

Novas Alternativas Terapêuticas Para a Administração Oral da Insulina

Novel therapeutic strategies for oral administration of insulin

Catarina Pinto Reis,¹

¹Departamento de Ciências da Saúde - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Av. do Campo Grande, 376, 1749 - 024 Lisboa - Portugal

Resumo

A Diabetes Mellitus é uma doença metabólica que se caracteriza fundamentalmente pela ausência de produção de insulina (sendo por isso designada de diabetes tipo 1), ou no caso de produzir a hormona, o organismo não consegue utilizá-la eficazmente (neste caso designada de diabetes tipo 2). Trata-se de uma doença em franca expansão e surge nos dias de hoje como uma das grandes preocupações para os profissionais de saúde. O aparecimento das complicações associadas à doença está relacionado com o controlo dos níveis sanguíneos de glucose. Nos casos de total ausência de produção de insulina (diabetes do tipo 1), o controlo da doença engloba injecções de insulina diárias, geralmente mais do que uma vez por dia, aliadas a um exercício físico frequente e a uma alimentação cuidada. Em termos terapêuticos, a insulina continua a ser a única forma de tratamento da diabetes do tipo 1. Até à data, a insulina tem sido administrada exclusivamente pela via parentérica. A investigação nesta doença incide na procura de novas vias de administração alternativas de insulina e na procura de novas terapêuticas com recurso, por exemplo, de implantação de células pancreáticas. Entre as vias de administração alternativas de insulina, destaca-se a investigação na via de administração oral de insulina uma vez que esta é considerada a via mais favorável do ponto de vista do doente mas também porque reproduz mais fielmente o que se passa num indivíduo sem a doença. O presente artigo resume algumas das estratégias que foram investigadas e/ou outras estratégias que ainda se encontram sob investigação nomeadamente as tecnologias que envolvem promotores de absorção, inibidores enzimáticos, células, micro e nanopartículas ou combinações de estratégias anteriores.

Palavras chave: Diabetes, insulina, administração oral, micro e nanotecnologias

Abstract

Diabetes Mellitus is a metabolic disease which is mainly characterized by the lack of insulin production (Type 1 diabetes), or in the case of producing this hormone, body cannot use it effectively (Type 2 diabetes). This is a rapid growing disease and now is considered as a major concern to health professionals. The onset of complications associated with the disease is related to the monitoring of glucose blood levels. In cases of total absence of production of insulin (Type 1 diabetes), the treatment of the disease include daily injections of insulin, usually more than once a day, associated to regular physical exercise and a careful diet. In terms of therapy, insulin remains the only form of control of Type 1 diabetes. Until today, insulin has been administered exclusively through the parenteral route. The research in this disease addresses new alternative routes of administration of insulin and new therapies using, for example, implantation of pancreatic cells. Among the alternative routes of administration of insulin, oral route is still extensively studied since it is considered the most accepted for the patient but also because it reflects more accurately what is happening in a person without the disease. This article summarizes some of the strategies that have been investigated and/or other strategies which are under research including technologies involving promoters of absorption, enzyme inhibitors, cells, micro and nanoparticles or combinations of the previous strategies.

Keywords: Diabetes, insulin, oral administration, micro and nanotechnology

Recebido em 09/10/2008

Aceite em 17/10/2008

Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2008; (5) 2: 174-205

Versão electrónica: <http://revistasaude.ulusofona.pt>

Introdução

A doença Diabetes Mellitus surge quando a produção/acção da insulina é inadequada ou completamente ausente e cujo tratamento/controlo com insulina exógena é complementar ou mesmo obrigatório, isto porque, administração exógena de insulina tem como objectivo obter níveis plasmáticos idênticos aos da secreção fisiológica bimodal em indivíduos não diabéticos. Na ausência ou acção inadequada da insulina, esta doença é, então, caracterizada por níveis sanguíneos elevados de glucose e episódios de cetoacidose. As complicações crónicas da doença incluem a retinopatia diabética, a nefropatia, a neuropatia periférica responsável, por exemplo, por úlceras nos pés e, ainda, disfunções gástricas, intestinais, genito-urinárias e sexuais. A doença também é acompanhada de uma incidência aumentada de aterosclerose cardiovascular, doença cerebrovascular e vascular periférica.

De uma forma muito esquemática, a Diabetes Mellitus pode ser classificada em quatro grandes grupos: tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos específicos associados a certos síndromes ou doenças. Relativamente ao último tipo, este ocorre quando existem situações de defeitos genéticos na função da célula pancreática β , defeitos genéticos na acção da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes induzida por substâncias químicas, formas pouco comuns de diabetes mediada por mecanismos imunes, síndromes genéticas e outras infecções. A Diabetes Mellitus do tipo 1 pode ser mediada imunologicamente ou ser do tipo idiopática. Geralmente, este tipo de diabetes tem início na infância ou na adolescência, mas pode ocorrer em qualquer idade, sendo responsável por 5 a 10% dos casos diagnosticados de diabetes. Caracteriza-se pela ausência total de produção de insulina, devido à destruição das células β pancreáticas, geralmente como resultado de uma resposta auto-imune. Nos doentes diabéticos do tipo 1, a necessidade da insulino-terapia é perpétua, ao contrário do que acontece noutras situações clínicas, em que pode ser transitória. Por este facto, este tipo de diabetes designa-se vulgarmente por Diabetes Mellitus do tipo 1 ou insulino-dependente. A Diabetes Mellitus do tipo 2 surge, normalmente, na fase adulta e considera-se a forma mais comum, constituindo, aproximadamente, 90% dos casos diagnosticados de diabetes. A patogenia deste tipo de diabetes é menos conhecida que a diabetes do tipo 1 mas importa desde logo esclarecer que na diabetes do tipo 2 não se observou, até ao momento presente, qualquer relação com o complexo de histocompatibilidade, nem a existência de mecanismos auto-imunes. Em todo caso deverá existir, à semelhança da diabetes do tipo 1, uma combinação de factores genéticos e ambientais^[1]. A diabetes do tipo 2

Introduction

Diabetes Mellitus disease surges when the production/action of insulin is inadequate or completely absent and whose treatment/control with exogenous insulin is complementary or even mandatory. This is because the aim of exogenous insulin administration is to obtain identical plasma levels to those of bimodal physiological secretion in non-diabetic individuals. In the absence or inadequate insulin action, this disease is characterized by high blood levels of glucose and ketoacidosis episodes. Chronic complications of the disease include diabetic retinopathy, nephropathy, and peripheral neuropathy which, for example, are responsible for foot ulcers and also gastro-intestinal, genital-urinary and sexual dysfunctions. The disease is also accompanied by a higher incidence of cardiovascular atherosclerosis, cerebral vascular and peripheral vascular disease.

Diabetes Mellitus can be classified schematically into four major groups: type 1, type 2, gestational and other specific types associated to certain syndromes or diseases. In relation to the last type, it occurs when there are genetic defects in pancreatic β cell function, insulin action, exocrine pancreatic disease, endocrinopathies, chemical-induced diabetes with substances, less common forms of diabetes mediated by immune mechanisms, genetic syndromes and other infections. Diabetes Mellitus type 1 can be mediated immunologically or be of the idiopathic type. Generally, this type of diabetes begins in childhood or adolescence but may occur at any age and is responsible for 5 – 10% of the cases of diabetes diagnosis. It is characterized by the total absence of insulin production due to the destruction of pancreatic β cells which is generally the result of an autoimmune response. In patients with type 1 diabetes, the need for insulin therapy is perpetual, contrary to what happens in other clinical situations where it can be transitional. For this reason, this type of diabetes is generally designated as Diabetes Mellitus type 1 or insulin-dependent. Diabetes Mellitus type 2 surges at an adult phase and is considered the most common thus constituting approximately 90% of the cases of diabetes diagnosis. A pathogenesis of this type of diabetes is less known than that of type 1 diabetes, but it is important to clarify that in type 2 diabetes there has been no observation until now of any relation to the histocompatibility complex or the existence of autoimmune mechanisms. In any case, there should be, as in type 1 diabetes, a combination of genetic and environmental factors^[1]. Type 2 diabetes is characterized by a decrease in insulin secretion, as illustrated in figure 1, hormone resistance, glucose intolerance and also lipid disorders. The majority of patients with type 2 diabetes do not need insulin therapy in order to survive. This is why this type

caracteriza-se por uma diminuição da secreção de insulina, conforme ilustra a figura 1, resistência à hormona, intolerância à glucose e, ainda, desordens lipídicas. A maioria dos doentes com diabetes do tipo 2 não requer insulino-terapia para sobreviver. Por isso, este tipo de diabetes designa-se vulgarmente por Diabetes Mellitus do tipo 2 ou não insulino-dependente. A terapêutica para estes casos recorre normalmente a antidiabéticos orais. Contudo, a insulino-terapia também pode ser alternativa no caso de falência dos antidiabéticos orais, em situações de intercorrências médicas graves, durante cirurgias, no período pré e pós-operatório e em situações de lesões isquémicas dos membros inferiores^[2].

of diabetes is normally designated as Diabetes Mellitus type 2 or non-insulin-dependent. Therapy for these cases normally resorts to oral antidiabetic drugs. However, insulin therapy may also be an alternative in the case of oral antidiabetic drug failure, in serious medical incidents, during surgery, in the preoperative or postoperative period and ischaemic lesions to the lower limbs^[2].

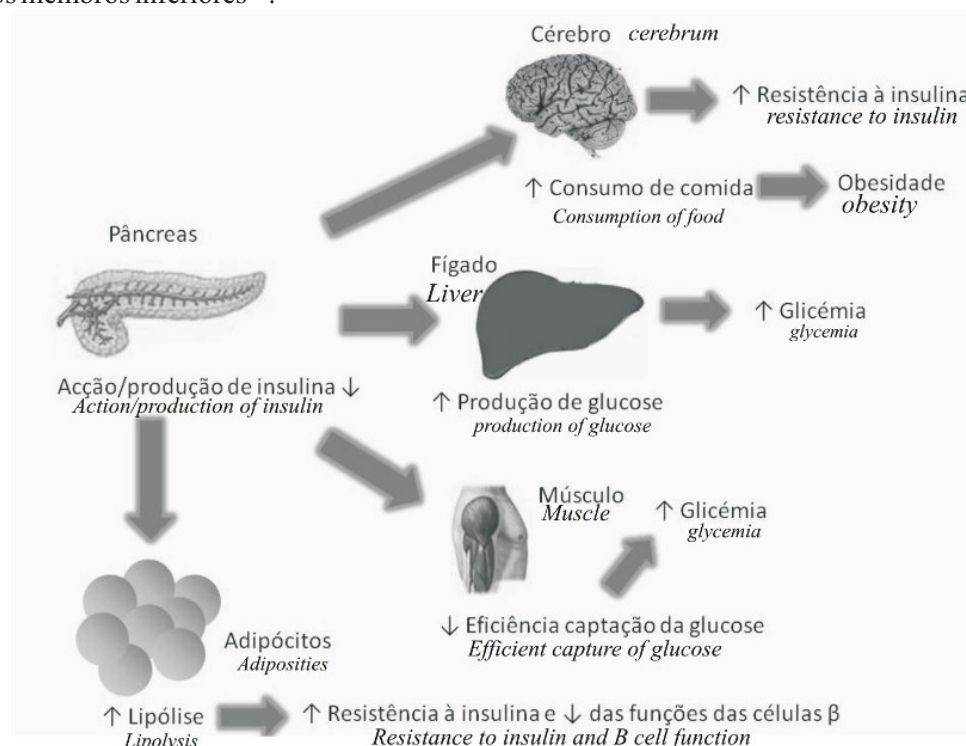


Figura 1- Mecanismos presentes na ausência de produção ou ineficácia da acção de insulina (diabetes do tipo 2).

Figure 1 -Mechanisms present in the absence of production or inefficiency of insulin action (diabetes type 2).

Apesar de décadas de esforços desenvolvidos, não foi, ainda, possível desenvolver uma forma de administração alternativa de insulina suficientemente segura ou eficaz, que substitua a administração parentérica nos diabéticos insulino-dependentes. Geralmente, estes doentes têm de administrar insulina exógena, várias vezes ao longo do dia, para obterem um bom controlo glicémico. Por isso, a investigação da tecnologia farmacêutica aposta em duas grandes abordagens: no prolongamento da actividade insulínica de forma a reduzir o número de doses e na procura de outras vias alternativas de administração. Na primeira situação, têm surgido muitos avanços, uma vez que têm surgido muitos análogos de insulina que diferem entre

In spite of the decades of effort, it still hasn't been possible to develop an alternative route of administration of enough insulin that is adequately safe or effective and that could substitute the parenteral route in insulin-dependent diabetics. Generally these patients have to administer exogenous insulin several times throughout the day to obtain good glycemic control. For that reason, research in pharmaceutical technology bets on two big approaches: prolong insulinic activity in order to reduce the number of doses and search for alternative routes of administration. In this first case, there have been significant advances since many insulin analogues, which are different among themselves mainly in the duration of their

si, fundamentalmente, na duração da sua acção e neste caso as insulinas dividem-se, de modo geral, em insulina de acção rápida, intermédia e lenta ou longa. Na segunda situação, isto é, na procura de outras vias alternativas de administração, os avanços tecnológicos são bem mais discretos.

Breve Noção Histórica da Insulina

A insulina é uma hormona anabólica secretada pelas células dos ilhéus de Langerhans do pâncreas sob a forma de pré-pró-hormona. Como se mostra na figura 2, a pré-pró-insulina é um grande polipéptido constituído por 16 aminoácidos que se repetem, no qual se consideram 3 porções: a cadeia A, que possui 21 aminoácidos com uma ponte dissulfureto intrapeptídica, ligando os 6º e 11º aminoácidos; a cadeia B, que possui 30 aminoácidos, estando ligada à cadeia A por duas pontes dissulfureto situadas entre as posições B7 e A7 e B19 e A20; e a cadeia C ou péptido C, que possui 33 aminoácidos e está intercalado entre as cadeias A e B, ligando-se à posição 1 da cadeia A e à posição 30 da cadeia B. A pré-pró-hormona é sujeita a uma série de quebras de ligação, dando origem à insulina que, por sua vez, é constituída por duas cadeias de aminoácidos A e B interligadas por duas pontes de dissulfureto. De acordo com a figura 3, a insulina é sintetizada como pré-pró-hormona nas células β , que é imediatamente clivada em pró-insulina. Esta é armazenada em vesículas secretoras do aparelho de Golgi, onde se dá a cisão em insulina e péptido C^[1]. Existem estudos que referem que a hormona sofre uma clivagem espontânea, enquanto outros apontam a clivagem como resultado de uma acção enzimática^[3]. Nesta última situação, uma protease específica cliva a molécula e dissocia o péptido C, mantendo apenas as cadeias A e B.

action, generally divide themselves into fast-acting, intermediate-acting, or long-acting insulin. In the second case, that is, in the search for alternative routes of administration, technological advances have been much more discreet.

Brief Historical Overview of Insulin

Insulin is an anabolic hormone secreted by the cells of the islets of Langerhans in the pancreas in the form of a preprohormone. As shown in figure 2, the preprohormone is a larger polypeptide constituted by 16 amino acids that repeat themselves and where three portions are considered: the A chain, which possesses 21 amino acids with an intrapeptide disulfide bridge, binds the 6th and 11th amino acids; the B chain, which possesses 30 amino acids, is linked to the A chain by two disulfide bridges between positions B7 and A7 and B19 and A20; and the C chain or C-peptide, which possesses 33 amino acids, is in-between the A and B chains, and is linked to position 1 of the A chain and position 30 of the B chain. The preprohormone is subjected to a series of connection breaks, thus giving origin to the insulin which is then constituted by A and B amino acids that are interlinked by two disulfide bridges. In accordance with figure 3, insulin is synthesized as a preprohormone in the β cells which is immediately cleaved in proinsulin. This is stored in the Golgi apparatus secretion vesicles where the insulin and C-peptide split occurs^[1]. There are some studies which state that the hormone suffers a spontaneous cleavage, while others point to the cleavage as a result of an enzymatic action^[3]. In this last situation, a specific protease cleaves the molecule and dissociates the C-peptide, leaving only the A and B chains.

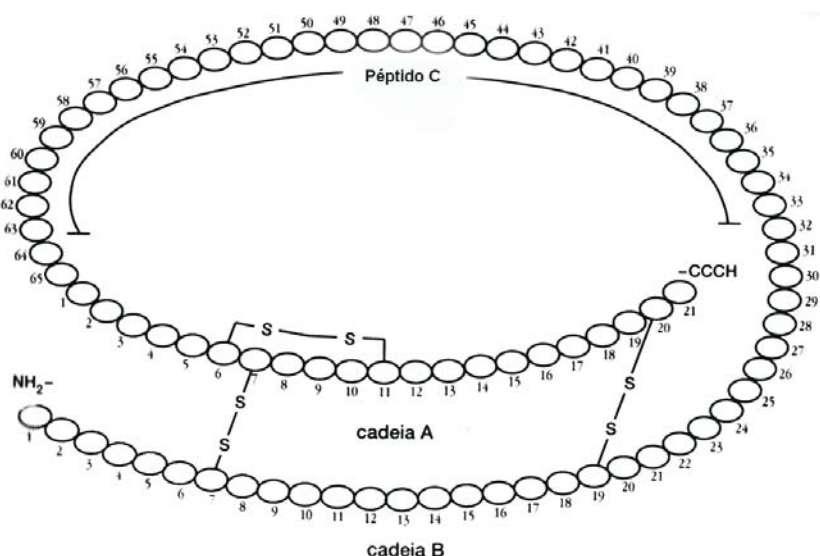


Figura 2- Representação esquemática da molécula de pré-pró-insulina^[2].
Figure 2 - Schematic representation of the preproinsulin molecule^[2].

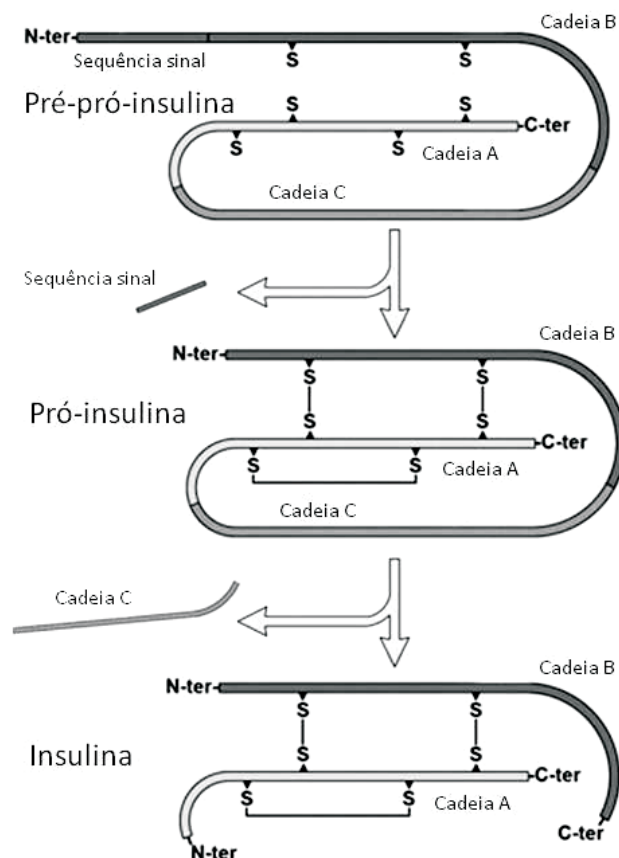


Figura 3- Síntese da insulina (adaptado de www.betacell.org).

Figure 3 - Insulin synthesis (adapted from www.betacell.org).

Em termos históricos, em 1889, Von Mering e Minkowski demonstraram que a pancreatectomia produzia, no cão, um síndrome semelhante à Diabetes Mellitus do ser humano, com polúria, polifagia, cetose, dificuldade de cicatrização e infecções várias. A descoberta da insulina e o início do seu uso na terapêutica da Diabetes Mellitus foi um dos marcos da medicina do século passado. Esta descoberta foi atribuída a Banting e Best que demonstraram, em 1921-1922, a acção terapêutica de um princípio activo, extraído do pâncreas, sobre cães e, posteriormente, em pessoas diabéticas. Foi também nos anos 20 que se obteve a forma cristalizada de insulina. Nos anos 50, Sanger estabeleceu a sequência de aminoácidos das duas cadeias de insulina e, por esse facto, ganhou o prémio Nobel da Química. Mais tarde, Katsoyannis conseguiu sintetizar a insulina [2].

A partir daqui, o estudo da molécula de insulina manteve-se na vanguarda da investigação médica e biotecnológica. Nesse campo, a investigação da insulina tem evoluído, fundamentalmente, em dois sentidos: a purificação da insulina e a obtenção de modos de acção/administração alternativos. Relativamente à purificação da insulina, os primeiros tipos baseavam-se em extractos pancreáticos do boi e

Historically speaking, in 1889, Von Mering and Minkowski showed that pancreatectomy produced in dogs a similar syndrome to Diabetes Mellitus in human beings with polyuria, polyphagy, ketose, wound-healing difficulties and several infections. The discovery of insulin and the start of its usage in treating Diabetes Mellitus was one of the achievements of medicine in the past century. This discovery was attributed to Banting and Best who showed, in 1921-1922, the therapeutic action of an active principal extracted from the pancreas of dogs and later in diabetic people. It was also during the 20s that the crystallized form of insulin was obtained. In the 50s, Sanger established the amino acid sequence of two insulin chains and for that won the Nobel Prize in Chemistry. Later, Katsoyannis was able to get insulin synthesis [2].

From this time onwards, the study of insulin molecule was at the vanguard of medical and biotechnical research. In this field, insulin research has primarily evolved in two directions: insulin purification and obtaining alternative modes/actions of administration. In relation to insulin purification, the first types were based on an ox and pig's pancreatic extracts. In fact, there is a huge similarity among human, porcine and bovine insulin. Porcine insulin differs from human

do porco. De facto, existe uma semelhança muito grande entre a insulina humana, suína e bovina. A insulina suína difere da insulina humana em um único aminoácido (substituição na insulina humana da treonina pela alanina na posição B30), enquanto a bovina tem a mesma modificação mais as duas substituições na insulina humana (treonina por alanina em A8 e isoleucina por valina em A10)^[2]. Além disso, o PM da insulina humana (PM = 5,808 kDa) é diferente da insulina do boi e do porco, sendo 5,734 e 5,778 kDa, respectivamente. Mais tarde, com as técnicas de biotecnologia e genética, foi possível a obtenção de insulina mais pura e com menos efeitos secundários, que estão normalmente associados às insulinas de origem animal. Os anos 80 trouxeram a chamada insulina humana e, mais recentemente, a insulina obtida através de técnicas de ADN recombinante (insulina bio sintética) ou através da modificação enzimática da insulina do porco (insulina semi-bio sintética), substituindo, nesta última, o único aminoácido que é diferente na insulina do porco e do homem na cadeia B. Nos anos 90, através dos avanços da genética, desenvolveram-se análogos da insulina, por meio de mutações na molécula da insulina que alteraram a sua farmacocinética. Quanto à duração da acção da insulina, conseguiram-se desenvolvimentos significativos, nomeadamente ao prolongar essa duração através da adição de zinco ou protamina, uma vez que a aplicação destes compostos altera o estado de associação da insulina. Outros aspectos relacionados com a melhoria da farmacocinética de insulina foram também alvo de investigação. Quanto às formas de administração de insulina, existe, ainda, uma grande insatisfação, pois a via subcutânea (s.c.) continua a ser a única via de administração utilizada na terapêutica da Diabetes Mellitus.

Clinicamente, a administração s.c. de insulina não reproduz a insulina fisiológica hepática e a da circulação sistémica. Num indivíduo normal, a insulina é secretada rapidamente, como resposta metabólica ao aumento de glucose no sangue após ingestão de comida, directamente para a veia porta e desta para o local primário da acção da insulina – o fígado. As concentrações hepáticas de insulina são francamente superiores às sistémicas. Quando a insulina é injectada pela via s.c., apenas 20% da insulina inicial alcança o fígado, uma vez que esta é libertada na circulação sistémica e é necessário um período de tempo para a sua dissolução e difusão, sendo este período de tempo independente da concentração de glucose no sangue. Dessa forma, podem ocorrer os casos de hipoglicémia. A administração de insulina pela via s.c. pode conduzir ainda a inúmeros efeitos adversos, nomeadamente, efeitos adversos alérgicos. Inicialmente, alguns dos efeitos adversos alérgicos da insulina estavam relacionados com o grau de purificação e origem

insulin in a single amino acid (substitution of threonine for alanine in position B30 in human insulin), while the bovine has the same modification plus two substitutions in human insulin (threonine for alanine in position A8 and isoleucine for valine in position A10)^[2]. In addition to that, the Mw in human insulin (Mw = 5,808 kDa) is different from ox and pig insulin which are 5,734 and 5,778 kDa, respectively. Later on, with the use of biotechnical and genetic techniques, it was possible to obtain a purer insulin with fewer secondary effects which are normally associated to insulin from animal origin. The 80s brought the term human insulin, and more recently, insulin obtained through recombinant DNA techniques (biosynthetic insulin) or through enzymatic modification of pig insulin (semi-biosynthetic insulin), which substitutes, in the latter, the only amino acid that is different in the pig and human insulin in the B chain. In the 90s, through genetic advances, insulin analogues were developed through insulin molecule mutations that altered its pharmacokinetics. Regarding the duration of the insulin action, significant developments were achieved, mainly by prolonging duration through the addition of zinc or protamine, since the applications of these compounds alter the state of insulin association. Other aspects related to the improvement of insulin pharmacokinetics were also the target of research. Concerning insulin administration routes, there is still a big dissatisfaction, since the subcutaneous route (s.r.) continues to be the only administration route used in treating Diabetes Mellitus.

Clinically speaking, the s.r. administration of insulin does not reproduce hepatic physiological insulin and systemic circulation. In a normal individual, the insulin is quickly secreted, as a metabolic response to the increase of glucose in the blood after food ingestion, directly to the portal vein and from here to the primary location of insulin action – the liver. The hepatic concentrations of insulin are frankly superior to the systemic ones. When the insulin is injected through s.r., only 20% of the initial insulin reaches the liver since it is liberated in the systemic circulation and it is necessary to have a period of time for its dissolution and diffusion, which is independent from the concentration of glucose in the blood. This is how cases of hypoglycemia may occur.

Insulin administration through s.r. may also lead to innumerable side effects, namely allergic adverse effects. Initially, some of the allergic adverse effects of insulin were related to the degree of purification and the animal origin of the insulin. Currently, these problems are not raised. However, local allergic phenomena may be more frequent with insulin in suspension. What's more there may be cases of hypersensitivity to zinc and protamine even though they are rare.

animal da insulina. Actualmente, estes problemas não se colocam. No entanto, os fenómenos alérgicos locais poderão ser mais frequentes com insulinas em suspensão. Além disso e apesar de raros, podem ocorrer casos de hipersensibilidade ao zinco e à protamina.

Um outro efeito adverso associado à terapia insulínica por via s.c. relaciona-se com a ocorrência de lipoatrofias^[2]. A insulina pode provocar a perda de tecido s.c. nas áreas de injeção repetida. Podem também ocorrer situações extremamente raras, tais como as reacções alérgicas generalizadas. Caracterizam-se por uma reacção anafilática e ocorre geralmente em indivíduos que retomam a insulino-terapia após a terem abandonado temporariamente^[2]. Efeitos adversos que ainda são comuns na prática clínica são o aparecimento de zonas de lipohipertrofia e, mais raramente, edemas insulínicos. A primeira situação acontece devido às injeções locais repetidas que promovem o aumento de gordura no tecido s.c. e, o subsequente desenvolvimento de adiposidades localizadas, isto porque, como a injeção repetida num determinado local se torna indolor, o doente diabético tem a tendência para continuar a injectar nessa área. A absorção de insulina nesta área lipohipertrofica é errática e a sua acção é menos potente, visto a insulina actuar localmente como factor lipogénico local. Os edemas insulínicos, apesar de raros, ocorrem no início ou reinício da terapêutica insulínica em indivíduos com largo período de descontrolo glicémico. A etiologia destes edemas está relacionada com um período prévio de desidratação crónica provocada por um estado permanente de hiperglicémia^[2]. Por último, do ponto de vista do doente, a administração s.c. traz variadíssimas complicações associadas ao desconforto psicológico. Vejamos que, se um paciente diabético precisar de administrar diariamente insulina s.c. para obter um bom controlo glicémico (por exemplo 4 i.d.), este regime corresponderá a cerca de 1500 injeções ao final de um ano. Esta via de administração não é, claramente, a primeira escolha do paciente.

Novas Alternativas Terapêuticas para a Administração Oral da Insulina

A obtenção de uma forma farmacêutica oral de insulina seria, certamente, uma grande contribuição para o tratamento da Diabetes Mellitus e, mesmo que não substituisse a terapia parentérica na sua totalidade, poderia em última instância, complementá-la. A importância da insulina oral é enorme e estende-se a vários níveis. Para além do aumento da adesão à terapêutica, por ser considerada do ponto de vista do doente uma via de administração mais cómoda, a insulina exógena administrada oralmente iria assemelhar-se, em todos os aspectos, à insulina

Another adverse effect associated to insulinic therapy through s.r. is related to the occurrence of lipoatrophies^[2]. The insulin may provoke a loss of s.r. tissue in the areas of repeated injection. Extremely rare situations may also occur, such as general allergic reactions. They are characterized by an anaphylactic reaction and generally occur in individuals who resume insulin therapy after having temporarily abandoned it^[2]. Other adverse effects which are still common in clinical practice are the appearance of lipohypertrophy zones, and more rarely, insulin edemas. The first situation occurs due to repeated local injections that promote the increase of fat in the s.r. tissue and the subsequent development of localized adiposis. This happens because the repeated injection in a given place becomes painless and the diabetic patient has the tendency of continuously injecting in that area. Insulin absorption in this lipohypertrophic area is erroneous and its action is not as potent since the insulin acts as a local lipogenic factor. The insulin edemas, even though rare, occur at the start or restart of insulinic therapy in individuals with long periods of poor glycemic control. The etiology of these edemas is related to a previous period of chronic dehydration provoked by a permanent state of hyperglycemia^[2]. Lastly, from the patient's point of view, s.r. administration brings several complications associated to psychological discomfort. If we look at a diabetic patient who needs a daily administration of s.r. insulin to obtain good glycemic control (for example, 4 i.d.), which corresponds to about 1500 injections at the end of a year, we understand that this administration route is clearly not the patient's first choice.

Novel Therapeutic Strategies for the Oral Administration of Insulin

Obtaining an oral pharmaceutical insulin delivery would certainly make a big contribution to the treatment of Diabetes Mellitus. Even if it didn't substitute parenteral therapy in its entirety, it could at least complement it. The importance of oral insulin is enormous and extends to various levels. In addition to the increase of adhesion to the therapy, since it is considered from the patient's point of view as a more comfortable route of administration, the exogenous insulin that is administered orally would resemble, in all aspects, physiological insulin in healthy individuals^[4]. Physiologically, the insulin absorbed by the intestine would be sent to the liver where it would play a fundamental role in the glucose metabolism, according to mechanisms very similar to the physiological state in individuals without the disease^[5]. In addition to that, the oral administration of insulin has also showed other

fisiológica em indivíduos saudáveis ^[4]. Fisiologicamente, a insulina absorvida pelo intestino, seria reencaminhada até ao fígado onde exerceria um papel fundamental no metabolismo da glucose, segundo mecanismos muito semelhantes ao estado fisiológico de indivíduos sem a doença ^[5]. Para além disso, a administração oral de insulina tem ainda demonstrado outros efeitos benéficos, nomeadamente na alteração da resposta imunitária, que é responsável pela destruição das células pancreáticas em doentes diabéticos ^[6].

Infelizmente, o objectivo anterior não é fácil de alcançar devido à sensibilidade às enzimas presentes ao longo do tracto gastrointestinal (TGI), a fraca permeabilidade intestinal e a própria instabilidade físico-química da proteína. Ao longo dos tempos, têm sido utilizadas diversas estratégias para administrar oralmente a insulina: inibidores enzimáticos, promotores de absorção, sistemas bioadesivos, lipossomas, micro e nanopartículas, modificação química da molécula de insulina, etc. Estas estratégias, até ao momento, têm obtido um sucesso muito discreto, mas quando associadas entre si, esse sucesso tem-se revelado bem mais expressivo. Os últimos desenvolvimentos tecnológicos ^[7] são prova disso e envolvem grandes companhias farmacêuticas, como a Emisphere Technologies, Inc., a Nobex Corporation, a AutoImmune, a Cortec, a Unigene Lab, etc.

A primeira estratégia para a insulina oral foi desenvolvida por Saffran e colaboradores ^[8], quando foram administradas doses elevadas de soluções de insulina a ratos diabéticos. Os níveis de glicémia diminuíram, mas os ratos tornaram-se hiperfágicos e perderam peso corporal. O mecanismo de acção da insulina proposto neste estudo foi baseado numa diminuição da motilidade gastrintestinal, da digestão e da absorção através da diminuição do fluxo sanguíneo do intestino para o fígado. Um outro estudo demonstrou um resultado ligeiramente diferente; observou-se um efeito benéfico da insulina oral apenas em termos de evolução da patologia diabética mas sem qualquer efeito nos níveis de glicémia ^[9].

De seguida, serão apresentados diversos estudos que se encontram organizados de acordo com o tipo de estratégia utilizada. A descrição não engloba todos os estudos que envolveram a administração oral de insulina, mas seleccionaram-se os mais relevantes na área.

Inibidores enzimáticos

Os inibidores enzimáticos são considerados estratégias muito úteis na administração oral de insulina. A insulina, tal como acontece com outros fármacos peptídicos, é degradada pelas enzimas presentes no TGI. A selecção do inibidor enzimático depende tanto

beneficial effects, namely in the alteration of immunity response which is responsible for the destruction of pancreatic cells in diabetic patients ^[6].

Unfortunately, the above mentioned aim is not easy to attain given the sensibility of the enzymes present throughout the gastrointestinal tract (GIT), weak intestinal permeability and the physicochemical instability of the protein itself. Throughout time, diverse strategies to orally administer insulin have been used: enzymatic inhibitors, absorption promoters, bioadhesive systems, liposomes, micro- and nanoparticles, chemical modification of insulin molecule, etc. These strategies have obtained until now a very discreet success, but when associated among themselves, this success reveals itself as being much more expressive. The latest technological developments ^[7] are proof of that and involve big pharmaceutical companies, such as Emisphere Technologies, Inc., Nobex Corporation, AutoImmune, Cortec, Unigene Lab, etc.

The first strategy for oral insulin was developed by Saffran and collaborators ^[8], when high doses of insulin solutions were administered to diabetic rats. The levels of glycemia decreased, but the rats became hyperphagic and lost body weight. The action mechanism of the insulin proposed in that study was based on a decrease of gastrointestinal motility, digestion and absorption through the decreased blood flow from the intestine to the liver. Another study showed a slightly different result; a beneficial effect of oral insulin was observed only in terms of the evolution of diabetic pathology but without any effect at the levels of glycemia ^[9].

Several studies will now be presented which are organized according to the type of strategy used. The description does not include all of the studies that involved oral administration of insulin, but rather is based on a selection of the most relevant ones in the area.

Enzymatic inhibitors

Enzymatic inhibitors are considered as very useful strategies for the oral administration of insulin. The insulin, just as it happens in other peptide drugs, is degraded by the enzymes present in the GIT. The selection of the enzymatic inhibitor depends on both the type of peptide drug and enzymes to inhibit.

Ziv and collaborators studied the effect of sodium collate and aprotinin in a solution containing insulin. This solution was injected in the ileum of rats and increased the intestinal absorption of the insulin ^[10]. Another study used acarbose as an inhibitor of intestinal α -glucosidase and observed a positive effect in diabetic animals ^[11]. The same occurred with a specific

do tipo de fármaco peptídico a proteger como do tipo de enzimas a inibir.

Ziv e colaboradores estudaram o efeito do colato de sódio e da aprotinina numa solução contendo insulina. Esta solução foi injectada no íleo de ratos e aumentou a absorção intestinal da insulina^[10]. Um outro estudo usou a acarbose como inibidor da α -glucosidase intestinal e observou-se um efeito positivo em animais diabéticos^[11]. O mesmo aconteceu com um inibidor específico da quimiotripsina FK-448 associado à quimostatina^[12]. Contudo, resultados obtidos em outros estudos revelaram que, a acção dos inibidores enzimáticos nem sempre foi previsível e eficaz. Por exemplo, um estudo que envolveu o inibidor da tripsina de soja fundamenta a observação anterior^[12].

Apesar de terem surgido resultados discordantes entre si, foram-se desenvolvendo muitos outros estudos que envolveram outros inibidores de enzimas, sendo eles a aprotinina ou o inibidor Bowman-Birk^[13, 14]. Um outro estudo consistiu na co-administração da aprotinina e do inibidor da tripsina de soja, aprotinina isolada ou a combinação de mesilato de camostato com a bacitracina. Esta última estratégia revelou-se mais eficaz na redução da glicémia, comparativamente com as outras estratégias^[15].

A partir deste, muitos têm sido os trabalhos que envolvem inibidores enzimáticos e sistemas poliméricos e que têm demonstrado um aumento da absorção intestinal da insulina, quando administrada oralmente. Por exemplo, o grupo pioneiro de Morishita e colaboradores desenvolveu uma formulação de microesferas de insulina contendo aprotinina^[16]. A seguir a este, foram surgindo outros trabalhos nesta área mas que usaram cápsulas de gelatina contendo colato de sódio e revestidas com Eudragit® S100 [17]; nanocápsulas de policianoacrilatos (PACA) dispersas em meio oleoso contendo o poloxamer 188 e o ácido deoxicólico^[18] e microesferas de N-8[2-(hidroxibenzoílo) amino] caprilato de sódio^[19].

A associação de inibidores enzimáticos também se tem revelado uma boa estratégia. Um trabalho desenvolvido por Marschütz e colaboradores^[20] associou diversos inibidores enzimáticos e demonstrou que a formulação em causa foi eficaz na redução da glicémia por mais de 72 h e não causou danos a nível das células intestinais.

Para além das cápsulas e microesferas, também foram utilizados pellets em associação com inibidores enzimáticos. Os pellets contendo insulina revestidos com azopolímeros e mesilato de camostato, conduziram a uma redução nos níveis de glicémia em ratos^[21]. Também a associação de inibidores enzimáticos com os lipossomas se revelou vantajosa^[22]. Foi ainda demonstrado que o tipo de inibidores enzimáticos influencia a sua eficácia. O trabalho desenvolvido por Agarwal e colaboradores^[23, 24]

inibitor of chymotrypsin FK-448 associated to the chymostatin^[12]. However, the results obtained in other studies revealed that the action of the enzymatic inhibitors was not always predictable and effective. For example, a study that involved a soy trypsin inhibitor founds the previous observation^[12].

Even though many conflicting results have surged, many other studies that involved other enzymatic inhibitors were developed, such as the aprotinin or the Bowman-Birk inhibitor^[13, 14]. Another study consisted in the co-administration of aprotinin and soy trypsin inhibitor, isolated aprotinin or a combination of camostate mesylate with bacitracin. This last strategy revealed to be more effective in the reduction of glycemia in comparison with other strategies^[15].

There has been a lot of other research based on this strategy involving enzymatic inhibitors and polymeric systems which have shown an increase in the intestinal absorption of insulin when administered orally. For example, the pioneer group Morishita and collaborators developed a formulation of insulin microspheres containing aprotinin^[16]. After this group, other research in the area has surged using gelatin capsules containing sodium collate and coated with Eudragit® S100^[17]; nanocapsules of polycyanoacrylates (PACA) dispersed in an oily environment containing poloxamer 188 and deoxycholic acid^[18] and microspheres N-8[2-(hydroxybenzoyl) amino] sodium caprylate^[19].

The association of enzymatic inhibitors has revealed itself as a good strategy. Research carried out by Marschütz and collaborators^[20] associated several enzymatic inhibitors and showed that the formulation was effective in the reduction of glycemia for more than 72 hours and did not cause any damage at the level of intestinal cells.

In addition to the capsules and microspheres, pellets were also used in association with enzymatic inhibitors. The pellets containing insulin and coated with azopolymers and camostate mesylate, led to a reduction of glycemic levels in rats^[21]. The association of enzymatic inhibitors to the liposomes also revealed to be advantageous^[22].

Another type of enzymatic inhibitor also showed to have an effective influence. The work developed by Agarwal and collaborators^[23, 24] involved polymethacrylate based microparticulates (PEC), containing chicken and duck ovomucoids as enzymatic inhibitors. It was observed that the chicken ovomucoid was ineffective in the chymotrypsin inhibition, while the duck ovomucoid was effective for the same enzyme. Curiously, the association of these two enzymatic inhibitors revealed to be effective in trypsin inhibition^[25]. This glycoprotein of duck ovomucoid was also used later on in hydrogel insulin^[26].

However, the chronic use of enzymatic inhibitors may

envolveu micropartículas de polietilcianoacrilato (PECA), contendo ovomucóides de galinha e de pato como inibidores enzimáticos. Observou-se que o ovomucóide de galinha foi ineficaz na inibição da quimiotripsina, enquanto que o ovomucóide de pato foi eficaz para a mesma enzima. Curiosamente, a associação destes dois inibidores enzimáticos revelou-se eficaz na inibição da tripsina^[25]. Esta glicoproteína da ovomucóides de pato foi ainda utilizada, mais tarde, num hidrogel de insulina^[26].

Porém, o uso crónico dos inibidores enzimáticos pode conduzir a uma toxicidade provocada pela sua inespecificidade. De facto, estes agentes, se não forem absorvidos, podem inibir as enzimas digestivas e alterar a digestão de outras proteínas como, por exemplo, as nutritivas^[27]. Por outro lado, se forem absorvidos, a sua absorção pode resultar numa toxicidade sistémica^[28]. Além disso, a acção inibitória dos inibidores enzimáticos pode aumentar a secreção das enzimas inibidas por um mecanismo de feedback negativo e originar efeitos secundários severos, como as intoxicações sistémicas ou como os casos de hipertrofia e hiperplasia do pâncreas^[29].

Promotores de absorção

O promotor de absorção é um agente capaz de aumentar a absorção intestinal de fármacos, pelas vias transcelular e paracelular. A promoção da absorção intestinal pode ocorrer por alteração estrutural da mucosa e membranas epiteliais ou, simplesmente, através da difusão do próprio fármaco através da membrana intestinal^[30]. Os promotores de absorção incluem os ácidos gordos^[31], os sais biliares, o ácido 5-metoxisalicílico^[32], Labrasol® (Gattefossé, NJ, EUA)^[33], polietilenoglicol (PEG)^[34] e agentes quelantes como, por exemplo, o ácido etilendiaminotetracético (EDTA), entre outros. Alguns deles são considerados tóxicos, principalmente, o dodecilsulfato de sódio, o EDTA e o desoxicolato de sódio^[30]. Outros, como o glicolato de sódio, o caprato de sódio e o n-lauril-β-D-maltopiranosídeo têm vindo a receber mais atenção como promotores de absorção da insulina devido à sua baixa toxicidade^[35,36].

Para a administração da insulina, os promotores de absorção mais usados têm sido os sais biliares, o EDTA e o citrato trisódico apesar dos geles de agentes emulsivos não iónicos também terem demonstrado um aumento da permeabilidade da insulina em ratos^[37].

Tal como sucedeu com os inibidores enzimáticos, a associação de estratégias com promotores de absorção também se revelou vantajosa, designadamente a associação de ácido gordo-éter gordo de polioxialquilenos (Brij®) e ácido esteárico^[38]. Em termos de combinação de estratégias, observou-se também que cápsulas de gelatina, contendo laurato de

lead to toxicity provoked by its unspecificity. In fact, if these agents are not absorbed, they may inhibit the digestive enzymes and alter the digestion of other proteins such as nutritious proteins^[27]. On the other hand, if they are absorbed, its absorption may result in systemic toxicity^[28]. Besides that, the inhibitory action of enzymatic inhibitors may increase enzyme secretion inhibited by a mechanism of negative feedback and originate severe secondary effects, such as systemic intoxication as well as cases of hypertrophy and hyperplasia of the pancreas^[29].

Absorption promoters

An absorption promoter is an agent capable of increasing the intestinal absorption of drugs through the transcellular and paracellular routes. The promotion of intestinal absorption may occur through a structural alteration of the mucosa and epithelial membranes or simply through the diffusion of the drug itself through the intestinal membrane^[30]. Absorption promoters include fatty acids, bile minerals, 5-methoxysalicylate acid^[32], Labrasol® (Gattefossé, NJ, USA)^[33], polyethylenoglycol (PEG)^[34] and chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), among others. Some of them are considered as toxic, mainly sodium dodecyl sulfate, EDTA, and sodium desoxycholate^[30]. Others, like sodium glycolate, sodium caprate and n-lauril-β-D-maltopyranoside have had some attention as insulin absorption promoters due to their low toxicity^[35,36].

For insulin administration, the most commonly used absorption promoters have been bile minerals, EDTA and trisodium citrate even though the gels of nonionic emulsion agents have also shown an increase in insulin permeability in rats^[37].

As had occurred with enzymatic inhibitors, the association between absorption promoters and strategies has also shown to be advantageous, namely in the association of fatty acids-polyoxyalkylene ether (Brij®) and stearic acid^[38]. In terms of combining strategies, it was also observed that gelatin capsules, containing sodium laurate in an oily environment increased the bioavailability of insulin from 9.3 to 12.7%^[39]. However, there was a different result with the Brij® and hydroxypropylcellulose association. This system was not effective in reducing glycemia in rabbits. Other studies surged and these involved other strategy combinations, such as the usage of two absorption promoters (Brij® 35 and sodium salicylate) and two polymers (cellulose and hydroxypropylcellulose)^[40]. In this last study, the glycemic effect was dependent on the viscosity level of hydroxypropylcellulose.

sódio em meio oleoso, aumentaram a biodisponibilidade da insulina de 9,3 para 12,7% [39]. Porém, foi obtido um resultado diferente com a associação Brij® com hidroxipropilcelulose. Este último sistema não foi eficaz na redução da glicemia em coelhos. Outros estudos surgiram e estes envolveram outras combinações de estratégias, tais como a utilização de dois promotores de absorção (Brij® 35 e salicilato de sódio) e de dois polímeros (celulose e hidroxipropilcelulose) [40]. Neste último estudo, observou-se que o efeito na glicemia foi dependente do grau de viscosidade da hidroxipropilcelulose.

Um estudo que merece particular atenção foi desenvolvido por Hosny e colaboradores [41], onde que foram utilizadas cápsulas de gelatina contendo salicilato de sódio, como promotor de absorção, e revestidas com uma mistura de vários tipos de Eudragit®. A dose administrada de insulina foi de 13,2 a 15,3 UI/kg e a biodisponibilidade observada foi de 13,26 a 14,15%, relativamente à injeção intraperitoneal (i.p.).

Uma outra estratégia para promover a absorção da insulina foi a aplicação de uma toxina designada por zonula occludens toxin (ZOT). Num estudo desenvolvido por Fasano e Uzzau, observou-se que a ZOT aumentou a permeabilidade intestinal da insulina, aumentando a sua biodisponibilidade de 8 para 16% [42]. A seguir a este estudo, muitos outros se desenvolveram e, os dados obtidos até ao momento mostram que ZOT é uma alternativa muito promissora para aumentar a absorção de insulina ou mesmo de outras proteínas [43].

Apesar de terem sido alcançados ótimos resultados com os promotores de absorção, a verdade é que, duma forma geral, estes agentes podem conduzir a uma alteração do tecido intestinal. Um estudo onde foram observados danos intestinais confirmou esta afirmação, mas tal facto ocorreu de uma forma não consistente [44]. Por este motivo, a problemática da toxicidade dos promotores de absorção tem sido alvo de debate. Por exemplo, um estudo desenvolvido por Suzuki e colaboradores [45] incidiu num estudo in situ de uma emulsão contendo ácido docosahexanóico em intestinos de ratos e demonstrou que, realmente, a absorção de insulina aumentou sem este causar danos nas células epiteliais do intestino. Pelo contrário, um outro estudo, que envolveu a aplicação de alquilglicósidos como promotores de absorção, mostrou diversas desvantagens devido aos danos causados nas membranas celulares [46]. Num outro estudo, onde foi testada a acção promotora de absorção e a potencial toxicidade em ratos do glicolato de sódio, taurocolato de sódio, deoxicolato de sódio, EDTA, salicilato de sódio, caprato de sódio, maleato de dietilo e mistura de micelas, observou-se que apenas o glicolato de sódio e o taurocolato de sódio mostraram

A study that deserves particular attention was developed by Hosny and collaborators [41], where gelatin capsules containing sodium salicylate were coated with a mixture of several types of Eudragit® and were used as an absorption promoter. The administered dose of insulin was 13.2 to 15.3 UI/kg and the bioavailability observed was 13.26 to 14.15%, in relation to the intraperitoneal (i.p.) injection.

Another strategy to promote insulin absorption was the application of a toxin designated as zonula occludens toxin (ZOT). In a study developed by Fasano and Uzzau, the ZOT increased the intestinal permeability of insulin, thus raising its bioavailability from 8 to 16% [42]. After this study, many others were developed and the data obtained until now shows that ZOT is a promising alternative for the increase of insulin absorption or even other proteins [43].

Even though great results were obtained with the absorption promoters, the truth is that in a general way these agents can lead to the alteration of intestinal tissue. A study that observed intestinal damage confirmed this affirmation, but that fact was not consistent [44]. For that reason, the problem of toxicity in absorption promoters has been the target of much debate. For example, a study developed by Suzuki and collaborators [45] was based on an in situ study of an emulsion containing docosahexaenoic acid in the intestines of rats and really showed that the absorption of insulin increased with it causing damage to the intestine's epithelial cells. However, another study that involved the application of alkylglycosides as absorption promoters showed several disadvantages due to the damage caused in the cellular membranes [46]. In yet another study, where the action of an absorption promoter was tested, the potential toxicity of sodium glycholate, sodium taurocholate, sodium deoxycholate, EDTA, sodium salicylate, sodium caprate, diethyl maleate, and micelle mixture in rats was observed. It showed that only sodium glycholate and sodium taurocholate had low levels of toxicity and acted as effective absorption promoters in phenol red [47].

Other compounds described in literature that presented a promotion of insulin absorption were the cyclodextrins [48-50] and, more recently, the peptides designated as cell-penetrating peptides [5]. The latter increased in about six to eight times the intestinal transport of insulin in Caco-2 cell cultures, in relation to normal insulin. However, this increase in intestinal transport does not ensure that a determined agent may effectively increase the bioavailability of a drug. Moreover, assuming that the lypophilic modification can favor the passage of insulin through the intestinal mucosa, several derivatives of chemically modified insulin by acylation of fatty acids or conjugation with polymers have been tested but many of them have

níveis baixos de toxicidade e actuaram como promotores eficazes da absorção do vermelho de fenol ^[47].

Outros compostos descritos na literatura e que apresentaram uma acção promotora de absorção da insulina foram as ciclodextrinas ^[48-50] e, mais recentemente, os péptidos designados por cell-penetrating peptides ^[5]. Estes últimos aumentaram cerca de seis a oito vezes o transporte intestinal da insulina em culturas celulares Caco-2, relativamente à insulina normal. Contudo, este aumento de transporte intestinal não assegura que um determinado agente possa, efectivamente, aumentar a biodisponibilidade de um fármaco. Além disso, assumindo que a modificação da lipofilia possa favorecer a passagem de insulina através da mucosa intestinal, diversos derivados da insulina quimicamente modificados por acilação de ácidos gordos ou por conjugação com polímeros têm vindo a ser testados, mas muitos deles têm-se revelado ineficazes no aumento da absorção intestinal da insulina ^[5]. Um dos poucos estudos em humanos que demonstrou um resultado contrário, isto é, observando-se um aumento da absorção de insulina foi através da aplicação do N-8[2-hidroxibenzoílo) amino] caprilato de sódio ^[5].

Um dado importante na utilização destes promotores de absorção prende-se com o facto de, apesar de aumentarem a permeabilidade do fármaco alvo, estes agentes também aumentam a permeabilidade de outras substâncias, tais como vírus e bactérias, o que pode levar a efeitos secundários adversos. Uma outra preocupação associada à aplicação de agentes promotores de absorção relaciona-se com a possível alteração da superfície da estrutura lipídica das membranas celulares. Por isso, é necessário que, no momento da selecção do promotor de absorção se questione o tipo de mecanismo envolvido bem como a potencial toxicidade que lhe possa estar associada.

Lipossomas

Os lipossomas são pequenas esferas de fosfolípidos cuja estrutura se assemelha à das membranas celulares. Tratam-se de pequenas vesículas constituídas por uma ou mais camada lipídica alternada com compartimentos aquosos e podem ser classificados em diferentes tipos ^[49].

O primeiro estudo de lipossomas com insulina surgiu com Patel e Ryman em cães diabéticos, onde foi observada uma diminuição da glicémia em função do tempo ^[51]. Desde então, muitos estudos têm usado os lipossomas na administração da insulina ^[52-61]. Na sua maioria, a diminuição da glicémia dependeu de factores como, por exemplo, a composição lipídica, a presença ou ausência de agente emulsivo, o tamanho do lipossoma e a carga eléctrica ^[56, 62-65].

shown to be ineffective in the increase of the intestinal absorption of insulin ^[5]. One of the few studies in humans that showed a contrary result, that is, observed an increase in the absorption of insulin was through the application of N-8[2-hydroxybenzoyl) amino] sodium caprylate ^[5].

An important fact in the usage of these absorption promoters is that even though there is an increase in the permeability of the targeted drug, these agents also increase the permeability of other substances such as viruses and bacteria which may lead to adverse secondary effects. Another worry associated to the application of these absorption promoter agents is related to the possible alteration of the surface of the lipidic structure of the membrane cells. For that, it is necessary, when selecting the absorption promoter, to ask which type of mechanism is involved as well as the potential toxicity which may be associated to it.

Liposomes

Liposomes are small spheres of phospholipids whose structure is similar to that of cell membranes. They are small vesicles constituted by one or more lipidic layers that alternate into aqueous compartments and can be classified into different types ^[49].

The first study of liposomes with insulin surged with Patel and Ryman in diabetic dogs where the decrease of glycemia in relation to time was observed ^[51]. Since then, many studies have used liposomes in insulin administration ^[52-61]. In its majority, the decrease of glycemia depended on factors such as lipidic composition, the presence or absence of emulsion agents, the size of the liposome and electric charge ^[56, 62-65].

Nonetheless, it is known that conventional liposomes are susceptible to enzymatic degradation and dissolution by bile minerals. That sensibility can decrease with polymerization reactions ^[62, 66, 67], through coating techniques with chitosan, polyvinilic alcohol or polyacrylic acid ^[52]. It can also occur through the incorporation of sodium taurocholate ^[68], dipalmitoylphosphatidylethanol ^[56] or sorbitan monoethers ^[63]. However, the results with liposomes containing insulin continue to be contradictory. That contradictoriness has been attributed to the different composition of diverse formulas and not so much to the efficiency of the liposomes themselves which in many areas of pharmaceutical technology have demonstrated excellent results ^[69].

Other approaches that are under study involve multiple emulsions that can be considered as potential vehicles for the oral administration of insulin ^[70-74]. Others involve vesicle systems that are very similar to liposomes. These systems are dominated by

Contudo, sabe-se que os lipossomas convencionais são susceptíveis de degradação enzimática e dissolução por parte dos sais biliares. Essa sensibilidade pode ser diminuída com reacções de polimerização^[62, 66, 67], através de técnicas de revestimento com quitosano, álcool polivinílico ou ácido poliacrílico^[52], ou por meio da incorporação de taurocolato de sódio^[68], de dipalmitoílfosfatidiletanol^[56] ou de monoésteres de sorbitano^[63]. Porém, os resultados com lipossomas contendo insulina continuam a ser contraditórios. Essa contrariedade tem sido atribuída à diferente composição das diversas formulações e, nem tanto à eficiência dos próprios lipossomas que, em muitas outras áreas da tecnologia farmacêutica, já têm demonstrado excelentes resultados^[69].

Outras abordagens que também se encontram em estudo envolvem emulsões múltiplas e podem ser consideradas potenciais veículos para a administração oral de insulina^[70-74]. Outras envolvem sistemas vesiculares muito semelhantes aos lipossomas. Estes sistemas são denominados por transfersomas e conduziram a um aumento da biodisponibilidade da insulina, quando administrados localmente na cavidade bucal^[75].

Micro e nanopartículas

O estudo pioneiro com nanopartículas de insulina preparadas pelo método de dessolvatação data de 1982^[76]. Esta formulação foi administrada oralmente a ratos e conduziu a uma diminuição da glicemia de 15 a 20%, após 3 h da administração. A redução da glicemia foi lenta, mas mais pronunciada do que a redução da glicemia observada com a administração s.c.^[76]. Praticamente na mesma altura, a insulina foi adsorvida a nanopartículas de PACA mas, após administração oral a ratos diabéticos, observou-se que a formulação anterior não conduziu a um abaixamento da glicemia. Mais tarde, em vez de adsorvida, a insulina foi encapsulada pelo mesmo grupo e, neste caso, foi observada uma redução ligeira na glicemia^[77].

Desde então, foram surgindo muitos estudos dedicados à administração oral de insulina. Um desses estudos foi realizado com nanopartículas de poli(isobutilcianoacriato) (PIBCA) preparadas pelo método de polimerização interfacial^[78, 79]. Estas nanopartículas, mais especificamente nanocápsulas, contendo insulina demonstraram um efeito hipoglicémico prolongado em ratos diabéticos, em jejum ou com alimentação, mas não demonstraram efeito hipoglicémico em ratos normais^[79]. A duração do efeito hipoglicémico prolongado foi atribuído não só a uma passagem lenta pelo TGI associada a uma chegada progressiva de nanocápsulas intactas, contendo insulina, à mucosa intestinal, mas também a outros passos após a absorção^[80]. Este efeito hipoglicémico

transfersomes and lead to the increase of insulin bioavailability when administered locally in the buccal cavity^[75].

Micro and nanoparticles

A pioneer study with insulin nanoparticles prepared by the desolvation method dates back to 1982 [76]. This formulation was administered orally to rats and led to a decrease of glycemia by 15 to 20%, after 3 hours of administration. The glycemic reduction was slow, but more pronounced than the glycemic reduction observed with s.r. administration^[76]. Practically at the same time, the insulin was adsorbed to PACA nanoparticles, but after oral administration to diabetic rats, the formulation showed that it did not lead to a lower glycemic level. Later on, instead of being adsorbed, the insulin was encapsuled by the same group and in this case there was a slight reduction in the glycemia^[77].

Since then, several studies that are dedicated to the oral administration of insulin have surged. One of those studies was carried out with poly(isobutyl cyanoacrylate) (PIBCA) nanoparticles prepared by the interfacial polymerization method^[78, 79]. These nanoparticles, more specifically nanocapsules, containing insulin showed a prolonged hypoglycemic effect in diabetic rats who had fasted or been fed but did not show a hypoglycemic effect in normal rats^[79]. The duration of the prolonged hypoglycemic effect was attributed not only to the slow passage through the GIT associated to a progressive arrival of the intact nanocapsules containing insulin to the intestinal mucosa, but also to other steps after absorption^[80]. This prolonged hypoglycemic effect was also explained by the retention of insulin in the polymeric system. In another study developed by Damgé and collaborators^[81], the encapsulation of insulin in PIHCA nanocapsules protected the drug from protheolitical enzymes and allowed for the absorption of insulin through the intestinal mucosa. The reduction of glycemia was 50-60% in relation to the basal amount of glycemia. Since Damgé's study [79], other researchers studied the advantages of PACA nanoparticles in the oral administration of insulin^[82-88].

Another example of the polymeric system was developed by Morishita and collaborators^[14], and consisted in Eudragit® microspheres containing an enzymatic inhibitor. In that study, a strong enzymatic protection of insulin was observed in relation to pepsin, but this formulation allowed for the degradation of insulin in the presence of trypsin and chymotrypsin. After oral administration of 20 UI/kg of insulin microspheres, without the enzymatic inhibitor, the bioavailability observed in diabetic and normal rats

prolongado foi, também, explicado pela retenção de insulina no próprio sistema polimérico. Num outro estudo desenvolvido por Damgé e colaboradores^[81], observou-se que a encapsulação de insulina em nanocápsulas de PIHCA protegeu o fármaco das enzimas proteolíticas e permitiu a absorção da insulina através da mucosa intestinal. A redução da glicémia foi de 50-60% em relação aos valores de glicémia basais. Desde o estudo de Damgé^[79], outros investigadores estudaram a vantagem das nanopartículas de PACA na administração oral de insulina^[82-88].

Um outro exemplo de sistema polimérico foi desenvolvido por Morishita e colaboradores^[14], e consistia em microesferas de Eudragit® contendo um inibidor enzimático. Neste estudo, foi observada uma forte protecção enzimática da insulina, relativamente à pepsina, mas esta formulação permitiu a degradação da insulina na presença de tripsina e quimiotripsina. Após administração oral de 20 UI/kg de microesferas de insulina, sem o inibidor enzimático, a biodisponibilidade observada em ratos diabéticos e ratos normais foi de 1,1 e 0,9%, respectivamente. Na presença do inibidor enzimático, para a aprotinina, a biodisponibilidade inicial aumentou para 2,1 e 3,4% em ratos diabéticos e normais, respectivamente. Este estudo concluiu que a presença de inibidores enzimáticos foi crucial para o aumento da biodisponibilidade da insulina^[14]. Esta conclusão foi, também, confirmada por outros grupos^[24].

Outro polímero aplicado na administração oral de insulina foi o álcool polivinílico. Kimura e colaboradores^[89] prepararam microesferas de álcool polivinílico e administraram esta formulação a ratos diabéticos nas doses 287-344,4 UI/kg. As microesferas aumentaram o tempo de residência da insulina a nível intestinal e foram responsáveis pelo efeito hipoglicémico observado. A biodisponibilidade da insulina obtida neste estudo foi de 2%.

Um outro polímero utilizado na administração da insulina foi o PMMA com PEG sob a forma de micropartículas^[90]. As micropartículas, depois de preparadas, foram introduzidas numa cápsula de gelatina. A biodisponibilidade obtida foi, consideravelmente, superior à biodisponibilidade obtida com cápsulas controlo, contendo insulina não encapsulada (4% versus 0,55%). Face a estes resultados, um outro grupo desenvolveu nanopartículas do mesmo polímero e observou que os níveis de glicémia obtidos foram muito inferiores aos valores do grupo controlo^[91, 92]. O efeito hipoglicémico prolongou-se durante 6 h. O PMMA foi ainda utilizado em outros estudos, misturado com outros polímeros, nomeadamente o alginato^[93] e o quitosano^[94].

Um trabalho que merece uma atenção especial foi desenvolvido por Mathiowitz e colaboradores^[95], que encapsularam a insulina em nanopartículas de ácido

was 1.1 e 0.9%, respectively. In the presence of the enzymatic inhibitor, for the aprotinin, the initial bioavailability increased from 2.1 to 3.4% in diabetic and normal rats, respectively. This study concluded that the presence of enzymatic inhibitors was crucial for increasing the insulin's bioavailability^[14]. This conclusion was also confirmed by other groups^[24]. Another applied polymer in the administration of oral insulin was polyvinyl alcohol. Kimura and collaborators^[89] prepared microspheres of polyvinyl alcohol and administered this formulation to diabetic rats in doses of 287-344,4 UI/kg. The microspheres increased the insulin's resistance time at the intestinal level and were responsible for the hypoglycemic effect observed. The bioavailability of the insulin obtained in this study was 2%.

Another polymer used in the administration of insulin was PMMA and PEG under the form of microparticles^[90]. The microparticles, after being prepared, were introduced in a gelatin capsule. The bioavailability obtained was, considerably higher to the bioavailability obtained in controlled capsules, containing insulin that was not encapsulated (4% versus 0.55%). Regarding these studies, the other group developed nanoparticles in the same polymer and observed that the levels of glycemia obtained were much inferior to the values of the control group^[91, 92]. The hypoglycemic effect lasted up to 6 hours. The PMMA was still used in other studies mixed with other polymers, namely alginate^[93] and chitosan^[94].

A study that deserves special attention was developed by Mathiowitz and collaborators^[95], who encapsulated insulin in nanoparticles of polylactic-co-glycolic (PLGA) acid and fumaric acid. This study showed a control of high levels of glycemia in animals with PLGA nanoparticles and fumaric acid that was much higher in relation to the animal control group, suggesting that the insulin liberated the nanospheres in its bioactive form and was capable of crossing the intestinal barrier. This formulation was reformulated in a later work and showed an oral bioavailability of 11.4%^[96].

The insulin was also encapsulated in PLA microparticles^[97]. The glycemic reduction obtained was $57 \pm 21\%$, after oral administration and the hypoglycemic variability was attributed to different insulin absorption through the GIT.

Other polymers, namely terpolymers and N-isopropylacrylamide, butyl methacrylate and acrylic acid^[98], polycaprolactone (PCL) and Eudragit®^[99], and calcium-casein phosphate^[100] were also used for the oral administration of insulin.

However, the advances in micro and nanotechnology point to the search of polymers whose origin is natural, such as alginate. The first work with alginate and insulin was developed by Gray in 1988^[101], and was

poli(lático-co-glicólico) (PLGA) e ácido fumárico. Este estudo demonstrou um controle nos níveis de glicemia dos animais com nanopartículas de PLGA e ácido fumárico muito superior em relação ao grupo de animais controle, sugerindo, assim, que a insulina foi libertada das nanoesferas na sua forma bioativa e foi capaz de atravessar a barreira intestinal. Esta formulação foi reformulada num trabalho posterior e demonstrou uma biodisponibilidade oral de 11,4%^[96]. A insulina foi, ainda, encapsulada em micropartículas de PLA^[97]. A redução da glicemia obtida foi de $57 \pm 21\%$, após administração oral, e a variabilidade hipoglicêmica foi atribuída à diferente absorção da insulina ao longo do TGI.

Outros polímeros, nomeadamente os terpolímeros de N-isopropilacrilamida, o metacrilato de butilo e ácido acrílico [98], a policaprolactona (PCL) e o Eudragit® [99], o fosfato de cálcio-caseína^[100] foram também utilizados para a administração oral de insulina.

Porém, as linhas de avanço da micro e da nanotecnologia apontam para a procura de polímeros de origem natural como, por exemplo, o alginato. O primeiro trabalho com alginato e insulina foi desenvolvido por Gray em 1988^[101], seguido mais tarde, pelo grupo de Sharma, em 1996. A insulina foi encapsulada em macroesferas de alginato pelo método extrusão/gelificação que, posteriormente, foram revestidas com quitosano^[102]. Infelizmente, este último sistema polimérico conduziu a eficiências de encapsulação baixas e, por essa razão, foram adoptadas alterações baseadas na manipulação do pH^[103], complexação com ciclodextrinas^[50, 103-105], encapsulação em lipossomas^[53], aplicando diferentes métodos de preparação de microesferas^[104, 105], recorrendo a reforços da matriz polimérica^[93, 106], etc. Um exemplo deste progresso foi observado com macroesferas de alginato preparadas por extrusão/gelificação externa e revestidas com quitosano^[107]. Neste caso, a eficiência de encapsulação obtida foi de 97% e a resistência enzimática da insulina foi de 5,8% e 12,3% para a pepsina e tripsina, respectivamente. Outros trabalhos foram, entretanto, publicados com macroesferas de alginato e demonstraram sucesso em termos de eficiência de encapsulação^[108]. Mais recentemente, surgiram estudos com microesferas de alginato produzidas pelo método de emulsificação/gelificação interna^[109, 110]. Na área da nanotecnologia têm surgido muitos trabalhos que englobam o alginato. Um desses trabalhos^[111] demonstrou uma redução significativa (cerca de 75%) dos níveis de glicemia basais após a administração oral de nanoesferas contendo insulina a 100 UI/kg, comparativamente às nanoesferas vazias ou insulina não encapsulada, que não revelaram qualquer efeito na glicemia. As nanoesferas contendo insulina produziram um efeito terapêutico prolongado e dependente da dose. Por outro lado, este mesmo estudo

later followed by the Sharma group, in 1996. The insulin was encapsulated in alginate macrospheres through the extrusion/gelification method and later recoated with chitosan^[102]. Unfortunately, this last polymeric system lead to low efficiency encapsulation and for that reason alterations were adopted based on the pH manipulation^[103], cyclodextrin complexation^[50, 103-105], liposome encapsulation^[53], applying different microsphere preparation methods^[104, 105], and resorting to reinforcements of a polymeric matrix^[93, 106], etc. An example of this progress was observed in alginate microspheres prepared for external extrusion/gelification and coated with chitosan^[107]. In this case, the encapsulation efficiency obtained was 97% and the enzymatic resistance of the insulin was 5.8% and 12.3% for the pepsin and trypsin, respectively. Other studies were in the meanwhile published with alginate macrospheres and showed success in terms of encapsulation efficiency^[108]. More recently, studies came about with alginate microspheres produced by internal emulsification/gelification^[109, 110]. In the area of nanotechnology a lot of work comprising alginate has surged. One of those studies^[111] demonstrated a significant reduction (approximately 75%) of the basal glycemia levels after oral administration of the nanospheres containing 100 UI/kg of insulin, in comparison with empty nanospheres or non-encapsulated insulin which did not reveal any effect in the glycemia. The nanospheres containing insulin produced a prolonged and dependent therapeutic effect on the dose. On the other hand, the same study demonstrated an improvement in the physiological response to the administration of an aqueous solution of glucose and the plasma levels of insulin increased significantly (seven times higher than the initial amount). This indicates that the insulin was protected and absorbed by the intestinal mucosa. The oral bioavailability of insulin in relation to non-encapsulated insulin administered by the s.r. administration was 34%. The intestinal absorption mechanism of the insulin was equally targeted in this study. The insulin was marked with FITC and the capture of the fluorescent insulin was quantified in intestinal segments by spectrofluorometry and visualized by fluorescence microscopy and confocal laser scanning. The results obtained by spectrofluorometry indicated that the insulin-FITC, in its free form or under the nanosphere form was captured by the intestinal mucosa. The microscopic observations confirmed these presuppositions. Both results showed that the insulin-FITC freed from the nanospheres in the lumen or associated to the nanospheres were capable of transporting to the intestinal mucosa, mainly through the mechanism associated to Peyer's plaques and the intercellular/paracellular passage. Although the

demonstrou uma melhoria da resposta fisiológica à administração de uma solução aquosa de glucose e os níveis plasmáticos de insulina aumentaram significativamente (sete vezes superior ao valor inicial), indicando, que a insulina foi protegida e absorvida pela mucosa intestinal. A biodisponibilidade oral da insulina em relação à insulina não encapsulada administrada pela via s.c. foi de 34%. O mecanismo de absorção intestinal da insulina foi igualmente alvo neste estudo. A insulina foi marcada com FITC e a captação da insulina fluorescente foi quantificada em segmentos intestinais por espectrofluorometria e visualizada por microscopia de fluorescência e confocal de varrimento laser. Os resultados obtidos por espectrofluorometria indicaram que a insulina-FITC, na forma livre ou sob a forma de nanoesferas, foi captada pela mucosa intestinal. As observações microscópicas confirmaram estes pressupostos. Ambos os resultados demonstraram que a insulina-FITC libertada das nanoesferas no lúmen ou associada às nanoesferas foi capaz de transpor a mucosa intestinal, principalmente através de um mecanismo associado às placas de Peyer e passagem intercelular/paracelular, embora a captação intracelular via ligação com o receptor celular não tenha sido excluída.

Para além do alginato, outro polímero natural, igualmente interessante, é o quitosano. Um dos trabalhos pioneiros com quitosano e insulina e que demonstrou algum sucesso, foi desenvolvido por Pan e colaboradores^[112]. Neste caso, o efeito hipoglicémico, observado após administração oral das nanopartículas com insulina, foi prolongado durante 15 h e a biodisponibilidade média obtida foi de 14,9%. Em outros trabalhos, observaram-se valores mais baixos de biodisponibilidade (entre 5,58 e 8,3%) com nanopartículas de quitosano preparadas por gelificação ionotrópica, após administração oral em ratos diabéticos^[113]. Num outro trabalho, o efeito hipoglicémico oral observado foi dependente do pH de preparação das nanopartículas^[114]. O quitosano foi ainda utilizado em associação com outros compostos como, por exemplo, com o PEG^[115], com o poli(metilmacrilato) (PMMA) e o PEG^[116], com as ciclodextrinas^[117] ou com monómeros de metacrilato, hidróclorido de n-dimetilaminoetilmetacrilato e cloreto de N-trimetilaminoetilmetacrilato^[118]. Um outro estudo envolveu microesferas de ftalato de quitosano^[119] e esta formulação demonstrou uma protecção significativa da insulina relativamente ao ataque proteolítico da pepsina mas, até ao momento presente, não foram apresentados ensaios in vivo com esta formulação. Um outro estudo desenvolvido por Lin e colaboradores^[120] que envolveu nanopartículas de quitosano e ácido poli(γ-glutâmico) demonstrou uma redução significativa da glicémia em cerca de 55% dos

intracelular capture through a connection with a cellular receptor was not excluded.

Besides alginate, chitosan is another natural polymer which is equally interesting. One of the pioneer works with chitosan and insulin that showed some success was developed by Pan and collaborators^[112]. In this case, the hypoglycemic effect observed after the oral administration of nanoparticles with insulin was prolonged during 15 hours and the average bioavailability obtained was 14.9%. In other works, lower values of bioavailability (between 5.58 and 8.3%) were observed with chitosan nanoparticles prepared for ionotropic gelification after oral administration in diabetic rats^[113]. In another work, the oral hypoglycemic effect was dependent on the pH preparation of the nanoparticles^[114]. The chitosan was still used in association with other compounds such as PEG^[115], with poly(methylmethacrylate) (PMMA) and PEG^[116], with cyclodextrins^[117] or with methacrylate monomers, n-dimethylaminoethylmethacrylate hydrochloride and n-trimethylaminoethylmethacrylate chloride^[118]. Another study involved chitosan phthalate microspheres^[119] and this formulation showed a significant protection of the insulin in relation to the proteolytic pepsin attack, but until now, in vivo tests with this formulation have not been presented. Another study developed by Lin and collaborators^[120] that involved chitosan nanoparticles and poly(γ-glutamic) acid showed a significant reduction of glycemia in about 55% of the basal levels and that effect was prolonged during 10 hours.

Besides chitosan alginate, there are other natural materials that have been used for the encapsulation of insulin, including gelatin^[121] and pectin^[122, 123].

Bioadhesive systems

Bioadhesive systems are normally used in association with other strategies. Bioadhesive systems allow for intimate contact between the intestinal mucosa and the drug, where it is possible to obtain high concentrations of the drug where the absorption takes place. On the other hand, these systems allow a vectorized administration of the drug for the specific location of absorption^[124]. Nonetheless, these systems can affect the turnover of the intestinal mucous and alter the physiology of the intestinal mucosa. Some of the bioadhesive polymers used in the oral administration of insulin were: polyacrylic acid linked to divinyl glycol (polycarbophil®) and chitosan^[49, 124, 125].

níveis basais e esse efeito prolongou-se durante 10 h. Para além do alginato e do quitosano, também outros materiais naturais têm sido usados para a encapsulação da insulina, entre os quais, a gelatina^[121] e a pectina^[122, 123].

Sistemas bioadesivos

Usualmente, os sistemas bioadesivos, em geral, são utilizados em associação com outras estratégias. Os sistemas bioadesivos permitem o contacto íntimo entre a mucosa intestinal e o fármaco, sendo possível obter concentrações elevadas do fármaco no local de absorção. Por outro lado, estes sistemas permitem uma administração vectorizada do fármaco para o local específico de absorção^[124]. Todavia, estes sistemas podem afectar o turnover do muco intestinal e alterar a fisiologia da mucosa intestinal. Alguns dos polímeros bioadesivos utilizados na administração oral de insulina, foram: o ácido poliacrílico ligado ao glicol divinílico (polycarbophil®) e o quitosano^[49, 124, 125].

Células

Uma outra forma de veicular insulina oralmente consistiu na encapsulação da insulina em eritrócitos principalmente devido à selectividade apresentada e à eficácia na administração, à própria biodegradabilidade e à não imunogenicidade^[126]. Al-Achi e Greewood desenvolveram diferentes formas de membranas eritrocitárias para veicular fármacos e outras substâncias e, neste caso particular, demonstraram que estes veículos contendo insulina diminuíram a glicémia em ratos diabéticos após administração oral. A redução da glicemia foi mais acentuada quando comparada com a administração de lipossomas contendo insulina^[127, 128].

Modificações químicas da insulina

A modificação química da estrutura de um péptido ou proteína é outra alternativa para aumentar a sua biodisponibilidade e a estabilidade face à degradação enzimática e permeabilidade membranar^[49].

Esta alternativa tecnológica foi posta em prática pelo grupo de Asada e colaboradores^[129] em 1994, com a modificação química de péptidos com ácidos gordos. Estes novos compostos, quando incubados no intestino a 37°C, demonstraram uma proteólise reduzida, principalmente, devido ao aumento do número de carbonos dos ácidos gordos ligados à fenilalanina na posição B1 da molécula de insulina. Esta especificidade de modificação química revelou-se importante no grau de associação da molécula de insulina^[130]. Além disso, esta abordagem demonstrou ser preferível à aplicação de inibidores enzimáticos e promotores de absorção, uma vez que, os derivados da

Cells

Another way to orally transport insulin consists in erythrocyte insulin encapsulation, namely due to the selectivity presented in the efficacy of the administration to its own biodegradability and non-immunogenicity^[126]. Al-Achi and Greewood developed different ways for the erythrocytic membranes to transport drugs and other substances and, in this particular case, showed that these vehicles containing insulin decreased the glycemia in diabetic rats after oral administration. The reduction of glycemia was heightened when compared with the administration of liposomes containing insulin^[127, 128].

Chemical modifications of insulin

The chemical modification of the structure of a peptide or protein is another alternative that increases its bioavailability and stability in relation to the enzymatic degradation and membrane permeability^[49].

This technological alternative was put in practice by Asada and collaborators group^[129] in 1994, with the chemical modification of peptides with fatty acids. These new compounds, when incubated in the intestine at 37°C, showed a reduced proteolysis, mainly due to the increase of carbon in the fatty acids linked to the phenylalanine in position B1 of the insulin molecule. This specificity of chemical modification revealed to be important in the degree of insulin molecule association^[130]. Moreover, this approach showed to be preferable to the application of enzymatic inhibitors and absorption promoters since the derivatives of insulin did not show damage at the level of intestinal mucosa and did not cause phenomena of local irritation as was verified with the previous strategies^[130]. Besides this work, diverse hypotheses were studied on the chemical modification of the insulin molecule, such as: insulin derivatives with palmitic acid^[131], monoglucosylated insulin with phenylalanine in position B1^[132], insulin-monoethoxy(polyethyleneglycol) derivatives^[133], insulin with PEG^[134], non-covalent insulin connection with N-8[2-(hydroxybenzoyl) amino] sodium caprylate^[135] and, more recently, the modification of insulin through the covalent connection of amphiphilic oligomers with low Mw. This last system was developed by the pharmaceutical company Nobex Corporation^[4] and was designated as HIM2. The design of the amphiphilic oligomers associated a connection of the alkyl lipophilic part in position 29 of the insulin's lysine amino acid. This type of chemical alteration allowed for an increase in the permeability of the insulin in the intestinal mucosa and lead to a localization of the insulin at the surface of cells. Studies in dogs showed that the oral bioavailability was approximately 8%.

insulina não demonstraram danos a nível da mucosa intestinal e não causaram fenómenos de irritação local, como se verificou nas estratégias anteriores^[130]. Para além deste trabalho, foram estudadas diversas hipóteses de modificação química da molécula de insulina como, por exemplo: derivados de insulina com o ácido palmítico^[131], insulina com a fenilalanina monoglucosilada na posição B1^[132], derivados insulina-monoetoxi(polietilenoglicol)^[133], insulina com PEG^[134], ligação não covalente da insulina com o N-8[2-(hidroxibenzoílo) amino] caprilato de sódio^[135] e, mais recentemente, a modificação da insulina pela ligação covalente de oligómeros anfifílicos de baixo PM. Este último sistema foi desenvolvido pela companhia farmacêutica Nobex Corporation^[4] e foi designado de HIM2. O design dos oligómeros anfifílicos associou uma ligação da parte alquil lipofílica com a parte hidrofílica do PEG. O resultante oligómero (hexílo) foi, depois, adicionado na posição 29 do aminoácido lisina da insulina. Este tipo de alteração química permitiu um aumento da permeabilidade da insulina na mucosa intestinal e conduziu a uma localização da insulina à superfície das células. Estudos em cães demonstraram que a biodisponibilidade oral foi de, aproximadamente, 8%. Até ao momento presente, os resultados dos ensaios clínicos de fase I e II sugerem que a biodisponibilidade se situa próxima de 5%. O mecanismo proposto para esse aumento da biodisponibilidade da insulina relaciona-se com um possível impedimento estérico ao ataque enzimático na molécula de insulina. Por outro lado, foi proposto que a ligação de oligómeros à insulina poderá inibir a degradação da molécula em tecidos alvo ou mesmo no sangue e, desta forma, prolongar o tempo de semi-vida da insulina. Um estudo realizado em humanos saudáveis e em doentes com diabetes do tipo 1 e 2 demonstrou que a administração do HIM2 resultou num rápido aumento da absorção de insulina (o pico máximo de insulina plasmática foi alcançado após 60 min e voltou aos níveis basais após 2 h) e subsequente diminuição dos níveis de glicémia. A produção endógena de glucose foi suprimida durante 3 h, mesmo quando a insulina plasmática voltou aos seus níveis basais^[5].

Foi desenvolvido, ainda, um outro estudo que também adoptou a estratégia de modificação química da insulina^[136]. Neste caso, realizou-se uma reacção de acilação com o anidrido dimetilmaleico e, posteriormente, conjugação com a transferrina via ligação dissulfureto. Este conjugado foi testado em cultura celular Caco-2 e demonstrou que a captação do conjugado ocorreu por transcitose mediada pelo receptor de transferrina e não mediada pelo receptor da insulina. Observou-se que o transporte em células Caco-2 da insulina conjugada com a transferrina foi cinco a quinze vezes superior, quando comparado com

Until now, the clinical test results in phases I and II suggest that the bioavailability is close to 5%. The mechanism proposed for that increase in insulin bioavailability is related to a possible steric impediment to the enzymatic attack of the insulin molecule. On the other hand, it was proposed that an oligomer connection to insulin may inhibit molecule degradation in target tissue or even in blood and in this way prolong the semi-life of insulin. The study undertaken in healthy humans and in type 1 and 2 diabetic patients showed that the administration of HIM2 resulted in a rapid increase of insulin absorption (the maximum peak of plasma insulin was reached after 60 minutes and returned to basal levels after 2 hours) and subsequent decrease of glycemic levels. The production of endogenous glucose was suppressed during 3 hours, even when the plasma insulin returned to its basal levels^[5].

There was yet another study that also adopted the strategy of chemically modifying insulin^[136]. In this case, an acylation reaction with the anhydride dimethylmaleic and subsequently conjugated with the transferrin through a disulphide connection. This conjugation was tested in a Caco-2 cell culture and demonstrated that the capture of the conjugated occurred with transcytosis mediated by the transferrin receptor and not the insulin receptor. It was observed that the transport of insulin Caco-2 cells conjugated with transferrin was five to fifteen times higher when compared with non-conjugated insulin^[136]. This study also revealed another particularity when added to a compound designated as Brefeldin A. This alteration modified the transport in insulin Caco-2 cells conjugated with transferrin to forty-five times higher when compared with non-conjugated insulin^[136]. These results were satisfying for the scientific community and many works were dedicated to insulin-transferrin conjugate^[137, 138].

a insulina não conjugada ^[136]. Este estudo revelou, ainda, uma outra particularidade, quando foi adicionado um outro composto designado por Brefeldin A. Esta alteração modificou o transporte em células Caco-2 da insulina conjugada com a transferrina para quarenta e cinco vezes superior, quando comparado com a insulina não conjugada [136]. Estes resultados foram motivo de satisfação para comunidade científica e foram muitos os trabalhos que se dedicaram ao conjugado de insulina com a transferrina ^[137, 138].

Formulações farmacêuticas para administração vectorizada: cólon e íleo

A administração específica no cólon pode ser encarada como uma forma alternativa de administração da insulina, principalmente, devido ao facto do cólon apresentar uma baixa actividade enzimática e uma drenagem linfática muito desenvolvida ^[6]. O primeiro estudo nesta área foi desenvolvido por Saffran e colaboradores ^[139], que produziram pellets de insulina revestidos com azopolímeros. A dose de insulina administrada variou entre 11 e 66 UI/kg, mas a biodisponibilidade da insulina obtida foi inferior a 1%. O efeito hipoglicémico observado foi atribuído à resistência enzimática, isto porque, o polímero de revestimento foi apenas degradado pelas bactérias presentes do cólon ^[140]. Um estudo posterior ^[21] utilizou um outro azopolímero como material de revestimento dos pellets de insulina e observou-se um valor de biodisponibilidade semelhante (0,89%) mas, mesmo assim, consideravelmente baixo quando se compara com outras estratégias orais descritas nesta dissertação. Já na administração vectorizada para o íleo, tanto quanto se pôde perceber nesta pesquisa, são escassos os trabalhos que se dedicaram à administração oral de insulina específica no íleo. Os estudos que existem baseiam-se em dois tipos de sistemas: sistemas difusão da insulina (sistemas insolúveis) ou sistemas poliméricos de dissolução controlada ^[141]. Os sistemas poliméricos de dissolução controlada apresentam vantagens em relação aos sistemas de difusão devido à sua maior distribuição e flexibilidade. Exemplo disso foi um estudo desenvolvido por McPhillips e colaboradores ^[141], no qual se produziram pellets de celulose e polivinilpirrolidona revestidos com Eudragit®. Este estudo revelou que a biodisponibilidade da insulina foi muito baixa, sendo 0,042% o valor mais elevado obtido.

Pharmaceutical formulations for vectorized administration: colon and ileum

The specific administration in the colon can be considered as an alternative form of insulin administration, mainly due to the fact that the colon presents a low enzymatic activity and a highly developed lymphatic drainage ^[6]. The first study in this area was developed by Saffran and collaborators ^[139], who produced insulin pellets coated with azopolymers. The insulin dose administered varied between 11 and 66 UI/kg, but the insulin bioavailability obtained was inferior to 1%. The hypoglycemic effect observed was attributed to enzymatic resistance, this since the polymer used for coating was only degraded by the bacteria in the colon ^[140]. A later study ^[21] used another azopolymer with coating material from the insulin pellets and a similar amount of bioavailability was observed (0.89%). Nonetheless, it was considerably lower when compared with other oral strategies described in this dissertation.

In the vectorized administration for ileum, so much as it could be understood in this research, there are scarce studies dedicated to the ileum specific oral administration of insulin. The studies that exist are based on two types of systems: insulin diffusion systems (insoluble systems) or polymeric systems with controlled dissolution ^[141]. The polymeric systems with controlled dissolution presented advantages in relation to diffusion systems due to their greater distribution and flexibility. An example of that was a study developed by McPhillips and collaborators ^[141], where cellulose and polyvinylpyrrolidone pellets were coated with Eudragit®. This study revealed that the bioavailability of the insulin was very low, with 0.042% being the highest value obtained.

Combinações de estratégias anteriores

A combinação das estratégias descritas anteriormente é utilizada para aumentar a biodisponibilidade oral da insulina. A Tabela 1 descreve alguns exemplos de estudos desenvolvidos que recorreram a duas ou mais estratégias associadas.

Combinations of the previous strategies

The combination of the strategies previously described is used to increase the oral bioavailability of insulin. Table 1 gives some examples of developed studies that resorted to two or more associated strategies.

Tabela 1 - Combinação de estratégias e seus efeitos observados
(* n.d. - não determinado; HPMC - hidroxipropilmetilcelulose; PEG - Polietilenoglicol)
Table1 - Combination of strategies and effects observed
(* n.d. - not determined; HPMC hidroxipropilcelulosis; PEG - Poliethyleneglicol)

Estratégias <i>Strategies</i>			Efeitos observados <i>Effects observed</i>	Referências <i>References</i>
1 ^a	2 ^a	3 ^a		
Cápsula <i>Capsule</i>	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (lauril sulfato de sódio <i>sodium lauryl sulfate</i>)	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i> (aprotinina <i>aprotinin</i>)	Redução da glicemia <i>Reduction of glycemia</i> (n.d.)	[142]
Microencapsulação <i>Microencapsulation</i> Micropartículas de Eudragit® <i>Eudragit®</i> <i>Microparticles</i>	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i> (n.d.)		Redução de 10-20% da glicemia <i>10-20% reduction of glycemia</i>	[13, 14]
Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (EDTA)	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i> (glicolato de sódio <i>sodium glycolate</i>)		Redução da glicemia (n.d.) <i>Reduction of glycemia</i> (n.d.)	[143]
Microencapsulação e sistemas gastrorresistentes <i>Microencapsulation and gastroresistant systems</i> Micropartículas revestidas com Eudragit® L <i>Microparticles coated with Eudragit® L</i>	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (colato de sódio <i>sodium cholate</i>)	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i> (inibidor da tripsina de soja <i>soy trypsin inhibitor</i>)	Redução de 40% da glicemia <i>40% reduction of glycemia</i>	[144]
Microencapsulação Cápsula de gelatina revestida com Eudragit®	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (salicilato de sódio <i>sodium salicylate</i>)		Biodisponibilidade de 13-14% <i>13-14% Bioavailability</i>	[41]
Sistema colónico Comprimidos de pectinato de cálcio <i>Colonic system</i> <i>Calcium pectinate pills</i>	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i> (colato de sódio e inibidor da tripsina de soja <i>sodium cholate and soy trypsin inhibitor</i>)		Redução fraca da glicemia <i>Weak reduction of glycemia</i> (n.d.)	[145]

Sistema bioadesivo Hidroxipropilcelulose <i>Hydroxypropyl cellulose bioadhesive system</i>	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (Brij [®] 35 e salicilato de celulose <i>Brij[®] 35 and cellulose salicylate</i>)		Redução da glicemia apenas com salicilato de celulose <i>Reduction of glycemia only with cellulose salicylate</i> (n.d.)	[40]
Microencapsulação Esferas de álcool polivinílico <i>Microencapsulation Polyvinyl alcohol spheres</i>	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i> (aprotinina e bacitracina <i>aprotinin and bacitracin</i>)		Biodisponibilidade de 1,8% com bacitracina <i>Bioavailability of 1.8% with bacitracin</i> Biodisponibilidade de 2,0% com aprotinina <i>Bioavailability of 2.0% with aprotinin</i>	[89]
Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (oleato de sódio e n-dodecil-β-D-maltopiranosídeo <i>sodium oleate and n-dodecyl-β-D-maltopyranoside</i>)	Vários inibidores enzimáticos <i>Various enzymatic inhibitors</i>		Biodisponibilidade de 1,6% <i>1.6% Bioavailability</i>	[146]
Microencapsulação <i>Microencapsulation</i> Lipossomas <i>Liposomes</i>	Modificação química da insulina <i>Chemical modification of insulin</i> (dietilamino etil-dextrano <i>diethylamino ethyl-dextran</i>)	Encapsulação lipossomas em microcápsulas <i>Encapsulation liposomes in microcapsules</i>	Aumento da estabilidade no TGI <i>Increase of GIT stability</i>	[147]
Sistema colônico Cápsulas de gelatina revestidas com azopolímero <i>Colonic system Gelatin capsules coated with azopolymer</i>	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (5-metoxisalicilato <i>5methoxysalicylate</i>)		Redução fraca da glicemia <i>Weak reduction of glycemia</i> (n.d.)	[8]

Sistema colónico Cápsulas de quitosano revestidas com azopolímero	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i>		Aumento de biodisponibilidade de 1,60% para 3,49%	[146]
<i>Colonic system Chitosan capsules coated with azopolymer</i>	(glicolatode sódio e n-dodecil-β-D- maltopiranosídeo <i>sodium glycholate and n-dodecyl-β-D- maltopyranoside</i>)		<i>Increase of bioavailability from 1.60% to 3.49%</i>	
Sistema gastroresistente Cápsulas de gelatina revestidas com Eudragit® <i>Gastroresistant system Gelatin capsules coated with Eudragit®</i>	Promotor de absorção (salicilato de sódio) <i>Absorption promoter (sodium salicylate)</i>	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i> (colato de sódio <i>sodium cholate</i>)	Redução de 27-30% da glicémia <i>Reduction of glycemia by 27-30%</i>	[148]
Emulsão <i>Emulsion</i>	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (n.d.)		Actividade farmacológica de 10% <i>10% Pharmacological activity</i>	[149]
Emulsão múltipla <i>Multiple emulsion</i>	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (taurocolato de sódio <i>sodium taurocholate</i>)	Inibidor enzimático (aprotinina) <i>Enzymatic inhibitor (aprotinin)</i>	Ausência de efeito na biodisponibilidade <i>Absence of effect in bioavailability</i>	[150]
Microencapsulação <i>Microencapsulation</i> Lipossomas <i>Liposomes</i>	Encapsulação de lipossomas em microcápsulas <i>Encapsulation of liposomes in microcapsules</i>		Libertação sustentada de insulina <i>Liberation sustained by insulin</i>	[53]
Emulsão múltipla <i>Multiple emulsion</i>	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (ácido eicosapentanóico e docosahehexanóico <i>eicosapentanoic and docosahaexanoic acid</i>)		Actividade farmacológica de 43,2% <i>43.2% Pharmacological activity</i>	[151]

Nanoencapsulação Nanopartículas PLGA e ácido fumárico <i>Nanoencapsulation PLGA nanoparticles and fumaric acid</i>	Sistema bioadesivo <i>Bioadhesive system</i>		Biodisponibilidade de 11,4% 11.4% <i>Bioavailability</i>	[96]
Nanoencapsulação <i>Nanoencapsulation</i> Nanopartículas <i>Nanoparticles</i> PIBCA <i>PIBCA</i>	Promotor de absorção Absorption promote (Pluronic® F68 e colato de sódio Pluronic® F68 and sodium cholate)		Actividade farmacológica de 49,2% 49.2% <i>Pharmacological activity</i>	[82]
Sistema colónico <i>Pellets revestidos com azopolímeros</i> <i>Colonic system Pellets coated with azopolymers</i>	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i> (mesilato de camostato <i>camostate mesylate</i>)		Aumento da biodisponibilidade de 0,9% para 3,4% <i>Increase of bioavailability from 0.9% to 3.4%</i>	[21]
Sistemas gastrorresistentes <i>Gastroresistant systems</i> Cápsulas de gelatina revestidas com Eudragit® <i>Gelatin capsules coated with Eudragit®</i>	Sistemas bioadesivos <i>Bioadhesive systems</i> (HPMC, <i>polycarbophil®</i> , Carbopol®934 <i>HPMC, polycarbophil®, Carbopol®934</i>)		Redução da glicémia <i>Reduction of glycemia</i> (n.d.)	[152]
Nanoencapsulação <i>Nanoencapsulation</i> Nanopartículas <i>Nanoparticles</i> PIBCA	Nanocápsulas dispersas numa microemulsão <i>Nanocapsules dispersed in a microemulsion</i>		Redução significativa dos níveis de glucose e absorção facilitada <i>Significant reduction of the glucose levels and absorption facilitated</i>	[153]
Nanoencapsulação <i>Nanoencapsulation</i> Nanopartículas PECA <i>PECA nanoparticles</i>	Promotor de absorção <i>Absorption promoter</i> (n.d.)	Inibidor enzimático Enzymatic inhibitor (aprotinina <i>aprotinin</i>)	Actividade farmacológica entre 0,5% e 1% <i>Pharmacological activity between 0.5% and 1%</i>	[154]

Nanoencapsulação <i>Nanoencapsulation</i>	Sistema gastrorresistente <i>Gastroresistant system</i>		Aumento da biodisponibilidade para 5,6-8,3%	[113]
Nanopartículas de quitosano <i>Chitosan nanoparticles</i>	(ftalato de HPMC <i>HPMC phthalate</i>)		<i>Increase of bioavailability to 5.6-8.3%</i>	
Sistemas bioadesivos <i>Bioadhesive systems</i>	Modificação química do quitosano	Inibidor enzimático Enzymatic inhibitor	Eficácia farmacológica de 1,69%	[124]
Comprimidos de quitosano <i>Chitosan pills</i>	<i>Chemical modification of chitosan</i> (n.d.)	(Bowman-Birk e elastatinal <i>Bowman-Birk and elastatinal</i>)	<i>Pharmacological efficacy of 1.69%</i>	
Nanoencapsulação <i>Nanoencapsulation</i>	Inibidor enzimático <i>Enzymatic inhibitor</i>	Modificação química da insulina	Redução de 50% da glicémia basal	[100]
Nanopartículas de fosfato de cálcio <i>Calcium phosphate nanoparticles</i>	(casein <i>casein</i>)	<i>Chemical modification of insulin (PEG)</i>		
Modificação química da insulina com PEG	Sistema bioadesivo <i>Bioadhesive system</i>		Redução para 40% da glicémia basal	[133]
<i>Chemical modification of insulin with PEG</i>	(derivados de insulina mono-, di- e terbutilcarbonato <i>mono-, di- and terbutylcarbonate insulin derivatives</i>)		<i>40% reduction of basal glycemia</i>	
Microencapsulação <i>Microencapsulation</i>	Sistema bioadesivo <i>Bioadhesive system</i>		Redução de 50% da glicémia basal	[155]
Micropartículas de alginate <i>Alginate microparticles</i>	(lectinas <i>lectins</i>)		<i>50% redução of basal glycemia</i>	
Microencapsulação <i>Microencapsulation</i>	Modificação química da insulina <i>Chemical modification of insulin</i>		Aumento da permeabilidade em células Caco-2 <i>Increase in the Caco-2 cell permeability</i>	[156]
Micropartículas <i>Microparticles</i>				
P(MAA-g-EG)	(transferrina <i>transferrin</i>)		(aumento de vinte e duas vezes 22-fold increase)	

Nanoencapsulação <i>Nanoencapsulation</i>	Modificação química da insulina <i>Chemical modification of insulin</i>	Biodisponibilidade de 7,7%	[157]
Nanopartículas de PLGA <i>PLGA nanoparticles</i>	(fosfatidilcolina de soja <i>soy phosphatidylcoline</i>)	7.7% <i>Bioavailability</i>	
Nanoencapsulação <i>Nanoencapsulation</i>	Sistemas bioadesivos <i>Bioadhesive systems</i>	Aumento de biodisponibilidade de 4,99% para 7,11% <i>Increase in bioavailability from 4.99% to 7.11%</i>	[158]
Nanopartículas sólidas lipídicas <i>Solid lipid nanoparticles</i>	(lectinas <i>lectins</i>)		
Nanoencapsulação e sistema gastrorresistente <i>Nanoencapsulation and gastroresistant system</i>	Sistemas bioadesivos <i>Bioadhesive systems</i> (Eudragit® RS)	Biodisponibilidade de 13,2% <i>13.2% Bioavailability</i>	[99]
Nanopartículas PCL <i>PCL nanoparticles</i>			
Nanopartículas baseadas em alginato <i>Nanoparticles based on alginate</i>	Revestimento com quitosano-PEG e albumina <i>Chitosan-PEG and albumin coating</i>	Redução de 75% nos níveis basais de insulina <i>75% reduction of basal levels of insulin</i>	[111]

A combinação de estratégias parece ser francamente vantajosa uma vez que, em algumas situações, conseguiu aumentar a biodisponibilidade oral da insulina. Contudo, convém não esquecer que alguns destes estudos, quando desenvolvidos em humanos, têm revelado uma variabilidade muito significativa nas respostas anteriores devido à dificuldade de adaptação da dose administrada para um doente específico. Além disso, as diferentes tentativas apresentadas anteriormente têm algumas limitações. Sabe-se que, por exemplo, as formulações de insulina com inibidores de proteases têm, em certos casos, efeitos imprevisíveis em ensaios in vivo e in vitro; as as

The combination of strategies appears to be frankly advantageous since in some situations it can increase the oral bioavailability of insulin. However, we must not forget that some of these studies, when developed in humans, have revealed a significant variability in the previous answers due to the difficulty in adaption to the administered dose for a specific patient. What's more, the different attempts previously presented have some limitations. It is known, for example, that formulations of insulin with protease inhibitors have, in certain cases, unexpected effects in in vivo and in vitro testing; the formulations with absorption promoters showed a lack of specificity and can lead to long term toxicity

formulações com promotores de absorção demonstraram falta de especificidade e podem conduzir a casos de toxicidade a longo prazo; ou ainda, os agentes emulsivos podem conduzir à lise da mucosa da membrana e provocar danos nas células epiteliais do TGI^[49]. Por outro lado, e como referido anteriormente, os sistemas bioadesivos podem afectar, significativamente, o turnover do muco do TGI e, consequentemente, alterar a fisiologia da mucosa intestinal. Para além disso, e mais especificamente, o mecanismo de absorção das nanopartículas suscita algumas dúvidas do ponto de vista toxicológico, especialmente quando se trata de administração crónica.

Conclusão

O presente artigo resumiu algumas das estratégias tecnológicas que permitiram a administração oral de insulina. Verificou-se que a combinação de estratégias parece ser francamente vantajosa uma vez que, em algumas situações, conseguiu aumentar significativamente a biodisponibilidade oral da insulina. Contudo, algumas das técnicas anteriormente descritas foram completamente abandonadas, outras continuam em forte desenvolvimento e outras, só agora, começam a serem desenvolvidas. Seja como for, a insulina oral constitui uma realidade próxima e, supõe-se que, serão poucos os anos que faltam para obter uma forma de administração alternativa viável e vantajosa.

Agradecimentos

Este artigo foi baseado na tese de doutoramento “Encapsulação de fármacos peptídicos através do método de emulsificação/gelificação interna” de Ana Catarina Beco Pinto Reis da Universidade de Coimbra em 2007. Aos meus orientadores do doutoramento, em especial, aos Professores Doutores Francisco Veiga e António Ribeiro, e também ao Professor Doutor Ronald Neufeld e Professora Doutora Christiane Damgé, quero expressar o meu sincero agradecimento pela orientação científica do doutoramento. À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, à Universidade de Coimbra, à Universidade de Queen’s (Kingston, Canadá) e à Universidade Louis Pasteur (Strasbourg, França) desejo também manifestar o meu agradecimento pelo amável acolhimento e pelo apoio que permitiram criar as condições indispensáveis para a realização dos trabalhos de doutoramento.

cases; or even, the emulsion agents can lead to the lysis of the membrane mucosa and provoke damage to the epithelial cells and GIT^[49]. On the other hand, as was referred previously, the bioadhesive systems can significantly affect the turnover of the mucous in the GIT and consequently alter the physiology of the intestinal mucosa. Moreover, and more specifically, the nanoparticles absorption mechanism raises some doubts from the toxicological point of view, especially when it concerns chronic administration.

Conclusion

The current article summarizes some of the technological strategies that permitted the oral administration of insulin. It was verified that a combination of strategies seems to be frankly advantageous since in some cases it was able to significantly increase the oral bioavailability of insulin. However, some of the previously mentioned techniques were completely abandoned, others continue to be strongly developed while others are only now starting to be developed. Whatever the circumstances, oral insulin constitutes a close reality and it is believed that there are only a few years remaining to obtain a viable and advantageous alternative form of administration.

Acknowledgements

This article was based on a Doctorate Dissertation titled “Encapsulação de fármacos peptídicos através do método de emulsificação/gelificação interna” (“Encapsulation of peptide drugs through the internal emulsification/gelification method”) by Ana Catarina Beco Pinto Reis at University of Coimbra in 2007. To my doctorate supervisors, especially to Professors Francisco Veiga, PhD and António Ribeiro, PhD, and also Professor Ronald Neufeld, PhD and Professor Christiane Damgé, PhD, I would like to express my sincere thanks for the scientific supervision of the PhD program. To the Foundation for Science and Technology (FCT), University of Coimbra, Queen’s University (Kingston, Canada) and Louis Pasteur University (Strasbourg, França) I would also like to express my many thanks for the kind reception and support that created the indispensable conditions needed to carry out the work for this PhD.

Referências / References

- [1].King MW. 2006 [cited 14/07/2007]; Available from: <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/diabetes.html>
- [2].Duarte R. Insulina. Diabetologia Clínica. Lisboa: Lidel-Edições Técnicas, Lda., 1997: 139-51.
- [3].Chien YW. Human insulin: Basic sciences to therapeutic uses. Drug Dev Ind Pharm 1996; 22: 753-89.
- [4].Still JG. Development of oral insulin: progress and current status. Diabetes Metabol Res Rev 2002; 18: S29-S37.
- [5].Cerneia S RI. Noninjectable methods of insulin administration. Drugs of Today 2006; 42: 405-24.
- [6].Hoffman A, Ziv E. Pharmacokinetic considerations of new insulin formulations and routes of administration. Clin Pharmacokinet 1997; 33: 285-301.
- [7].Lin C, Gokhale R, Trivedi JS, Ranade V. Recent strategies and methods for improving insulin delivery. Drug Dev Res 2004; 63: 151-60.
- [8].Saffran M, Pansky B, Budd GC, Williams FE. Insulin and the gastrointestinal tract. J Control Rel 1997; 46: 89-98.
- [9].Heng W, Yuxiu L, Qi S, Guohua Y. Oral administration of insulin to female nonobese diabetic mice inhibited diabetes and induced Fas ligand expression on islets of Langerhans. Chin Med J 2000; 113: 433-6.
- [10].Ziv E, Lior O, Kidron M. Absorption of protein via the intestinal wall. A quantitative model. Biochem Pharmacol 1987; 36: 1035-9.
- [11].Katavoich MJ, Meldrum MJ. Effect of insulin and acarbose alone and in combination with the female streptozotocin-induced diabetic rat. J Pharm Sci 1993; 82: 1209-13.
- [12].Fujii S, Yokoyama T, Ikegaya K, Sato F, Yokoo N. Promoting effect of the new chymotrypsin inhibitor FK-448 on the intestinal absorption of insulin in rats and dogs. J Pharm Pharmacol 1985 1985; 37: 545-9.
- [13].Morishita M, Morishita I, Takayama K, Machida Y, Nagai T. Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. Int J Pharm 1992; 78: 1-7.
- [14].Morishita I, Morishita M, Takayama K, Machida Y, Nagai T. Hypoglycemic effect of novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor in normal and diabetic rats. Int J Pharm 1992; 78: 9-16.
- [15].Yamamoto A, Taniguchi T, Rikyu K, Tsuji T, Fujita T, Murakami M, et al. Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. Pharm Res 1994; 11: 1496-500.
- [16].Morishita I, Morishita M, Takayama K, Machida Y, Nagai T. Enteral insulin delivery by microspheres in 3 different formulations using Eudragit L-100 and S-100. Int J Pharm 1993 1993; 9: 29-37.
- [17].Hosny EA, Ghilzai NMK, Elmazar MM. Promotion of oral insulin absorption in diabetic rabbits using pH-dependent coated capsules containing sodium cholate. Pharm Acta Helv 1997; 72: 203-7.
- [18].Damgé C, Vranckx H, Balschmidt P, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. J Pharm Sci 1997; 86: 1403-9.
- [19].QI R, Ping QN. Gastrointestinal absorption enhancement of insulin administration of enteric microspheres and SNAC to rats. J Microencapsul 2004; 2: 37-5.
- [20].Marschutz MK, Caliceti P, Bernkop-Schnürch A. Design and in vivo evaluation of an oral delivery system for insulin. Pharm Res 2000; 17: 1468-74.
- [21].Tozaki H, Nishioka J, Komoike J, Okada N, Fujita T, Muranishi S, et al. Enhanced absorption of insulin and (Asu(1,7))eel-calcitonin using novel azopolymer-coated pellets for colon-specific drug delivery. J Pharm Sci 2001; 90: 89-97.
- [22].Katayama K, Kato Y, Onishi H, Nagai T, Machida Y. Double liposomes: hypoglycemic effects of liposomal insulin on normal rats. Drug Dev Ind Pharm 2003; 29: 725-31.
- [23].Agarwal V, Nazzal S, Reddy IK, Khan MA. Transport studies of insulin across rat jejunum in the presence of chicken and duck ovomucoids. J Pharm Pharmacol 2001; 53:1131-8.
- [24].Agarwal V, Reddy IK, Khan MA. Polymethacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: Preparation and in vitro dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors. Int J Pharm 2001; 225: 31-9.
- [25].Agarwal V, Reddy IK, Khan MA. Oral delivery of proteins:effect of chicken and duck ovomucoid on the stability of insulin in the presence of alfa-chymotripsin and trypsin. Pharm Pharmacol Commun 2000; 6: 223-7.
- [26].Plate NA, Valuev IL, Sytov GA, Valuev LI. Mucoadhesive polymers with immobilized proteinase inhibitors for oral administration of protein drugs. Biomaterials 2002; 23: 1673-7.
- [27].Otsuki M, Ohki A, Okabayashi Y, Suehiro I, Baba S. Effect of synthetic protease inhibitor camostatate on pancreatic exocrine function in rats. Pancreas 1987; 2: 164-9.
- [28].McCaffrey G, Jamieson JC. Evidence for the role of a cathepsin D-like activity in the release of gal beta 1-4GlcNAcAlpha 2-6 sialyltransferase from rat and mouse liver in whole-cell systems. Comp Biochem Physiol B 1993; 104: 91-4.
- [29].Peppas NA, Kavimandan NJ. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: Insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. Eur J Pharm Sci 2006 11; 29: 183-97.
- [30].Shao Z, Li Y, Krishnamoorthy R, Chermak T, Mitra AK. Differential effects of anionic, cationic, nonionic, and physiologic surfactants on the dissociation, alpha-chymotryptic degradation, and enteral absorption of insulin hexamers. Pharm Res 1993 1993; 10: 243-51.
- [31].Mesiha M, Plakogiannis F, Vejosoth S. Enhanced oral absorption of insulin from desolvated fatty-acid sodium glycocholate emulsions. Int J Pharm 1994 1994; 111: 213-6.

- [32].Nishihata T, Rytting JH, Kamada A, Higuchi T. Enhanced intestinal absorption of insulin in rats in the presence of sodium 5-methoxysalicylate. *Diabetes* 1981; 30: 1065-7.
- [33].Eaimtrakan S, Prasad YVR, Ohno T, Konishi T, Yoshikawa Y, Shibata N, et al. Absorption-enhancing effect of labrasol on the intestinal absorption of insulin in rats. *J Drug Target* 2002; 10: 255-60.
- [34].Michel C. Administration orale d'insuline par les nanocapsules et nanoparticules d'alkylcyanoacrylate [PhD Thesis]. Strasbourg: Universite Louis Pasteur; 1991.
- [35].Uchiyama T, Sugiyama T, Quan Y-S, Kotani A, Okada N, Fujita T, et al. Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-Lauryl-B-D-maltopyranoside. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1241-50.
- [36].Katsuma M, Watanabe S, Kawai H, Takemura S, Sako K. Effects of absorption promoters on insulin absorption through colon-targeted delivery. *Int J Pharm* 2006; 307: 156-62.
- [37].Touitou E, Donbrow M, Rubinstein A. Effective intestinal absorption of insulin in diabetic rats using new formulation approach. *J Pharm Pharmacol* 1980; 32:108-10.
- [38].Mesiha MS, El-Bitar HI. Hypoglycemic effect of oral insulin preparation containing Brij 35, 52, 58, or 92 and stearic acid. *J Pharm Pharmacol* 1981; 33: 733-4.
- [39].Touitou E, Rubinstein A. Targeted enteral delivery of insulin to rats. *Int J Pharm* 1986; 30: 95-9.
- [40].Mesiha M, Sidhom M. Increased oral absorption enhancement of insulin by medium viscosity hydroxypropyl cellulose. *Int J Pharm* 1995 1995; 114: 137-40.
- [41].Hosny EA, Ghilzai NMK, Al-Dhawalie AH. Effective intestinal absorption of insulin in diabetic rats using enteric coated capsules containing sodium salicylate. *Drug Dev Ind Pharm* 1995; 21: 1583-9.
- [42].Fasano A, Uzzau S. Modulation of intestinal tight junctions by zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *J Clin Invest* 1997; 99:1158-64.
- [43].Carino GP, Mathiowitz E. Oral insulin delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 35: 249-57.
- [44].Bernkop-Schnürch A, Clausen AE, Guggi D. The use of auxiliary agents to improve the mucosal uptake of peptides. *Med Chem Rev* 2005; 1:1-10.
- [45].Suzuki A, Morishita M, Kajita M, Takayama K, Isowa K, Chiba Y, et al. Enhanced colonic and rectal absorption of insulin using a multiple emulsion containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *J Pharm Sci* 1998; 87: 1196-202.
- [46].Eley JG, Triumalashetty P. In Vitro Enhancement of Alkylglycosides as Permeability Enhancers. *AAPS Pharmsci Technol* 2001; 2:1-7.
- [47].Uchiyama T, Yamamoto A, Hatano H, Fujita T, Muranishi S. Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers in the large intestine: intestinal absorption of phenol red and protein and phospholipid release from the intestinal membrane. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 1618-21.
- [48].Shao Z, Li Y, Chermak T, Mitra AK. Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. Part 2. Effects of beta-cyclodextrin derivatives on alpha-chymotryptic degradation and enteral absorption of insulin in rats. *Pharm Res* 1994 1994; 11: 1174-9.
- [49].Gowthamarajan K, Kulkarni GT. Oral insulin – fact or fiction? Possibilities of achieving oral delivery for insulin. *Resonance* 2003:38-46.
- [50].Dileep KJ, Moses LR, Sharma CP. Modulation of insulin release from chitosan-alginate microsphere. *Trends Biomater Artif Org* 1998; 12:42-6.
- [51].Patel HM, Ryman BE. Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes. *FEBS Lett* 1976; 62: 60-3.
- [52].Takeuchi H, Yamamoto H, Niwa T, Hino T, Kawashima Y. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm Res* 1996; 13: 896-901.
- [53].Ramadas M, Paul W, Dileep KJ, Anitha Y, Sharma CP. Lipoinulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats. *J Microencapsul* 2000; 17: 405-11.
- [54].Wu ZH, Ping QN, Lai JM, Wei Y. [Hypoglycemic effect of polysaccharide-coated insulin liposomes after oral administration in mice]. *Yao Xue Xue Bao* 2003; 38: 138-42.
- [55].Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Morimoto K, Kakemi M, Yamashita S, et al. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: improvement of stability of insulin in GI tract. *Int J Pharm* 1997 1997; 157: 73-80.
- [56].Kisel MA, Kulik LN, Tsybovsky IS, Vlasov AP, Vorob'yov MS, Kholodova EA, et al. Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *Int J Pharm* 2001; 216:105-14.
- [57].Manosroi A, Bauer KH. Effects of gastrointestinal administration of human insulin and a human insulin-DEAE-dextran complex entrapped in different compound liposomes on blood glucose in rats. *Drug Dev Ind Pharm* 1990 1990; 16: 1521-38.
- [58].Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Kakemi M, Oku N, et al. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. *J Pharm Sci* 1999 1999; 88: 248-52.
- [59].Zhang N, Ping QN, Huang GH, Xu WF. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int J Pharm* 2005; 294: 247-59.
- [60].Kim A, Yun MO, Oh YK, Ahn WS, Kim CK. Pharmacodynamics of insulin in polyethylene glycol-coated liposomes. *Int J Pharm* 1999; 180: 75-81.
- [61].Huang Y-Y, Wang C-H. Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *J Control Rel* 2006; 113: 9-14.
- [62].Agarwal V. Current status of the oral delivery of insulin. *Pharm Technol* 2001: 76-90.

- [63].Varshovaz J, Pardakhty A, Hajhashemi V, Najafabadi AR. Development and physical characterization of sorbitan monoester niosomes for insulin oral delivery. *Drug Deliv* 2003; 10: 251-62.
- [64].Dapergolas G, Gergoriadis G. Hypoglycaemic effect of liposomeentrapped insulin administered intragastrically. *Lancet* 1976; 2: 824-7.
- [65].Choudhari KB, Labhasetwar V, Dorle AK. Liposomes as a carrier for oral administration of insulin: effect of formulation factor. *J Microencapsul* 1994; 11: 319-25.
- [66].Chen H, Torchilin V, Langer R. Polymerized liposomes as potential oral vaccine carrier: stability and bioavailability. *J Control Rel* 1996; 42: 263-72.
- [67].Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature* 1998;386:410-4.
- [68].Degim Z, Unal N, EYsiz D, Abbasoglu U. The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer. *Life Sci* 2004; 75: 2819-27.
- [69].Simões S, Filipe A, Faneca H, Mano M, Penacho N, N ND, et al. Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2: 237-54.
- [70].Matsuzawa A, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Absorption of insulin using water-in-oil-in-water emulsion from enteral loop in rats. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1718-23.
- [71].Ho HO, Hsiao CC, Sheu MT. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *J Pharm Sci* 1996; 85: 138-43.
- [72].García-Fuentes M, Torres D, Alonso MJ. Design and lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Coll Surf B Biointerf* 2003; 27: 159-68.
- [73].Cilek A, Celebi N, Timaksiz F, Tay A. A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats. *Int J Pharm* 2005; 298: 176-85.
- [74].Li C-L, Deng Y-J. Oil-based formulations for oral delivery of insulin. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1101-7.
- [75].Song Y, Wang Y, Thakur R, Meidan VM, Michniak B. Mucosal drug delivery: membranes, methodologies, and applications. *CRC Crit Rev Ther Drug Carr Syst* 2004; 21: 195-256.
- [76].Oppenheim RC, Stewart NF, Gordon L, Patel HM. Production and evaluation of orally administered insulin nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm* 1982; 8: 531-46.
- [77].Couvreur P, Lenaerts V, Kante B, Roland M, Speiser PP. Oral and parenteral administration of insulin associated to hydrolysable nanoparticles. *Acta Pharm Technol* 1980; 26: 220-2.
- [78].Al Khouri Fallouh N, Roblot-Treupel L, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *Int J Pharm* 1986; 28: 125-32.
- [79].Damgé C, Michel C, Aprahamian M, Couvreur P. New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes* 1988; 37: 246-51.
- [80].Michel C, Defontaine L, Aprahamian M, Couvreur P, Damgé C. Insulin nanocapsules: variations in the biological response depending on the administration site along the digestive tract. In: Tony L. Whateley (depart. Pharm. Sci UoS, Glasgow, U.K.), editor. *Microencapsulation of drugs*. Chur- Switzerland: Hardwood Academic Publishers, 1992: 233-42.
- [81].Damgé C, Michel C, Aprahamian M, Couvreur P, Devissaguet J-P. Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *J Control Rel* 1990; 13: 233-9.
- [82].Radwan MA. Enhancement of absorption of insulin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats. *Drug Dev Ind Pharm* 2001; 27: 981-9.
- [83].Zhang Q, Zacong S, Tsuneji N. Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *Int J Pharm* 2001; 218: 75-80.
- [84].Behan N, O'Sullivan C, Birkinshaw C. Synthesis and in-vitro drug release of insulin-loaded Poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Macromol Biosci* 2002; 2: 336-40.
- [85].Mesiha MS, Sidhom MB, Fasipe B. Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm* 2005; 288: 289-93.
- [86].Pinto-Alphandary H. Visualization of insulin-loaded nanocapsules: in vitro and in vivo studies after oral administration to rats. *Pharm Res* 2003; 20: 1071-84.
- [87].Cournarie F, auchere D, Chevenne d, Lacour B, Seiller M, Vauthier C. Absorption and efficiency of insulin after oral administration of insulin-loaded nanocapsules in diabetic. *Int J Pharm* 2002; 242: 325-8.
- [88].Watnasirichaikul S, Davies NM, Rades T, Tucker IG. Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions. *Pharm Res* 2000; 17: 684-9.
- [89].Kimura T, Sato K, Sugimoto K, Tao R, Murak T, Kurosaki Y, et al. Oral administration of insulin as poly(vinyl alcohol) gel spheres in diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 897-900.
- [90].Lowman AM, Morishita M, Kajita M, Nagai T, Peppas NA. Oral delivery of insulin using pH responsive complexation gels. *J Pharm Sci* 1999; 88: 933-7.
- [91].Foss AC, Goto T, Morishita M, Peppas NA. Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57: 163-9.
- [92].Foss AC, Peppas NA. Investigation of the cytotoxicity and insulin transport of acrylic-based copolymer protein delivery systems in contact with caco-2 cultures. *Eur J Pharm Biopharm* 2004 5; 57: 447-55.
- [93].Sajeesh S, Sharma CP. Polymethacrylic acid-alginate semi-IPN microparticles for oral delivery of insulin: a preliminary investigation. *J Biomat Appl* 2004 7; 19: 35-45.

- [94].Sajeesh S, Sharma CP. Interpolymer complex microparticles based on polymethacrylic acid-chitosan for oral insulin delivery. *J Appl Polym Sci* 2006; 99: 506-512.
- [95].Mathiowitz E, Jacob JS, Y.S. J, P. CG, E. CD, Chaturverdi P, et al. Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. *Nature* 1997; 386: 410-4.
- [96].Carino GP, Jacob JS, Mathiowitz E. Nanosphere based oral insulin delivery. *J Control Rel* 2000; 65: 261-9.
- [97].Ma XY, Pan GM, Lu Z, Hu JS, Bei JZ, Jia JH, et al. Preliminary study of oral polylactide microcapsulated insulin in vitro and in vivo. *Diabetes, Obes Metabol* 2000; 2: 243-50.
- [98].Ramkissoon-Ganorkar C, Liu F, Baudys M, Kim SW. Modulating insulin-release profile from pH/ thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight. *J Control Rel* 1999; 59: 287-98.
- [99].Damgé C, Maincent P, Ubrich N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J Control Rel* 2007; 117: 163-70.
- [100].Morçol T, Nagappan P, Nerenbaum L, Mitchell A, Bell SJD. Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin. *Int J Pharm* 2004; 277: 91-7.
- [101].Gray CJ, Dowsett J. Retention of insulin in alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 1988; 31: 607-12.
- [102].Hari PR, CHANDY T, SHARMA CP. Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin. *J Appl Polym Sci* 1996; 59: 1795-801.
- [103].Moses R, Dileep KJ, Sharma CP. Beta cyclodextrin-insulin-encapsulated chitosan/alginate matrix: oral delivery system. *J Appl Polym Sci* 1999; 75: 1089-96.
- [104].Jerry N, Anitha Y, Sharma CP, Sony P. In vivo absorption studies of insulin from an oral delivery system. *Drug Deliv* 2001; 8: 19-23.
- [105].Timmy SA, Victor SP, Sharma CP, Kumari V. Betacyclodextrin complexed insulin loaded alginate microspheres-oral delivery system. *Trends Biomater Artif Org* 2002; 15: 48-53.
- [106].Kumar TM, Paul W, Sharma CP, Kuriachan MA. Bioadhesive, pH responsive micromatrix for oral delivery of insulin. *Trends Biomater Artif Org* 2005; 18.
- [107].Onal S, Zihnioglu F. Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: oral therapeutic peptide delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2002; 30: 229-37.
- [108].Wang K, He Z. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *Int J Pharm* 2002; 244: 117-26.
- [109].Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo IV, Goncalves AR, Veiga F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *Int J Pharm* 2006; 311: 1-10.
- [110].Silva CM, Ribeiro AJ, Ferreira D, Veiga F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29: 148-59.
- [111].Reis CP, Veiga FJ, Ribeiro AJ, Neufeld RJ, Damgé C. Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response. *J Pharm Sci* 2008; in press.
- [112].Pan Y, Li Y, Zhao H, Zheng J, Xu H, Wei G, et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm* 2002; 249: 139-47.
- [113].Cui F, Zhang L, Zheng J, Kawashima Y. A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. *J Drug Del Sci Tech* 2004; 14: 435-9.
- [114].Ma Z, Lim TM, Lim L-Y. Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int J Pharm* 2005; 293:271-80.
- [115].Prego C, Torres D, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quinoa E, Alonso MJ. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree. *J Control Rel* 2006; 111:299-308.
- [116].Sajeesh S, Sharma CP. Novel pH responsive polymethacrylic acid-chitosan-polyethylene glycol nanoparticles for oral peptide delivery. *J Biomed Mater Res Pt B Appl Biomater* 2005; 76:299-305.
- [117].Sajeesh S, Sharma CP. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *Int J Pharm* 2006; 325: 147-54.
- [118].Qian F, Cui F, Ding J, Tang C, Yin C. Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization. *Biomacromolecules* 2006; 7: 2722-7.
- [119].Ubaidulla U SY, Ahmed FJ, et al. Chitosan phthalate microspheres for oral delivery of insulin: Preparation, characterization, and in vitro evaluation. *Drug Del* 2007; 14: 19-23.
- [120].Lin Y-H, Mi F-L, Chen C-T, Chang W-C, Peng S-F, Liang H-F, et al. Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules* 2007; 8:146-52.
- [121].Narayani R, Panduranga Rao K. Hypoglycemic effect of gelatin microspheres with entrapped insulin and protease inhibitor in normal and diabetic rats. *Drug Deliv J Deliv Targ Ther Ag* 1995; 2: 29-38.
- [122].Cheng K, Lim L-Y. Insulin-loaded calcium pectinate nanoparticles: effects of pectin molecular weight and formulation pH. *Drug Dev Ind Pharm* 2004 4; 30: 359-67.
- [123].Musabayane CT, Munjeri O, Bwititi P, Osim EE. Orally administered, insulin-loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol* 2000; 164: 1-6.
- [124].Krauland AH, Guggi D, Bernkop-Schnurch A. Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. *J Control Rel* 2004; 95: 547-55.
- [125].Bernkop-Schnurch A, Krauland AH, Leitner VM, Palmberger T. Thiomers: potential excipients for non-invasive peptide delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 253-63.

- [126].Hamidi M, Zarei N, Zarrin AH, Mohammadi-Samani S. Preparation and in vitro characterization of carrier erythrocytes for vaccine delivery. *Int J Pharm* 2007; 338: 70-8.
- [127].Al Achi A, Greenwood R. Human insulin binding to erythrocyte-membrane. *Drug Dev Ind Pharm* 1993 1993; 19: 673-84.
- [128].Al Achi A, Greenwood R. Intraduodenal administration of biocarrier-insulin systems. *Drug Dev Ind Pharm* 1993 1993; 19: 1303-15.
- [129].Asada H, Douen T, Mizokoshi Y, Fujita T, Muranishi S, et al. Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine: relative importance of insulin association characteristics in aqueous solution. *Pharm Res* 1994 1994; 11:1115-20.
- [130].Asada H, Douen T, Waki M, Adachi S, Fujita T, Yamamoto A, et al. Absorption characteristics of chemically modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine. *J Pharm Sci* 1995; 84: 682-7.
- [131].Hashizume M, Douen T, Murakami M, Yamamoto A, Muranishi S, et al. Improvement of large intestinal absorption of insulin by chemical modification with palmitic acid in rats. *J Pharm Pharmacol* 1992 1992; 44: 555-9.
- [132].Hashimoto T, Nomoto M, Komatsu K, Haga M, Hayashi M. Improvement of intestinal absorption of peptides: adsorption of B1-Phe monoglucosylated insulin to rat intestinal brush-border membrane vesicles. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 197-204.
- [133].Calcei P, Salmaso S, Walker G, Bernkop-Schnurch A. Development and in vivo evaluation of an oral insulin-PEG delivery system. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22: 315-23.
- [134].Hinds KD, Campbell KM, Holland KM, Lewis DH, Piche CA, Schmidt PG. PEGylated insulin in PLGA microparticles. In vivo and in vitro analysis. *J Control Rel* 2005; 104: 447-60.
- [135].Malkov D, Angelo R, Wang HZ, Flanders E, Tang H, Gomez-Orellana I. Oral delivery of insulin with the eligen® technology: Mechanistic studies. *Curr Drug Deliv* 2005; 2:191-7.
- [136].Shah D, Shen W-C. Transcellular delivery of an insulin-transferrin conjugate in enterocyte-like Caco-2 cells. *J Pharm Sci* 1996; 85:1306-11.
- [137].Xia CQ, Wang J, Shen WC. Hypoglycemic effect of insulin-transferrin conjugate in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 29: 594-600.
- [138].Xia CQ, Shen WC. Tyrphostin-8 enhances transferrin receptor-mediated transcytosis in Caco-2 cells and increases hypoglycemic effect of orally administered insulin-transferrin conjugate in diabetic rats. *Pharm Res* 2001; 18: 191-5.
- [139].Saffran M, Kumar GS, Savariar C, Burnham JC, Williams F, Neckers DC. A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. *Sci Reports* 1986; 233:1081-4.
- [140].Narayani. Oral delivery of insulin making needles needless. *Trends Biomat Artif Org* 2001; 15:12-6.
- [141].McPhillips A, Uraizee S, Ritschel W, Sakr A. Evaluation of fluid-bed applied acrylic polymers for the targeted peroral delivery of insulin. *STP Pharma Sci* 1997; 7: 476-82.
- [142].Kraeling MEK, Ritschel WA. Development of a colonic release capsule dosage form and the absorption of insulin. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1992; 14: 199-209.
- [143].Geary RS, Wade Schlameus H. Vancomycin and insulin used as models for oral delivery of peptides. *J Control Rel* 1993; 23: 65-74.
- [144].Ziv E, Kidron M, Raz I, Krausz M, Bar On H, et al. Oral administration of insulin in solid form to nondiabetic and diabetic dogs. *J Pharm Sci* 1994 1994; 83: 792-4.
- [145].Rubinstein A, Radaï R. In vitro and in vivo analysis of colon specificity of calcium pectinate formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 1995 1995; 41: 291-5.
- [146].Tozaki H, Komoike J, Tada C, Maruyama T, Terabe A, Suzuki T, et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1016-21.
- [147].Manosroi A, Manosroi J. Microencapsulation of human insulin DEAE-dextran complex and the complex in liposomes by the emulsion non-solvent addition method. *J Microencapsul* 1997; 14: 761-8.
- [148].Hosny EA, Khan Ghilzai NM, Al Najar TA, Elmazar MM. Hypoglycemic effect of oral insulin in diabetic rabbits using pH-dependent coated capsules containing sodium salicylate without and with sodium cholate. *Drug Dev Ind Pharm* 1998 1998; 24: 307-11.
- [149].Morishita M, Matsuzawa A, Takayama K, Isowa K. Improving insulin enteral absorption using water-in-oil-water emulsion. *Int J Pharm* 1998; 172: 189-98.
- [150].Silva-Cunha A, Cheron M, Grossiord JL, Puisieux F, Seiller M. W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: biological activity after oral administration to normal and diabetic rats. *Int J Pharm* 1998; 169: 33-44.
- [151].Morishita M, Kajita M, Suzuki A, Takayama K, Chiba Y, Tokiwa S, et al. The dose-related hypoglycemic effects of insulin emulsions incorporating highly purified EPA and DHA. *Int J Pharm* 2000; 201: 175-85.
- [152].Hosny EA, Al-Shora HI, Elmazar MM. Effect of bioadhesive polymers, sodium salicylate, polyoxyethylene-9-lauryl ether, and method of preparation on the relative hypoglycemia produced by insulin enteric-coated capsules in diabetic beagle dogs. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28: 563-70.
- [153].Watanasirichaikul S, Rades T, Tucker IG. In vitro release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 473-80.
- [154].Radwan MA, Aboul-Enein. The effect of the oral absorption enhancers on the in vivo performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats. *J Microencapsul* 2002; 19: 225-35.
- [155].Kim B-Y, Jeong JH, Park K, Kim J-D. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-

microparticle conjugates in oral insulin delivery system. *J Control Rel* 2005; 102: 525-38.

[156].Kavimandan NJ, Losi E, Peppas NA. Novel delivery system based on complexation hydrogels as delivery vehicles for insulin-transferrin conjugates. *Biomaterials* 2006 7; 27: 3846-54.

[157].Cui F, Shi K, Zhang L, Tao A, Kawashima Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J Control Rel* 2006; 114: 242-50.

[158].Zhang N, Ping Q, Huang G, Xu W, Cheng Y, Han X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Int J Pharm* 2006; 327: 153-9