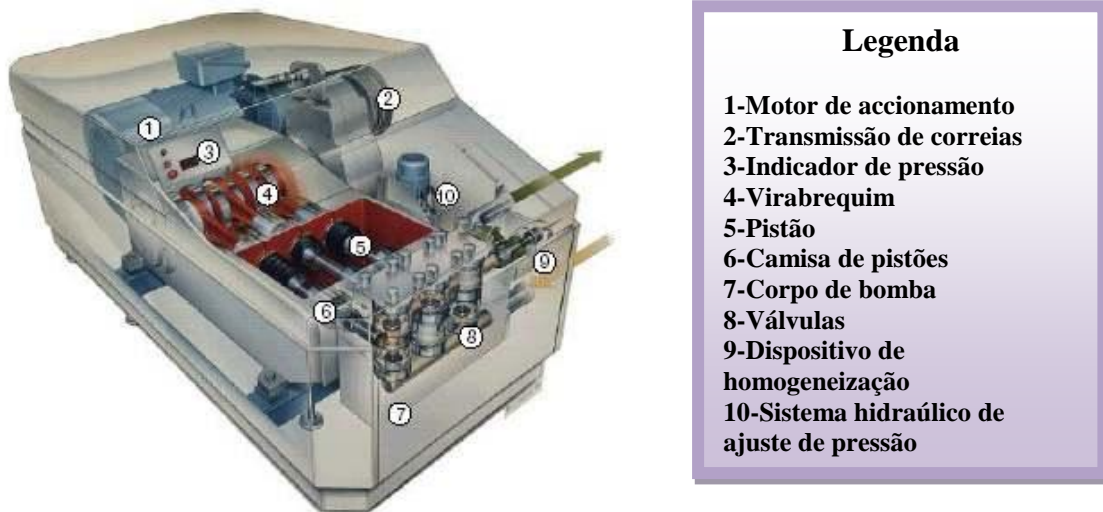
- possibilidade de serem internalizadas (fagocitadas) por células, podendo a degradação intracelular provocar efeitos tóxicos.

### 1.5. Métodos de preparação das 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 (Martins, Sarmiento et al., 2007). A sua escolha baseia-se na natureza da substância activa a ser incorporada e também dos lipídeos. O método mais vulgarmente usado é o da homogeneização a alta pressão (HAP). Este método pode ser realizado a quente e a frio (Muller et al., 2005).

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 tensioactivo que deve encontrar-se à mesma temperatura para evitar que o lipídeo solidifique usando para isso, um homogeneizador de alta velocidade, isto é, o Ultraturrax. É obtida uma pré-emulsão com um diâmetro de partícula entre 2-5 µm. Seguidamente, esta pré-emulsão é submetida ao aparelho de HAP, onde a pressão ronda os 250-500 bar e passa por três a cinco ciclos de homogeneização (Martins, Sarmiento et al., 2007; Muller et al., 2005; Zara et al., 1999; Fundaro et al., 2000; Wissing, Kayser et al., 2004).

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 tensioactivo. 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 homogéneas com a substância activa molecularmente dispersa (Martins, Sarmiento et al., 2007; Muller et al., 2005; Wissing, Kayser et al., 2004).



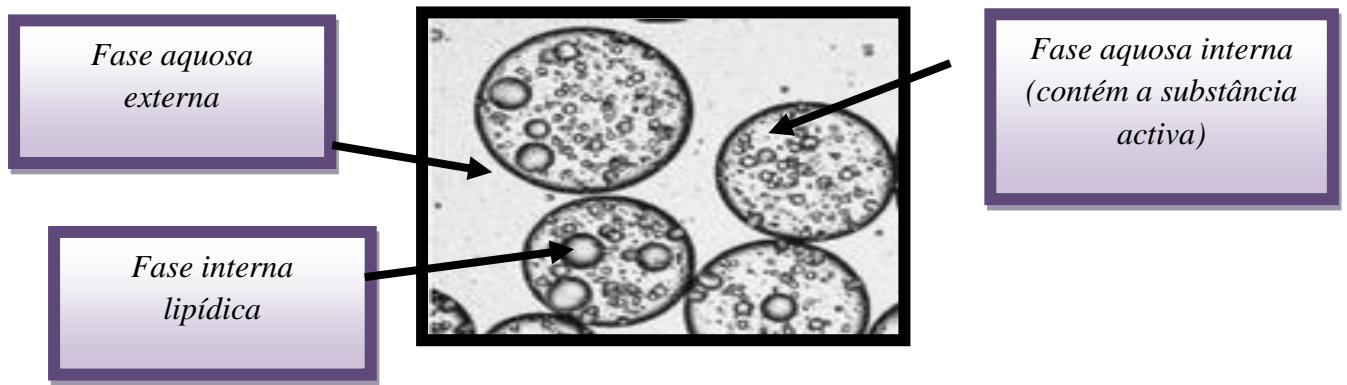
**Figura 8:** Representação esquemática de um homogeneizador de alta pressão com respectiva legenda (adaptado de Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

No método de difusão do solvente, o lipídeo é primeiramente dissolvido numa fase orgânica (ex. tolueno, etanol, acetona ou clorofórmio), num banho de água com uma temperatura de 50°C, aproximadamente. 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. Também, as dispersões obtidas são diluídas, devido à solubilidade limitada do lipídeo no solvente orgânico. (Hu et al., 2002; Muller et al., 2005; Wissing, Kayser et al., 2004).

As emulsões A/O/A são sistemas onde se veicula partículas de reduzido tamanho de determinada substância activa dentro de partículas maiores de natureza lipófila, na qual se encontram dispersas numa fase externa aquosa. Estas emulsões podem ser usadas como formas farmacêuticas de libertação modificada, devido à existência destas duas emulsões. As

*duplas emulsões contém emulsões simples A/O ou O/A e requerem na sua preparação pelo menos dois agentes tensioactivos. Um destes terá que apresentar um valor baixo de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) para estabilizar a emulsão primária e outro com valor elevado de EHL para estabilizar a emulsão secundária. O tensioactivo com valor baixo de EHL é predominantemente lipófilo e é adicionada à fase oleosa. O outro tensioactivo com valor elevado de EHL é predominantemente hidrófilo e é adicionado à fase externa aquosa. A concentração destes dois tensioactivos presentes na formulação é crucial para a estabilidade da dupla emulsão. Existem duas interfases nas duplas emulsões A/O/A, a primeira entre a fase externa aquosa e a fase oleosa, que contém o tensioactivo com valor baixo de EHL e a segunda entre a fase oleosa e as partículas de substância activa incorporada, onde ambos os tensioactivos se encontram presentes, isto é, nesta interfase. A particularidade única das duplas emulsões A/O/A comparativamente às emulsões simples é a difusão da água através da fase oleosa devido às pressões osmóticas desequilibradas entre a fase externa e a fase interna. A fase oleosa actua como uma membrana de separação destas duas fases. Deste modo, as moléculas de natureza polar dissolvidas quer numa fase quer na outra conseguem atravessar a fase oleosa através do gradiente de concentração. No caso da fase aquosa, através da pressão osmótica. As moléculas são várias vezes transportadas através de micelas do tensioactivo lipófilo presente na fase oleosa. A difusão de água pode eventualmente causar intumescimento, quebra e agressão nas partículas da fase aquosa interna, comprometendo a sua estabilidade e a libertação modificada das substâncias activas (Jiao and Burgess, 2003).*

*O método de preparação de duplas emulsões A/O/A foi descrito por Garcia-Fuentes (Garcia-Fuentes et al., 2002), na qual se adiciona um estabilizador (agente tensioactivo) 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 stress químico e térmico.*



**Figura 9:** Representação esquemática de uma emulsão tipo A/O/A (adaptado de Bayer)

Gasco e colaboradores (1993) desenvolveram e optimizaram um método para a preparação das SLN via microemulsões, que foi adoptado e modificado por vários laboratórios. Primeiramente, uma microemulsão quente fora preparada por agitação, contendo usualmente 10% de lípido sólido derretido, 15% de agente tensioactivo e mais de 10% de co-agente tensioactivo. Esta microemulsão quente foi então dispersa sob agitação num excesso de água gelada (aproximadamente 2 a 3 °C) usando uma seringa termostatizada devidamente desenvolvida. O excesso de água foi removido por ultra-filtração ou por liofilização no sentido de aumentar a concentração da partícula. Vários factores experimentais como a composição da microemulsão, o padrão de dispersão, a temperatura e a liofilização foram e são actualmente vastamente estudados na obtenção do tamanho e estrutura das SLN (Wissing, Kayser et al., 2004).

#### **1.6. Uso de SLN como meio de transporte para substâncias activas peptídicas e proteicas**

As proteínas e peptídeos são actualmente estudadas como novas biomoléculas terapêuticas e apresentam algumas dificuldades para serem veiculadas e administradas, tais como (Almeida and Souto, 2007; Joshi and Muller, 2009): (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 hidrofóbicas. A ruptura de alguma destas interacções irá afectar a estrutura e estabilidade das proteínas. Além disso, a estabilidade física e química das proteínas podem ser comprometidas por factores como o pH, força iónica, temperatura, pressão elevada, solventes não-aquosos, iões metálicos, detergentes, adsorção e agitação. A maioria destes factores estão comumente presentes nos processos de produção, incluindo esterilização e liofilização, podendo provocar dano nas proteínas que consequentemente reduz a actividade biológica, pode adicionalmente induzir a sua agregação e representar proteínas imunogénicas. Os problemas iniciais associados à entrega de proteínas e peptídeos incluíam modificação química e alteração da sequência dos aminoácidos que acarreta uma série de complicações já anteriormente referidas. Para além das complicações associadas às modificações estruturais, o uso de substâncias tensioactivas como o açúcar, sais, polióis, PEGs, etilenoglicol, polímeros, iões metálicos e aminoácidos revelam algumas preocupações essencialmente do ponto de vista toxicológico, contudo são imprescindíveis para a estabilidade dos sistemas de transporte como as SLN. Dependendo da proteína, estes tensioactivos tradicionais podem aumentar a estabilidade da proteína apenas a um nível limitado e outras alternativas estão a ser abordadas de modo a que seja possível num futuro próximo veicular péptidos e proteínas com elevado potencial farmacológico de uma forma viável e segura para os doentes (Almeida and Souto, 2007; Duncan et al., 1995; Hu et al., 2004).*

## 1.7. Vias de Administração das SLN

*Apesar da via de administração mais frequentemente aplicada ser a via subcutânea ou a via endovenosa, aborda-se neste estudo outras vias alternativas como as vias oral e nasal.*

### 1.7.1. 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 (Moeller and Jorgensen, 2008). Contudo, a baixa disponibilidade (1-2%) associada a factores físicos e fisiológicos oferecida por esta via, torna-a pouco fiável (Carino and Mathiowitz, 1999; Hichcliffe and Illum, 1999).*

*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, 1999; Silva e tal., 2003):*

1) **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.*

2) **A barreira enzimática:** *a digestão de proteínas por proteases inicia-se no estômago e continua à medida que se percorre o tracto gastrointestinal. 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.*

3) **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/péptido.*

*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 and Mathiowitz, 1999).*

*Contudo, 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 and Scheuch, 2008).*

### 1.7.2. Via Intranasal

*A via intranasal não é utilizada com tanta frequência, contudo constitui uma alternativa bastante prática e inovadora no que respeita a administração de peptídeos e*

*proteínas. Um aspecto especial desta via é a possibilidade de veicular substâncias directamente para o cérebro usando a nanotecnologia. Podem ser obtidas elevadas taxas de biodisponibilidade, especialmente quando se recorre ao uso de adjuvantes. As formulações podem ser tanto soluções como suspensões ou emulsões. A insulina é um péptido preferido para o uso desta via (Moeller and Jorgensen, 2008).*

*Comparativamente a outras vias, a via intranasal é uma das vias mais fiáveis e favoráveis para a terapêutica sistémica crónica.*

*A cavidade nasal tem relativamente uma grande área de absorção e devido à presença de uma rica vascularização na mucosa nasal permite uma rápida absorção, capaz de evitar o fenómeno de primeira passagem hepática. A terapia nasal com insulina deve sobretudo ser capaz de controlar adequadamente os níveis de glucose sanguíneos e também prevenir as complicações associadas a esta patologia (Hirai et al., 1981).*

*Apesar do potencial desta via, existem um número de factores que limitam a absorção de substâncias activas associadas maioritariamente à fisiologia normal da cavidade nasal. Desta forma, as limitações são (Hinchcliffe and Illum, 1999; Hirai et al., 1981; Hirai et al., 1978):*

**1) Deposição e eliminação de substâncias activas na cavidade nasal:** *as partículas que depositam na cavidade nasal tendem a ser rapidamente eliminadas pelos mecanismos mucociliares. A eliminação mucociliar limita o tempo disponível para as substâncias activas serem absorvidas sistemicamente. Este facto pode ser um factor importante para aumentar a absorção da insulina. O local de deposição e eliminação das proteínas e peptídeos depende do tipo de sistema, do tipo de administração e do tamanho das partículas. A deposição das partículas absorvidas depende do diâmetro aerodinâmico equivalente das partículas. Estas devem ter um tamanho de partícula inferior a 1µm e serem capazes de atravessar através da cavidade nasal para o tracto respiratório inferior, se possuírem um tamanho superior a 10 µm podem depositar na cavidade nasal e ficarem aprisionadas na mucosa. Para além do tamanho da partícula existem outros factores capazes de influenciar a absorção, tais como, a velocidade da corrente de ar, a turbulência do ar que*

*entra, a densidade, forma e higroscopia das partículas associados também à fisiologia dos compartimentos nasais e à presença de patologias nasais. A eliminação das substâncias activas pode ser reduzida em doentes com condições patológicas como rinite atrófica ou alérgica, sinusite crónica, poliposis nasal ou infecções que podem afectar a função mucociliar. Deste modo, as condições patológicas podem causar uma distribuição inadequada a nível nasal da substância activa, que afectará consequentemente a sua absorção e biodisponibilidade para exercer acção terapêutica.*

2) **Penetração da camada mucosa e transposição da membrana epitelial:** *a membrana epitelial é revestida por uma camada mucosa que a protege e é vital para o mecanismo de eliminação mucociliar. É a primeira barreira física que as substâncias activas encontram, podendo o muco constituir uma barreira selectiva para macromoléculas, como peptídeos e proteínas. As substâncias activas atravessam a membrana epitelial por transporte paracelular ou transcelular. Os compostos lipófilos tendem a atravessar as membranas biológicas pela via transcelular desde que seja capaz de difundir nos lipídeos da membrana e atravessar o citoplasma da célula. Já os compostos hidrófilos são absorvidos pela via paracelular. Sendo moléculas polares hidrófilas de peso molecular relativamente alto, a maioria dos peptídeos e proteínas, são pobremente absorvidas através das membranas biológicas, na qual origina baixa biodisponibilidade.*

3) **Degradação enzimática:** *apesar da via intranasal evitar o fenómeno de primeira passagem hepática associado à baixa biodisponibilidade da via oral, existem muitas enzimas localizadas na cavidade nasal capazes de degradar as substâncias activas peptídicas e proteicas. Estas ficam expostas a várias enzimas como as lisossomais quando atravessam a mucosa. Hirai e colaboradores (1981) demonstraram que a insulina foi rapidamente degradada no homogeneizado nasal, aproximadamente 9 a 50% durante um período de incubação de 10 a 60 minutos, respectivamente. Gizurarson e Bechgaard (1991) estudaram a degradação da insulina na cavidade nasal humana e reportaram que menos de 0,5% da dose aplicada foi destruída por enzimas locais durante o período de absorção.*

**Tabela 2:** Comparação entre vias de administração oral e nasal

<b>Via de administração</b>	
<b>Oral</b>	<b>Nasal</b>
<b>Não invasiva</b>	<i>Não invasiva</i>
<b>Fácil administração</b>	<i>Fácil administração</i>
<b>Acção mais lenta</b>	<i>Acção rápida</i>
<b>Sofre fenómeno de primeira passagem hepática</b>	<i>Evita o fenómeno de primeira passagem hepática</i>
<b>Necessário elevada quantidade de substância activa se a biodisponibilidade for baixa</b>	<i>Necessários vários adjuvantes na formulação</i>

### 1.8. Técnicas para aumentar o desempenho e a libertação de substâncias activas usando vectores lipídicos

*Uma técnica comum para aumentar o desempenho e a libertação de substâncias activas usando vectores lipídicos é o uso de promotores de absorção, entre os quais os detergentes/ agentes tensioactivos, ácidos gordos ou sais biliares que são susceptíveis de permeabilizar o muco e as camadas epiteliais, e penetrar por entre as junções intercelulares, como exemplo existem SDS, o EDTA e o desoxicolato de sódio. O glicocolato de sódio, o caprato de sódio e o n-lauril- $\beta$ -D-maltopiranosido são considerados promotores úteis devido à sua elevada capacidade promotora de absorção aliada à sua inocuidade (Silva et al., 2003) A desvantagem associada a esta técnica é o seu potencial toxicológico. Estes agentes podem provocar danos graves nas membranas, levando mesmo à sua dissolução, o que consequentemente provoca inflamação local e mesmo infecção por patogénios biológicos. Os sais biliares e os ácidos gordos são os componentes mais usados, pois aumentam a permeabilidade da bicamada fosfolipídica celular das células epiteliais do tracto gastrointestinal de modo a promover a absorção das substâncias activas. Uma grande desvantagem deste sistema é o ataque que ocorre à superfície do lipídeo, o que permite que os componentes do tracto gastrointestinal, incluindo toxinas e patogénios biológicos, tenham acesso à corrente sanguínea. Deste modo, a entrega de insulina e não só, de variadas substâncias activas podem ser efectuadas através de vectores lipídicos, pois para além de protegerem a própria substância activa das enzimas digestivas presentes no intestino delgado, podem conter inibidores das proteases. Estes, são incluídos nas formulações orais de insulina para parar a degradação pelas enzimas digestivas e podem ser combinadas com qualquer outro método para a entrega de insulina (Carino and Mathiowitz, 1999).*

## Capítulo II

### *Obtenção de nanopartículas de insulina: métodos de preparação, análise da estabilidade física e estudos toxicológicos*

*Neste capítulo serão descritos todos os métodos e materiais utilizados para a realização da parte prática do trabalho.*

*Quanto ao método de preparação das nanopartículas incluído neste estudo, foi o método da dupla-emulsão descrito por Garcia-Fuentes (García-Fuentes et al., 2002). O péptido usado foi a insulina que tem uma natureza hidrófila e como tal deve ser veiculada na fase interna aquosa nas duplas emulsões A/O/A, de forma a conferir uma protecção enzimática. Este método já foi referido no capítulo I, na alínea 1.5. e será devidamente explicado neste capítulo.*

*A estabilidade física das dispersões de SLN foi avaliada através da medição do tamanho de partícula, nomeadamente por espectroscopia de correlação fotónica.*

*Como já foi anteriormente referido, estes sistemas são usualmente bem tolerados, pois são compostos de lipídeos fisiológicos, o que diminui o risco de toxicidade. Contudo, pode sempre surgir citotoxicidade associada sendo vulgarmente atribuída aos componentes que constituem a fase aquosa, como os tensioactivos não iónicos e conservantes que podem ser eventualmente utilizados (Mehnert and Mader, 2001; Schubert and Muller-Goymann, 2005). Neste estudo, os tensioactivos usados foram o tween 80 e o poloxâmero 188 ou lutrol liofilizado. Quanto ao lipídeo usado foi o softisan 100. Considerando as SLN uma futura aplicação na entrega de peptídeos e proteínas, que são macromoléculas, é inevitável o recurso à administração parenteral. Por esta razão, a citotoxicidade associada aos lipossomas e às SLN é um parâmetro essencial para a tolerância “in vivo” em humanos e/ou animais. Muitos estudos comprovaram que os lipídeos mais seguros são os acilgliceróis*

*compostos por ácidos gordos e lecitinas. Deste modo, uma boa tolerabilidade depende em primeiro lugar da escolha do agente tensioactivo e em segundo lugar da escolha do lipídeo (Martins, Sarmiento et al., 2007).*

### **2.1. *Drosophila melanogaster***

*A *Drosophila melanogaster* é um organismo teste vulgarmente utilizado em testes genotóxicos. Mais conhecida como a mosca da fruta, este organismo é extensamente estudado. O género *Drosophila* compreende mais de 1.700 espécies (Bächli, 2006) de moscas pequenas, distribuídas por todas as regiões do mundo. Estas, na sua maioria, alimentam-se de microorganismos presentes em fungos e vegetais em decomposição. Algumas espécies são mais restritas a nível ecológico, utilizando apenas uma espécie hospedeira como local de desenvolvimento e reprodução. Contudo, outras são mais versáteis, podendo utilizar uma variada gama de recursos em diferentes fungos e/ou plantas (Carson, 1971).*

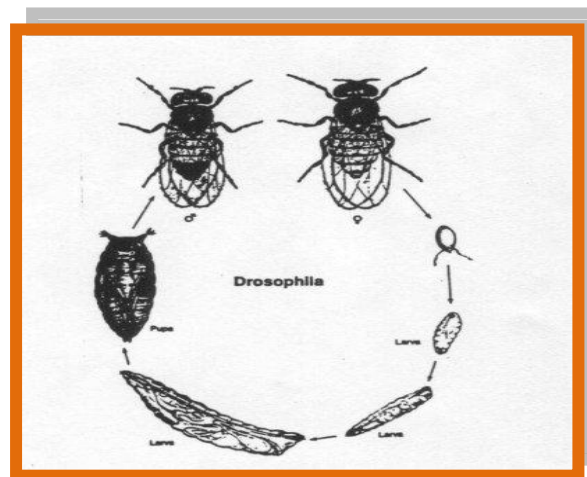
*Existem diversas vantagens para o uso deste organismo em estudos de antigenotoxicidade. Podem destacar-se as seguintes (Gaivão, 1999):*

- *ciclo de vida relativamente curto (10-12 dias a uma temperatura de 24°C para gerar descendência);*
- *sistema enzimático microsomal de desintoxicação semelhante aos mamíferos (existência do citocromo P450 em larvas e adultos);*
- *caracterização genética excelente, sendo um dos organismos eucariotas mais bem estudados;*
- *reprodutibilidade elevada (pode originar mais de 200 descendentes);*

## Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos

- *espermatogénese semelhante aos mamíferos, com duração de aproximadamente dezenas e cinquenta horas desde a espermatogónia primária até à formação do espermatozóide maduro;*
- *meios de cultura de baixo custo e de rápida preparação, o que significa uma poupança em termos económicos e de tempo relativamente a outros sistemas desenvolvidos em mamíferos;*
- *reduzido espaço para manutenção, sendo apenas necessário uma câmara climatizada com ciclo de luz;*
- *manuseamento fácil, mesmo tendo-se que lidar com centenas de indivíduos.*

*A *D. melanogaster* demora, em média, nove dias para completar o seu ciclo de vida entre o ovo e adulto. Esta passa por um período embrionário que ocorre no interior do ovo, por três estágios larvais, por uma fase curta de pré-pupa e pela fase de pupa, na qual, sob influência hormonal, os tecidos larvais são lisados, os tecidos adultos diferenciam-se a partir dos discos imaginais, e da pupa emerge a mosca adulta (Blauth, 2005) tal como ilustrado na figura 10.*



**Figura 10:** *Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (adaptado de UNAM)*

## Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos

*A D. melanogaster é considerada um excelente modelo biológico pelo facto de muitos dos mecanismos genéticos demonstrados no homem terem sido primeiramente descritos neste insecto. Outro factor importante é que todos os seus genes já foram mapeados (Panizzi and Parra, 1991).*

*No final da década passada, as questões éticas relacionadas com o uso de animais e problemas com a investigação toxicológica tornaram-se uma das preocupações fundamentais para a ciência e a ética. O uso de drosophila é recomendado pelo European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), cujo objectivo é reconhecer métodos alternativos que reduzam ou substituam o uso de animais de laboratório (Benford et al., 2000).*

*A combinação entre as características da drosophila e a abundante morfologia adulta e embrionária, a complexidade fisiológica, o comportamento estereotipado e a variedade de adaptações ecológicas, têm contribuído para a expansão da sua utilização a nível da investigação genética, principalmente a nível da organização e transmissão de genes, para a análise dos mecanismos fundamentais de desenvolvimento e evolução do genoma. Também a conservação das sequências codificantes entre a drosophila e outros organismos, incluindo os humanos, o que tem provocado uma enorme expansão na aplicação de moscas em investigação biomédica (Molnar et al., 2006).*

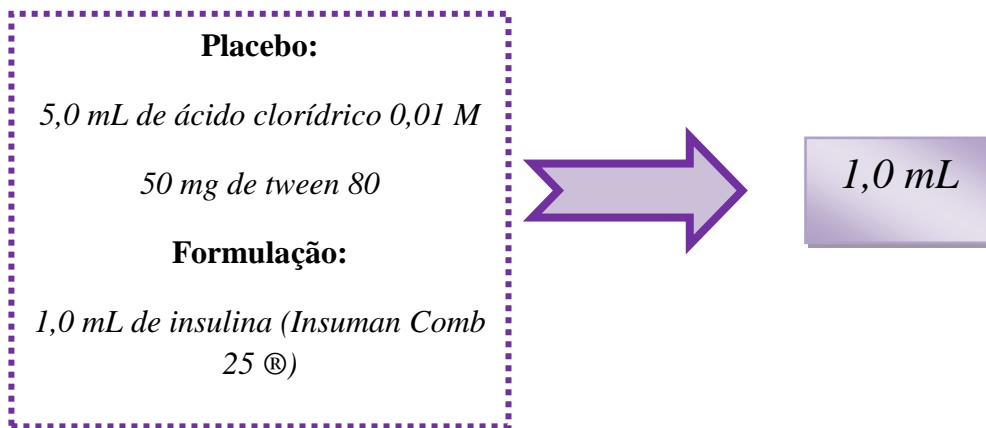
## 2.2. Procedimento experimental

**Tabela 3:** Descrição dos materiais utilizados no protocolo experimental para a preparação das nanopartículas de lipídeos sólidas.

MATERIAL	REAGENTES
3 gobelés de 50,0 mL	
Balança Analítica	Insuman Comb 25 ® Suspensão injectável (Lote U065, Val: 05/2010)
Espátula de metal	Acetato de Etilo
2 Varetas	Softisan 100
Ultra Turrax T25 ( IKA-Labortechnik, Germany)	Lecitina de Soja
Agitador magnético	Poloxâmero 188 (Lutrol liofilizado)
Placa de aquecimento	Tween 80
Balão de fundo redondo	Ácido clorídrico 0.01 M
Rotavapor	Água ultra pura
Micropipetas de 5,0 µL; 1000 µL	
Microscópio óptico	

### 2.2.1. Formulação das SLN de insulina preparadas

#### Fase 1 ou fase interna oleosa



#### Fase 2 ou fase aquosa



*5.0 mL de acetato de etilo*  
*500 mg de softisan*  
*50 mg de lecitina de soja*

#### Fase 3 ou fase externa oleosa



*400 mg de poloxâmero 188*  
*Água ultra-pura qbp 40 mL*

### 2.2.2. Selecção e preparação das nanopartículas

*O método utilizado para a obtenção das nanopartículas foi o método da dupla emulsão descrito por Garcia-Fuentes (Garcia-Fuentes et al., 2002). Retirou-se 1,0 mL de insulina (Insuman Comb 25 ®) e adicionou-se, a quente ( $\approx 38^\circ\text{C}$ ), 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 do placebo, substituiu-se a insulina por uma fase constituída por 5,0 mL de HCl 0,01M e 50,0 mg de Tween 80, mas na qual só se utilizou 1,0 mL. Quando ambas as fases se encontravam à mesma temperatura ( $\approx 40^\circ\text{C}$ ) e as gorduras devidamente derretidas, juntaram-se as duas fases e homogeneizou-se no Ultra Turrax T25 durante 10 minutos. Seguidamente, esta primeira emulsão foi dispersa por uma fase que continha 400,0 mg de Poloxâmero 188 e 40,0 mL de água ultra pura. Homogeneizou-se por mais 5 minutos e no final, deixou-se arrefecer num agitador magnético até que a temperatura da emulsão rondasse os  $23^\circ\text{C}$ . Depois, transferiu-se para um balão de fundo redondo, na qual se sujeitou ao rotavapor durante 30 minutos a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ .*

*Após a sua preparação, retirou-se 5,0  $\mu\text{L}$  da amostra para visualização no microscópio óptico.*

### 2.2.3. Medição do tamanho de partícula

*O tamanho das partículas obtidas foi medido por espectroscopia de correlação fotónica a  $25^\circ\text{C}$  (PCS Malvern Zetasizer Nanoseries). As amostras foram diluídas com água ultra-pura para a análise ocorrer em concentrações aceitáveis, na qual se comparou duas formulações, uma preparada na semana anterior e a outra preparada na véspera. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.*

2.2.4. Testes toxicológicos em *Drosophila melanogaster*

**Tabela 4:** Descrição dos materiais utilizados no protocolo experimental para os testes toxicológicos.

<b>MATERIAL</b>	<b>REAGENTES</b>
Frasco com tampa (eterizador), Mortório	<i>Levedura</i>
Pincel	<i>Açúcar</i>
Algodão cardado e hidrófilo	<i>Agar</i>
Frascos de vidro de 200,0 mL (Todos iguais)	<i>Água destilada</i>
Placa de aquecimento	<i>Sal</i>
Micropipetas e pontas (10 µL, 100 µL e 1000 µL)	<i>Ácido propiónico</i>
Provetas	<i>Formulações de placebo e insulina</i>
Lupa	<i>Éter sulfúrico</i>
Panela e colher de pau	<i>Softisan 100</i>
Gobelés	

## MATERIAL BIOLÓGICO

### *Drosophila melanogaster*

#### **2.2.4.1. Preparação do meio de crescimento (*drosophila* padrão)**

*Dissolveu-se a quente numa panela 150,0 mL de sacarose em 1,0 L de água destilada. Adicionou-se seguidamente, 18 g de ágar e mexeu-se devidamente. Num gobelé, dissolveu-se a frio e separadamente o fermento (+/- 125-150 g) em 0,5 L de água e depois adicionou-se à mistura da panela. Quando começou a ferver, contaram-se 20 minutos, sempre mexendo para evitar a formação de grumos. Por fim, retirou-se do lume e adicionou-se 7,5 mL de ácido propiónico, que actua como antifúngico.*

#### **2.2.4.2. Preparação dos frascos com as amostras (placebo e insulina)**

*Para testar várias concentrações de insulina e placebo utilizou-se como base a tabela 5, que indica os volumes de cada componente que se transferiu para cada frasco de 200,0 mL. Tanto as amostras de placebo e de insulina foram testadas em duplicado.*

**Tabela 5:** *Volumes medidos dos vários constituintes e a respectiva concentração de insulina*

<b>Volume de amostra medido (mL)</b>	<b>Volume de água destilada (mL)</b>	<b>Volume de meio de crescimento (mL)</b>	<b>Concentração de Insulina (mg/mL)</b>
<b>5,0</b>	<b>0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,58</b>
<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>25,0</b>	<b>0,29</b>
<b>1,25</b>	<b>3,75</b>	<b>25,0</b>	<b>0,15</b>
<b>0,625</b>	<b>4,375</b>	<b>25,0</b>	<b>0,073</b>
<b>0</b>	<b>5,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>

*Através da interpretação da tabela 5, existiam cinco concentrações diferentes de insulina nos frascos. Estas concentrações estavam espaçadas por intervalos idênticos, isto é, o intervalo entre elas era de exactamente o dobro, desde o frasco de menor para o de maior concentração. A amostra de insulina foi diluída com água destilada para perfazer um volume final de 5,0 mL e no final calculou-se a concentração de insulina presente em cada um dos frascos. Esta mistura foi adicionada a 25,0 mL de meio de crescimento previamente introduzido no frasco. Posteriormente, agitou-se cuidadosamente os frascos para que a solução contendo insulina se dispersasse pelo meio de crescimento. Após solidificação do conteúdo dos frascos, adicionaram-se as drosophilas. Procedeu-se da mesma forma para as amostras de placebo. Como já foi anteriormente referido, as amostras foram todas testadas em duplicado.*

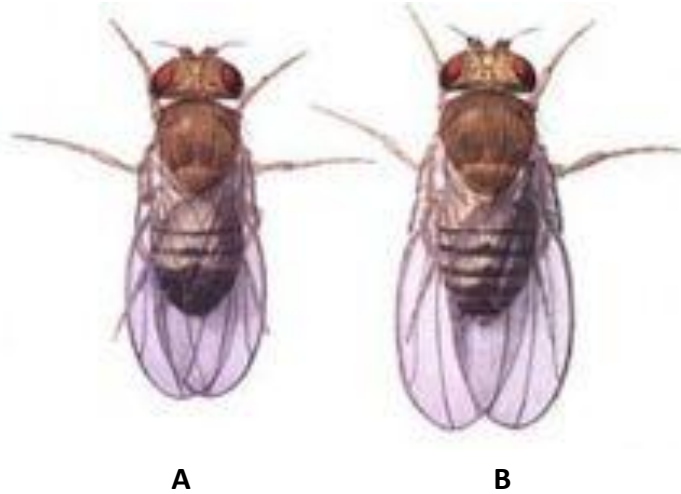
#### **2.2.4.3. Preparação dos frascos com o lipídeo**

*Para testar a toxicidade do lipídeo usado na formulação utilizou-se o volume correspondente à quantidade utilizada na formulação, isto é, como se usou 500 mg de Softisan 100 nas formulações, então mediu-se 0,52 mL do lipídeo para cada um dos frascos (duas réplicas) de 200,0 mL, os quais continham 25,0 mL de meio. Para esse efeito, derreteu-se o lipídeo com a ajuda de uma placa de aquecimento e após adição ao meio de crescimento, misturou-se e deixou-se repousar para solidificar. Posteriormente, adicionaram-se as drosophilas.*

#### **2.2.4.4. Ensaio de toxicidade e género sexual das moscas adultas**

*Depois de o meio estar devidamente solidificado, colocaram-se 30 casais de moscas por cada frasco. Isto foi possível através do recurso à eterização das moscas num eterizador contendo éter sulfúrico, o qual induzia o seu adormecimento. Verteram-se as moscas para um papel branco para possibilitar a sua separação por sexo e a sua contagem para cada frasco teste.*

*É visível um dimorfismo sexual bem acentuado no abdómen do adulto. As fêmeas apresentam uma alternância típica de listas claras e escuras nos segmentos abdominais e são visivelmente menores, os machos por sua vez apresentam a extremidade do abdómen negra devido à fusão (coalescência) dos segmentos terminais e são de dimensões menores.*



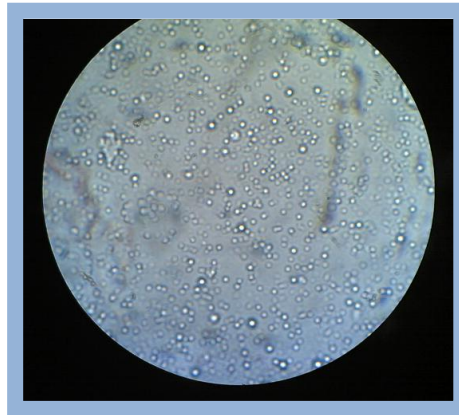
**Figura 11:** *Drosophila melanogaster* macho (A) e fêmea (B) (adaptado de Wikipedia)

*Rolhou-se devidamente o frasco com algodão carpado. Quando completou uma semana de incubamento à temperatura ambiente, retiraram-se os casais, de forma a permitir o desenvolvimento da descendência na semana seguinte. No final dessa semana, contou-se o número de moscas presentes em cada frasco. Para isso, anestesiaram-se as moscas por breves momentos (durante 30 a 40 segundos) com vapores de éter sulfúrico, num eterizador. Os insectos anestesiados foram colocados sobre uma folha de papel branca adequada ao seu transporte e manipulação. Os indivíduos foram manipulados com um pincel para evitar danos na sua integridade física.*

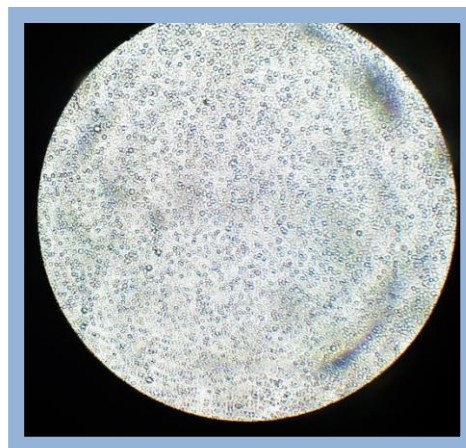
### Capítulo III – Apresentação e discussão dos resultados obtidos

#### 3.1. Obtenção das nanopartículas de lipídeos sólidas

As figuras 11 e 12 representam nanopartículas de lipídeos sólidas obtidas a partir de uma emulsão A/O/A.



**Figura 12:** *Nanopartículas de lipídeos sólidas obtidas a partir de uma emulsão O/A/O do placebo*

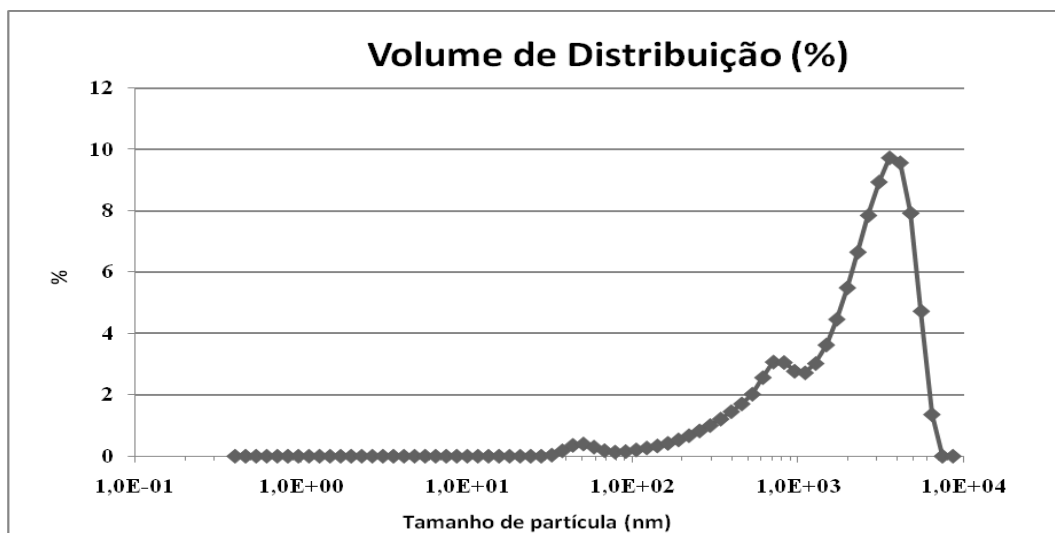


**Figura 13:** *Nanopartículas de lipídeos sólidas obtidas a partir de uma emulsão O/A/O de insulina*

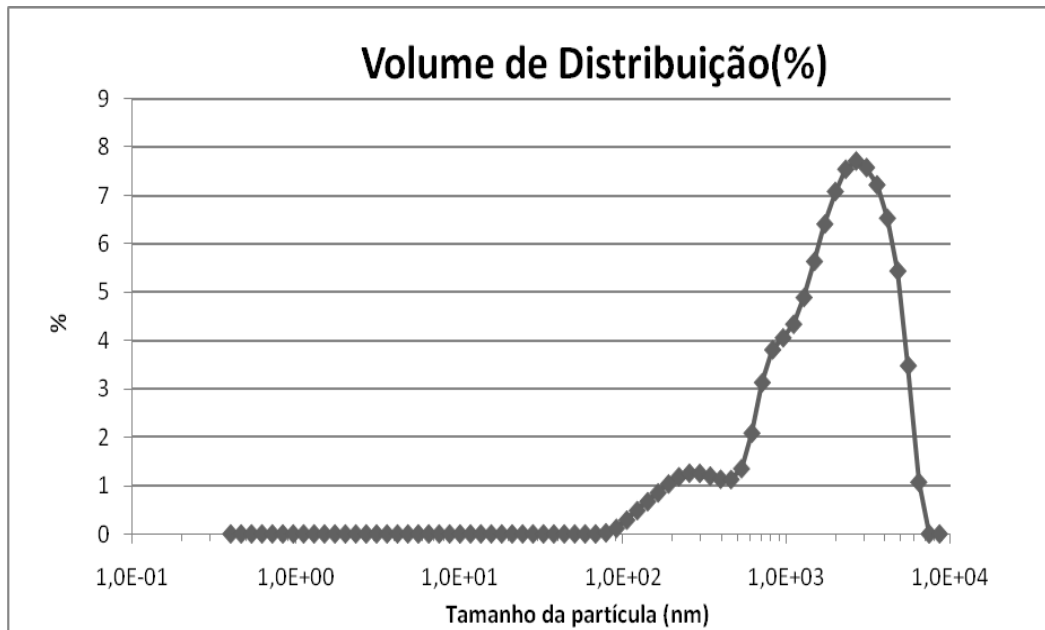
Verifica-se que foram obtidas nanopartículas de lipídeos sólidas de dimensões relativamente homogêneas tanto na formulação placebo como na formulação contendo a insulina. A análise da estabilidade das SLN foi controlada após uma semana, contudo registou-se que após uma semana estas ainda se encontravam perfeitamente estáveis, por isso as imagens são literalmente idênticas, daí não existir a necessidade da sua demonstração. Foi possível verificar que 16 dias após a sua preparação, as SLN apresentaram uma ligeira separação das fases, ocorrendo duas fases distintas no interior dos tubos de preparação. Contudo, estes resultados são esperados, uma vez que a molécula de insulina é bastante instável, apesar do armazenamento ter sido efectuado numa sala controlada com temperatura a 4° C e ao abrigo da luz. Para este estudo, estes resultados são menosprezáveis, uma vez que enquanto as formulações de SLN mantiveram-se estáveis, foi possível avaliar o tamanho de partícula e toxicidade perante *Drosophila melanogaster*.

### 3.2. Tamanho de partícula

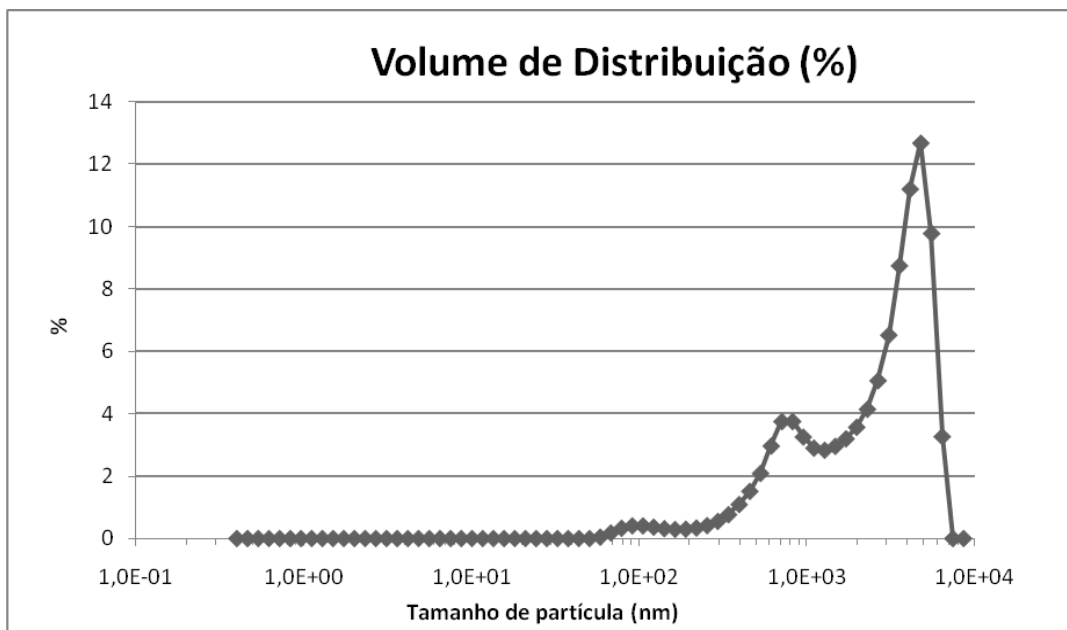
As figuras 13 à 16 representam o volume de distribuição das nanopartículas de lipídeos sólidas de acordo com o respectivo tamanho de partícula tanto das formulações placebo como na formulação contendo insulina.



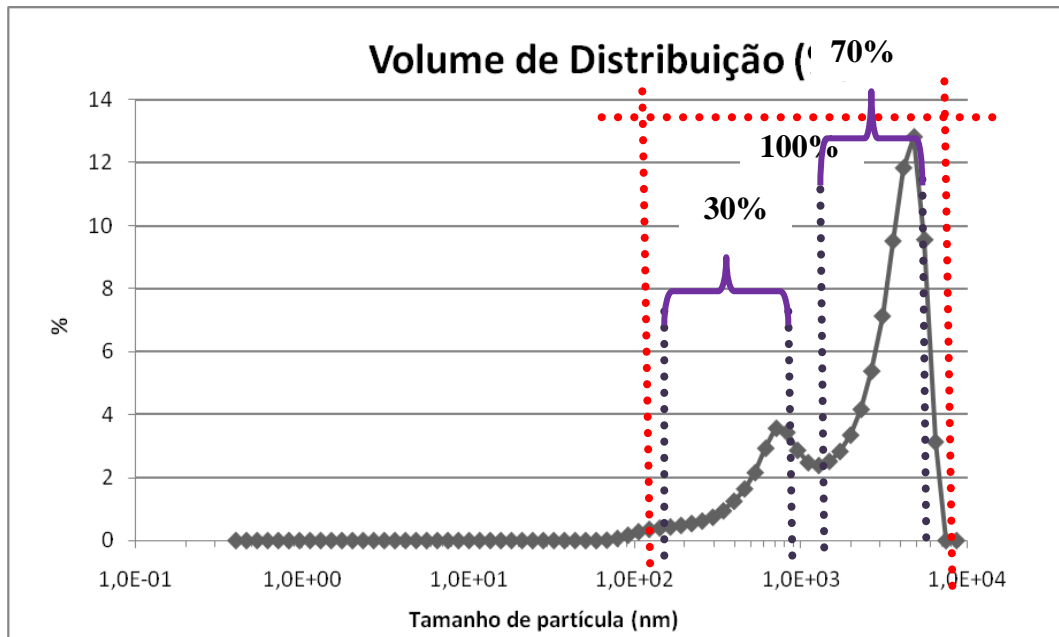
**Figura 14:** Análise por espectrofotometria de correlação fotónica da formulação de SLN contendo insulina, ao fim de uma semana de armazenamento à temperatura de 4°C.



**Figura 15:** Análise por espectrofotometria de correlação fotônica da formulação de SLN contendo insulina, ao fim de um dia de armazenamento à temperatura de 4°C.



**Figura 15:** Análise por espectrofotometria de correlação fotônica da formulação de SLN contendo placebo, ao fim de uma semana de armazenamento à temperatura de 4°C.



**Figura 16:** Análise por espectrofotometria de correlação fotônica da formulação de SLN contendo placebo, ao fim de um dia de armazenamento à temperatura de 4°C.

Verifica-se que foram obtidas nanopartículas de lipídeos sólidas com tamanho relativamente homogêneo tanto na formulação contendo insulina como na formulação placebo. É também possível verificar que ambas as amostras, isto é, a amostra da formulação de SLN contendo insulina com uma semana e a outra com um dia, não apresentaram diferenças significativas quanto ao tamanho de partícula,  $\pm 100$  nm. O mesmo se verifica para as amostras de placebo, apresentando um tamanho relativamente idêntico,  $\pm 100$  nm. Contudo, através desta análise, é possível identificar duas populações de SLN. Todas as representações gráficas apresentam a existência destas duas populações, mas a esquematização gráfica da existência destas duas populações está implícita na figura 16, onde se visualizou que aproximadamente 30 % apresentaram tamanho de partícula de 100 nm, enquanto a restante, aproximadamente 70% apresentaram tamanho de partícula correspondente a 1000 nm.

### 3.3. Testes de Toxicidade

As tabelas 5, 6 e 7 representam a genotoxicidade apresentada pela descendência das moscas traduzidas em quantidade de moscas quando testadas com a formulação de SLN contendo insulina, a formulação placebo e com o lipídeo (Softisan 100) incorporado na formulação.

**Tabela 6:** Sobrevivência da descendência relativamente à formulação de SLN contendo insulina

	Volume de amostra testado (mL)	[Insulina] mg/mL	Réplica 1 (Número de descendência originada)	Réplica 2 (Número de descendência originada)	Média (Número de descendência originada)
<b>Insulina</b>	5,0	0,58	360	289	325
	2,5	0,29	380	427	404
	1.25	0,15	251	287	270
	0,625	0,072	507	366	437
	0	0	161	128	145

**Tabela 7:** *Sobrevivência da descendência relativamente à formulação placebo de SLN*

	<b>Volume de amostra testado (mL)</b>	<b>Réplica 1 (Número de descendência originada)</b>	<b>Réplica 2 (Número de descendência originada)</b>	<b>Média (Número de descendência originada)</b>
<b>Placebo</b>	<b>5,0</b>	<b>0</b>	<b>492</b>	<b>492</b>
	<b>2,5</b>	<b>376</b>	<b>334</b>	<b>355</b>
	<b>1.25</b>	<b>404</b>	<b>438</b>	<b>421</b>
	<b>0,625</b>	<b>496</b>	<b>521</b>	<b>509</b>
	<b>0</b>	<b>426</b>	<b>371</b>	<b>399</b>

**Tabela 8:** *Sobrevivência da descendência relativamente ao lipídeo incorporado na formulação*

	<b>Volume de lipídeo testado (mL)</b>	<b>Réplica 1 (Número de descendência originada)</b>	<b>Réplica 2 (Número de descendência originada)</b>	<b>Média (Número de descendência originada)</b>
<b>Lipídeo (Softisan 100)</b>	<b>0,52</b>	<b>266</b>	<b>245</b>	<b>256</b>

## Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos

*Através da análise dos resultados referentes à insulina, as concentrações testadas não demonstraram toxicidade para a descendência dos casais de drosophila testados. Pode visualizar-se que a média de descendência originada oscilou entre 145 e 435 indivíduos. Quanto aos resultados evidenciados pela amostra contendo placebo, também pode verificar-se que não existiu toxicidade para a descendência dos casais de drosophila testados. Comparativamente à amostra de insulina, ocorreu maior descendência, que oscilou entre 509 e 355 indivíduos, contudo as concentrações de insulina testadas não se revelaram tóxicas para o organismo em estudo. Quanto ao teste com o lipídeo softisan 100, também foi possível verificar que este não apresentou toxicidade, o que vai de encontro ao que seria esperado, pois os lipídeos usados em formulações entéricas devem ser desprovidos de toxicidade. Em todas as amostras testadas, não conseguiu estabelecer-se uma correlação significativa quanto às concentrações utilizadas, isto é, a sobrevivência da população não decresceu com a aumento da concentração de insulina e placebo usados, logo para testar qual seria a concentração mínima tóxica ou para estabelecer uma correlação significativa dose/efeito tóxico teria que usar-se concentrações mais elevadas. Em suma, verifica-se que as três formulações testadas neste ensaio não demonstraram genotoxicidade significativa sobre D. melanogaster. Uma vez que a quantidade de descendência originada é de aproximadamente duzentos descendentes, pode-se visualizar apenas um dos resultados (tabela 5) é que não se encontra na aceitabilidade deste ensaio de genotoxicidade.*

## Capítulo IV

### Conclusão geral

*Foram obtidas nanopartículas de lipídeos sólidos contendo insulina, através do método de dupla emulsão descrito por Garcia-Fuentes (Garcia-Fuentes e tal., 2002) com êxito. Sendo assim, torna-se possível evitar a degradação proteolítica desta proteína e a manutenção da sua actividade biológica através da encapsulação destas em sistemas coloidais lipídicos.*

*Com o presente estudo, foi também possível concluir que a formulação elaborada não revela toxicidade para as concentrações de insulina testadas, sendo de assegurar que todos os componentes utilizados são toleráveis e aptos de serem veiculados a nível entérico.*

*Desta forma, as nanopartículas de lipídeos sólidos são uma grande aposta para o futuro, de modo a melhorar a qualidade de vida do doente e também a assegurar a sua melhor adesão à terapêutica.*

## Capítulo V

### Referências bibliográficas

Almeida, A., J. and Souto, E., B. (2007). “Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(6):478-490.

Bächli, G. (2006). “Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae”. Disponível em: <http://www.taxodros.uzh.ch/>. [Consultado em 19 de Janeiro de 2010]

Bangham, A.D. (1993). “Liposomes: The Babraham connection”. *Chemistry Physiologic Lipids* 64:275-85.

Bayer disponível em: <http://www.bayer-technology.com/typo3temp/pics/764acbb476.jpg>. [Consultado em 23 de Setembro de 2009]

Benford, D., Hanley, B. and Bottrill, K. (2000). “Biomarkers as predictive tools in toxicity testing”. *Alternative Laboratory of Animals* 28:119.

Blauth, M. (2005). “Expressão de elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*”. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Carino, G. P. and Mathiowitz E. (1999). “Oral insulin delivery”. *Advanced drug Delivery Reviews* 35(2-3):249-257.

Carson, H. (1971). “The ecology of *Drosophila* breeding sites”. *Harold Lyon Arboretum Lecture, University of Hawaii*, 2:1-28.

Duncan, M., R., Lee, J., M., Warchol, M., P.(1995). “Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene”. *International Journal of Pharmaceutics* 120:179-8.

Fundaro, A., Cavalli, R., Bargoni, A. et al.(2000). “Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats”. *Pharmacology Research* 42:337-43.

Gabizon, A., Catane, r., Uziely, B. et al. (1994). “Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes”. *Cancer research* 54:987-92.

Gaivão, I. (1999). “Avaliação genotóxica de compostos indutores de espécies reactivas de oxigénio: um estudo em *Drosophila melanogaster*”. Tese de Douturamento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Gallarate, M. Trotta, M. et al. (2008) “Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation”. *Journal of Microencapsulation* 1:9.

García-Fuentes, M. Torres, D.Alonso, M.J. (2002). “Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules”. *Colloid Surface B*. 27:159-68.

Gasco, M., R. (1993). “Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution”. *U.S Patent* 5:250-236.

Geocities disponível em:  
<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Launchpad/9071/insulin.jpg>. [Consultado em 22 de Setembro de 2009]

Gizurarson, S., and Bechgaard E. (1991). “Study of nasal enzyme activity towards insulin in vitro”. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39:2155-2157.

Guimarães, S. Moura, D. and Soares da Silva, P. (2006). “ Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas”. Porto Editora.

*Graf, A., Rades, T. et al. (2009). "Oral insulin delivery using nanoparticles based on microemulsions with different structure-types: Optimisation and in vivo evaluation." European Journal of Pharmaceutical Sciences 37(1): 53-61.*

*Gregoriades, G., Florence, A., T., Patel, H., M. (1993). "Liposomes in drug delivery". Amsterdam: Harwood Academic Publishers.*

*Hinchcliffe, M. and Illum, L. (1999). "Intranasal insulin delivery and therapy". Advanced Drug Delivery Reviews 35(2-3):199-234.*

*Hirai, S., Ikenaga, T., Matsuzawa, T. (1978). "Nasal absorption of insulin in dogs". Diabetes 27:296-299.*

*Hirai, S., Yashiki, H., Mima, H. (1981). "Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in rats". International Journal of Pharmaceutics 9:165-172.*

*Hu, F. Q., Yuan, H., Zhang, H. (2002) "Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physiochemical characterization". International Journal of Pharmacology 239:121-8.*

*Hu, F. Q., Hong, Y., Yuan, H. (2004) "Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide". International Journal of Pharmacology 273:29-35.*

*Jiao, J. and Burgess, D., J. (2003). "Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80". AAPS Pharmaceutics Science 5(1):E7.*

*Joshi, M. D. and Muller, R. H. (2009) "Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 71(2):161-72.*

*Liu, J. Gong, T. et al. (2007) "Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization". International Journal of Pharmacology 340(1-2):153-62.*

*Liu, J., Gong, T. et al. (2008). "Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin." International Journal of Pharmaceutics 356(1-2): 333-44.*

*Martins, S., Sarmiento, B. et al. (2007) "Lipid –based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles". International Journal of Nanomedicine 2(4):595-607.*

*Martin, F., Papahadjopoulos, D. (1982). "Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to performed vesicles". Journal of Biological Chemistry 257:286-8.*

*Mehnert, W. and Mader, K. (2001). "Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications". International Journal Drug Reviews 47:165-96.*

*Moeller, E., H. and Jorgensen, L. (2008). "Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals". Proteins Therapeutics 5(2-3):e89-e94.*

*Molnar, C., Terriente, A. and Celis, J. (2006). "Drosophila as a model system for genetic and genomic research".*

*Muchow, M., Maincent, P, (2008). "Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery". Drug Development and Industrial Pharmacy 34(12):1394-405.*

*Muller, R., H., Mehnert, W. and Souto, E.,B. (2005). "Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for dermal delivery". International Journal of Pharmaceutics 366:170-184.*

## Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos

Muller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A. (2002). "Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs". *International Journal of Pharmaceutics* 242:121-8.

Muller, R.H., Runge, R et al.. (2006). "Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals". *International Journal of Pharmaceutics* 317(1):82-9.

Oppenheimer, C., L. and Czech, M., P. (1983). "Purification of the type II insulin-like growth factor receptor from rat placenta." *Journal of Biological Chemistry* 258(14): 8539-42.

Panizzi, A. and Parra, J. (1991). "Ecologia nutricional de insectos e as suas implicações no manejo de pragas". *Editorial de São Paulo*, 35.

PNL –Pacific Northwest National Laboratory disponível em: <http://www.pnl.gov/cmsd/highlights/images/silical117full.jpg>. [Consultado em 25 de Outubro de 2009]

PREVADIAB/SPD, Sociedade Portuguesa de Diabetologia disponível em: <http://www.spd.pt/images/ond%20-%20relatorio%20anual%20diabetes%202010.pdf>. [Consultado em 19 de Janeiro de 2010]

ReportWorld disponível em: [http://www.reportworld.co.kr/data/rw\\_kstudy/2672/kstudy2672112\\_0002.jpg](http://www.reportworld.co.kr/data/rw_kstudy/2672/kstudy2672112_0002.jpg). [Consultado em 25 de Outubro de 2009]

Sarmiento, B. Martins, S. et al. (2007). "Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles". *International Journal of Nanoparticles* 2(4):743-749.

Sarmiento, B. Martins, S. et al. (2007). "Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of Polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile". *Carbohydrates Polymers* 69(4):725-731.

Schubert, M.,A. and Muller-Goymann, C.,C. (2005). “Characterization of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61:77-86.

Scielo – Scientific electronic library online disponível em: <http://www.scielo.br/img/revistas/rbcf/v41n3/a03fig02.gif>. [Consultado em 23 de Setembro].

Senior, J., H. (1987). “A review of controlling factors”. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carriers Systems* 3:123-93.

Siekmeier, R. and Scheuch, G. (2008). “Systemic treatment by inhalation of macromolecules : Principles, problems and examples”. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59 Suppl 6:53-79.

Siekmeier, R. and Scheuch, G. (2008). “Inhaled insulin: does it become reality?”. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59 Suppl 6:81-113.

Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D. and Veiga, F. (2003). “Administração oral de peptídeos e proteínas : III. Aplicação à insulina”. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 39:1.

Singh, B and Chauhan N. (2008). “Modification of psyllium polysaccharides for use in oral insulin delivery”. *Food Hydrocolloids* 23(3):928-935.

Souto, E.B. Muller, R.H. (2006). “Lipid nanoparticles (SLN and NLC) for drug delivery nanoparticles for pharmaceutical applications”. Berlin: American Scientific Publishers pp. 103-22.-

Relatório anual do observatório nacional da diabetes em Portugal (2009) disponível em: <http://www.spd.pt/images/ond%20-%20relatorio%20anual%20diabetes%202010.pdf>. [Consultado em 19 de Janeiro de 2010]

## Vectorização de péptidos e proteínas em sistemas coloidais lipídicos

UNAM- Universidad Nacional Autónoma de México disponível em: <http://depa.pquim.unam.mx/genetica/images/prac11z.jpg>. [Consultado em 23 de Janeiro de 2010]

Unicamp- Universidade Estadual de Campinas disponível em: [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/junho2007/fotosju362-online/9a.jpg](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/junho2007/fotosju362-online/9a.jpg). [Consultado em 23 de Setembro de 2009]

Wikipedia disponível em: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7c/55542main\\_maflies\\_med.jpg/220px-55542main\\_maflies\\_med.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7c/55542main_maflies_med.jpg/220px-55542main_maflies_med.jpg). [Consultado em 22 de Janeiro de 2010]

Wissing, S., A., Kayser, O. et al. (2004). "Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(9):1257-72.

Zara, G., P., Cavalli, R., Fundaro, A. et al. (1999). "Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN)". *Pharmacology Research* 40:281-6.

Zhang, N. Ping, Q., Huang, G. et al. (2006). "Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin". *International Journal of Pharmacology* 327:153-9.