

Carolina Jacinto Correia

**Nanopartículas de insulina para
administração oral**

Orientação – Professora Doutora Catarina Pinto Reis

**Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias**

Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde

Lisboa

2014

Carolina Jacinto Correia

**Nanopartículas de insulina para
administração oral**

Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada na Universidade Lusófona
de Humanidade e Tecnologias/Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Orientação – Professora Doutora Catarina Pinto Reis

**Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde**

**Lisboa
2014**

Prefiro escorregar nos becos lamacentos,
Redemoinhar aos ventos,
Como farrapos, arrastar os pés sangrentos,
A ir por aí...
Se vim ao mundo, foi
Só para desflorar florestas virgens,
E desenhar meus próprios pés na areia inexplorada!
O mais que faço não vale nada.

José Régio –Cântico Negro

Dedicatória

A presente dissertação é dedicada aos meus pais que sempre me deram todo o apoio, ao longo dos 5 anos de curso, para concretizar este objectivo.

Agradecimentos

Os principais agradecimentos recaem sobre os meus pais e os meus avôs que sempre estiveram do meu lado e sem eles tudo seria mais difícil.

Agradeço especialmente à Ana pela paciência e por ter estado sempre do meu lado nos momentos mais complicados ao longo deste caminho.

A todos os meus amigos que sempre estiveram presentes agradeço por todo o apoio e carinho demonstrado.

Resumo

Atualmente, a Diabetes Mellitus é uma patologia de elevada prevalência com graves consequências e a administração subcutânea de insulina para alguns tipos de Diabetes é fundamental para o controlo metabólico dos doentes retardando o desenvolvimento das várias complicações inerentes, como sejam as complicações neurológicas, micro e macrovasculares. Porém, a procura de uma cura efetiva sem a necessidade de insulino-terapia tem desencadeado o desenvolvimento de várias abordagens. A administração de insulina a partir de vias de administração não invasivas como, por exemplo, a oral apresenta inúmeras vantagens. No entanto, a baixa biodisponibilidade dos péptidos condiciona a sua entrada no mercado. Atualmente, a Nanotecnologia desempenha um papel relevante em diversas áreas, nomeadamente, no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos. O presente trabalho engloba uma revisão da Nanotecnologia aplicada à insulina e um desenvolvimento de um método de produção de nanopartículas de insulina, recorrendo a um polímero biodegradável e biocompatível e a um sistema emulsivo, para posterior administração oral.

Palavras – chave: Diabetes Mellitus, oral, insulina, nanopartículas, emulsão múltipla

Abstract

Nowadays, Diabetes Mellitus is a highly prevalent disease which generates negative consequences and subcutaneous administration of insulin in some type of Diabetes is critical for metabolic control in diabetics, delaying the development of inherent complications, such as neurologic, micro and macrovascular. The research for an effective cure, without insulin therapy has triggered the development of several approaches.

The administration of insulin through non-invasive routes like oral shows numerous advantages. However, the low oral bioavailability of peptides generally delays its entry into the market. Currently, Nanotechnology plays an important role in several fields including the development of new therapeutic systems.

This work includes an overview of Nanotechnology applied to insulin and the development of the production method of insulin nanoparticles using of a biodegradable and biocompatible polymer and a emulsion system for potential oral administration.

Keywords: Diabetes Mellitus, oral, insulin, nanoparticles, multiple emulsion

Abreviaturas, siglas, acrónimos e símbolos

ACP→Nanoesferas de carbono anfotéricas

ADN →Ácido desoxirribonucleico

AS-ODN→Poli-L-lisina-bromidrato e oligonucleótidos anti-sense

ATG→Globulina anti-timócito

ATP→Adenosina trifosfato

BRAD→Agente de regeneração β para a Diabetes

CT→Tomografia computadorizada

CTLA4-Ig→Abatacept

CS→Sulfato de condroitina

DPP-4→Inibidor da dipeptidil peptidase-4

EE→Eficiência de encapsulação

FDA→Food and Drug Administration

GSK→GlaxoSmithKline

GIP→ Inibidor polipeptídico gástrico

GI→ Gastrointestinal

GLP-1→Glucagon-like peptide-1

GNPs→Nanopartículas de ouro

GAD65→Isoforma 65-kD do ácido glutâmico descarboxilase

GRAS→ Geralmente reconhecido como seguro

G-CSF→Fator de estimulação de colónias granulocitárias

Hb_{A1C} →Hemoglobina glicosilada

HLA→Antigénio humano leucocitário

HMPC→ (Hidroxipropil) metilcelulose

HPLC→Cromatografia líquida de alta eficiência

ICH→ Conferência Internacional de Harmonização

IDF→Federação Internacional da Diabetes

IRS-1→Substrato 1 do receptor da insulina

IFIH1→Helicase interferão induzida

MM→Massa molecular

MRSA→*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina

MDI→Inalador de dose medida
NOD→Diabéticos não obesos
OH→Grupo hidroxilo
OKT3→Muromonab CD3
PEG→Polietilenoglicol
PDCPA→Polimetacrilato dimetilaminoetilo tiolado
PAA→Ácido poliacrílico
PAH→Hidrocloreto de poli (alilamina)
PDI→Inalador de pó seco
PDI →Índice de polidispersividade
PLGA→Ácido poli (lático-co-glicólico)
PLA→Ácido poli (lático)
PCL→Policaprolactona
pI→Ponto isoelétrico
PPEs→Promotores da permeabilidade paracelular
SRE→Sistema retículo-endotelial
SEM→Microscopia electrónica de varrimento
SiNP→Nanopartículas de sílica
SLN→Nanopartículas sólidas lipídicas
SGLT-2→Transportador 2 da glicose dependente do sódio
TNF α →Fator de necrose tumoral

Índice

Resumo	5
Abstract	6
Abreviaturas	7-8
Índice de figuras	11
Índice de tabelas	12
Índice de equações.....	13
Introdução	14-15

Capítulo I. Insulina

1 – Insulina como um marco na história.....	16
1.1. Origem e estrutura química.....	16-17
1.2. Controlo da secreção.....	18-19
1.3. Propriedades farmacológicas.....	19
1.4. Mecanismo de ação.....	20-21
1.5. Efeitos adversos.....	21-22
1.6. Estratégias para a independência de insulina exógena.....	22
1.6.1. Imunosuppressores.....	23
1.6.2. Antigénios específicos.....	24
1.6.3. Anti-inflamatórios.....	24-25
1.6.4. Terapia celular.....	25
1.6.5. Hormonas.....	26
1.6.6. Terapia regenerativa.....	26
1.6.7. Transplantes.....	26-27
1.6.8. Desenvolvimentos futuros.....	27

Capítulo II. Diabetes Mellitus

2 – Diabetes Mellitus como uma patologia prevalente.....	28
2.1. Classificação clínica.....	29-30
2.2. Diagnóstico e tratamento.....	30-31

2.2.1. Tipos de Insulina.....	31-32
2.2.2. Incretinas.....	32
2.2.3. Antidiabéticos Orais.....	33-34
2.3. Sinais e Sintomas.....	34
2.4. Complicações.....	34-36

Capítulo III. Nanotecnologia

3 – Nanotecnologia como abordagem revolucionaria.....	37-39
3.1. Nanopartículas para administração de insulina.....	39-40
3.2. Alternativas à administração subcutânea.....	41
3.2.1. Administração bucal.....	41-42
3.2.2. Administração nasal.....	42
3.2.3. Administração pulmonar.....	43
3.2.4. Administração transdérmica.....	44
3.2.5. Administração oral.....	44-46

Capítulo IV. Projecto

4 – Contextualização do projeto de investigação: Nanotecnologia.....	47-48
4.1. Polímero.....	48-49
4.2. Método de produção.....	49-51
4.3. Aspectos toxicológicos.....	51-52
4.4. Resultados.....	52-54
4.5. Perspetivas futuras.....	55
Conclusão.....	56
Bibliografia	57-75

Índice de figuras

Figura 1. Biossíntese da insulina.....	17
Figura 2. Mecanismo homeostático da glicose – Insulina e glucagon.....	18
Figura 3. Secreção de insulina mediante estimulação.....	19
Figura 4. Mecanismo de ação da insulina.....	20
Figura 5. Aumento em 55% da incidência da Diabetes a nível mundial, de 2013 a 2035.....	28
Figura 6. Desenvolvimento de uma úlcera diabética em 10 dias.....	35
Figura 7. Hidrólise do PLGA.....	49
Figura 8. Etapas do sistema múltiplo emulsivo (A/O/A).....	51
Figura 9. Microfotografia em microscopia electrónica de varrimento da formulação D mostrando um grande número de nanopartículas esféricas. Escala = 100µm.....	53
Figura 10. Cromatograma representativo da insulina (tempo de retenção a 16,34 min).....	54

Índice de tabelas

Tabela I. Testes de diagnóstico e escala de valores para a determinação da Diabetes Mellitus.....	31
Tabela II. Tipos de insulina, a duração de ação e o regime posológico recorrente.....	32
Tabela III. Várias classes de anti-diabéticos e principais diferenças.....	34
Tabela IV. Tipos de sistemas, granulometria, estudos modelo e aspetos relevantes de estudos com nanopartículas de insulina.....	40
Tabela V. Sistemas orais, métodos, granulometria e aspetos relevantes de estudos com nanopartículas de insulina.....	46
Tabela VI. Métodos, tipo de fármacos encapsulados e granulometria de estudos que recorreram à utilização de nanopartículas de PLGA.....	49
Tabela VII. Variação dos parâmetros em estudos nos vários lotes produzidos.....	50
Tabela VIII. Granulometria, índice de polidispersividade e EE dos diferentes lotes.....	53

Índice de equações

Equação I. Determinação da eficiência de encapsulação (EE).....	47
Equação II. Forças de deformação: p é a pressão exercida, γ a tensão interfacial entre fases distintas e r o raio da gotícula.....	51

Introdução

A Diabetes Mellitus é uma patologia, de elevada prevalência mundial, que se caracteriza por desequilíbrios a nível metabólico. Atualmente, existem quatro formas distintas de manifestação da Diabetes que se expressam consoante os marcadores imunológicos, os sinais e os sintomas característicos de cada tipo. Ainda que sejam utilizados antidiabéticos orais, a administração subcutânea de insulina representa em muitos casos a melhor alternativa terapêutica para o controlo e minimização do impacto desta patologia na vida de muitos diabéticos. Apesar da existência de diversos tipos de insulina no mercado, a procura de uma cura efetiva sem a necessidade de insulino terapia desencadeou o desenvolvimento de várias abordagens que tem sido testadas ao longo do tempo.

Assim, promover o desenvolvimento de células β , contrariar os mecanismos imunológicos de destruição celular, aumentar a sensibilidade à atuação desta hormona, manipular células estaminais, desenvolver um bio pâncreas totalmente funcional ou mesmo controlar os níveis de resposta pancreática, tem sido alguns dos pressupostos inerentes à diminuição das necessidades de insulina exógena.

Embora a via parentérica seja a única forma de administração global, são várias as condicionantes existentes.

A via oral surge assim como uma alternativa vantajosa, no entanto, o baixo tempo de semi vida em circulação sistémica e a baixa biodisponibilidade das proteínas dificultam a sua introdução no mercado como uma alternativa viável. Deste modo, com o objectivo de aumentar a biodisponibilidade oral têm sido desenhados vários sistemas como os lipossomas, os dendrímeros, as micropartículas, os nanotubos de carbono e particularmente as nanopartículas poliméricas que associado à sua granulometria na escala sub-celular são sistemas biocompatíveis. A nanomedicina representa assim uma solução para o desenvolvimento futuro deste tipo de sistemas. Atualmente, existem no mercado, não só diversos sistemas terapêuticos na escala nanométrica, como inovações transversais a diversas áreas tais como do diagnóstico, da imagiologia, da cosmética, nos dispositivos implantáveis entre outras.

Na presente monografia encontra-se descrito o desenvolvimento inicial de um projeto na área da nanotecnologia que envolve a produção de nanopartículas poliméricas de insulina para administração oral.

Deste modo, a produção das nanopartículas a partir de um sistema múltiplo emulsivo do tipo A/O/A foi a abordagem escolhida tendo o PLGA¹ sido o polímero de eleição. Globalmente foi analisado o efeito na alteração de diferentes parâmetros e os vários lotes produzidos foram avaliados em três aspectos essenciais, granulometria, morfologia e eficiência de encapsulação.

Assim, o estudo granulométrico foi efetuado por espectroscopia de correlação fotónica tendo sido avaliados o tamanho médio das partículas e o índice de polidispersividade, a morfologia foi analisada por SEM² e a eficiência de encapsulação determinada por HPLC³. A formulação D obteve assim os melhores resultados, com um tamanho médio de 396nm e um PDI⁴ de 0,19 foi verificada a presença de nanopartículas esféricas e monodispersas sem a presença de aglomerados sendo a eficiência de encapsulação na ordem dos 65%.

¹Ácido poli (lático-co-glicólico)

²Microscopia electrónica de varrimento

³Cromatografia líquida de alta eficiência

⁴Índice de polidispersividade

1 – Insulina como um marco na história

Decorria o ano de 1869 quando Langerhans, um jovem médico alemão descreve o pâncreas como contendo dois tipos de células, umas que produziam o fluido pancreático e outras como sendo um mistério. Vinte anos passaram até que Minkowski e Von Mering ao realizarem uma pancreatômia a um cão perceberam como a Diabetes se desenvolvia estudando as consequências de tal intervenção. Mais tarde, o termo insulina foi finalmente proposto por Meyer, mas foi apenas em 1921 que Banting e Best verdadeiramente a identificaram ao fazerem a sua extração a partir dos ductos pancreáticos de um cão [1].

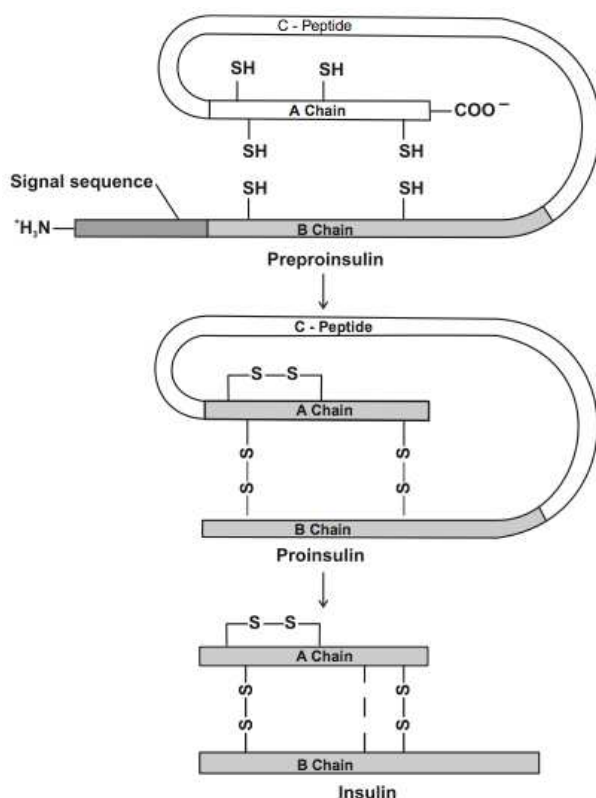
A utilização terapêutica da insulina foi pois um marco revolucionário na história da medicina tendo sido considerado um sucesso o primeiro tratamento com esta hormona num jovem de 14 anos internado num hospital em Toronto, Canadá em 1922 [1]. Durante os anos 30, a insulina foi tecnologicamente modificada tendo sido lançada no mercado com a adição de protamina de zinco, conferindo-lhe uma maior flexibilidade e longa duração. Mas, foi só mais tarde que a primeira insulina biosintética humana foi lançada, uma vez que até então eram apenas utilizados análogos de origem bovina e suína. Os avanços sustentados pela genética sucederam-se, principalmente, pela necessidade de se diminuir os riscos de reações adversas e pela procura de um maior controlo ao nível da duração da sua ação. Em 1996, a primeira insulina lispro produzida a partir de DNA recombinante foi aprovada pela FDA tendo sido lançada com o nome de Humalog [2]. Atualmente, as insulinas de origem humana e as insulinas recombinantes substituíram as de origem animal no controlo da Diabetes Mellitus a sua via de administração continua a ser exclusivamente parentérica.

1.1) Origem e estrutura química

A insulina é um polipeptídeo secretado sob a forma de pré pro hormona pelas células β que constituem os ilhéus pancreáticos de Langerhans. Após a sua síntese, esta é rapidamente transportada até ao retículo endoplasmático, onde pela ação de enzimas proteolíticas sofre um processo de clivagem originando, assim, a pró-insulina [3]. Como descrito na Figura 1, estruturalmente, a insulina é composta por duas cadeias

ligadas por pontes dissulfureto, a A com 21 aminoácidos e a B com 30 aminoácidos, que resultam da clivagem da pró-insulina pela perda do polipéptido C ao nível das micro vesículas do aparelho de Golgi.

Figura 1. Biossíntese da insulina (Retirado Joshi, 2007).

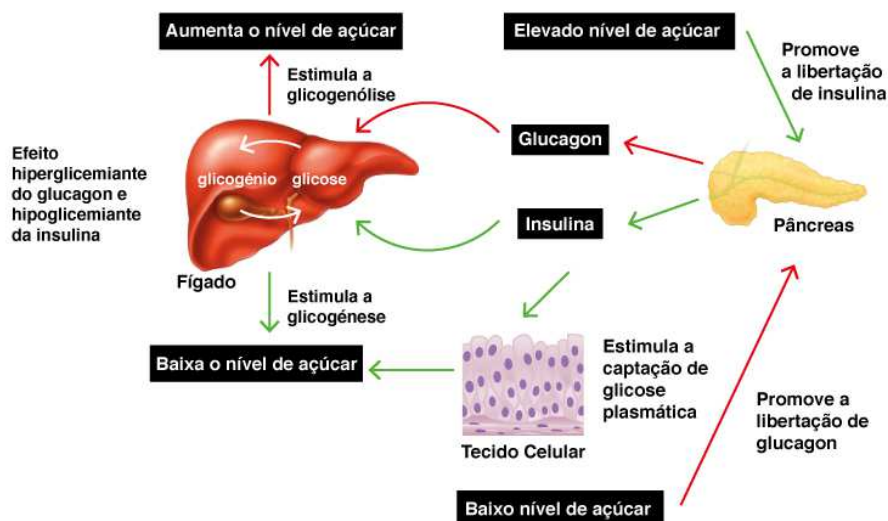


A baixas concentrações, a molécula insulina encontra-se como um monómero, mas à medida que as concentrações aumentam, ocorre um processo de agregação em que se formam dímeros e hexâmeros [4]. Entre vários factores, o meio onde se encontra a proteína vai condicionar os diversos estados moleculares, uma vez que o pH, a concentração de sais e até determinados iões podem originar diversos equilíbrios [4]. Paralelamente, a insulina é uma molécula anfotérica cuja carga é determinada pelo pH do meio. O seu ponto isoelectrico (pI) varia entre os 5,3 e os 5,4 e a sua massa molecular (MM) é, aproximadamente, de 6 KDa [5].

1.2) Controlo da secreção

Como resposta a vários estímulos, a insulina é secretada (Figura 2). Embora certas substâncias promovam um aumento da secreção, nomeadamente, determinadas proteínas (arginina, lisina, leucina e alanina), os cetóácidos, os estrogénios, a acetilcolina, a colecistocinina, o glucagon, as sulfonilureias entre outras, são os níveis plasmáticos de glicose que assumem o papel de maior preponderância nesta auto-regulação através de um mecanismo de feedback negativo.

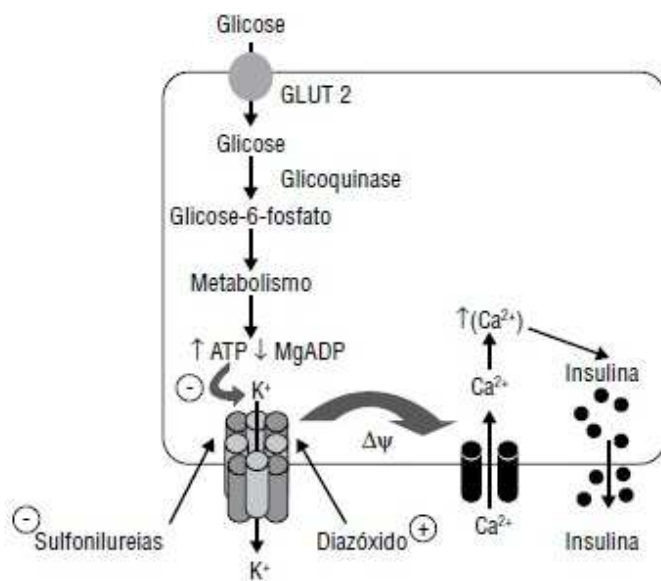
Figura 2. Mecanismo homeostático da glicose – Insulina e glucagon.



Inicialmente, o processo desenrola-se com a entrada de glicose nas células β através de receptores membranares (Figura 3). Após a sua entrada, esta é oxidada atuando como um sensor de glicose. Sabe-se que níveis plasmáticos inferiores a 90mg/dL não induzem a secreção desta hormona [5].

Ao haver um aumento da disponibilidade de ATP, os canais de potássio encerram ocorrendo um influxo de cálcio que permite a exocitose das microvesículas que contêm esta hormona [3]. Assim, a insulina é difundida para a corrente sanguínea, atuando primeiramente ao nível do tecido hepático, onde exerce um papel crucial na regulação metabólica.

Figura 3. Secreção de insulina mediante estimulação (Retirado de Alila Medical Images).



1.3) Propriedades farmacológicas

Perturbações ao nível da secreção de insulina e no seu mecanismo de ação levam ao aparecimento da Diabetes Mellitus, uma patologia crónica caracterizada por episódios de cetoacidose e níveis elevados de glicose plasmática [6].

Deste modo, a insulinoterapia adquire um papel fundamental em muitos casos, procurando minimizar o impacto nefasto das consequências exercidas a nível metabólico que condicionam o funcionamento de todos os processos biológicos, principalmente, a nível microvascular. Consoante as necessidades terapêuticas individuais, a escolha do tratamento envolve de uma forma geral, as insulinas de acção rápida, curta, intermédia ou lenta/longa permitindo uma maior flexibilidade e uma diminuição no número de doses administradas. No entanto, a via de administração parentérica que recorre à utilização diária de injeções subcutâneas de insulina têm várias condicionantes pelo que existe uma grande procura de novas soluções ao nível da indústria farmacêutica.

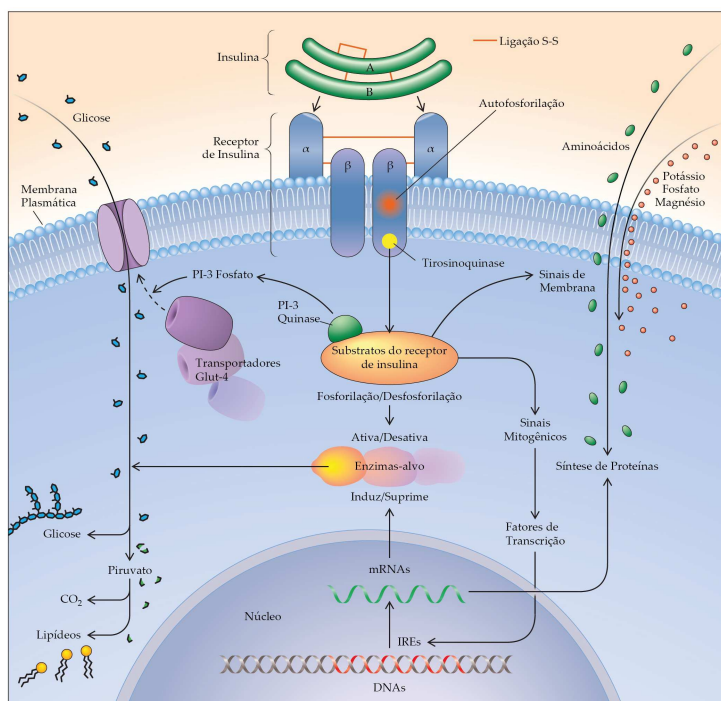
1.4) Mecanismo de ação

O receptor da insulina é uma cinase das tirosinas, ou seja, tem a capacidade de transferir grupos fosfato do ATP em resíduos de tirosina a nível intracelular das células alvo. É constituído por duas subunidades α no domínio extracelular e duas subunidades β que constituem o domínio transmembranar [7].

Assim, conforme descrito na Figura 4, para que o processo se desenrole forma-se inicialmente um complexo hormona/receptor ao nível da membrana plasmática, induzindo um conjunto de autofosforilações de vários substratos, sendo o mais conhecido o receptor da insulina-1 (IRS-1), com a ativação consequente de várias proteínas intracelulares que alteram a sua atividade gerando uma resposta biológica.

Os receptores GLUT que se encontram em constante turnover são os transportadores específicos responsáveis pela entrada de glicose nas células e a sua formação está dependente dos níveis plasmáticos de insulina [7].

Figura 4. Mecanismo de ação da insulina (Retirado de Haller, 2005).



Na maioria dos tecidos, a entrada da glicose é dependente da ligação da insulina ao receptor, no entanto, a nível neuronal e hepático o processo é independente [7].

Para além de facilitar a entrada de glicose a nível celular, a insulina desempenha um papel muito importante na regulação do metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos [7]. A nível hepático ocorre uma estimulação para o armazenamento de glicose sob a forma de glicogénio, havendo simultaneamente uma inibição da atividade da glicose-6-fosfatase, a enzima responsável pela difusão da glicose na corrente sanguínea. Quando os níveis de glicogénio no fígado são elevados, ocorre um aumento de síntese de ácidos gordos que são transformados em lipoproteínas que intervêm posteriormente na produção de triglicerídeos ao nível dos adipócitos. A insulina ao inibir a ação das lipases promove, igualmente, uma acumulação de ácidos gordos nestes tecidos.

Quando os níveis de glicose plasmática diminuem, a secreção de insulina diminui, pelo que ocorre a reversão dos efeitos acima referidos, intervindo hormonas de contra-regulação como, por exemplo, o glucagon, o cortisol e a epinefrina. Por outro lado, a somatostatina produzida essencialmente ao nível do hipotálamo inibe a secreção de insulina e de glucagon a nível pancreático.

1.5) Efeitos adversos

✓ Hipoglicémia

Apenas 20% da quantidade inicial da insulina administrada pela via subcutânea atinge o fígado, sendo este valor independentemente da concentração de glicose plasmática [8]. Consequentemente, um dos problemas gerados pelas baixas concentrações de insulina no tecido hepático são os picos de hipoglicémia que podem levar ao coma ou até mesmo à morte.

✓ Lipodistrofias

Injeções repetidas no mesmo local podem levar ao aparecimento de lipodistrofias, gerando a perda de tecido adiposo e, consequentemente, alterações na taxa de absorção local de insulina.

✓ Reacções anafiláticas

Embora não frequentes podem ocorrer em indivíduos que retomam a utilização de insulinoterapia. Nestes casos, a insulina funciona como um antigénio. Ao ser

reconhecido pelo sistema imunitário como um corpo estranho há a indução da produção de anticorpos anti-insulina [8].

✓ Ganho de peso

Inicialmente, o corpo tende a adaptar-se a correções ao nível dos processos catabólicos [4].

✓ Alergias locais

Atualmente com o elevado grau de pureza das insulinas produzidas por recombinação genética não é comum acontecerem reacções de hipersensibilidade. No entanto, a administração de suspensões de insulina aumenta a frequência dos casos [8].

✓ Adesão à terapêutica

O desconforto psicológico associado à administração de injeções diárias para um controlo eficaz dos níveis glicémicos pode condicionar a terapêutica, e deste modo, levar ao aparecimento de complicações a curto prazo.

1.6) Estratégias para a independência da insulina exógena

Um tratamento sem insulino-terapia seria de facto um avanço considerável no tratamento da Diabetes Mellitus, e muitos passos têm sido dados nessa direcção sustentados por um maior conhecimento ao nível das vias metabólicas e das estruturas biomoleculares.

Deste modo, a possibilidade de reversão dos danos ao nível das células β , administração de outras hormonas reguladoras, a possibilidade de transplantes celulares viáveis, ou através do desenvolvimento de um pâncreas artificial totalmente funcional e biocompatível são hipóteses cada vez mais plausíveis, e que visam encontrar uma cura efetiva. No entanto, contornar os processos imunológicos biológicos, a variabilidade intra- e interindividual e evitar a toxicidade dos vários sistemas terapêuticos, constituem os principais obstáculos ao desenvolvimento destas abordagens.

1.6.1) Imunossupressores

O primeiro grande ensaio clínico de imunossupressão para o tratamento da Diabetes Mellitus tipo I foi realizado nos anos 80 envolvendo a utilização de ciclosporina A[9]. Apesar dos tratamentos a longo prazo terem restaurado a normoglicémia através da preservação de células β , o que levou a uma redução na necessidade de insulino-terapia, a intensa toxicidade renal associada desencadeou um abandono precoce do ensaio [10, 11]. Mais tarde, decorria o ano de 1985 quando Eisenbarth e a sua equipa reportaram os efeitos verificados com a administração de ATG (globulina anti-timocítica). De facto, as necessidades de insulina exógena diminuíram devido ao atraso na destruição das células β , mas os elevados níveis de trombocitopenia condicionaram o estudo [12].

Recentemente com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais surgiu uma nova abordagem promissora sendo que a sua elevada especificidade para o alvo e o baixo risco inerente são pontos centrais na sua intervenção terapêutica. A utilização do anticorpo OKT3 com acção anti-CD3, um tipo de receptor expresso na superfície das células T, permitiu a remissão completa da Diabetes Mellitus tipo I. No entanto, em alguns casos ocorreu uma super estimulação das células T pelo que a sua utilização revelou ser inadequada[13]. Paralelamente, Pescovitz e a sua equipa demonstraram um aumento da capacidade funcional das células β através da utilização do rituximab, um anticorpo anti-CD20 com acção ao nível das células β . No entanto, não se evidenciaram alterações na necessidade de insulino-terapia e nos níveis de péptido C [14] quando concluída a fase II dos ensaios clínicos. Recentemente, foram testados os efeitos do abatacept (CTLA4-Ig) na progressão da Diabetes Mellitus tipo I. O seu mecanismo de acção envolve a inibição de uma via metabólica de activação das células T podendo assim proteger as células remanescentes de um ataque auto-imune[15, 16]. Muitas questões se levantam relativamente aos períodos de maior eficácia aquando a administração de agentes imunossupressores, uma vez que a resposta imunológica é condicionada por diferenças horárias e pelos diferentes ciclos biológicos.

1.6.2) Antígenos específicos

Os auto-antígenos intervenientes na resposta imunológica podem ser utilizados para eliminar padrões de auto-reatividade das células T, ativar e expandir tregs nos tecidos alvo, atuando como reguladores da atividade imunológica.

Através de modelos genéticos confirmou-se que a insulina e a pró-insulina atuavam como iniciadores do processo de auto-imunidade responsável pela destruição das células β [17-20]. Num estudo efetuado em ratos diabéticos não obesos (NOD), ao ser induzida uma mutação num aminoácido que codifica para o péptido B:9-23 da insulina, removeu-se um epítipo reconhecido pelo CD4 das células T, prevenindo-se assim qualquer tipo de Diabetes [21, 22]. Num estudo paralelo foi administrada insulina humana de cadeia B concomitantemente com uma injeção de DNA plasmídeo contendo pró-insulina. Os resultados demonstraram uma extensa indução, especificamente auto antigénica, da atividade regulatória das células T [23].

Vários estudos têm demonstrado a importância do ácido glutâmico descarboxilase (GAD65) na prevenção da destruição das células β evidenciando uma redução no declínio do péptido C [24, 25]. Atualmente, decorre um ensaio clínico relativo à capacidade sinérgica de associação entre o Diamyd (GAD65), vitamina D e o ibuprofeno na preservação da capacidade secretória das células β e o impacto do seu perfil de segurança nos processos biológicos [26].

1.6.3) Anti-inflamatórios

Maioritariamente as doenças crónicas tais como as metabólicas têm um padrão de inflamação associado que contribui para o agravamento das consequências fisiopatológicas.

Assim, várias estratégias recorrendo a agentes anti-inflamatórios têm sido desenvolvidas e testadas. Recentemente, a administração de etanercept originou uma redução na perda do péptido C através de um bloqueio do factor de necrose tumoral alfa (TNF α) [27,28]. Os dados sugerem o fator idade como crucial. De fato, a Diabetes do tipo I foi revertida em ratos NOD mais jovens. No entanto, em indivíduos mais velhos o processo foi acelerado [29].

A utilização de antagonistas dos receptores IL-1 β tem sido descrita como benéfica em indivíduos que apresentem ambas as formas patológicas da doença. Em ensaios clínicos envolvendo indivíduos diabéticos do tipo II, a administração de anakinra possibilitou um melhor controlo do perfil glicémico, diminuiu o padrão inflamatório, aumentou a sensibilidade celular à ação da insulina e induziu um aumento na produção de pró-insulina [30].

Outras terapias utilizadas no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 1 incluem o Gleevec, um inibidor da tirosina cinase, atualmente no mercado como anti-neoplásico usado no tratamento de leucemias [31] e a proteína α -1 anti-tripsina, inibidora da atividade da serina protease. O efeito protetor desta proteína nos ilhéus pancreáticos tem sido demonstrado em ensaios *in vitro* e *in vivo* [32]. De uma forma geral, impedem os efeitos apoptóticos celulares ao reduzirem a atividade das caspases 3, retardando assim a progressão da doença.

1.6.4) Terapia celular

Em 2007, Voltarelli e a sua equipa foram os primeiros a reportar resultados que indicavam um quadro de insulino independência por um período médio de 16 meses, envolvendo um transplante de células estaminais do tecido hematopoético com a administração simultânea de ciclofosfamida, fator de estimulação de colónias granulocitárias (G-CSF) e ATG [33, 34]. Sendo este tipo de abordagem relativamente agressiva do ponto de vista toxicológico, muitas questões se levantaram relativamente ao custo/benefício.

A utilização de células dendríticas é atualmente uma realidade clínica devido à capacidade de obtenção de uma resposta tolerogénica [35-38]. Estas células para além de induzirem anergia por contacto celular direto ou através das citocinas promovem uma estimulação na produção de tregs e uma diminuição das células T auto-reativas prevenindo a diabetes em ratos NOD. O principal ponto de foco após um ensaio clínico de fase I com administração de injeções de poli-L-lisina-bromidrato e oligonucleótidos anti-sense (AS-ODN) tratadas com células dendríticas foi a total ausência de efeitos adversos [39, 40].

1.6.5) Hormonas

Um equipa de investigadores de Harvard descobriu recentemente uma hormona que promove a proliferação de células β , aumenta a tolerância à glicose e regula o metabolismo lipídico -a betatrofina. Segundo eles, “Em vez de ser necessário administrar insulina 3x por dia, poderemos administrar esta hormona 1x por semana, por mês ou sob a melhor perspectiva 1x por ano”, é este o mote dado pelo responsável da descoberta [41].

Atualmente, decorre um estudo sobre os níveis plasmáticos desta hormona em indivíduos com Diabetes tipo II, com diabetes gestacional e em indivíduos saudáveis procurando estabelecer-se correlações entre as variáveis, e paralelamente, estudar o impacto da betatrofina no desenvolvimento da retinopatia diabética [42].

1.6.6) Terapia regenerativa

A Perle Bioscience tem desenvolvido uma nova proteína capaz de regenerar as células β . As BRAD ligam-se diretamente a um receptor celular dos ductos pancreáticos desencadeando um processo de divisão celular das células progenitoras, originando-se novos ilhéus. Os ensaios pré-clínicos demonstraram um melhor controlo glicémico e um quadro de normoglicémia associado [43].

Os inibidores da bomba de prótons como o pantoprazol têm sido correlacionados com um aumento da capacidade funcional das células β levando à diminuição dos níveis de hemoglobina glicada e a um aumentados níveis de pró-insulina e do péptido C. A supressão da produção de ácido gástrico promove um estado de hipergastremia. Sabe-se que agastrina tem uma ação direta na estimulação das células β funcionando como um fator de crescimento celular [44].

1.6.7) Transplantes

O transplante de um biopâncreas artificial totalmente funcional tem sido testado ao longo das últimas três décadas [45]. O desenvolvimento de dispositivos independentes de terapia imunossupressora e que sejam igualmente eficazes no controlo glicémico é um objetivo global.

Estes dispositivos contêm células ou clusters celulares e podem ser implantados num local específico ou transplantados na corrente sanguínea mimetizando o funcionamento de um órgão normal. Uma membrana semipermeável protege estas células do ataque imunológico ao mesmo tempo que permite a difusão de oxigénio e nutrientes necessários para a viabilidade celular [46]. Porém, a ineficácia das várias tentativas sustentaram-se ao nível do controlo da formação de tecido fibrótico, dos processos de difusão e do tempo de resposta ao estímulo da glicose [47, 48]. Atualmente, decorrem estudos com este tipo de dispositivos em indivíduos com diabetes do tipo I [49].

1.6.8) Desenvolvimento futuro

A GlaxoSmithKline (GSK) tem desenvolvido sensores bioelectrónicos implantáveis, com capacidade reguladora de impulsos eléctricos ao nível das células neuronais apostando na prevenção e no controlo de inúmeras patologias [50]. O objetivo principal engloba o controlo funcional dos diversos órgãos, tais como o pâncreas, promovendo uma auto-regulação dos níveis de insulina endógena.

2 – Diabetes Mellitus como uma patologia prevalente

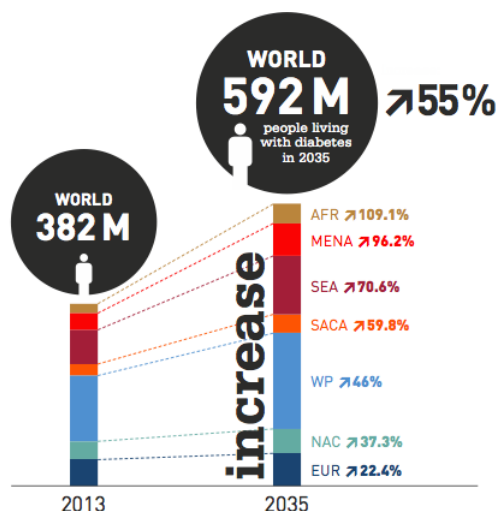
A Diabetes Mellitus é uma doença crónica de elevada prevalência global que, embora heterogeneia na sua etiologia, a sua frequência tem vindo a aumentar tanto nos países em desenvolvimento como nos mais industrializados.

Segundo os dados revelados pela Federação Internacional da Diabetes (IDF) atualmente existem cerca de 382 milhões de diabéticos em todo o mundo (Figura 5), sendo cerca de metade aqueles que se encontram sob diagnóstico. Em 2013, morreram 5,1 milhões de diabéticos, o equivalente a uma morte a cada 6 segundos. A China e a Índia são os países mais afetados e a maior taxa de incidência abrange a faixa etária entre os 40 e 59 anos. Paralelamente, o impacto económico associado ascende a cerca de 11% do consumo total gasto na saúde mundial [51].

Segundo a OMS, cerca de 80% das mortes associadas à Diabetes ocorrem em países de baixo e médio rendimento e em 2030 será a sétima maior causa de morte global [52].

Em Portugal, cerca de 1 milhão de pessoas vive com esta patologia [53].

Figura 5. Aumento em 55% da incidência da Diabetes a nível mundial, de 2013 a 2035. Espera-se que em 2035, cerca de 592M de pessoas vivam com esta patologia sendo os países africanos os mais afetados com um aumento na ordem dos 109%. Seguindo-se o Médio Oriente e a África do Norte (96,2%), o Sul da Ásia (70,6%), a América Central e do Sul (59,8%), a região Ocidental do Pacífico (46%), a América do Norte e Caraíbas (37,3%) e, por último, os países europeus (22,4%). (Retirado do IDF Diabetes Atlas).



2.1) Classificação clínica

A Diabetes Mellitus apresenta-se sob a forma de 4 classes clínicas distintas:

O tipo I, que geralmente resulta de uma destruição auto-imune das células β é caracterizado pela presença de anticorpos anti-GAD (descarboxilase do ácido glutâmico) e anticorpos contra as células dos ilhéus e contra a insulina. Embora a sua etiologia permaneça desconhecida, fatores ambientais e genéticos adquirem um papel preponderante. Evidências sugerem que os picornavírus podem, de forma direta ou indireta através de mecanismos auto-imunes relacionados com o gene IFIH1, induzir a destruição destas células [54]. Paralelamente, polimorfismos genéticos no HLA (antígeno leucocitário humano) estão diretamente relacionados com uma maior susceptibilidade patológica [55-57]. No entanto, determinados indivíduos não demonstram qualquer tipo de marcador imunológico, pelo que a sua classificação engloba uma Diabetes tipo I na forma idiopática.

O tipo II, que resulta de uma diminuição dos níveis de segregação de insulina aliada a um aumento da resistência à sua ação. Fatores genéticos e ambientais estão igualmente interligados na susceptibilidade desta patologia. São considerados fatores de risco a obesidade, idade avançada, predisposição genética familiar, Diabetes Gestacional prévia, baixo peso à nascença e fatores comportamentais como elevada ingestão calórica, stress, inactividade física e determinados fármacos como a utilização prolongada de estatinas [58-60].

A Gestacional, que é diagnosticada durante a gravidez e caracteriza-se por uma intolerância à ação da glicose. Se os níveis de glicémia se mantiverem dentro da normalidade através de um controlo sistemático, a Diabetes desaparece após o parto. Fatores de risco como uma gravidez tardia, elevado peso ou hipertensão aumentam exponencialmente a probabilidade de se desenvolver Diabetes Gestacional. Paralelamente, estudos recentes apontam a terapia de substituição hormonal, devido ao elevado teor de estrogénios, como um fator precipitante ao promover um aumento dos níveis de cortisol plasmáticos [61].

Outros tipos específicos, que englobam diferentes causas, tais como, defeitos genéticos na produção e no nível de ação da insulina, endocrinopatias, infeções, doenças que afetam o pâncreas exócrino e indução por ação de fármacos ou químicos.

Muitas vezes o diagnóstico imediato não é fácil de ser estabelecido, surgindo deste modo a necessidade de serem avaliados os sinais de progressão clínica.

2.2) Diagnóstico e tratamento

Embora a Diabetes seja uma doença crónica apostar na prevenção minimizando os vários fatores de risco, e optar por um diagnóstico precoce são aspetos essenciais no combate à progressão epidemiológica da Diabetes Mellitus.

Assim, é essencial monitorizar os níveis de glicose plasmática de forma periódica. Um estado de pré Diabetes poderá ser indicativo de uma posterior Diabetesdo tipo II, pelo que indivíduosque se encontrem neste patamar terão que optar por medidas de controlo prévias. Atualmente, os níveis de hemoglobina glicadaHb_{A1C}(que determinam um perfil glicémico durante os últimos 2 a 3 meses), o teste de tolerância oral à glicose (PTGO) e os níveis de glicémia pós-prandial e em jejum estão pradonizados para o diagnóstico e conforme sumarizado na Tabela I.O risco é apresentado mediante uma escala de valores [62].Atualmente,o Google em parceria com a Novartis tem desenvolvido lentes de contacto para a determinaçãodos níveis de glicose plasmática, esperando assim revolucionar o mercado dos dispositivos para diabéticos[63]

Tabela I. Testes de diagnóstico e escala de valores para a determinação da Diabetes Mellitus.

Resultado	Glicémia Pós Prandial	Glicémia em Jejum	Teste Oral de Tolerância	A₁C
Normal	< 140mg/dl	< 100mg/dl	< 140mg/dl	< 5,7%
Pré Diabetes	140-199mg/dl	100-125mg/dl	140-199mg/dl	5,7-6,4%
Diabetes	≥ 200mg/dl	≥ 126mg/dl	≥ 200mg/dl	≥ 6,5%

Na Diabetes do tipo I, a administração diária de insulina basal e pós-prandial é essencial para normalizar os valores glicémicos. É igualmente importante controlar a ingestão de hidratos de carbono, minimizar a ingestão de álcool e determinar diariamente os níveis de glicose plasmática, recorrendo-se a dispositivos próprios. Na Diabetes do tipo II, o tratamento farmacológico inicial centra-se na utilização de antidiabéticos orais e, eventualmente com a progressão da doença, a introdução de insulina poderá ser benéfica. Durante a gravidez se os níveis de glicose forem anormais, o controlo glicémico é efetuado, por via de regra, com recurso à insulino terapia.

2.2.1) Tipos de insulina

A insulina pode ser administrada por seringa, caneta ou bomba dependendo exclusivamente da preferência pessoal [64]. Esta deve ser conservada entre os 2 e os 8°C e não deve ser congelada. Após abertura, o prazo de validade é, geralmente, de 1 mês. Os tipos de insulina disponíveis no mercado encontram-se descritos na Tabela II.

Tabela II. Tipos de insulina, a duração de ação e o regime posológico recorrente [65].

Tipo de Insulina	Ação	Nome Comercial	Posologia
<u>Ação Rápida</u>	Início: 10-15min Pico máximo: 1-2h Duração: 3-5h	NovoRapid® Humalog® Apidra®	0-15min antes da refeição
<u>Ação Regular/Curta</u>	Início: 30min Pico máximo: 2-3h Duração: 6,5h	Humulin® - R Novolin®-ge Toronto	30-45min antes da refeição
<u>Ação Intermédia</u>	Início: 1-3h Pico máximo: 5-8h Duração: 18h	Novolin®-ge NPH Humulin®-N	Antes de dormir, ou 2x/dia
<u>Ação Prolongada</u>	Início: 90min Pico máximo: - Duração: 16-24h	Lantus® Levemir®	1/2x dia
<u>Pré Mistura</u>	Ação rápida + ação intermédia	Humulin® (30/70) Novolin®-ge (30/70; 40/60; 50/50) Humalog® Mix 25 e 50 Novomix® 30	Depende da combinação

2.2.2) Incretinas

As incretinas são hormonas peptídicas secretadas a nível intestinal como resposta à ingestão de alimentos e de glicose oral, encontrando-se descritas como promotoras do aumento dos níveis de insulina. Alterações na sua produção ou atividade estão muitas vezes relacionadas com desequilíbrios metabólicos associados ao aparecimento da Diabetes Mellitus do tipo II [66].

Deste modo, as GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) e as GIP (Inibidor polipeptídico gástrico) englobam os dois maiores grupos de incretinas. Após a refeição, estas são rapidamente libertadas para a corrente sanguínea exercendo efeito ao nível das células β limitando os níveis de glicose pós-prandial [67, 68]. Diversos estudos sugerem que a secreção fisiológica das GIP, após ingestão de glicose, é superior à

secreção das GLP-1 [69]. Paralelamente, estas são degradadas na circulação sistêmica pela ação das enzimas DPP-4 (Inibidor da dipeptidil peptidase-4) [70, 71]. Especificamente as GLP-1 diminuem a secreção de glucagon, atrasam o esvaziamento gástrico e reduzem o apetite. Diversos estudos indicam uma diminuição dos mecanismos apoptóticos das células β promovendo a sua proliferação [72]. A administração exógena desta hormona demonstra um padrão de atuação similar à sua atividade endógena no controlo da normoglicémia [73].

A secreção das GIP é potenciada em maior escala após ingestão de lípidos. Inúmeras evidências sugerem um sinergismo com a glicose no aumento da proliferação das células β , no aumento da taxa de sobrevivência celular e na regulação dos mecanismos apoptóticos [74, 75]. O seu principal mecanismo de ação envolve a estimulação da glicose dependente da secreção de insulina [76].

2.2.3) Antidiabéticos orais

A implementação de medidas não farmacológicas como o incentivo à prática de exercício físico, a ausência de hábitos tabágicos e uma alimentação saudável complementam um plano de intervenção terapêutico individual, adequado às características de cada doente mediante a definição de “targets” glicémicos.

A metformina é a primeira opção de tratamento utilizada em monoterapia. Se os valores pré- estabelecidos de HbA_{1c} não forem atingidos após 3 meses, outra classe de antidiabéticos deverá ser adicionada, tais como as sulfonilureias, glitazonas, inibidores DPP-4 e agonistas GLP-1.

Caso seja necessário poderá igualmente ser adicionada insulina basal [77]. Recentemente foi introduzida uma nova classe, os inibidores SGLT-2 (transportador 2 da glicose dependente do sódio) que bloqueiam a reabsorção renal da glicose [78]. A Tabela III compara as várias classes de antidiabéticos.

Tabela III. Várias classes de anti-diabéticos e principais diferenças.

	Metformina	Sulfonilureia	Glitazona	Inibidor DPP-4	Agonista GLP-1	Insulina
Eficácia (A₁C)	Elevada	Elevada	Elevada	Intermédia	Elevada	Muito Elevada
Hipoglicémia (Risco)	Baixo	Moderado	Baixo	Baixo	Baixo	Muito Elevado
Peso	Neutro/Redução	Aumento	Aumento	Neutro	Redução	Aumento
Efeitos adversos	G.I	Hipoglicémia	Edema; I.C	Raros	G.I	Hipoglicémia
Custo	Reduzidos	Reduzidos	Variáveis	Elevados	Elevados	Variáveis

2.3) Sinais e sintomas da Diabetes

Uma detecção precoce da doença é sustentada pelo reconhecimento prévio de sinais e sintomas característicos e completada por dados analíticos.

Deste modo, os sinais mais frequentes englobam [79] :

- Poliúria;
- Polidipsia;
- Polifagia;
- Formigueiro ou dormência nas mãos/pés (mais comum no tipo II);
- Perda de peso (mais comum no tipo I);
- Fadiga;
- Visão alterada;
- Disestesias;
- Infecções com maior gravidade e recorrência;
- Cetoacidose (mais comum no tipo I).

2.4) Complicações da Diabetes

A Diabetes pode afetar vários órgãos, tecidos e células. No entanto, existem complicações mais frequentes que requerem um controlo mais restrito.

De fato, a disfunção que se verifica a nível microvascular induz uma diminuição na capacidade de resposta ao processo de regeneração tecidual e combate à infecção. Cerca de metade os diabéticos que apresentam um certo grau de neuropatia associado[80].

Na Diabetes existe também um aumento da incidência de infecções cutâneas bacterianas e fúngicas aliado a um prurido localizado. Frequentemente devido a uma diminuição dos mecanismos de sensibilidade aparecerem úlceras de elevada gravidade que podem conduzir à amputação dos membros inferiores como demonstra a Figura 6. A título meramente informativo, a cada 30 segundos um diabético perde a perna [81]. As complicações a nível ocular como o aparecimento de cataratas, glaucoma e retinopatias são igualmente frequentes e o risco de cegueira é muito superior nestes indivíduos.

Figura 6. Desenvolvimento de uma úlcera diabética em 10 dias(Retirado do *The New England Journal of Medicine* 2013; 369:2252).



A hipoglicémia e a cetoacidose metabólica são estados transitórios que podem levar à morte e que refletem um descontrolo metabólico.

Deste modo, quando a célula não consegue obter a glicose necessária ou porque os níveis de insulina são baixos ou porque a absorção de hidratos de carbono é reduzida,

a compensação energética ocorre com a produção de corpos cetónicos a partir de ácidos gordos. Sinais e sintomas como vómitos, dor abdominal, cansaço, dificuldade respiratória, poliúria, polidipsia, hálito “frutado” e níveis elevados de cetonas na urina alertam para este quadro. A reposição eletrolítica e a administração de insulina são muitas vezes essenciais para a completa correção deste problema. Paralelamente, um estado de hipoglicémia caracteriza-se por baixos níveis de glicose plasmática, normalmente inferiores a 70mg/dL. É uma das principais complicações estando muitas vezes associada à administração de insulina subcutânea. Sinais e sintomas, tais como a ansiedade, suores, confusão, irritabilidade, fadiga, náuseas, tonturas e um baixo nível glicémico são indicativos de hipoglicémia. A ingestão posterior de glicose (15 a 20g) é fundamental, e se ocorrer um agravamento do quadro geral com convulsões ou mesmo um estado de inconsciência, recorre-se à administração de glucagon para estimulação dos processos de glicogenólise hepática [82].

3 - A Nanomedicina como abordagem revolucionária

As nanopartículas são sistemas sólidos à base de polímeros ou outras substâncias naturais que se encontram na escala nanométrica (nm), e que servem essencialmente como veículo de fármacos e outras substâncias [83].

Em 1995 foi finalmente aprovada a introdução do primeiro sistema nanoterapêutico no mercado, a doxorubicina lipossômica (Doxil[®]) [84]. Tinha sido dado o mote para o que viria a suceder: uma investigação frenética no desenvolvimento deste tipo de produtos, nomeadamente, ao nível do diagnóstico e imagem, no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos e dispositivos implantáveis.

Deste modo, são várias as vantagens na utilização deste tipo de abordagem em prol dos sistemas moleculares tradicionais. Com a Doxil[®] os efeitos adversos da doxorubicina foram minimizados e a eficácia terapêutica potenciada devido à capacidade de se administrarem doses mais elevadas a uma escala tolerável [85]. Atualmente, ao nível da quimioterapia são várias as formulações em fase de desenvolvimento clínico que apostam na utilização de ligandos a nanotransportadores que atuam seletivamente no tecido tumoral [86]. Um outro conceito envolve a administração intratumoral de nanopartículas contendo quimioterápicos que potenciam a destruição do tumor a partir de um mecanismo de indução das células T [87]. Paralelamente, o Zoladex[®], um implante disponível comercialmente contendo goserrelina e constituído por nanopartículas de ácido poli(lático) (PLA) e ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA) está indicado no tratamento do cancro da mama e da próstata em estadios avançados [88]. A manipulação da taxa de degradação polimérica possibilita uma libertação controlada e prolongada por um período de 28 dias, minimizando assim o desconforto associado a um elevado número de administrações, conferindo-lhe vantagem relativamente aos sistemas convencionais [88].

Por outro lado, as vacinas toxóides oferecem uma abordagem promissora no combate a infeções cada vez mais resistentes à ação antimicrobiana, sendo as nanoesponjas uma ferramenta experimental como plataforma indutora de uma resposta imunitária mais eficaz [89]. Este fato é sustentado pelo desenvolvimento de sistemas contendo toxinas, como seja a α - β hemolisina produzida pelo MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), encapsulada num núcleo polimérico envolvido por uma

membrana eritrocitária, revelando resultados muito promissores [89]. Paralelamente, um outro conceito emerge no campo da imunologia, a utilização de nanossistemas virais que mimetizam a superfície celular revestida de moléculas de hidratos de carbono, que funcionam como o receptor alvo da entrada do vírus *influenza* nas células, por exemplo, do sistema respiratório [90]. As partículas virais ligam-se assim a estes sistemas ao invés das células hospedeiras prevenindo-se um quadro de infeção posterior. Apesar de se encontrarem numa fase precoce de desenvolvimento espera-se que futuramente possam ter um grande impacto no controlo de muitas doenças [90].

Numa tentativa de se utilizarem células estaminais para a reparação de uma determinada lesão, como a isquémia do miocárdio, a administração de nanopartículas de ferro acopladas a anticorpos específicos que reconhecem tanto as células estaminais como o próprio local lesado é um conceito com particular relevo ao nível da medicina regenerativa [91].

Mais, a incidência de doenças oculares que afetam principalmente a retina, tem aumentado a um ritmo avassalador e a barreira intra-vitreal dificulta a administração de fármacos por esta via. Assim, estratégias como a utilização de nanotransportadores promovem não apenas uma libertação sustentada, como aumentam a capacidade de penetração intra-retina, embora esta eficácia careça de tradução a nível clínico [92].

Atualmente, decorrem diversos ensaios clínicos em fases II e III para determinar a eficácia e a segurança na utilização de uma formulação tópica de nanopartículas de capsaicina utilizada no tratamento da dor neuropática dolorosa em indivíduos diabéticos. Os objectivos principais englobam a diminuição da sensação de queimadura após aplicação, a redução no número de utilizações diárias e a manutenção da eficácia analgésica [93].

Outra área da Nanomedicina é ao nível do diagnóstico. A tomografia computadorizada (CT) é um exame complementar de diagnóstico não invasivo por imagem de elevada aplicabilidade clínica. Atualmente, são utilizados agentes de iodo que funcionam como agentes de contraste. Porém, o elevado padrão de reações adversas associado ao baixo tempo de semi-vida em circulação destas moléculas sustentam a necessidade de se encontrarem alternativas viáveis como o desenvolvimento de agentes de contraste à escala nanométrica. As recentes

abordagens envolvem a utilização de nanopartículas de ouro, à base de lantanídeos, de substâncias iodadas mas encapsuladas em lipossomas peguillados ou dendrímeros que poderão ter várias vertentes de utilização, nomeadamente, ao nível do estudo do sistema linfático [94, 95]. Uma das nanopartículas mais estudadas e com grande potencial de aplicabilidade, são as nanopartículas de ouro (GNPs). As GNPs são potenciais nanotransportadores, agentes foto térmicos, radiosensíveis e agentes de contraste [86].

3.1) Nanopartículas como sistemas de administração de insulina

Ao longo do tempo, diversos sistemas orais tem sido desenvolvidos, tais como comprimidos, cápsulas, emplastos intestinais, hidrogéis, emulsões, micro- e nanopartículas com o objectivo de manter a integridade biológica da insulina ao longo do trato GI e potenciar a taxa de absorção paracelular e/ou transcelular ao nível dos enterócitos. De uma forma vantajosa em relação aos sistemas anteriormente citados, as nanopartículas tendem a ser capturadas pelas células M que constituem as placas de Peyer, promovendo um aumento da biodisponibilidade oral da insulina e do seu efeito hipoglicémico [96, 97].

Os nanossistemas e excipientes utilizados contrariam os fenómenos de degradação enzimática da insulina, induzem um maior tempo de adesão da insulina à mucosa intestinal e favorecem a absorção da insulina [96, 98]. A utilização de promotores como os PPEs (promotores da permeabilidade paracelular), de substâncias mucoadesivas e outras que diminuem a resistência da superfície da membrana apical como os tensioativos, as micelas ou mesmo os sais biliares, são estratégias desenvolvidas que promovem a capacidade de absorção de macromoléculas como a insulina. É neste contexto que a escala nanométrica surge com particular foco à escala global.

Assim, geralmente são utilizados sistemas, tais como as nanopartículas lipídicas que englobam os lipossomas e as nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), as nanopartículas poliméricas de origem sintética tais como o PLGA, PLA, policaprolactona (PCL) e os polialquilcianoacrilatos (PACA) e de origem natural como o quitosano e o alginato. Todos estes sistemas podem ser funcionalizados, ou seja, as suas propriedades superficiais poderão ser alteradas [99].

Deste modo, a combinação de vários polímeros e o processo de formulação desenvolvido facilita a modelação de características físico-químicas (carga elétrica e o tamanho de partícula, a capacidade mucoadesiva, etc.), da eficiência de encapsulação (EE), do perfil de libertação e o seu comportamento biológico. A TabelaIV ilustra alguns estudos mais recentes com este tipo de sistemas com a insulina.

Tabela IV. Tipos de sistemas, granulometria, estudos modelo e aspetos relevantes de estudos com nanopartículas de insulina.

<u>Sistema</u>	<u>Tamanho</u>	<u>Estudo Modelo</u>	<u>Relevância</u>	<u>Referências</u>
SiNP-PEG	304nm	<i>In vitro</i> – células de Franz	Sem alterações conformacionais; Rápida libertação	100
PDCPA - sensível ao pH	284nm	<i>In vivo</i> – ratos NOD <i>In vitro</i> – células CACO 2	Redução da glicemia (19%); Maior mucoadesividade e permeabilidade	101
Pectina	348nm	<i>In vivo</i> – ratos NOD	Libertação controlada	102
CS - AuNPs	123nm	<i>In vivo</i> – ratos NOD <i>In vitro</i> – células CACO 2	Sem citotoxicidade; Eficiência na regulação glicémica	103
PEG - Amido	32nm	<i>In vitro</i> – células CACO 2 Fluídos – SIF; SGF	Libertação <20% (2h); Proteção gástrica; Absorção significativa	104
ACP	330nm	<i>In vitro</i> – Membrana cólon <i>In vivo</i> - ratos NOD	Proteção gástrica; Boa absorção; Libertação controlada	105
Ácido fólico - PAA e PAH	266nm	<i>In vitro</i> – células Caco 2 <i>In vivo</i> – Ratos NOD <i>Ex vivo</i> - Duodeno	Hipoglicémia prolongada (18h); Boa absorção	106
Alginato	800nm	<i>In vivo</i> : ratos Wistar	Hipoglicémia 14h Biodisponibilidade 35%	107

3.2) Vias de administração alternativas à insulina subcutânea

As vias não invasivas conferem um grau de dependência entre a capacidade de permeação através das membranas plasmáticas (absorção) e a biodisponibilidade do princípio ativo.

Assim, as proteínas requerem muitas vezes a utilização de promotores de absorção e outras substâncias que favoreçam a sua estabilidade biológica. Deste modo, paralelamente ao desenvolvimento de sistemas orais entéricos, várias alternativas tem sido desenhadas explorando as potencialidades de diversas vias de administração como a bucal, oral, nasal, pulmonar e a transdérmica [108 - 109].

3.2.1) Administração bucal

O tecido epitelial da cavidade bucal, além de representar uma superfície muito acessível e relativamente imóvel, apresenta uma baixa atividade enzimática e permite a absorção direta de substâncias, evitando assim o efeito hepático de primeira passagem e os níveis de atuação das várias enzimas ao longo do trato GI. Paralelamente, estas formulações oferecem ainda uma maior tolerância local e um potencial de controlo de libertação de ordem 0 [110].

O desenvolvimento destes sistemas contendo fármacos enzimaticamente lábeis como a insulina, apresenta características particularmente atrativas. No entanto, algumas limitações ao nível da permeabilidade, principalmente, com a administração de macromoléculas, levam ao desenvolvimento de estratégias que englobam a utilização de agentes químicos promotores da absorção e mucoadesivos. Alguns estudos que recorreram à adição de lecitina de soja como promotor de absorção, demonstraram não apenas um aumento da taxa de permeação da insulina, como revelaram um bom perfil de segurança não se verificando danos ao nível da mucosa [111]. Mais recentemente, Giovinco e a sua equipa desenvolveram um filme de nanopartículas de PLA e Polietilenoglicol (PEG) revestidas com quitosano e que revelou uma maior taxa de permeação em comparação com o fármaco isolado. Ainda neste estudo, a libertação de 70% da insulina foi sempre controlada e a conformação estrutural e atividade biológica da insulina manteve-se intacta após absorção sistémica [112]. Porém, comercialmente estes sistemas não se revelam muito

apelativos, não só devido ao elevado consumo de tempo e custos associados, mas também devido à pouca aceitação por parte do doente comparativamente a outras vias alternativas [110].

3.2.2) Administração nasal

A via nasal permite uma rápida absorção sistémica devido à sua elevada área de superfície vascularizada, evita o efeito hepático de primeira passagem e as várias formulações, das quais se englobam as gotas, os geles e os aerossóis são de fácil administração e aceitação por parte do doente [113]. No entanto, a elevada atividade mucociliar e a atuação de enzimas proteolíticas, como as peptidases, condicionam a absorção de moléculas de elevado peso molecular como a insulina. Outro aspeto relevante são as questões que se colocam sobre o perfil de absorção, uma vez que se sabe que condições comuns como constipações ou gripes alteram o ambiente existente na cavidade nasal [114].

Com o objectivo de se contornarem as barreiras existentes várias estratégias têm sido implementadas, como a inclusão de ciclodextrinas capazes de dissociar hexâmeros de insulina em moléculas mais pequenas, gerando um mecanismo adicional promotor da absorção, a inclusão de surfactantes e sais biliares que diminuem a viscoelasticidade do muco e a integridade das junções paracelulares e, finalmente, a inclusão de carbómeros descritos em alguns estudos como adjuvantes promotores da biodisponibilidade da insulina [114].

Recentemente, foi desenvolvido um estudo com nanossistemas que diminuíram significativamente os níveis de glicémia apresentando uma forte inibição enzimática e capacidade de adsorção à mucina [115].

Porém, e embora este tipo de sistemas apresentem diversas vantagens para a administração sistémica deste tipo de fármacos, problemas como o desenvolvimento de promotores de absorção com toxicidade mínima e a obtenção de doses precisas e reprodutíveis é atualmente um desafio que se coloca.

3.2.3) Administração pulmonar

A elevada área de superfície, entre 70 a 140m², permite uma rápida distribuição do fármaco, a elevada permeabilidade e vascularização do tecido pulmonar comparativamente à região intestinal promove uma rápida absorção favorecendo um rápido início de ação, a existência de uma baixa atividade enzimática e de uma imunotolerância local representa um ambiente favorável para a administração de péptidos e proteínas. De uma forma geral, os alvéolos podem ser facilmente alcançados por partículas de tamanho inferior a 3µm administradas sob a forma de aerossóis. Sistemas como nebulizadores ultrassónicos, inaladores de dose medida (MDI) e inaladores de pó seco (PDI) são atualmente utilizados com esta finalidade [116].

O primeiro sistema para a administração pulmonar de insulina (Exubera®) sob a forma de pó seco foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 2006, tendo sido desenvolvido por recombinação genética, apresentando um perfil farmacocinético e farmacodinâmico idêntico à administração subcutânea de insulinas de ação rápida [117, 118]. No entanto, a baixa aceitabilidade e efeitos secundários a nível pulmonar levou à sua retirada do mercado humano mais tarde.

Atualmente a Afrezza®, aprovada pela FDA em Junho de 2014 é a única opção disponível como sistema para a inalação de insulina ultra rápida utilizada no tratamento prandial da Diabetes do tipo I e tipo II [119, 120]. No decorrer dos ensaios clínicos, verificou-se um maior controlo glicémico diminuindo-se o risco associado de hipoglicémia e um menor ganho de peso em comparação com os análogos administrados por via subcutânea. Em relação aos efeitos adversos mais comuns, estes incluíram o aparecimento de tosse e ligeiras alterações ao nível da função pulmonar [121]. Globalmente esta via apresenta um grande potencial no desenvolvimento de novas abordagens. No entanto, algumas limitações e questões se colocam, tais como, a possível acumulação de proteínas nos pulmões, a ocorrência de alterações morfológicas e na capacidade ventilatória, o aparecimento de hipoglicémias decorrentes e aumento do risco de desenvolvimento de cancro pulmonar em ex-fumadores. [117].

3.2.4) Administração transdérmica

A pele, o maior órgão do corpo humano representa uma abordagem terapêutica com inúmeros benefícios, tais como, capacidade para uma administração sustentada ao longo do tempo minimizando efeitos adversos sistémicos, evitando o efeito hepático de primeira passagem e melhorando a adesão por parte do doente, particularmente, devido à facilidade de administração. No entanto, a camada mais exterior da epiderme, o estrato córneo, representa o maior desafio na administração de moléculas peptídicas devido à baixa permeabilidade inerente ao seu efeito barreira [122].

Recentemente tem sido utilizados diversos métodos que promovem a absorção da insulina no estrato córneo, tais como, injeções a jato que funcionam a elevadas pressões sem requererem a utilização de seringas [123], a iontoforese que promove a absorção molecular a partir da aplicação de corrente elétrica [124], a sonoforese que produz cavitações a partir de ultrassons [125] e a utilização de transferossomas baseados em vesículas lipídicas ultradeformáveis [126, 127]. Paralelamente, com a finalidade de se obter um efeito sinérgico adicionam-se também aqui promotores de absorção como ácidos gordos, tensioativos, carbómeros, entre outros. Hama e Kimura utilizaram com sucesso um mecanismo de iontoforese para promover a permeação transdérmica de insulina encapsulada em lipossomas tendo verificado a dissociação de junções intercelulares [128]. Paralelamente, num outro estudo com a aplicação de iontoforese e a utilização de carbómeros como o carbopol e derivados da celulose como o HMPC (Hidroxipropilmetilcelulose), que devido à sua capacidade de intumescimento/relaxamento exerce um controlo da cinética de libertação, a formulação gelificada de insulina apresentou um bom perfil de absorção, tendo diminuído de forma considerável os níveis de glicose plasmática [129].

3.2.5) Administração oral de insulina

O desenvolvimento de uma formulação para administração oral de insulina poderá melhorar de forma significativa a qualidade de vida de um diabético, não só em relação à adesão terapêutica mas também relativamente aos processos fisiológicos minimizando o impacto das complicações inerentes.

Porém, e como se sabe, a via parentérica é hoje a única forma de administração de insulina utilizada na prática clínica mas a necessidade de administrações diárias, as lipodistrofias recorrentes que condicionam a taxa de absorção local e o baixo controlo hepático inerente que aumenta o risco de hipoglicémias afetam a eficácia e a segurança terapêutica.

A via oral surge assim como uma alternativa muito vantajosa, não sendo invasiva é mais conveniente do ponto de vista do doente e a mimetização do percurso hepático da insulina endógena confere-lhe um maior perfil de segurança e preferência clínica. No entanto, o baixo tempo de semi-vida em circulação sistémica e a baixa biodisponibilidade resultante da degradação enzimática e do seu elevado peso molecular e hidrofilia, dificultam a sua introdução no mercado como alternativa à via subcutânea [130, 131].

Ao longo do tempo, várias estratégias têm sido testadas para melhorar a biodisponibilidade oral da insulina contornando as diversas barreiras que se colocam ao longo do trato GI. É neste contexto que a utilização de nanopartículas surge com especial foco de interesse ao nível da tecnologia farmacêutica englobando diversos sistemas, tais como, lipossomas, dendrímeros, nanotubos de carbono e, particularmente, as nanopartículas poliméricas que associadas à sua granulometria são sistemas biocompatíveis com propriedades físico-químicas que permitem uma libertação controlada e conferem um maior grau de proteção ao fármaco encapsulado [132, 133]. A Tabela V apresenta alguns estudos mais recentes que envolveram a administração oral de insulina com particular relevância à Nanotecnologia.

Tabela V. Sistemas orais, métodos, granulometria e aspetos relevantes de estudos com nanopartículas de insulina.

Sistema	Método de produção	Granulometria	Relevância	Referências
Lipossomas de biotina (BLPs)	Evaporação	150nm	Biodisponibilidade -12%	134
PMAA-PEG	Polimerização e peguilação	460nm	Baixa citotoxicidade Grande capacidade de transporte paracelular	135
PLGA-SPC	Evaporação/emulsão	200nm	Efeito hipoglicemiante – 12h EE – 90%	136
EudragitL100-Cisteína	Precipitação	324nm	Maior capacidade mucoadesiva Efeito hipoglicemiante prolongado	137
SLNs-SA-R8	Emulsão/difusão de solvente	162nm	Maior capacidade de absorção intracelular Biodisponibilidade -14%	138
Acetato de amido-PEG	Precipitação e peguilação	32nm	Grande capacidade mucoadesiva Abertura de junções paracelulares Controlo na libertação: <20% - 2h	139
Meta metilacrilato-Quitosano	Emulsão múltipla-A/O/A	300-400nm	EE – 87% Estabilidade a diferente pH	140
Dendrímeros-poli(L-lisina)	Polimerização	300-600nm	EE = 99% Estabilização em meio ácido: <60% em 3h Libertação controlada:<70% em 6h	141

4 – Contextualização do projeto de investigação: Nanotecnologia e insulina oral

O principal objectivo do projeto foi a produção de nanopartículas de PLGA estáveis com grande capacidade de encapsulação da insulina para futuros testes *in vivo*. As primeiras nanopartículas produzidas pelo nosso grupo de investigação através de um método de emulsificação espontânea por deslocação do solvente [142] revelaram a existência de um nanossistema muito estável com partículas monodispersas mas cuja eficiência de encapsulação (EE) foi muito baixa (cerca de 11 a 30%) e dependente dos parâmetros de processo e formulação utilizados. A EE foi determinada espectrofotometricamente. Estas nanopartículas foram administradas a ratos diabéticos tendo sido observado um efeito hipoglicemiante ao final de 5 horas.

No actual projecto, as nanopartículas foram produzidas a partir de um método de emulsão múltipla (A/O/A) para favorecer a encapsulação de fármacos de carácter hidrofílico e a eficiência de encapsulação foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de acordo com um método previamente descrito [143]. O método de quantificação por HPLC trata-se de um método com exactidão, maior reprodutibilidade que permite uma rápida separação e identificação.

Neste caso, a percentagem de insulina encapsulada foi determinada de forma indireta a partir da análise do sobrenadante recorrendo-se a um método isocrático a um fluxo constante de 0,8 mL min⁻¹ numa coluna LiChrospher 100, RP-18 (5 µm, 250 x 4 mm i.d) com um detetor de UV a 214 nm. A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de Na₂SO₄ anidro (0,2 M) ajustada a um pH de 2,3 com ácido fosfórico e acetonitrilo (73:27, v/v). A EE foi assim determinada a partir de uma curva de calibração, com o limite de linearidade entre 1–100 ppm ($y = 66,726x$, $R^2 = 0,9995$), e de acordo com a seguinte equação:

Equação I

$$\frac{(\text{Insulina inicial adicionada} - \text{Insulina presente no sobrenadante})}{\text{Insulina inicial adicionada}} \times 100$$

Os resultados evidenciaram um aumento da EE para cerca de 65% e as partículas obtidas revelaram ser estáveis e monodispersas.

4.1) Justificação do polímero utilizado

O PLGA é um polímero reconhecido pela FDA como seguro (GRAS) [144, 145]. Após a administração, o PLGA sofre uma reação de hidrólise, gerando os monómeros iniciais, o ácido láctico e o ácido glicólico (Figura 7), compostos que também desempenham um papel importante ao nível do metabolismo fisiológico humano [146]. Vários estudos demonstram que o aumento da percentagem de ácido glicólico acelera a taxa de degradação polimérica. Assim, o PLGA (50:50) exibe uma taxa de degradação superior comparativamente às restantes formulações (65:35), (75:25) e (85:15) [147]. Inicialmente, o processo de degradação é rápido, sendo cerca de 30%, ocorrendo posteriormente uma estabilização do sistema culminando com a eliminação total ao nível da respiração pulmonar e a nível renal. Paralelamente, o PLGA apresenta capacidade de se moldar em diversas formas e tamanhos sendo solúvel em solventes orgânicos como a acetona e o etanol. A biodistribuição e a farmacocinética seguem um perfil não linear e dose dependente [148]. As suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e versatilidade fazem do PLGA um dos mais atrativos na prática clínica, levando à sua utilização contínua como nanossistema. A Tabela VI apresenta alguns dos nanossistemas de PLGA com insulina. De uma forma geral, estes sistemas conferem uma maior especificidade, capacidade de moldagem, um melhor perfil de segurança, não só de curta mas de longa duração e permitem uma libertação mais sustentada do fármaco. Paralelamente, a sua utilização transversal em diferentes áreas de intervenção deve-se essencialmente à capacidade de encapsulação de fármacos de diversos pesos moleculares, cargas e níveis de hidrofobicidade.

Figura 7. Hidrólise do PLGA (Retirado de Shive, et al.).

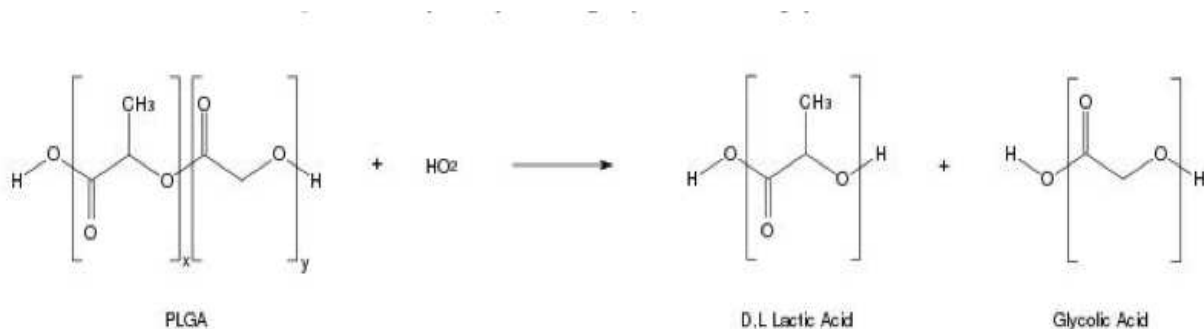


Tabela VI. Métodos, tipo de fármacos encapsulados e granulometria de estudos que recorreram à utilização de nanopartículas de PLGA.

Métodos	Tipo de fármaco	Granulometria	Referências
Emulsão/Evaporação	Metotrexato	130-200nm	149
	Docetaxel	199nm	150
Emulsão múltipla (A/O/A)	Vírus NDV (Newcastle)	700nm	151
Nanoprecipitação	Lamotrigina	110-170nm	152
Polimerização/Emulsão	Rivastigmina	135nm	153
Emulsificação/evaporação do solvente	Etoposido	105nm	154
Emulsão múltipla A/O/A	Minociclina	139-226nm	155
Emulsão	L-Dopa	250nm	156
Emulsão	Netilmicina	140nm	157
Emulsificação/evaporação do solvente	Dorzolamida	100-300nm	158

4.2) Justificação do método de produção de nanopartículas

A primeira estratégia utilizada neste projecto para melhorar a EE foi a alteração do método de produção. A literatura descreve que as emulsões do tipo A/O/A são as

mais adequadas para encapsular fármacos de grandecarácter hidrofílico como acontece com os péptidos e as proteínas[159].

Deste modo, este novo sistema consiste na formação de um reservatório aquoso dentro de gotículas lipídicas revestidas por uma fase externa aquosa. Genericamente, o PLGA é dissolvido numa mistura de acetona/etanol e a insulina é adicionada a uma solução tamponada. Após a formação da primeira emulsão, esta é incorporada na fase externa estabilizada por um agente tensioativo com ou sem adição de um sal (Figura 8). São vários os fatores que limitam não só o tamanho da partícula como a EE, destacando-se a escolha dos solventes e a velocidade de agitação [160]. Neste projecto foram produzidos vários lotes de nanopartículas de PLGA contendo insulina. A Tabela VII apresenta os parâmetros estudados que condicionaram o processo de formulação, tais como, a quantidade de polímero, o volume da fase externa, a velocidade de agitação, o tipo de insulina (com ou sem protamina), os tensioativos e a presença de um sal.

Tabela VII. Variação dos parâmetros em estudos nos vários lotes produzidos.

Lotes	PLGA (mg)	Fase externa (ml)	Velocidade de agitação (rpm)	Tipo de Insulina	Tipo de Tensioativo	NaCl (%)
A	75	5	1400	Actrapid	F68	0
B	75	5	800	Actrapid	F68	0
C	100	5	800	Insuman	PVA	0
D	100	20	1000	Insuman	PVA	5
E	100	20	1000	Insuman	F68 e PVA	10
F	100	20	1000	Insuman	PVA	5
G	100	20	1000	Novorapid	F68 e PVA	5
H	100	20	1000	Novorapid	F68 e PVA	2
I	100	20	1000	Novorapid	PVA	10

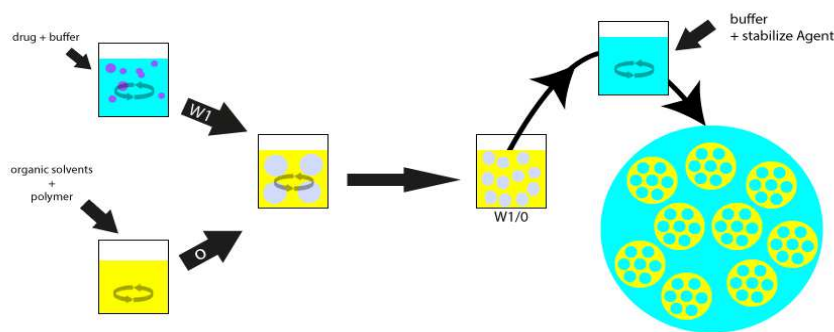
Durante o processo de emulsificação, as gotículas estão sujeitas a forças de deformação, sendo a capacidade deformável de um corpo oposta à pressão exercida. Quando a agitação mecânica gera forças capazes de superar essa mesma pressão, a deformação ocorre (Equação II).

Equação II [161] – p é a pressão exercida, γ a tensão interfacial entre fases distintas e r o raio da gotícula.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r}$$

Em geral, quanto maior a agitação, maior a dispersão homogénea e menor o tamanho de partícula. Porém, quanto maior velocidade de agitação para produzir a emulsão, maior será a dificuldade no controlo do processo. Uma elevada agitação pode interferir com o equilíbrio osmótico entre a fase interna e externa e assim diminuir a EE [162]. Paralelamente, a insulina pode afectar a sua estabilidade [163].

Figura 8. Etapas do sistema emulsivo múltiplo (A/O/A).



4.3) Sustentação para a escolha das nanopartículas de PLGA ao nível toxicológico

Diversos estudos sugerem que as nanopartículas provenientes de qualquer tipo de material podem criar padrões específicos de biodistribuição e perfis toxicológicos [165]. Este pressuposto condiciona em parte a entrada deste tipo de materiais no mercado, sendo o cepticismo em relação a um custo/benefício favorável a longo prazo uma realidade em foco.

Assim, a evolução tecnológica carece de mais estudos específicos que comprovem a segurança na utilização de nanomateriais, uma vez que as características físico-

químicas inerentes a estes sistemas conferem particularidades únicas favoráveis ao desenvolvimento global.

Estudos toxicológicos com dispositivos contendo PLGA sugerem o aparecimento no local de administração de reações ligeiras de hipersensibilidade [166, 167]. No entanto, o seu perfil de biodegradabilidade e biocompatibilidade fazem da sua utilização segura. O ácido láctico entra diretamente no ciclo do ácido tricarboxílico sendo eliminado sob a forma de dióxido de carbono e água. Paralelamente, o ácido glicólico poderá seguir duas vias distintas, tais como, excreção de forma inalterada a nível renal ou metabolização similar à do ácido láctico [168].

A toxicidade intrínseca dos níveis residuais de solventes nas formulações devem seguir as orientações da Conferência Internacional de Harmonização (ICH). Deste modo, quer o etanol quer a acetona apresentam um baixo potencial de toxicidade, designando-se por solventes de classe III.

4.4) Resultados do projeto

A produção de nanopartículas a partir do método de emulsão múltipla foi um sucesso: o tamanho de partícula mais pequeno foi de 398,6nm com um índice de polidispersividade (PDI) de 0,19. Quanto mais próximo de zero for este último valor, maior homogeneidade das partículas em termos de tamanho. Em termos granulométricos o tamanho e o grau de dispersão das nanopartículas foram determinados por espectroscopia de correlação fotónica a partir do aparelho DelsaTMNanoC (Beckman Coulter, USA).

Os aspectos mais relevantes deste estudo evidenciaram a redução do tamanho das nanopartículas com a adição de um sal numa concentração entre 2 e 5% (p/v). O tamanho de partícula foi igualmente condicionado pela utilização de diferentes tipos de insulina.

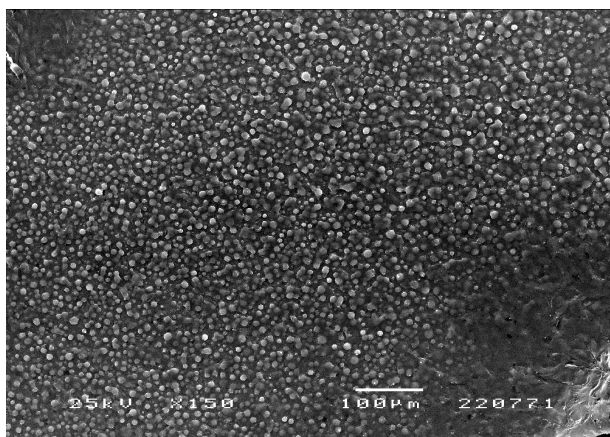
Tabela VIII. Granulometria, PDI e EE dos diferentes lotes.

Lotes	Tamanho médio (nm)	PDI	EE (%)
A	1352,6	0,54	53,7
B	1598,9	0,36	48,8
C	1070	0,36	14,1
D	398,6	0,19	65,2
I	1283,8	0,007	60,4
F	631,3	0,27	60,6
G	942	0,31	50,6
H	760,4	0,34	56,0
I	2082,2	1,18	49,3

A determinação da razão fármaco/polímero mais favorável foi outro dos fatores que poderá ter promovido um aumento da capacidade de retenção e encapsulação da insulina. No entanto, os resultados obtidos neste parâmetro foram inconclusivos.

Globalmente, os valores de EE foram mais elevados do que no estudo preliminar, destacando-se a formulação D com um baixo PDI e uma EE de 65%. As análises de microscopia electrónica de varrimento (SEM) revelaram ainda a existência de nanopartículas esféricas sem a presença de aglomerados e confirmaram os dados granulométricos anteriores (Figura 9).

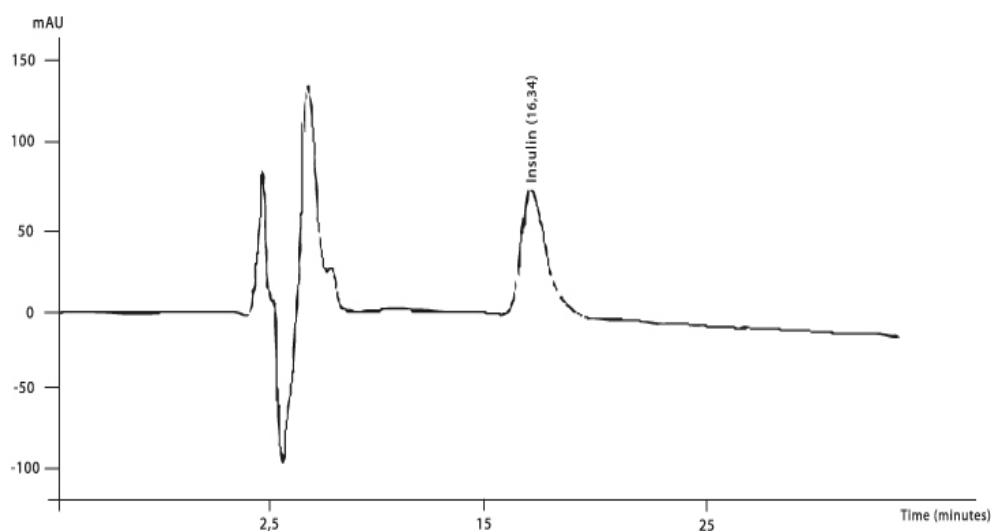
Figura 9. Microfotografia de SEM da formulação D apresentando um grande número de nanopartículas esféricas. Escala = 100µm.



Deste estudo concluiu-se ainda que a velocidade de agitação condiciona todo o processo de produção. A velocidade de 1000 rpm conduziu a sistemas mais estáveis e homogêneos. Paralelamente, com a utilização da insulina Insuman verificaram-se valores de EE superiores revelando uma possível interação sinérgica entre os cristais de protamina e o PLGA.

Encontra-se ainda descrito que a utilização de eletrólitos na fase externa diminui o tamanho de partícula promovendo uma maior retenção da insulina nas camadas poliméricas [169]. No entanto, o excesso de NaCl poderá levar a um desequilíbrio osmótico e, consequentemente, à destabilização do sistema. Neste estudo verificou-se que a adição de NaCl conduziu não apenas a uma diminuição no tamanho de partícula mas também a um aumento ligeiro nos valores de EE. Sugere-se que a promoção das interações electrostáticas é potenciada pela utilização de agentes tampão e condicionada pelo ponto isoelétrico (pI) da insulina e pelo pKa do PLGA. Assim, a manutenção do pH entre os 3 e os 5,3 é essencial para maximizar a EE. Além disso, a insulina após encapsulação espera-se que se tenha mantido estável uma vez que os ensaios de HPLC demonstraram a existência de um pico único bem definido (Figura 10), sem a presença de produtos de degradação e com o mesmo tempo de retenção da insulina antes do processo de encapsulação.

Figura 10. Cromatograma representativo da insulina (tempo de retenção a 16,34 min).



4.5) Perspetivas futuras deste projecto

O revestimento destas nanopartículas com materiais mucoadesivos, com materiais com capacidade de aumentar o tempo em circulação sistémica e de protecção da insulina da degradação enzimática, é um desafio que se coloca futuramente. Paralelamente, a avaliação *in vitro* e *in vivo* da bioatividade da insulina após encapsulação, o estudo do perfil de redução glicémica após a sua administração oral a modelos animais diabéticos e os aspetos toxicológicos a curto e a longo prazos devem ser estudados e monitorizados com a presente formulação.

De uma forma geral, este projecto sugere que a utilização de Nanotecnologia na área da Diabetes representa uma solução inovadora e efetiva que visa a melhoria da qualidade de vida de um diabético num futuro próximo.

Conclusão

A Diabetes Mellitus continua a ser uma preocupação global que carece de medidas preventivas mais eficazes e de inovações terapêuticas que visam melhorar o prognóstico destes doentes. Um estado de equilíbrio metabólico engloba uma produção e uma atuação eficaz da insulina a nível celular. Atualmente as administrações subcutâneas diárias de insulina geram alguns inconvenientes que condicionam a ação terapêutica desejada.

Assim, com os vários desenvolvimentos que sucedem na área procura-se encontrar não só uma cura efetiva mas também implementar abordagens mais cómodas e seguras do ponto de vista do doente.

O desenvolvimento de um sistema que permita a administração oral de insulina tem sido um desafio de várias décadas, e a nanotecnologia uma ferramenta de grande utilidade e potencialidade para a investigação na veiculação deste tipo de proteínas, esperando-se num futuro próximo a entrada no mercado deste tipo de nanossistemas.

O desenvolvimento crescente na área da nanomedicina levou à entrada no mercado de novos veículos terapêuticos, nomeadamente na área da quimioterapia, de novas abordagens ao nível do diagnóstico e imagem e na introdução de novos sistemas implantáveis contribuindo globalmente para a evolução científica.

O desenvolvimento inicial do projeto de produção das nanopartículas para administração oral revelou ser uma abordagem promissora para a encapsulação de insulina. De facto, a utilização de um sistema múltiplo emulsivo, o controlo das diferentes variáveis de formulação e a utilização de um polímero com as características do PLGA contribuíram para o sucesso dos objectivos alcançados.

Bibliografia

- [1]. Rosenfeld L, et al. Insulin: discovery and controversy. *Clinical Chemistry* 2002;12:2270-88.
- [2]. Perle Bioscience. The Road to Insulin Independence. Disponível em <http://www.perlebioscience.com/the-road-to-insulin-independence/>. Acedido a 18 de Maio de 2014.
- [3]. Chari ST, et al. Mechanism(s) of Pancreatic Cancer-induced Diabetes. *Journal of the Pancreas* 2014; 5:2777.
- [4]. Shashank R, et al. Insulin History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *Journal of the Pancreas* 2007; 55-64.
- [5]. Dominguez LJ, et al. The discovery of insulin: what really happened 80 years ago. *Annali Italiani di Medicina Interna* 2001; 3:155-162.
- [6]. Guthrie RA, et al. Pathophysiology of diabetes mellitus. *Critical Care Nursing Quarterly* 2004; 2:113-25.
- [7] Mota Pinto A. Fisiologia; Fundamentos e aplicações. Lisboa: Lidel; 2009: 462-464.
- [8]. Duarte R. Insulina. *Diabetologia Clínica* 1997; 139-151.
- [9]. Feutren G, et al. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet* 1986; 2:119–124.
- [10]. Stiller CR, et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 1984; 4643:1362–1367.

- [11]. Bougneres PF, et al. Factors associated with early remission of type I diabetes in children treated with cyclosporine. *The New England Journal of Medicine* 1988; 11:663–670.
- [12]. Eisenbarth GS, et al. Anti-thymocyte globulin and prednisone immunotherapy of recent onset type I diabetes mellitus. *Diabetes Research* 1985; 6:271–276.
- [13]. Chatenoud L. “Use of CD3 antibodies in transplantation and autoimmune diseases.” *Transplantation Proceedings* 1994; 6:3191–3193.
- [14]. Pescovitz MD, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *New England Journal of Medicine* 2009; 22:2143–2152.
- [15]. Lee RS, et al. CTLA4Ig-induced linked regulation of allogeneic T cell responses. *The Journal of Immunology* 2001; 3:1572–1582.
- [16]. Barlow AK, et al. Anti-CD2 monoclonal antibodies prevent spontaneous and adoptive transfer of diabetes in the BB/Wor rat. *American Journal of Pathology* 1992; 5:1043–1051.
- [17]. Thrower SL, et al. Proinsulin peptide immunotherapy in type 1 diabetes: report of a first-in-man Phase I safety study. *Clinical and Experimental Immunology* 2009; 2:156–165.
- [18]. Skyler JS, et al. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 2002; 22:1685–1691.
- [19]. Nanto-Salonen K, et al. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 9651:1746–1755.
- [20]. Walter M, et al. No effect of the altered peptide ligand NBI-6024 on beta-cell residual function and insulin needs in new-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 11:2036–2040.

[21]. Nakayama M, et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 2005; 7039:220–223.

[22]. Concannon P, et al. *New England Journal of Medicine* 2009; 16:1646–1654.

[23]. Orban T, et al. Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy.” *Journal of Autoimmunity* 2010; 4:408–415.

[24]. Agardh CD, et al. Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications* 2005; 4:238–246.

[25]. Ludvigsson J, et al. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2008; 18:1909–1920.

[26]. DIABGAD - Trial to Preserve Insulin Secretion in Type 1 Diabetes Using GAD-Alum (Diamyd) in Combination With Vitamin D and Ibuprofen. NCT01785108 (Serial Study). Disponível em:
[http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01785108?term=diamyd+and+diabetes&rank=](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01785108?term=diamyd+and+diabetes&rank=2)
2. Acedido a 24 de Junho de 2014.

[27]. Rabinovitch A, et al. Cytotoxic effects of cytokines on human pancreatic islet cells in monolayer culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 1:152–156.

[28]. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1998; 2:129–151.

[29]. Mastrandrea L, et al. Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Diabetes Care* 2009; 7:1244–1249.

- [30]. Donath MY, Mandrup-Poulsen T. The use of α -interleukin-1-receptor antagonists in the treatment of diabetes mellitus. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* 2008; 5:240–241.
- [31]. Louvet C, et al. Tyrosine kinase inhibitors reverse type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 48:18895–18900.
- [32]. Koulmanda M, et al. Curative and beta cell regenerative effects of α 1-antitrypsin treatment in autoimmune diabetic NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2008; 42:16242-16247.
- [33]. Couri CE, et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous non- myeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association* 2009; 15:1573-1579.
- [34]. Voltarelli JC, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association* 2007; 14:1568– 1576.
- [35]. Toby P, et al. Dendritic cells, tolerance induction and transplant outcome. *American Journal of Transplantation* 2002; 4:299–307.
- [36]. Hackstein H, et al. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends in Immunology* 2001; 8:437–442.
- [37]. Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunological Reviews* 2003; 196:125–146.
- [38]. Nouri-Shirazi M, Thomson AW. Dendritic cells as promoters of transplant tolerance. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2006; 4:325–339.

[39]. Harnaha J, et al. Interleukin-7 is a survival factor for CD4⁺ CD25⁺ T-cells and is expressed by diabetes-suppressive dendritic cells. *Diabetes* 2006; 1:158–170.

[40]. Chappert P, et al. Antigen-driven interactions with dendritic cells and expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells occur in the absence of inflammatory signals. *Journal of Immunology* 2008; 1:327–334.

[41]. Potential Diabetes Breakthrough. Disponível em:
<http://news.harvard.edu/gazette/story/2013/04/potential-diabetes-breakthrough/>.
Acedido a 15 de Maio de 2014.

[42]. Espes D, et al. Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetologia* 2014; 1:50-53.

[43]. Perle Bioscience. Disponível em:<http://www.perlebioscience.com/about/>.
Acedido a 3 de Maio de 2014.

[44]. Pantoprazole on Insulin Secretion in Diabetes (IBP). NCT01541735 (Serial Study). Disponível
em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01541735?term=pantoprazole&rank=32>.
Acedido a 4 de Junho de 2014.

[45]. Silva AI, et al. An Overview on the Development of a Bio-Artificial Pancreas as a Treatment of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Medicinal Research Reviews* 2006; 2: 181-222.

[46]. Hunkeler D. Bioartificial organs transplanted from research to reality. *Nature Biotechnology* 1999;17:335–336.

[47]. Monaco AP, et al. Transplantation of islet allografts and xenografts in totally pancreatectomized β -diabetic dogs using the hybrid artificial pancreas. *Annals of Surgery* 1991;214:339–362.

- [48]. Maki T, et al. Treatment of diabetes by xenogeneic islets without immunosuppression—Use of a vascularized bioartificial pancreas. *Diabetes* 1996;45:342 – 347.
- [49]. Bionic Pancreas outperforms insulin pumps in adults, youth. June 15, 2014. Disponível em: <http://www.nih.gov/news/health/jun2014/niddk-15.htm>. Acedido a 20 de Julho de 2014.
- [50]. GSK Shifts Investment Towards Bioelectronics. Disponível em: <http://clarkstonconsulting.com/insight/gsk-shifts-investment-towards-bioelectronics>. Acedido a 22 de Julho de 2014.
- [51]. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Sixth edition. Disponível em: http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf. Acedido a 2 de Setembro de 2014.
- [52]. World Health Organization. Diabetes. October, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>. Acedido a 2 de Setembro de 2014.
- [53]. Direção-Geral da Saúde. Diabetes: Factos e Números 2013. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes – Portugal. Disponível em: <http://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/diabetes-factos-e-numeros-2013.aspx>. Acedido a 5 de Setembro de 2014.
- [54]. Nejentsev S, et al. Rare Variants of IFIH1, a Gene Implicated in Antiviral Responses, Protect Against Type 1. *Diabetes* 2009; 59:387-389.
- [55]. John AT, et al. HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329:599-604.
- [56]. Nejentsev S, et al. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* 2007; 450:887-892.

- [57].Khalil I, et al. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. The Journal of Clinic Investigation 1990; 4:1315–1319.
- [58]. Ray K. Statin diabetogenicity: guidance for clinicians. Cardiovascular Diabetology 2013; 12(Suppl 1): S3.
- [59].Sattar NA, et al. The use of statins in people at risk of developing diabetes mellitus: evidence and guidance for clinical practice. AtherosclerosisSupplements 2014; 1:1-15.
- [60].Matteucci E, Giampietro O. Statin intolerance: why and what to do with a focus on diabetic people. Current Medicinal Chemistry 2013; 11:1397-1408.
- [61].Mackay L, et al. Hormone replacement therapy for women with type 1 diabetes mellitus. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2013;CD008613 (Serial Study).
- [62]. American diabetes Association. Diagnosing Diabetes and Learning About Prediabetes. September 22, 2014 Disponível em:
<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diagnosis/?loc=db-slabnav>. Acedido a 17 de Julho de 2014.
- [63]. BBC News Techonology Google unveils 'smart contact lens' to measure glucose levels. January 17, 2014. Disponível em:
<http://www.bbc.com/news/technology-25771907>. Acedido a 2 de Abril de 2014.
- [64]. BD. Métodos de Aplicação. Disponível em:
<https://www.bd.com/brasil/diabetes/page.aspx?cat=19151&id=19400>. Acedido a 20 de Abril de 2014.
- [65]. American Diabetes Association. Insulin Basics. July 28, 2014 Disponível em:
<http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/medication/insulin/insulin-basics.html>. Acedido a 14 de Junho de 2014.

[66]. Sharma P, et al. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes – Future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 1:48-62.

[67]. Elliott RM, et al. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post- prandial and 24-h secretion patterns. *Journal of Endocrinology* 1993; 138:159–166.

[68].Inzucchi SE, McGuire DK. New drugs for the treatment of diabetes mellitus.Part II. Incretin-based therapy and beyond. *Circulation* 2008; 117:574–584.

[69]. Creutzfeldt W, Nauck M. Gut hormones and diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 1992; 8:149–177.

[70].Deacon CF, et al.Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 1995; 44:1126–1131.

[71]. Kieffer TJ, et al. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide-1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase-IV. *Endocrinology* 1995; 136:3585–3596.

[72]. Kjems LL, et al. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion effects on cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* 2003; 52:380–386.

[73]. Åhrén B. 2011. GLP-1 for type 2 diabetes. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 2011; 317:1239–1245.

[74]. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacology Reviews* 2008; 60:470–512.

[75]. Freeman JS. Role of the incretin pathway in the pathogenesis of type 2 mucus glycoproteins. Symposia of the Society for Experimental Biology 2009; 43:289–316.

[76]. Kim SJ, et al. Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of Bax expression. The Journal of Biological Chemistry 2005; 280:22297–22307.

[77]. Duarte R, et al. Recomendações Nacionais da SPD para o Tratamento da Hiperglicemia na Diabetes Tipo 2. Revista Portuguesa de Diabetes 2013; 1:30-41.

[78]. Goodman & Gilman Online (12th edition). Chapter 43: Endocrine pancreas and pharmacotherapy of diabetes mellitus and hypoglycemia. Disponível em: <http://accessmedicine.com/content.aspx?aID=16674636>. Acedido a 20 de Maio de 2014.

[79]. American Diabetes Association. Diabetes Symptoms. September 12, 2014. Disponível em: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/symptoms/?loc=db-slabnav>. Acedido a 25 de Outubro de 2014.

[80]. American Diabetes Association. Complications. Disponível em: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/complications/?loc=lwd-slabnav>. Acedido a 14 de Julho de 2014.

[81]. Putting feet first in diabetes. The lancet 2005; Vol:366;154-178.

[82]. American Diabetes Association. Hypoglycemia (Low Blood Glucose). September 16, 2014. Disponível em: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/blood-glucose-control/hypoglycemia-low-blood.html?loc=lwd-slabnav>. Acedido a 12 de Outubro de 2014.

[83]. Couvreur P, Puisieux F. Nano and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. Advanced Drug Delivery Reviews 1993; 10:141-162.

[84].Gopalakrishna P, Ceballos-Coronel ML. Science and technology of the emerging nanomedicines in cancer therapy: A primer for physicians and pharmacists. Sage Open Medicine 2013; 45:168-179.

[85] Engelberth SA, et al. Development of nanoscale approaches for ovarian cancer therapeutics and diagnostics. Critical Reviews Oncogenesis 2014; 19:281-315.

[86].Tennyson L, et al. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. Chemical Society Reviews 2012; 41:2885–2911.

[87]. Moghimi MS, et al. Nanomedicine: current status and future prospects. The FASEB Journal 2005; 19:311-330.

[88] Hillery MA, Lloyd WA, et al. Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. London: Taylor & Francis; 2001: 101-103.

[89]. UC San Diego News Center. Nanosponge Vaccine Fights MRSA Toxins. December 02, 2013. Disponível em:
http://ucsdnews.ucsd.edu/pressrelease/nanosponge_vaccine_fights_mrsa_toxins.
Acedido a 14 de Setembro de 2014.

[90]. R&D. New nanotechnology “traps” viruses before they infect host cells. June, 2014. Disponível em:<http://www.rdmag.com/news/2014/01/new-nanotechnology-traps-viruses-they-infect-host-cells>. Acedido a 14 de Setembro de 2014.

[91]. Nanowerk. Combining antibodies, iron nanoparticles and magnets steers stem cells to injured organs. September 2014. Disponível em:
<http://www.nanowerk.com/nanotechnology-news/newsid=37294.php>. Acedido a 13 de Setembro de 2014.

[92]. Sachin S, et al. Intravitreal drug delivery in retinal disease: are we out of our depth? Informa healthcare 2014; 11(10)

- [93]. Clinical Trials. Capsaicin Nanoparticle in Patient With Painful Diabetic Neuropathy. NCT01125215 (Serial Study). Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01125215?term=capsaicin&rank=6>. Acedido a 15 de Outubro de 2014.
- [94]. Key J, Leary JF. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine* 2014; 9:711-26.
- [95]. Lee N, et al. Nano-Sized CT Contrast Agents. *Advanced Materials*. 2013, 25, 2641–2660.
- [96] Damgé, C, et al. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2008;1:1-24.
- [97] Lopes MA, et al. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2014;10:1139–1151.
- [98] Carino GP, Mathiowitz E, et al. Oral insulin delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999;35:249–257.
- [99]. Rekha MR, Sharma CP. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes – Future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 1:48-62.
- [100]. Andreani T, et al. Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 473:627-635.
- [101]. Sonia TA, Sharma CP. pH sensitive thiolated cationic hydrogel for oral insulin delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2014; 4:642-650.
- [102]. Wong TW, Sumiran N. Oral calcium pectinate-insulin nanoparticles: influences of alginate, sodium chloride and Tween 80 on their blood glucose lowering performance. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013; 66:646-657.

[103]. Cho HJ, et al. Chondroitin sulfate-capped gold nanoparticles for the oral delivery of insulin. *International Journal of Biological Macromolecules* 2014; 63:15-20.

[104]. Minimol PF, et al. PEGylated starch acetate nanoparticles and its potential use for oral insulin delivery. *Carbohydrate Polymers* 2013; 95:1-8.

[105]. Agrawal AK, et al. Improved Stability and Antidiabetic Potential of Insulin Containing Folic Acid Functionalized Polymer Stabilized Multilayered Liposomes Following Oral Administration. *Macromolecules* 2014; 15:350-360.

[106]. Ganeshkumar M, et al. Preparation of amphiphilic hollow carbon nanosphere loaded insulin for oral delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 103:238-243.

[107] Reis CP, et al. Alginate Microparticles as Novel Carrier for Oral Administration. *Biotechnology and Bioengineering* 2007; 5:977-989.

[108]. Reis CP, Damge C. Nanotechnology as a Promising Strategy for Alternative Routes of Insulin Delivery. *Methods in Enzymology* 2012, Volume 508.

[109]. Peppas NA, Kavimandan NJ. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: Insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 29:183–197.

[110]. Sharma PK, et al. Noninvasive Routes of Proteins and Peptides Drug Delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 4:367-375.

[111] Hillery MA, Lloyd WA, et al. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. London: Taylor & Francis; 2001: 186-196.

[112]. Tian W. et al. Effect of soybean-lecithin as an enhancer of buccal mucosa absorption of insulin. *Biomedical Materials and Engineering* 2012; 22:171-178.

- [113].Giovino C, et al. An integrated buccal delivery system combining chitosan films impregnated with peptide loaded PEG-b-PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 112:9-15.
- [114].Owens DR, et al. Alternative routes of insulin delivery. *Diabetic Medicine* 2003; 20:886–898.
- [115].Hillery MA, Lloyd WA, et al. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. London: Taylor & Francis; 2001: 238-260.
- [116].Wang Y, et al. Mucoadhesive and enzymatic inhibitory nanoparticles for transnasal insulin delivery. *Nanomedicine* 2014; 4:451-64.
- [117]. Hillery MA, Lloyd WA, et al. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. London: Taylor & Francis; 2001: 261-267.
- [118].Santos CT, Edelman S. Inhaled insulin: a breath of fresh air? A review of inhaled insulin. *Clinical Therapeutics* 2014; 8:1275-89.
- [119].Baran MK, Godoy AT. What went wrong? A retrospective on Exubera. *Advance for Nurse Practitioners* 2008; 11:53-77.
- [120]Aschenbrenner DS. Afrezza: fast-acting inhaled insulin. *The American Journal of Nursing* 2014; 10:22-3.
- [121].Bloomgarden ZT. Afrezza: some questions about a new approach to prandial insulin. *Journal of Diabetes* 2014.
- [122].Kling J. Sanofi to propel inhalable insulin Afrezza into market. *Nature Biotechnology*. 2014; 9:851-852.
- [123]. Hillery MA, Lloyd WA, et al. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. London: Taylor & Francis; 2001: 208-234.

[124].Li CY, et al. Needle-free injection of insulin powder: delivery efficiency and skin irritation assessment. *Journal of Zhejiang University Science B* 2014; 10:888-899.

[125]. Pillai O, et al. Transdermal iontophoresis of insulin: II. Physicochemical considerations. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 254:271-80.

[126]. Kost J, et al. Synergistic effect of electric field and ultrasound on transdermal transport. *Pharmaceutical Research* 1996; 13:633-638.

[127]. Vanbever R, et al. Macromolecules as novel transdermal transport enhancers for skin electroporation. *Pharmaceutical Research* 1997; 14:638-644.

[128].Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. *Clinical Pharmacokinetics* 2003; 5:461-474.

[129].Hama S, et al. Electric stimulus opens intercellular spaces in skin. *The Journal of Biological Chemistry* 2014; 4:2450-2456.

[130].Akram M, et al. Design and development of insulin emulgel formulation for transdermal drug delivery and its evaluation. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 2:323-32.

[131].Lopes MA, et al. Intestinal uptake of insulin nanoparticles: facts or myths? *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2014; 7:629-638.

[132].Ribeiro AJ. Editorial: nanotechnology as a strategy to improve treatment of diabetes. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2014; 7:589.

[133].Woitiski CB, et al. Strategies toward the improved oral delivery of insulin nanoparticles via gastrointestinal uptake and translocation. *BioDrugs* 2008; 4:223-237.

- [134]. Zhang X, et al. Biotinylated liposomes as potential carriers for the oral delivery of insulin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2014; 167–176.
- [135]. Torres-Lugo M, et al. Physicochemical behavior and cytotoxic effects of p(methacrylic acid–g-ethylene glycol) nanospheres for oral delivery of proteins. *Journal of Controlled Release* 2002; 197–205.
- [136]. Cui F, et al. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin–phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release* 2006; 242–250.
- [137]. Zhang Y, et al. Thiolated Eudragit nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 341–350.
- [138]. Zhang ZH, et al. Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid–octaarginine for oral administration of insulin. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 3333–3339.
- [139]. Minimol PJ, et al. PEGylated starch acetate nanoparticles and its potential use for oral insulin delivery. *Carbohydrate Polymers*. 2013; 1-8.
- [140]. Siddhartha TV, et al. Design and development of oral nanoparticulated insulin in multiple emulsion. *Current Drug Deliver* 2014; 472-485.
- [141]. Sideratou Z, et al. Arginine end-functionalized poly(L-lysine) dendrigrafts for the stabilization and controlled release of insulin. *Journal of Colloid and Interface Science* 2010; 433–441.
- [142]. Pinheiro E, et al. (2013). Insulin-loaded Poly(D, L-lactic-co-glycolic) nanoparticles: production and characterization studies. Comunicação apresentada no II Simpósio Nacional de Nanociência e Nanotecnologia Biomédica: Nano 2013, Lisboa.

- [143].Correia C, et al. Optimization of the encapsulation efficiency of a novel oral insulin delivery nanosystem. *Biomedical and Biopharmaceutical Research* 2014; 1:111-119.
- [144].do Carmo FA, et al. Therapeutic nanosystems for oral administration of insulin. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2014; 7:620-628.
- [145]. Navgire SD, et al. Recent Patents On Oral Insulin Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery Formulation* 2014 31:67-80.
- [146]. Zhi Min Wua L, et al. HP55-coated capsule containing PLGA/RS nanoparticles for oral delivery of insulin.*International Journal of Pharmaceutics* 2012; 298:1-8.
- [147].Shive J, et al. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres.*Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 28:5-24.
- [148]. Siegel H, et al. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier.*Polymers* 2011; 3:1377-1397.
- [149].Moura CC, et al. Co-association of methotrexate and SPIONs into anti-CD64 antibody-conjugated PLGA nanoparticles for theranostic application.*International Journal of Nanomedicine* 2014; 4911-4922.
- [150]. Manoochchri S, et al. Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 21-58.
- [151]. Zhao K, et al. Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine. *International Journal of Nanomedicine* 2014; 4609-4619.

[152]. Lalani J, et al. Protein-Functionalized PLGA Nanoparticles of Lamotrigine for Neuropathic Pain Management. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 2014 21:32-46.

[153]. Joshi SA, et al. Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2010; 189-199.

[154]. Yadav KS, Sawant KK. Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation. *Current Drug Delivery* 2010; 51-64.

[155]. Sadat T, et al. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 221-234.

[156]. Gambaryan PY, et al. Increasing the Efficiency of Parkinson's Disease Treatment Using a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Based L-DOPA Delivery System. *Experimental Neurobiology* 2014; 246-252.

[157]. Kolate A, et al. Polymer assisted entrapment of netilmicin in PLGA nanoparticles for sustained antibacterial activity. *Journal of Microencapsulation* 2014; 1-14.

[158]. Musarrat HW, et al. Dorzolamide-loaded PLGA/vitamin E TPGS nanoparticles for glaucoma therapy: Pharmacoscintigraphy study and evaluation of extended ocular hypotensive effect in rabbits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014; 423-431.

[159]. Mingguang Li Z, et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of PLGA nanoparticles with varied mPEG content. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 7:1345-1356.

- [160]. Cunha AS, et al. Insulin in w/o/w multiple emulsions: preparation characterization and determination of stability towards proteases in vitro. *Journal of Microencapsulation* 1997; 3:311-319.
- [161]. Reis CP. (2007) Encapsulação de Fármacos Peptídicos pelo Método de Emulsificação/Gelificação Interna. Tese apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de doutor.
- [162]. Wang W, et al. Microfluidic approach for encapsulation via double emulsions. *Current Opinion in Pharmacology* 2014; 18:35-41.
- [163]. Gaudana R, et al. Encapsulation of Protein-Polysaccharide HIP Complex in Polymeric Nanoparticles. *Journal Drug Delivery* 2011; 1-7.
- [164]. Moraima Morales-Cruz G, et al. Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres. *Results Pharmaceutical Sciences* 2012; 2:79-85.
- [165]. Gajjar RM, Kasting GB. Absorption of ethanol, acetone, benzene and 1,2-dichloroethane through human skin in vitro: a test of diffusion model predictions. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2014 19:54-63.
- [166]. Olivier JC, et al. Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharmaceutical Research* 1999; 16:1836–1842.
- [167]. Dailey L, et al. Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 215:100–108.
- [168]. Sundback CA, et al. Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials* 2005; 26:5454–5464.

[169]. Yeh MK, et al. In vivo and in vitro characteristics for insulin-loaded PLA microparticles prepared by w/o/w solvent evaporation method with electrolytes in the continuous phase. *Journal of Microencapsulation* 2004; 7:719-728.