



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JANIRA MARIA NASCIMENTO ALVES BEZERRA

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS ANALÍTICOS E TECNOLÓGICOS PARA
OBTENÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS PARA
ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA**

RECIFE

2016

JANIRA MARIA NASCIMENTO ALVES BEZERRA

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS ANALÍTICOS E TECNOLÓGICOS PARA
OBTENÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS PARA
ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares-Sobrinho

Recife

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Bezerra, Janira Maria Nascimento Alves

Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral da insulina/Janira Maria Nascimento Alves Bezerra. – Recife: O Autor, 2016.
44 f.: il.

Orientadores: José Lamartine Soares-Sobrinho
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Farmacologia 2. Insulina 3. Nanotecnologia I. Soares-Sobrinho, José Lamartine (orient.) II. Título.

615.1 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2016-228



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 15 de março de 2016

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 15 de março de 2016, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Mônica Felts de La Roca Soares
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Magaly Andreza Marques de Lira
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr^a. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Carvalho

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda de Larrazábal

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA**

Prof. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

À Minha Mãe querida, Vilma Nascimento, ao meu querido Pai Edson Alves e aos meus amados irmão Rivaldo Souza e cunhada Andréia Passos, são os meus alicerces nessa passagem aqui na terra.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, Primeiramente, pela graça, amor e misericórdia em minha vida, por ter me proporcionado esta experiência, dando-me forças na caminhada para a execução do projeto.

Aos meus pais **Vilma Nascimento** e **Edson Alves** por todo amor, carinho, dedicação, paciência quanto as minhas ausências para me dedicar ao projeto, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, por toda compreensão e ajuda. Obrigada por tudo!!

Ao meu irmão **Rivaldo Souza** e cunhada **Andréia Souza** pela ajuda diária das tarefas familiares, pelo carinho, cuidado e apoio constante. Deus vos abençoe!! Muito grata!!

Ao **Prof. Doutor José Lamartine Soares Sobrinho** pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, pela orientação, ensinamentos científicos, pela compreensão, pela paciência e por todos os puxões de orelha necessários para meu aprendizado, muito obrigada por tudo professor. Desejo bênçãos de Deus para sua vida e de toda sua família.

A **Dr^a Flávia Lucena** por toda ajuda, carinho, compreensão, ensinamentos científicos, pelo seu envolvimento e adição no projeto com seu conhecimento e experiência, pelos momentos de agonia para me acordar e correr com o projeto, por encabeçar a ideia da escrita do artigo de revisão sobre a goma de cajueiro, que resultou em uma destacável publicação. Deus a abençoe abundantemente.

A **Prof^a. Larissa Rolim** por ter me acolhido, pelos ensinamentos científicos, pela oportunidade e confiança de realização de uma parte do projeto em seu laboratório com sua ajuda e conhecimento. E a toda sua equipe do CAFMA/UNIVASF que me receberam muito bem.

A querida **Camila Figueirêdo, Maria Luiza, Ana Carolina, Thaisa Cardoso e Dayane Casimiro** que sempre com paciência se dispuseram a ouvir sobre o projeto e me ajudar, mesmo ocupadas com suas atividades. Pelo apoio emocional, pelas palavras de conforto e as broncas também. Deus vos recompense muito.

As queridas **Alessandra Ribeiro e Laisa Fontinele** por todo suporte e ajuda na minha ida a Teresina, auxiliando nos trabalhos laboratoriais e convivência no local, respectivamente. Alterando seus horários diários e compartilhando momentos de família. Muito grata tudo!!

A **Prof^a. Mônica Felts de La Rocca Soares**, pelos ensinamentos, por todo apoio técnico, pelo aprendizado pessoal e profissional.

A **Prof^a. Miracy Muniz** por todo apoio e ensinamentos.

Ao **Prof. Edson Cavalcanti da Silva Filho**, por todos ensinamentos e apoio técnico

Aos **Profs. Antonio Jose Ribeiro e Francisco José de Baptista Veiga** p
ensinamentos e pelo apoio técnico.

Às minhas queridas amigas **“sexteto”** que estiveram ao meu lado nessa jornada, pela amizade, companheirismo, pelo apoio e compreensão da minha ausência nas festas e encontros **Suellen Ferreira, Renata de Cássia, Waleska Leão, Marília Santana, Shirliane Nayana.**

A **toda equipe querida de companheiros do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos – NCQMC** por todo apoio, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela ajuda, ensinamentos, momentos de descontração e convívio diário.

“É graça divina começar bem.
Graça maior, persistir na caminhada certa.
E graça das graças é nunca desistir.”
Dom Helder Câmara

RESUMO

BEZERRA, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina. 2016. 108.f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos utilizando biopolímeros, como a goma de cajueiro e quitosana tem-se destacado pela formação de nanoestruturas por complexação polieletrólítica, realizada pela interação das diferentes cargas dos materiais e devido as suas promissoras propriedades, dentre elas: excelente biodegradabilidade, elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade. Usados no desenvolvimento nanotecnológico de formulações para proteção de fármacos peptídicos, como a insulina, para sua administração por via oral, no qual faz-se necessário pela sua instabilidade em variações de pH. Este trabalho teve como objetivo a síntese de nanopartículas a partir de biopolímeros por complexação polieletrólítica para administração oral de insulina e avaliação analítica do fármaco e seu principal produto de degradação o A-21 em meio ácido. Nanopartículas de goma de cajueiro e quitosana foram sintetizadas por complexação polieletrólítica com e sem adição do tripolifosfato de sódio, como agente de reticulação. Foram caracterizadas quanto ao seu tamanho, carga superficial, índice de polidispersão e adicionalmente a Espectroscopia da Região do Infravermelho (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TG). Para a determinação analítica da insulina e seu principal produto de degradação o A-21 foi realizado um planejamento experimental fatorial, a fim de analisar quais variantes iriam influenciar para obtenção de um menor tempo de análise das moléculas por HPLC. Vinte e sete experimentos foram realizados e destacou-se dentre os valores observados nos tempos de retenção de 5,18 min para insulina e 9,10 min para o A-21, na condição onde a temperatura da coluna foi de 35°C, fluxo do eluente de 1,0 mL/min⁻¹ e na proporção da fase móvel de 52% KH₂PO₄, 31% acetonitrila e 17% metanol, uma análise final com cerca de 11 minutos. Em média os fatores que mais influenciaram no sistema foram o fluxo do eluente e a proporção da fase móvel, demonstrados através da estimativa dos efeitos, análise da variância e teste F. O modelo linear obtido demonstrou ter uma boa predição para o método, com pontos reais de distribuição aleatórios condizentes aos resultados obtidos experimentalmente, a variância total explicada de 91,14% e o modelo deixa de explicar 8,86% dos resíduos. A adequabilidade cromatográfica da combinação das variáveis independentes resultaram em valores próximos ou dentro dos limites estabelecidos. Os resultados das avaliações de concentração dos biopolímeros, proporção dos agentes de reticulação, ordens de adição, pH das soluções mostraram-se bastante significativos na influência dos tamanhos das partículas, potencial zeta e índice de polidispersão. Houve uma grande distinção das preparações com e sem TPP, pois foi evidenciada uma eficaz ação reticulante entre os polieletrólitos, as ligações cruzadas realizadas foram importantes para aperfeiçoamento dos parâmetros, demonstrado a redução dos tamanhos das nanopartículas, de modo homogêneo e com baixos índices de polidispersão, potenciais zeta na faixa neutra diferindo nos valores de acordo com a concentração adicionado. Através das caracterizações realizadas por FTIR, MEV e TG houve a demonstração da interação entre os materiais estudados. As características e propriedades apresentadas pelas nanoesferas formadas pela interação GC/TPP/QT indicam um promissor sistema de liberação de fármacos e proteção para moléculas instáveis ao ambiente gastrointestinal.

Palavras-chave: Nanopartículas, biopolímeros, goma de cajueiro, quitosana, TPP, sistema de liberação.

ABSTRACT

BEZERRA, M.N.A. Evaluation of analytical and technological aspects to obtain nanostructured polymeric systems for oral administration of insulin. 2016. 108.f. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The development of drug delivery systems using biopolymers such as cashew gum and chitosan it has been highlighted by the formation of nanostructures by complexation polyelectrolytic held by the interaction of the different loads of materials and due to their promising properties, among them: excellent biodegradability, high biocompatibility, low toxicity. Used in nanotechnological development of formulations for protection peptide drugs such as insulin, for administration orally, in which it is necessary for its instability at pH variations. This study aimed to the synthesis of nanoparticles from biopolymers by complexation polyelectrolytic for oral administration of insulin and analytical evaluation of the drug and its main degradation product A-21 in acid. cashew gum and chitosan nanoparticles were synthesized by complexation polyelectrolytic with and without addition of sodium tripolyphosphate as crosslinking agent. They were characterized as to their size, surface charge, polydispersity and additionally Spectroscopy Infrared Region index (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetric Analysis (TG). For the analytical determination of insulin and its main degradation product A-21 factorial experimental design was conducted to analyze variants which would influence to obtain a shorter analysis of molecules by HPLC. Twenty-seven experiments were conducted and it was highlighted among the values observed at 5.18 min retention time of 9.10 min for insulin and A-21 in the condition where the column temperature was 35 ° C, flow of the eluent of 1.0 ml / min⁻¹ and the rate of mobile phase of 52% KH₂PO₄, 31% acetonitrile and 17% methanol, with a final analysis about 11 minutes. On average the factors that most influence the system were the eluent flow and the proportion of the mobile phase, demonstrated by estimating the effect of variance analysis and test F. The resulting linear model was shown to have a good prediction for the method, with points real random distribution consistent with the results obtained experimentally, the total explained variance of 91.14% and the model fails to explain 8.86% of the waste. Chromatographic suitability of the combination of the independent variables resulted in close to or within the established limits. The results of evaluations concentration of biopolymers, the proportion of cross-linking agents, addition orders, the solutions pH were quite significant in the influence of particle size, zeta potential and molecular weight distribution index. There was distinction of preparations with and without TPP, as was evidenced effective action crosslinking of polyelectrolytes, cross-connections made were important for improvement of the parameters shown to reduce the size of the nanoparticles, homogeneous way and with low levels of polydispersity, zeta potential in the neutral range in differing values according to the concentration added. Through the characterizations made by FTIR, SEM and TG was the demonstration of the interaction between the studied materials. The characteristics and properties presented by the nanospheres formed by the interaction GC / TPP / QT indicate a promising system of drug delivery and protection for unstable molecules to the gastrointestinal environment.

Key-words: Nanoparticles, biopolymers, cashew gum, chitosan, TPP, polyelectrolyte complex, cross-linking, drug delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração dos tipos de nanopartículas que podem ser: nanocápsulas e nanoesferas.	27
Figura 2: Representação da estrutura do poliânion tripolifosfato de sódio (TPP).	33
Figura 3: Exsudato extraído do tronco do cajueiro (A), goma obtida em pó após processos de purificação (B).	35
Figura 4: Representação de um fragmento da goma de cajueiro. R representa D-manose, L-ramnose, a L-arabinose ou 1,2 –arabinose ligadas as cadeias.	36
Figura 5: Representação da estrutura do biopolímero quitosana.	38
Figura 6: Esquema representando a síntese da molécula de insulina.	43
Figura 7: Cromatograma obtido evidenciando a formação do pico da insulina e seu produto de degradação o A-21 baseado no método de Najjar et al (2014).	61
Figura 8: Adequação na escala do cromatograma para melhor visualização do pico do A-21 (aumento do zoom) referente a indicação na (Figura 9).	62
Figura 9: Mecanismo de degradação da molécula de insulina humana em soluções de pH ácido.	63
Figura 10: Cálculo da probabilidade normal a partir das estimativas dos efeitos.	66
Figura 11: Gráfico dos valores observados (no eixo Y) versus valores previsto (eixo X) para predição do método ideal.	68
Figura 12: Cromatograma obtido após otimização do método evidenciando formação do pico de insulina (5.81 min) do A-21 (9,10 min).	70
Figura 13: Adequação na escala do cromatograma para melhor visualização do pico do A-21 (aumento do zoom) referente a indicação na (Figura 12).	70
Figura 14: Ilustração do processo de interação eletrostática entre os biopolímeros, goma de cajueiro (GC) e quitosana (QT) para formação das nanoesferas.	74
Figura 15: Representação da interação entre os átomos presentes nas moléculas de goma de cajueiro (GC) e tripolifosfato de sódio (TPP).	78
Figura 16: Representação esquemática das possíveis interação entre os biopolímeros goma de cajueiro (GC), quitosana (QT) e tripolifosfato de sódio (TTP) para a formação de nanopartículas.	83
Figura 17: Espectros FTIR correspondente ao complexo polieletrólítico formado e o de cada constituinte: Quitosana, goma de cajueiro (GC), tripolifosfato de sódio (TPP).	84
Figura 18: Morfologia das nanoesferas formadas, artefatos e agregados, numa formulação sem adição de crioprotetor, observadas por microscopia eletrônica de varredura.	86

Figura 19: Morfologia do complexo polieletrólítico sem adição de crioprotetor visualizado por microscópio eletrônico de varredura (MEV).	86
Figura 20: Imagem do agregado formado do complexo polieletrólítico com a adição de crioprotetor (Manitol 1%).	87
Figura 21: Curva de TGA demonstrando os eventos observados no complexo polieletrólítico (CP), Goma de cajueiro (GC), Tripolifosfato de sódio (TPP) e a quitosana (QT).	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis usados no Planejamento Fatorial 3^3 empregados no desenvolvimento do método analítico para análise da insulina.	52
Tabela 2: Matriz do planejamento 3^3 utilizada no desenvolvimento do método cromatográfico para insulina, Montgomery (2003).	53
Tabela 3: Representação da ordem de gotejamento das soluções de quitosana (QT) e Tripolifosfato de sódio (TPP) sobre a solução de goma de cajueiro (GC) para obtenção das nanoesferas por complexação polieletrólítica.	56
Tabela 4: Condições cromatográficas realizadas por diversos autores e sistemas cromatográficos utilizados, juntamente com as respostas obtidas (tempo de retenção).	60
Tabela 5: Matriz do planejamento fatorial 3^3 (27 experimentos) e os tempos de retenção (TR) obtidos após realização das análises.	64
Tabela 6: Efeitos estimados calculados para as variáveis independentes e as associações entre elas. Variáveis destacadas em vermelho são estatisticamente significativas.	65
Tabela 7: Efeitos estimados recalculados excluindo fatores não significativos, demonstrando a persistência da significância das variáveis significativas.	66
Tabela 8: Análise da variância para o modelo linear.	69
Tabela 9: Adequabilidade do sistema cromatográfico referentes ao pico da insulina e o A-21.	71
Tabela 10: Condições dos ensaios extras realizados, verificando a inadequabilidade do sistema cromatográfico nos níveis testados.	73
Tabela 11: Determinação do tamanho, Pdi e potencial zeta das diferentes proporções de goma de cajueiro (GC) e quitosana (QT) misturados para obtenção de nanoesferas.	75
Tabela 12: Determinação do tamanho, Pdi e potencial zeta das diferentes proporções de goma de cajueiro (GC), quitosana (QT) e tripolifosfato de sódio (TPP), após formadas as nanoesferas.	79
Tabela 13: Representação dos efeitos causados no tamanho, pdi e potencial zeta das nanoesferas sintetizadas com diferentes ordens de adição do polímero (QT) e agente de reticulação (TPP).	81

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High-performance liquid chromatography
TR	Tempo de retenção
A-21	Desamidação do aminoácido asparagina posição 21 da insulina
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio dibásico
FACEPE	Fundação de Apoio Científico do Estado de Pernambuco
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
DOE	Design e otimização de experimentos
PVE	Pesquisador visitante exterior
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
FTIR	Espectroscopia do infravermelho com transformador de Fourier
TA	Análise termogravimétrica
LIMAV	Laboratório interdisciplinar de materiais avançados
PDI	Índice de polidispersão
DM	Diabetes mellitus
AVE	Acidente vascular encefálico
RMN	Ressonância magnética nuclear
QT	Quitosana
GC	Goma de cajueiro
NP	Nanopartículas
PLGA	Poli (lático- glicólico)
PEG	Polietileno glicol
PECA	Poli (butilcianoacrilato)
PMNA	Poli (etilcianoacrilato)
PACA	Poli (alquilcianoacrilato)
PLA	Ácido polilático
TPP	Tripolifosfato de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Micro-Litro
Min^{-1}	Minuto menos 1
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
T	Temperatura
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
®	Marca registrada
+	Mais
-	Menos
=	Igual
°	Grau
M	Molar
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
mg	Miligrama
g	grama
L	Litro
β	Letra grega beta
ε	Erro aleatório
f	Valor da porção anterior do pico, em relação a 5% da altura
mV	Mili volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1 NANOTECNOLOGIA	26
3.1.1 <i>Nanopartículas</i>	26
3.2 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	27
3.2.1 <i>Polimerização de monômeros por emulsão</i>	28
3.2.2 <i>Polimerização interfacial de monômeros</i>	28
3.2.3 <i>Emulsão e evaporação do solvente a partir de polímeros pré-formados</i>	29
3.2.4 <i>Deposição interfacial e deslocação do solvente</i>	30
3.2.5 <i>Preparação de nanopartículas por diálise</i>	31
3.2.6 <i>Por complexação polieletrólítica</i>	31
3.2.7 <i>Por Reticulação iônica</i>	32
3.3 BIOPOLÍMEROS UTILIZADOS COMO MATÉRIAS PRIMAS NA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	33
3.3.1 <i>Goma de cajueiro</i>	34
3.3.2 <i>Quitosana</i>	38
3.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA FÁRMACOS PEPTÍDICOS	40
3.5 DIABETES MELLITUS	41
3.6 INSULINA	42
3.7 DEGRADAÇÃO DA MOLÉCULA DE INSULINA HUMANA	45
3.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE INSULINA	46
3.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 PARTE I: PLANEJAMENTO FATORIAL COMO FERRAMENTA PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE INSULINA E O SEU PRINCIPAL PRODUTO DE DEGRADAÇÃO O A-21	50
4.1.1 <i>Matéria prima, reagentes</i>	50
4.1.2 <i>Equipamentos</i>	50
4.1.3 <i>Preparo da solução de insulina</i>	50

4.1.4 Preparo da solução de A-21	50
4.1.5 Sistema e condições cromatográficas	50
4.1.6 Adequabilidade do sistema cromatográfico	51
4.1.7 Planejamento experimental e otimização do método analítico da insulina R por CLAE – DAD	51
4.2 PARTE II: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS OBTIDOS A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS	52
4.2.1 Substâncias, reagentes e equipamentos	54
4.2.2 Preparação das soluções de quitosana, goma de cajueiro e tripolifosfato de sódio	54
4.2.3 Preparação de nanoesferas de goma de cajueiro/ quitosana por complexação polieletrólítica	55
4.2.4 Determinação das quantidades de goma de cajueiro e quitosana incorporada nas microesferas	55
4.2.5 Preparação de nanoesferas de goma de cajueiro/ quitosana e agente de reticulação por complexação polieletrólítica	55
4.2.6 Avaliações analíticas da formação de nanopartículas	56
4.2.6.1 Determinação de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta	56
4.2.6.2 Estudo de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	56
4.2.6.3 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	56
4.2.6.4 Análise termogravimétrica (TG)	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 PARTE I: PLANEJAMENTO FATORIAL COMO FERRAMENTA PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE INSULINA E O SEU PRINCIPAL PRODUTO DE DEGRADAÇÃO O A-21	59
5.1.1 Análise da insulina e A-21 por CLAE-DAD	59
5.1.2 Análise estatística das estimativas dos efeitos	64
5.1.3 Adequabilidade do sistema cromatográfico para determinação da insulina	69
5.2 PARTE II: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS OBTIDOS A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS	73
5.2.1 Formação de nanoesferas de goma de cajueiro e quitosana	73
5.2.2 Avaliação das diferentes proporções dos biopolímeros na obtenção das nanoesferas	73
5.2.3 Avaliação de nanoesferas de goma de cajueiro, quitosana e TPP por complexação polieletrólítica	76
5.2.4 Influência da proporção do agente reticulante na formação dos complexos	78
5.2.5 Efeito da ordem de adição biopolímero/agente de reticulação	80
5.2.6 Efeitos da variação de pH das soluções na formação da nanoesferas	81

5.2.7 Avaliações analíticas da formação de nanopartículas	83
5.2.7.1 Estudo de Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)	83
5.2.7.2 Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	85
5.2.7.3 Análise Termogravimétrica (TG)	87
6 CONCLUSÃO	91
7 PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICE A – Artigos publicados	107

INTRODUÇÃO

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

1 INTRODUÇÃO

Os fármacos peptídicos, desempenham importantes papéis numa gama de processos biológicos e reações, usualmente são administrados por via parentérica, devido as particularidades físico-químicas e características biofarmacêuticas (LAUTERBACH; GOYMANN, 2015). Entretanto, os estudos tem se focado no desenvolvimento de sistemas de liberação nanoparticulados polimérico, os quais apresentam pelo menos uma das suas dimensões na faixa nanométrica, para a administração alternativa por via oral, livrando-os das complicações invasivas das outra vias e demonstrando maior facilidade de dosificação, contornando os fatores críticos atribuídos aos processos da via parentérica e protegendo a molécula (LAMMERS, 2013; AGRAWAL et al., 2014; ZARNEGAR, 2014; TAKEUCHI; TAHARA; ONODERA, 2016; ZHANG et al., 2016).

A aplicação de bioplímeros como materiais para preparação de nanopartículas, vem apresentando vantagens destacáveis frente aos polímeros sintéticos, proporcionando uma excelente degradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade, alguns até apresentam a característica de mucoadesividade, como a quitosana (SHUKLA; TIWARI, 2012; YANG et al., 2015). Dentre eles a goma de cajueiro tem demonstrado emprego promissor, devido as suas peculiaridades estruturais e físico-químicas. Obtida a partir do exsudato derivado da espécie *Anacardium occidentale* L, bastante cultivada nas regiões do nordeste brasileiro. A presença do grupamento ácido glucurônico viabiliza a realização de interações com outros polímeros catiônico, que pode resultar na formação de sistemas nanoestruturados, dependendo do método de preparo empregado, para carreamento de substâncias ativas (FURTADO et al., 2013, RIBEIRO et al., 2016).

As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas pelo mais variados métodos, dependendo dos polímeros utilizados e o fármaco que se pretende encapsular. Atualmente um dos métodos mais usados é o de complexação polieletrólítica, no qual os polímeros interagem espontaneamente por interações eletrostáticas, a partir das diferenças de suas cargas, por meio também de ligações de hidrogênio, interações, não sendo necessário o uso de solventes ou exposição dos materiais a métodos extremos de preparação (KIZELAY; KAYITMAIZER; DUBIN, 2011; LUO; WANG, 2014; MASOOD, 2016).

A molécula de insulina, fármaco peptídico, necessita da manutenção das condições adequadas de temperatura, luminosidade, pH da solução e armazenamento para manter sua estabilidade, estrutura conservada e desenvolver sua atividade terapêutica (NAKAZAWA et al., 2012). Porém, quando os critérios para sua conservação não são obedecidos, leva-se a degradação da proteína e diminuição de sua ação biológica (STRICKLEY, 1995). Como forma de identificar tais eventos na molécula, tem-se empregado técnicas analíticas sensíveis, robustas e eficientes, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (MOHAMMAD et al, 2014) em conjunto com a criação e otimização de métodos de análises que reproduzam os resultados de forma rápida e fidedigna, por meio de planejamentos experimentais (KUMAR et al., 2015; XIE et al., 2015).

O presente trabalho realizado faz parte dos objetivos iniciais do projeto PVE - Pesquisador Visitante do Exterior, edital fomentado pelo CNPq, o qual tem por finalidade a síntese de nanopartículas a partir de biopolímeros para administração oral de insulina e avaliação analítica do fármaco. Entretanto, no presente estudo adicionalmente foi realizada uma parte das pesquisas voltadas para a determinação de insulina e seu principal produto de degradação o A-21 por meio da utilização de ferramentas de planejamento fatorial para otimização de método analítico, com posterior aplicação do fármaco nas nanoestruturas já obtidas, sendo por isso o presente estudo dividido em duas partes, a primeira citada anteriormente e a segunda voltada para a síntese de nanopartículas poliméricas.

OBJETIVOS

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar nanopartículas a partir de biopolímeros para administração oral de insulina e avaliar analiticamente o fármaco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o método analítico rápido, simples e eficiente para determinação de insulina e seu principal produto de degradação o A-21 por CLAE – DAD.
- Sintetizar nanopartículas a base de goma de cajueiro e quitosana por complexação polieletrólítica para aplicação em sistemas de liberação de ativos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 NANOTECNOLOGIA

Com o advento dos estudos sobre nanotecnologia, novos rumos foram sendo descobertos para a empregabilidade em sistemas de liberação de medicamentos, avanços rápidos e recentes foram evidenciados, de notável destaque na área farmacêutica a partir dos anos 50 e 60, com a demonstração de propostas de desenvolvimento das primeiras nanopartículas, visando a liberação de fármacos e vacinas (KREUTER, 2007; CROMMELIN; FLORENCE, 2013).

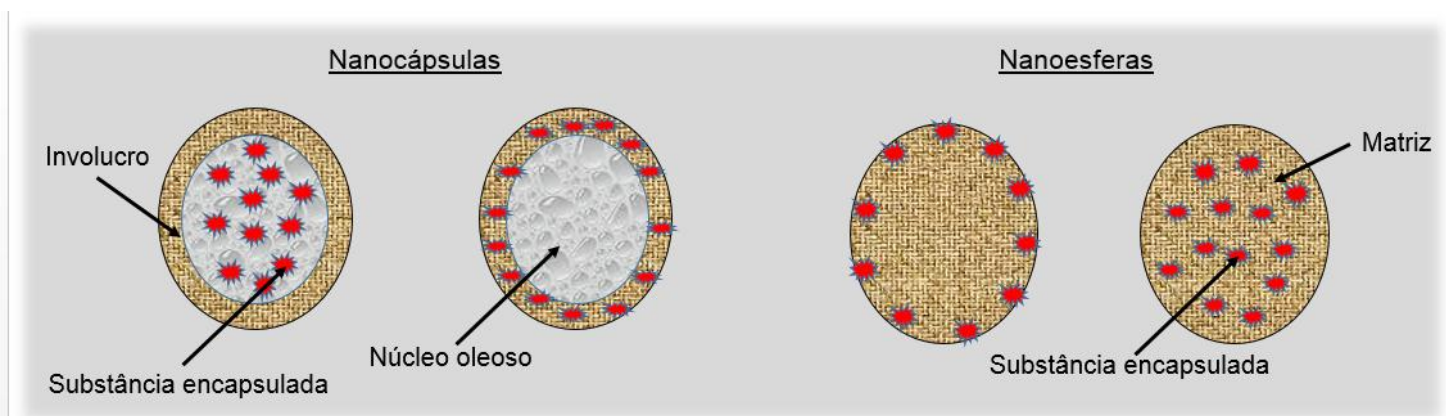
No ano de 2005 foi iniciada a comercialização do Abraxane®, o primeiro produto aprovado de uma formulação de nanopartículas sintetizadas a partir de albumina, para encapsulamento do paclitaxel, um antineoplásico (KAIALY; SHAFIEE, 2016), desde então formulações produzidas com nanopartículas tem sido investigadas para o tratamento de algumas doenças, tais como: tuberculose (PANDEY; SHARMA; KHULLER, 2005), diabetes (FONTE et al., 2015), câncer (PEPPAS; BLANCHETTE, 2004) entre outras e sua empregabilidade nas mais diversas indústrias tem sido atuante, como: a de alimentos, biomédica, cosméticos, gráfica, agrícola etc (KUMARI; KUMAR; YADAV, 2010; BOISSEAU; LOUBATON, 2011; HEILIGTAG; NIEDERBERGER, 2013).

3.1.1 Nanopartículas

As nanopartículas são caracterizadas pelo seu reduzido diâmetro, que compreende pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica, numa faixa de 1 a 1000 nm (KAIALY; SHAFIEE, 2016). A sua inferior granulometria é um dos focos de sua utilização em diversas formulações, por desempenhar algumas vantagens, como: a facilidade na passagem pelas barreiras biológicas, captação a nível intracelular, o qual aumenta a biodisponibilidade de muitas substâncias ativas (HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), além de atuar como proteção ao encapsular moléculas instáveis, melhorando a estabilidade física e química a diversos fatores, como: o pH do meio, atividade enzimática, ação do sistema imunológico e também proteger o organismo de moléculas tóxicas, liberando-as especificamente em seus locais de ação (OURIQUE; POHLMANN; GUTERRES; BECK, 2008)

Estruturalmente as nanopartículas podem ser de dois tipos, divididas de acordo com sua composição e organização: nanoesferas e nanocápsulas (RAO E GECKELER, 2011). As nanoesferas apresentam-se como um sistema do tipo matriz em sua estrutura, os materiais interagem e se organizam sem delimitações de espaço entre si, as substâncias ou fármacos podem estar retidos ou adsorvidos entre o material ou sobre a sua superfície, distribuídos de maneira homogênea ou heterogênea (Figura 8). Porém, as nanocápsulas são sistemas em que há a presença de um invólucro circundando um núcleo, que pode ser lipofílico ou hidrofílico, dependendo do método de preparação (LETCHFORD; BURT, 2007; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). A substância encapsulada pode estar presente de forma suspensa ou dissolvida no conteúdo do núcleo ou também adsorvida a superfície (Figura 1) (KHOEE; YAGHOUBIAN, 2008; HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Figura 1: Ilustração dos tipos de nanopartículas que podem ser: nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: Autoria própria.

3.2 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Para escolha do método adequado de preparação de nanopartículas é de fundamental importância analisar as propriedades dos materiais precursores da síntese, como a composição do polímero (carga superficial, hidrofobicidade, toxicidade, etc), a natureza dos excipientes, quando necessário, e as características físico-químicas do fármaco, que leva a prever a sua localização nas nanopartículas. Tais pontos tem forte influência nas características finais, como o tamanho da partícula, carga final, via de administração, área de aplicação (Kawasaki; PLAYER; 2005; REIS et al., 2006; HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A formação das nanopartículas pode dá-se de forma geral por reações de polimerização de monômeros, que subdividem-se em métodos que envolvam reações de

polimerização interfacial ou por meio de emulsões (aquosas ou orgânicas), ou outra forma de síntese e a mais usual que utiliza o polímero já formado, seja ele de origem natural, sintético, semi sintético ou diretamente de uma macromolécula (BOISSEAU; LOUBATON, 2011; RAO; GECKELER, 2011).

3.2.1 Polimerização de monômeros por emulsão

Consiste em um dos métodos mais rápidos, antigos, simples e que direciona a elevados níveis de eficiência de encapsulação (ROLLAND et al., 1986). Para a reação de polimerização de monômero por emulsão, micro emulsão, mini emulsão há a presença de uma fase externa aquosa ou orgânica e o monômero pode estar disperso em uma delas sem ou com adição de agentes emulsivos, respectivamente. A reação ocorre quando existe a interação entre uma molécula iniciadora utilizada, que pode ser um íon ou radical livre com o monômero. Khoee e colaboradores (2014) prepararam nanopartículas a partir de PCL/PEG por fotopolimerização do PEG com pares hidrofílicas do PCL utilizando como iniciador Irgacure 2959. Por meio do uso desse método alguns fármacos já foram encapsulados, como a doxorrubicina (ROLLAND et al., 1986) e antibióticos beta- lactâmicos (TUROS et al., 2007).

Entretanto, o uso do método limita-se a algumas desvantagens, como a utilização de polímeros não biodegradáveis (poli(metilmetacrilato) (PMMA), poli(etilcianoacrilato) (PECA), poli(butilcianoacrilato) (PBCA)), a necessidade de iniciação físico química da reação, o uso de solventes orgânicos tóxicos, agentes emulsivos e a formação de produtos finais com a presença de resíduos de monômeros e moléculas iniciadoras (KUMARI; KUMAR; YADAV, 2010; RAO; GECKELER, 2011)

3.2.2 Polimerização interfacial de monômeros

A reação de polimerização interfacial envolve a interação entre dois monômeros dissolvidos numa fase orgânica ou aquosa com reativos (iniciadores) na interface de dois líquidos. Usualmente, esse método utiliza como polímero base os derivados de PACA (poli(alquilcianoacrilato)). Os monômeros do polímero escolhido juntamente com a substância que deseja-se encapsular são dissolvidos numa mistura de óleo e álcool absoluto, submetida ao processo de extrusão através de uma agulha e gotejada sobre uma solução aquosa com ou sem a presença de etanol e/ou cetona e posterior adição de um agente emulsivo, sendo necessário a concentração por evaporação do solventes utilizado, como demonstrado pelo protocolo de preparação desenvolvido por Khouri e colaboradores (1986).

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

A formação das nanopartículas pela polimerização dos monômeros ocorre de forma espontânea a partir das interações com os íons iniciadores presentes na fase aquosa, com altas taxas de eficiência de encapsulação e formação *in situ* de uma membrana polimérica nas nanocápsulas. O método é bastante conhecido para preparação das nanopartículas pela sua facilidade na preparação e tem sido adotado em muitos campos, diferenciando em alguns pontos dependendo das características da substância encapsulada. Porém, semelhantemente ao método anterior apresenta como desvantagens o uso de solventes orgânicos como fase externa e processos que desestabilizem as moléculas encapsuladas.

3.2.3 Emulsão e evaporação do solvente a partir de polímeros pré-formados

Os métodos anteriormente citados envolvem a eliminação de compostos residuais, devido ao processo de formação das nanopartículas realizado, que grande parte dos monômeros usados são de baixo índice de biodegradabilidade, tornando difícil a execução da preparação e metabolismo dos polímeros, desta forma a síntese de nanopartículas demonstra ser mais usual, simples e vantajosa a partir de polímeros pré-formados, ponto que será explanado nos exemplos de metodologias citadas a seguir:

Um dos primeiros métodos de preparação de nanopartículas desenvolvidos com a utilização de polímeros pré-formados, sendo a princípio o polímero escolhido dissolvido numa fase orgânica e estabilizadores e/ou aditivos são adicionados na fase aquosa para a preparação de uma emulsão, sendo a mesma submetida a homogeneização a altas velocidade ou por meio de ultrassons, seguindo da evaporação do solvente utilizado pelo emprego de altas temperaturas, subsequentemente acontece a precipitação do polímero e formação das nanopartículas. Em alguns casos adicionalmente é finalizado com a liofilização do produto final para melhor conservação e estudos de caracterização (MOHAMED et al., 2016; HAGGAG et al., 2016).

Os polímeros sintéticos mais comumente usados para esse método são o ácido poli(láctico-glicólico) (PLGA) que foi utilizado por Mohamed e colaboradores (2016) para o encapsulamento de curcumina e por Haggag e colaboradores (2016) que usou a técnica para projetar um sistema de entregar para liberação controlada de insulina, além do PLGA revestida com PEG. Phuong e colaboradores a partir do ácido poliláctico (PLA) juntamente com o TPGS sintetizaram nanopartículas com paclitaxel encapsulado. A metodologia requer a utilização de altas temperaturas para evaporação do solvente, que pode influenciar na

alteração de tamanho e morfologia das nanopartículas e fortes processos de agitação limitando a aplicabilidade do método a determinadas substâncias ativas mais sensíveis, o qual demanda tempo no processo de preparação, além de na sua maioria ser empregado para fármacos lipossolúveis.

3.2.4 Deposição interfacial e deslocação do solvente

O processo de preparação por deposição interfacial é realizado dissolvendo-se o polímero juntamente com o fármaco em uma mistura de solventes de baixa polaridade que podem ser a acetona, benzoato de benzila e fosfolipídios, sendo essa mistura gotejada sobre uma solução aquosa sob agitação, ocorrendo a deposição do polímero na interface gerada entre as gotículas de óleo e a fase externa aquosa, formando as exclusivamente nanocápsulas, Song e colaboradores (2015) utilizaram PLGA-PCL com tamanhos de partículas de 50 -100 nm em média.

A Deslocação do solvente é um método que fundamenta-se na precipitação do polímero dissolvido na fase oleosa, na presença ou não de um agente emulsivo, no qual difundir-se para fase aquosa ocasionando a formação instantânea da suspensão coloidal (REIS et al., 2006). A aplicabilidade da técnica é grande, porém se restringe ao uso de solventes hidrossolúveis, sendo eles de forte influência no aumento de tamanho das partículas, destacando que alguns considerados tóxicos, como o diclorometano. É de suma importância a escolha dos sistema fármaco/polímero/solvente e não solvente, ressaltando que deverão ser miscíveis o solvente e não solvente utilizados.

Estudos para formação de nanopartículas a partir desse método foram descritos nos trabalhos de Pandey e colaboradores (2015) com a síntese de nanopartículas a partir do polímero PLA encapsulando a quercetina, que apresenta possíveis ações antineoplásica, obtendo partículas com dimensões médias de 32 ± 8 - 152 ± 9 nm. Zhu e colaboradores (2016) utilizaram a mistura do TPGS-PLA para preparação e encapsulação do fármaco docetaxel que também utilizado no tratamento do câncer.

3.2.5 Preparação de nanopartículas por diálise

Para realização do método de diálise na preparação de nanopartículas é utilizada uma membrana de diálise com tamanho de poros de peso molecular adequado dependendo da substância ativa escolhida. O processo de formação se dá através da realização de troca de meios, a passagem do solvente do interior da membrana é precedida por uma perda da solubilidade do polímero, levando a formação de uma suspensão coloidal homogênea (PITOMBEIRA et al., 2015).

O método demonstra ser eficaz e simples na preparação de nanopartículas numa pequena faixa de tamanho. No trabalho de Dias e colaboradores (2016) foi utilizada a técnica para preparação de nanopartículas a partir da goma de cajueiro acetilada, visando encapsular o diclofenaco de dietilamina para liberação transdérmica e foi conseguida uma taxa de eficiência de encapsulação mais de 60%.

3.2.6 Por complexação polieletrólítica

Para a formação de nanopartículas através do método de complexação polieletrólítica tem-se por base a interação entre polímeros opostamente carregados, que podem ser por interações eletrostáticas, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Fenômeno físico-químico ocorrendo por meio da mistura de soluções aquosas de polycations e poliânions, sendo uma finamente dispersa na outra, resultando em partículas coloidais sem adição de substâncias químicas que venham interagir de forma covalente e não sendo necessário a inclusão de solventes orgânicos (TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007; GUCHT et al., 2011; LUO; WANG, 2014)

Alguns fatores característicos do polímero e do meio de preparação apresentam influências críticas para a síntese dos complexos, como: o seu peso molecular, densidade de cargas dos polieletrólitos, pH do meio de reação, proporção da mistura, temperatura e força de cisalhamento (WOITISKI et al., 2009; KIZILAY; KAYITMAZER; DUBIN, 2011). Usualmente a técnica se dá pelo gotejamento da solução de um dos polímero sobre a solução de um polycation ou poliânion, sob forte ou suave agitação, dependendo das características dos polímeros utilizados (LUO; WANG, 2014).

O método de complexação polieletrólítico é bastante usado para preparação de nanopartículas para encapsulamento de diversas substâncias ativas como descrito no trabalho

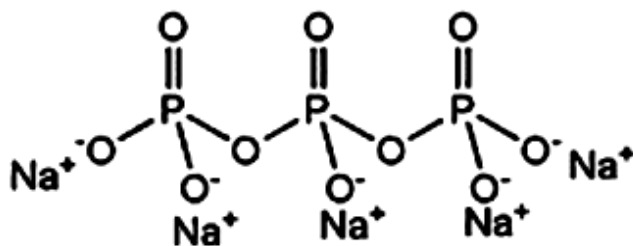
de Woitiski e colaboradores (2010) que encapsulou a molécula de insulina a partir da formação de nanopartícula por interação dos biopolímeros alginato, sulfato de dextrano com a adição de cloreto de cálcio como agente de nucleação e revestimento com quitosana e albumina. Seguindo o fundamento de interação entre as cargas dos biopolímeros Tan e colaboradores (2016) sintetizaram nanopartículas explorando as características catiônicas da quitosana e a levemente aniônica da goma arábica e a existência da interação entre eles para encapsulação do antioxidante curcumina. Semelhantemente, Volod'ko e colaboradores (2016) diferentemente usou como biopolímero aniônico a carragenana, fortemente carregada com grupos sulfatos desprotonados interagindo também com a quitosana que dispõe de grupos aminas positivamente carregados.

3.2.7 Por Reticulação iônica

A adição na preparação de nanopartícula de moléculas de baixa massa molar como agentes de reticulação, auxiliam na formação de ligações cruzadas com biopolímeros, realizando pontes entre cadeias das moléculas. Biopolímeros comumente apresentam em suas estruturas grupos funcionais (-OH, -COOH e NH_2) que podem interagir para a formação de ligações cruzadas com o agente de reticulação. As principais interações entre cadeias podem ser iônicas ou covalentes dependendo das características do agente de reticulação. Os agentes usualmente mais utilizados para reticulação covalente de polissacarídeos são o formaldeído, a epícloridrina, o glutaraldeído e o tripolifosfato (TPP) para reticulações iônicas (GAN et al., 2005; MOHAMMADPOURDOUNIGHI et al., 2010; RAMPINO et al., 2013, VIMAL et al., 2013).

O TPP é um poliânion que pode formar gel durante a interação iônica com biopolímeros catiônicos (Figura 2), sendo a quitosana o mais normalmente utilizado, como destacado no trabalho realizado por Cerchiara e colaboradores (2015) que através da interação iônica realizada entre quitosana e TPP sintetizou nanopartículas para encapsulação da vancomicina. Também Diop e colaboradores (2015) usando os mesmos materiais prepararam nanopartículas para encapsulação da molécula de insulina e pode-se evidenciar que a adição do TPP ao meio foi de fundamental importância para formação de nanopartícula mais estáveis e com tamanhos mais ideais.

Figura 2: Representação da estrutura do poliânion tripolifosfato de sódio (TTP).



Fonte: Kabir et al, 2000.

Além da carga do polissacarídeo o poliânion pode interagir, quando em condições favoráveis do pH do meio, com grupamentos –OH formando ligações de hidrogênio como evidenciado por Kabil e colaboradores (2000) observando e caracterizando essa interação entre o poliânion e o biopolímero goma guar e Rodrigues e colaboradores (2012) também essa interação com o polissacarídeo carragenana e o agente reticulante.

Muitas vantagens podem ser observadas a partir da reticulação iônica para a preparação de nanopartículas, como a realização de processos simples com condições brandas de síntese, uso de um poliânion (TPP) não tóxico e com a presença de ânions multivalentes, não necessária a utilização de solventes orgânicos, modificadores químicos, evitando o uso de materiais que apresentem toxicidade ao organismo e ao meio ambiente (FAN, YANG, HONG, 2012; LI; HUANG, 2012; GOKCE et al., 2014).

3.3 BIOPOLÍMEROS UTILIZADOS COMO MATÉRIAS PRIMAS NA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

O uso de polímeros naturais e seus derivados vem sendo largamente empregados nos centros de pesquisas, indústrias farmacêuticas e alimentícia, devido as suas características peculiares e por apresentar vantagens de não serem tóxicos, biodegradáveis, obtenção por recursos naturais, baixo custo e biocompatibilidade com sistemas biológicos (YANG et al., 2015). Dentre a utilização de biopolímero para aplicabilidade em formulações de nanopartículas destacam-se a goma de cajueiro e quitosana (que será detalhada no próximo ponto) bastante em evidencia atualmente e direcionados para sistemas de entrega de drogas.

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

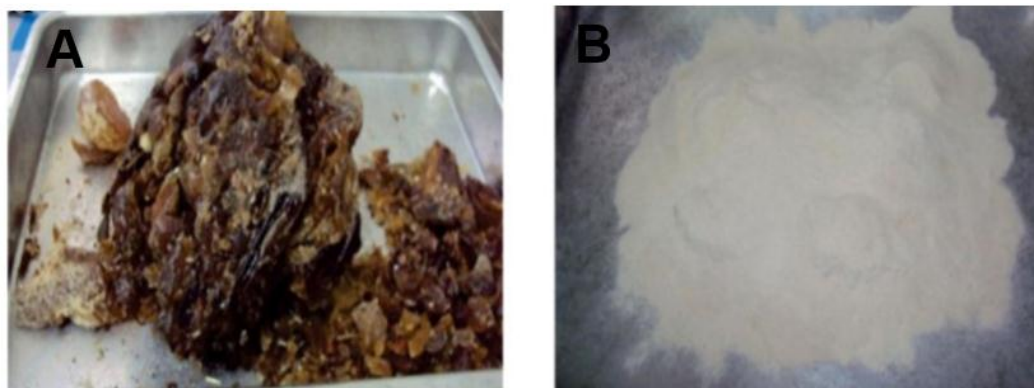
Polissacarídeos que apresentam em sua grande maioria solubilidade em água e que formam soluções viscosas a baixas concentrações são caracterizadas por gomas. Algumas espécies vegetais como mecanismos de defesa a fatores físicos (ferimentos) ou proteção a patógenos liberam, através mais comumente de seus galhos e caules, um exsudato constituído por variados monossacarídeos e proteínas. Suas propriedades ímpares tem gerado forte interesse em seu estudo e emprego para utilização industrial, sendo já de uso corriqueiro a goma arábica (*Acacia Senegal*), goma de caraia (*Sterculia urens*), goma ghatti (*Anogeissus atifolia*) e a goma tragacanto (*Astragalus Sp*) utilizados como espessantes e estabilizantes nas áreas farmacêutica e alimentícia (PRAJAPATI et al, 2013).

3.3.1 Goma de cajueiro

Anacardium occidentale L. é a espécie conhecida popularmente por cajueiro, vegetal nativo da América do Sul, com favorecimento de cultivo em regiões de clima tropical. Seu pseudofruto e amêndoa (castanha) tem forte papel na movimentação da economia de algumas regiões brasileiras, gerando empregos e fonte de renda para a localidade, campo destacado nos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. Além disso, a goma do cajueiro produzida a partir do exsudato também tem sido evidenciado nos focos de pesquisas e aplicabilidade na indústria (PAULA et al., 2012).

Através de excisões realizadas por estresse físico ou uso de adjuvantes químicos no tronco da árvore tem-se a extração do exsudato, produzido pelas células epiteliais da espécie, como forma de defesa a agressões físicas ao vegetal ou ação de patógenos. Esse material extraído tem uma variada constituição de polissacarídeos que podem diferir nas quantidades produzidas dependendo do local de cultivo, período do ano, solo do plantio, maturidade da árvore (FURTADO et al., 2013; PITOMBEIRA et al., 2015). Alguns processos após a extração são realizados para eliminar ou reduzir materiais que estão associados a goma devido ao método de retirada da resina (Figura 3).

Figura 3: Exsudato extraído do tronco do cajueiro (A), goma obtida em pó após processos de purificação (B).

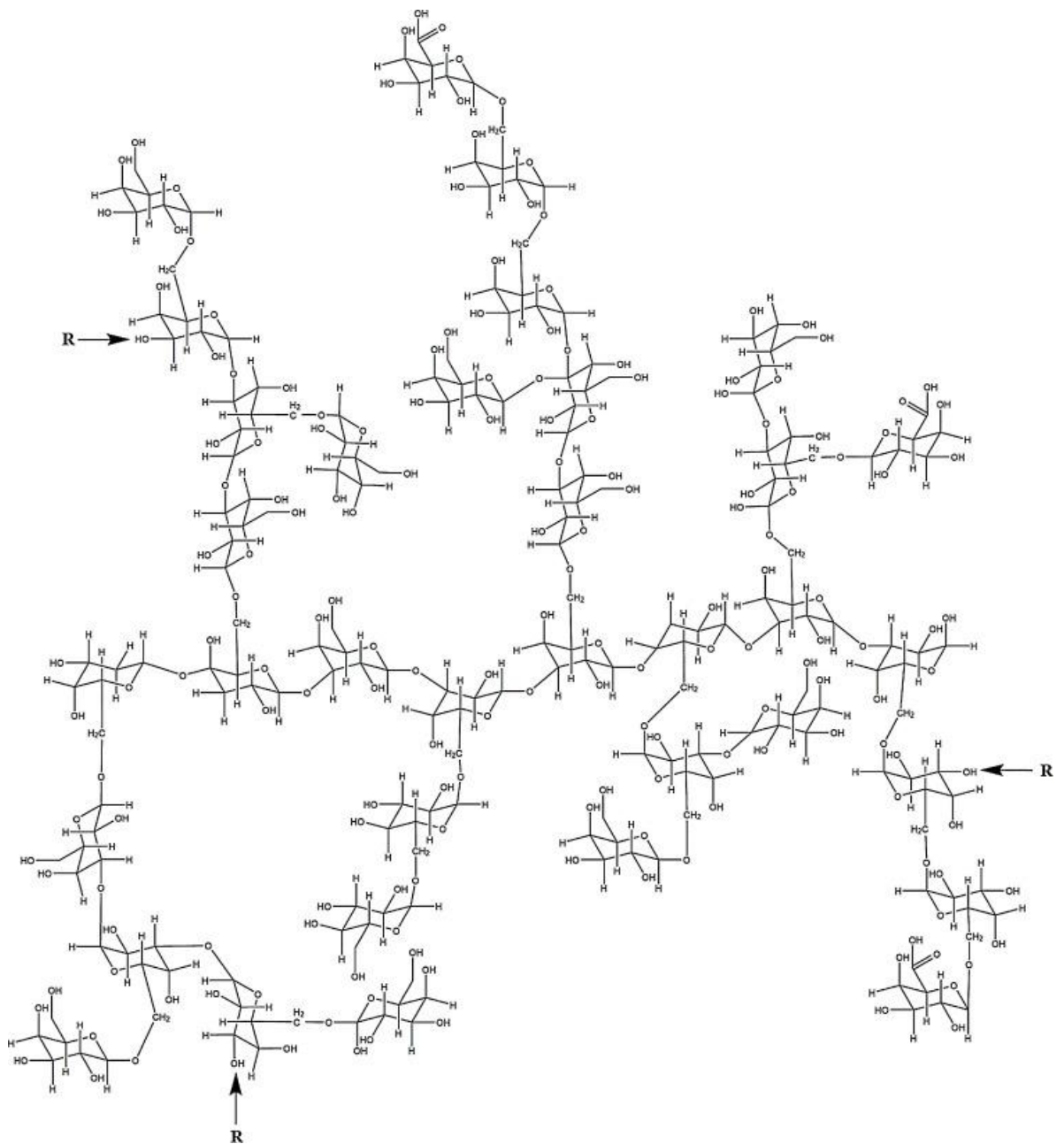


Fonte: Furtado et al 2013. Foto: Roselayne Ferro

Estudos de caracterização da goma de cajueiro para elucidação de sua estrutura e características físico-químicas foram iniciados por Anderson e Bell (1975) esclarecendo através de técnicas simples analíticas a composição da goma. No decorrer dos anos demais técnicas em diferentes condições foram utilizados para melhor compreensão dessa estrutura, como: Reações de hidrólise, reações de imunoquímica, estudos de oxidação com periodato e reações cruzadas com anti-soros (BOSE; BISWAS, 1985).

Com o avanço de técnicas de caracterização mais robustas como cromatografia de permeação em gel, dispersão de luz, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) a composição, estrutura e distribuição dos monossacarídeos podem ser evidenciados com mais acurácia (Figura 4), demonstrando que a goma de cajueiro é composta por unidades de β -D-galactopirranose em cerca de 72% do material, α -D-glucopirranose (14%), α -L-arabinofuranose (4,6%), α -L-rhamnopirranose (3,2%) e ácido β -D-glucurônico (4,5%), destacando o componente majoritário na cadeia principal a β -D-galactopirranose, onde também na mesma encontram-se três tipos de ramificações com os demais constituintes, ligando-se nos carbonos C-1 e C-3, C-1 e C-6 e em C-3 – C-6 (PAULA; RODRIGUES, 1995; PAULA et al, 1998; RIBEIRO et al., 2016).

Figura 4: Representação de um fragmento da goma de cajueiro. R representa D- manose, L-ramnose, a L-arabinose ou 1,2-arabinose ligadas as cadeias.



Fonte: Ribeiro et al, 2016.

Como pode ser evidenciado na figura 11 a goma é composta por heteropolissacarídeos ramificados que dependendo do país de origem podem diferir nas porcentagens dos monossacarídeos, a exemplo a goma extraída das regiões brasileiras apresenta uma maior teor de β -D-galactopirranose e um menor de α -L-arabinofuranose em relação as cultivadas na Índia e Papua. Isso também pode ser observado na constituição de íons metálicos presentes na

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

molécula que dependem diretamente em sua composição da constituição de sais presentes no solo de cultivo da espécie (PAULA; RODRIGUES, 1995).

A goma é um biopolímero parcialmente solúvel em água a temperatura ambiente que apresenta uma reduzida viscosidade em solução, com uma energia de ativação de aproximadamente 6 kJ/mol, apresenta comportamento pseudoplástico não newtoniano, com pouca interação intra e intermolecular, semelhantemente a goma arábica e menor em relação a outras gomas, como a goma de caraia, tragacanto que quando em concentração de 1% apresentam uma faixa de viscosidade de 1100-3400 mPas em relação a goma de caju na mesma proporção sendo 1,0 a 1,8mPas (PAULA; RODRIGUES, 1995; ZAKARIA; RAHMAN, 1995; PAULA et al., 1998; MOTHE; RAO, 1999).

Fatores como temperatura e pH do meio tem forte influência na solubilidade e viscosidade do polissacarídeo, o aumento da temperatura eleva sua solubilidade em água, entretanto reduz sua viscosidade, devido as reações de hidrólise que ocorrem nos monossacarídeos, interrompendo as interações físicas existentes. Relacionado ao pH tem-se uma máxima viscosidade quando a goma em solução estar numa faixa de pH abaixo de 5, quando os grupamentos iônicos estão em momento neutro, não ionizados (PAULA; RODRIGUES, 1995; ZAKARIA; RAHMAN, 1995; PAULA et al., 1998).

Na constituição estrutural da goma de cajueiro a existência do ácido glucurônico, mesmo em baixas concentrações, fornecem grupos aniônicos que são intermediários para a realização de interações com outros polímeros por meio de reações de complexação polieletrólíticas (FURTADO et al., 2013, RIBEIRO et al., 2016). Esse tipo de reação envolvendo a goma do cajueiro vem sendo bastante explorada nas áreas de micro e nano formulações como demonstrado no trabalho de Abreu e colaboradores (2012) que sintetizaram nanogels para o encapsulamento de óleo essencial a partir da interação entre os grupos aniônicos da goma e catiônicos presentes na quitosana. A formação de nanopartículas, para encapsular substâncias voláteis também foi realizado por Oliveira e colaboradores (2014), porém ao invés de usar a quitosana utilizou-se o alginato, no qual apresentou uma boa interação com o polieletrólito, resultando no desenvolvimento de nanopartículas. Soares et al (2014) preparou nanogles em diferentes proporções de goma de caju e quitosana, com a pequena adição de cloreto de cálcio para auxiliar na reticulação entre os bioplímeros e obteve

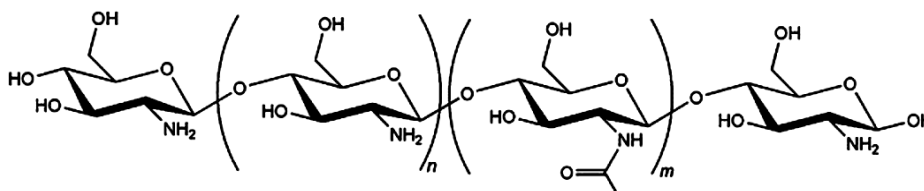
hidrogéis para aplicação como curativos que absorvem exsudatos de processos inflamatórios tópicos.

Além dos empregos citados anteriormente para a goma de caju outras aplicações podem ser destacadas, como na indústria de alimentos utilizada como emulsificante de bebidas, na qual apresentou um inchaço de 50% maior em relação a goma arábica, que é mais usada para esses fins, de acordo com Porto e colaboradores (2015). Para a indústria farmacêutica foi evidenciada sua atividade terapêutica como anti-inflamatório (YAMASSAKI et al., 2015), protetor gástrico (CARVALHO et al., 2015), curativo (MOREIRA et al., 2015) e como excipiente farmacêutico. Pelas características do biopolímero em ser biodegradável, biocompatível, não tóxico sua aplicação tem se mostrado promissora para sistemas de entrega de drogas, como realizado por Pitombeira e colaboradores (2015) que produziram pelo método de dialise nanopartículas com tamanho médio de 179 nm para encapsulamento do fármaco indometacina, bastante insolúvel, sendo liberado de forma controlada por até 72 horas.

3.3.2 Quitosana

O biopolímero quitosana como a goma de cajueiro apresenta acentuada aplicação nas formulações em escalas de tamanho nas faixas micro e nanométrica, devido a seu caráter catiônico, atribuído aos grupamentos amins presentes em sua estrutura que quando protonados fornecem a molécula carga positiva. A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina, presente no exoesqueleto de crustáceos, insetos e também encontrado em alguns fungos. Sua estrutura linear é composta por unidade repetidas de β - (1-4) N-Acetilglicosamina e D- Glucosamina (Figura 5) (RINAUDO, 2006; RAMPINO et al., 2013; SHAH et al., 2016).

Figura 5: Representação da estrutura do biopolímero quitosana.



Fonte: Rodrigues et al, 2012.

Maior parte de sua estrutura é hidrófila, porém a alta porcentagem de monômeros acetilados e sua distribuição nas cadeias tem um efeito significativo na redução de sua

solubilidade e alteração de sua conformação em meio aquoso, apresentando comportamento pH dependente em solução (SINHA et al., 2004; FUENTES; ALONSO, 2012). Peculiaridades do biopolímero tem atraído a atenção dos pesquisadores, devido as suas propriedades biofarmacêuticas, destacando por apresentar mucoadesividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e facilidade em se transportar entre as junções apertadas epiteliais, sendo características atrativas para aplicabilidade na área biomédica e particularmente em sistemas de entrega de drogas (DASH et al., 2011; SCHNURCK; DUNNHAUPT, 2012).

A quitosana pode interagir com outros polímeros que possuem carga negativa, sendo ela um dos biopolímeros mais utilizados na formação de estruturas por complexação polieletrólítica. Os polímeros aniônicos mais requeridos são os que contenham o grupamento carboxilato e sulfato. Como exemplo Paula e colaboradores (2011) prepararam micropartículas com a quitosana e a goma de cajueiro (contem em sua estrutura ácido carboxílico) por reação de complexação polieletrólítica para encapsula o óleo essência, derivado da espécie *Lippia sidoides*, que apresenta atividade larvicida contra o mosquito *Aedes Aegypti* resultando na formação de complexos de ação efetiva e controle prolongado sobre a larva.

Kashyap e equipe (2015) desenvolveram um sistema de entrega de pesticidas, sintetizando nanopartículas por geleificação ionotrópica da quitosana e sulfato de dextrano, polímero que apresenta grande quantidade em sua estrutura de grupamentos sulfatos e Delair e colaboradores (2011) estudaram sobre a aplicação da interação dessas duas moléculas por complexação como possíveis carreadores de fármacos e demais substâncias. Interação também observada com poliânios, a exemplo com agentes reticulantes, como o TPP o qual foi utilizado em conjunto com o biopolímero catiônico para encapsulação de diversas substâncias ativa, evidenciado tal ponto no trabalho de Martins e colaboradores (2012) que realizaram a síntese de micropartículas para liberação controlada de heparina e Shah e equipe (2016) utilizaram dos mesmos polieletrólitos para encapsular a curcumina, um polifenol derivado da espécie *Curcuma longa*, que apresenta fraca solubilidade em água e meia vida plasmática curta o que resulta em baixas biodisponibilidade no plasma, como forma de contornar essa problemática foi realizada a encapsulação da curcumina na tentativa de aumentar seu tempo de retenção e elevar sua biodisponibilidade no organismo.

3.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA FÁRMACOS PEPTÍDICOS

Os estudos de sistemas de entrega nanoencapsulados de fármacos peptídicos estão continuamente melhorando, como o objetivo de elevar a atividade terapêutica, proteger a molécula de meios biológicos nocivos e minimizar efeitos secundários indesejados. Sistemas avançados e reativos de entrega são desenvolvidos para realizar variadas funções tais como: a detecção, isolamento e/ou liberação de agentes terapêuticos para tratamentos condicionado as patologias (CROMMELIN; FLORENCE, 2013; SAFARI; ZARNEGAR, 2014; MASOOD, 2016).

Nanoestruturas poliméricas destacam-se pelas suas propriedades únicas de biodegradação, contribuindo também efetivamente na liberação do fármaco, a partir da erosão da estrutura, degradação ou por meio da difusão do fármaco através do material polimérico. Grande parte dos biopolímeros utilizados apresentam-se sensíveis a estímulos para desenvolver sua resposta no ambiente desejado (WILCZEWSKA et al., 2012; LAMMERS, 2013; RIBEIRO et al., 2016). Podem ser exibidas mudanças a estímulos físicos, como: a variações de temperatura, solventes e luz ou químicos, tais como: a alguns tipos de reagentes, pH do meio, íons em solução ou de reconhecimento químico. Dependendo do estímulo imposto pode-se verificar mudanças na forma da nanoestrutura, volume, propriedades mecânicas ou taxas de permeação (MOGOSANU et al., 2016; SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Os avanços destacados nesse âmbito tem atraído atenções para o encapsulamento de fármaco peptídicos devido aos progressos para sua melhor versatilidade, propriedades de liberação sustentada, granulometria sub celular e biocompatibilidade com tecidos e células. As nanopartículas são uma alternativa para contornar alguns fatores limitantes do uso de fármacos peptídicos, como: a baixa biodisponibilidade, degradação proteolítica e hidrolítica, fraca estabilidade aos meios ácidos e básicos, tempo de meia vida curto e baixa permeabilidade intestinal (LYNCH et al., 2008; ZHANG; XU; HUANG, 2015).

De alta relevância o aprimoramento em sistemas de entrega de fármacos peptídicos, levando em consideração que eles desempenham importantes papéis numa vasta quantidade de processos biológicos e reações, sendo caracterizados pela sua elevada eficiência e potência. Porém, grande parte das moléculas utilizadas para desenvolvimento de tais atribuições no

organismo são administradas por via intravenosa, pois suas particularidades físico-químicas as limitam a tal (LAUTERBACH; GOYMANN, 2015), entretanto a via que oferece mais vantagens é a oral, sendo livre das complicações associadas a via parentérica, não invasiva e maior facilidade de dosificação. O foco das pesquisas atualmente é desenvolver sistemas de liberação nanoparticulados poliméricos de fármacos peptídicos por via oral para driblar fatores como: solubilidade do fármaco reduzida, degradação por ação de enzimas secretadas no meio gastrointestinal, estabilidade reduzida, proteção da molécula até seu local de ação, entre outros (WOITISKI et al., 2009; SHUKLA; TIWARI, 2012; AGRAWAL et al., 2014; TAKEUCHI; TAHARA; ONODERA, 2016).

3.5 DIABETES MELLITUS

Quando os níveis produzidos de insulina são nulos ou até mesmo baixos pode desencadear-se a Diabetes Mellitus, uma doença relativamente comum na atualidade que acomete grande parte da população, provocada por uma deficiência na secreção desse hormônio, que existe quatro tipos: tipo 1 ou diabetes mellitus dependente de insulina, seu desenvolvimento começa cedo e rapidamente torna-se grave, tipo 2 ou diabetes mellitus não dependente de insulina, frequentemente passa despercebida, de aparecimento lento e moderado, tipo 3 ocasionada por problemas não metabólicos, terapia farmacológica entre outros e a diabetes gestacional que ocorre frequentemente no período gestacional (KATZUNG, 2007; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010).

A Diabetes mellitus tipo I (DM-I) é ocasionada por uma destruição auto imune nas células Beta das ilhotas de Langerhans, presentes no pâncreas, geralmente ocorre no início da infância ou adolescência, os níveis baixos ou até mesmo nulos de insulina e os altos níveis de glicose no sangue caracterizam essa patologia, na qual apresenta a necessidade de administração de insulina sintética exógena, para controlar os níveis de glicose e auxiliar na captação de glicose pelas células em períodos antecedentes as refeições (OLIVEIRA; MOURA, 2006).

A incidência da DM-I vem sendo bastante crescente em diversos países, inclusive no Brasil onde de acordo com os autores (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). A federação internacional de diabetes informou que 366 milhões de pessoas apresentavam a doença em 2011 e estima-se que em 2030 este número irá aumentar para até 552 milhões (FONTE et al., 2015). Diversos fatores contribuem para esse aumento, como: o crescimento da população, a

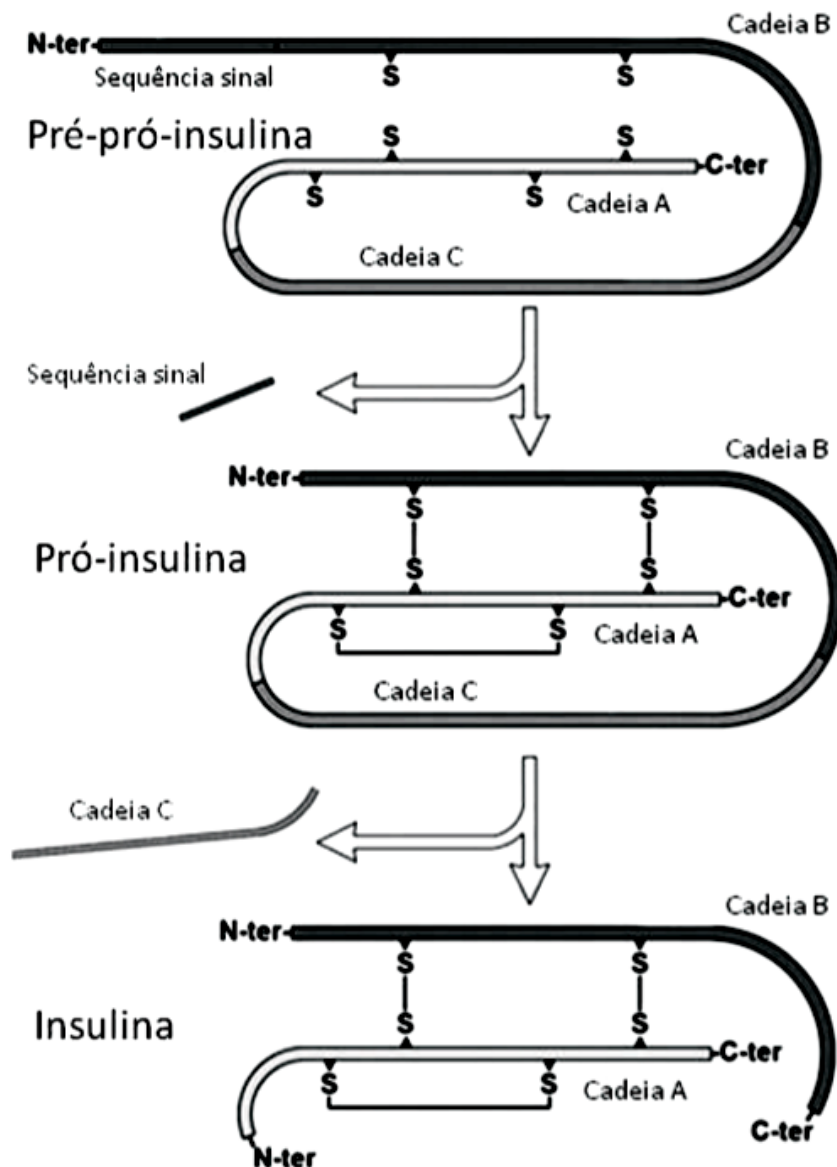
estimativa de vida maior em todo o mundo, má-alimentação, sedentarismo e obesidade. Na fase aguda da doença alguns sintomas podem ser observados, como: perda da força, emagrecimento, polifagia, poliúria e na fase crônica podem ocasionar arteriopatia periférica, acidente vascular encefálico (AVE), micro angiopatia, nefropatia, neuropatia, infarto do miocárdio, aterosclerose progressiva das artérias, levando à necrose isquêmica das extremidades dos órgãos internos e à obstrução microvascular, causando lesão na retina, nos glomérulos renais e nos nervos periféricos, estudos evidenciam as doenças cardiovasculares como uma das principais causas de mortalidade em pacientes diabéticos (SANTOS et al, 2008; CENTEMERO et al, 2009).

3.6 INSULINA

O hormônio insulina vem sendo alvo de estudos desde muito tempo, historicamente os cientistas Von Mering e Minkowiki no ano de 1889 em investigação experimental demonstraram no cão que a pancreatite produzia efeitos como: poliúria, cetoacidose, polifagia, entre outros que se assemelhavam a diabetes mellitus. Anos depois por volta de 1921 foi evidenciada a descoberta da insulina propriamente dita por Banting e Best, onde através da extração da insulina do pâncreas canino demonstraram sua ação terapêutica. O pesquisador Sanger nos anos 50 ganhou o prêmio Nobel de Química por conseguir evidenciar a sequência de aminoácidos das duas cadeias de insulina em adição, anos depois, o cientista Katsoyannis realizou a síntese da molécula de insulina, análises que auxiliaram no estudo da molécula até os dias presentes (SILVA; RIBEIRO; FERREIRA, 2003; REIS, 2008).

Fisiologicamente a molécula de insulina é sintetizada inicialmente como pré-pro insulina composta por uma grande cadeia polipeptídica subdividida em três porções: cadeia A apresentando 21, cadeia B que possui 30 aminoácidos e são interligados com a cadeia A por duas pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína, cadeia C ou peptídeo C com mais de 33 aminoácidos, intercalando a cadeia A e B onde após toda essa estrutura ser clivada é armazenada na forma de pro-insulina nas vesículas secretoras do complexo de Golgi e quando necessário sua secreção as ligações entre insulina e peptídeo C são quebradas e a insulina é liberada (Figura 6) (RANG et al, 2003; RASKIN, 2006). Apresenta um peso molecular de 5,8 Daltons e a conservação da estrutura da insulina é de fundamental importância para o desenvolvimento de sua ação fisiológica. (YIP et al., 2000) NELSON; COX, 2002; SILVA; RIBEIRO; FERREIRA, 2003).

Figura 6: Esquema representando a síntese celular da molécula de insulina.



Fonte: Reis (2008, p.177)

Os testes precusores com a molécula foram realizados utilizando material extraído do pâncreas canino, entretanto, no decorrer do tempo a insulina foi sendo extraída do órgão de outras espécies, como: bovina e suína, a primeira espécie apresenta estrutura semelhante a produzida pelo organismo humano, porém difere na composição de três distintos aminoácidos, na espécie suína a uma diferença apenas em um aminoácido da constituição (HIRSH, 2005). Contudo, foi evidenciado que as técnicas utilizadas para produção das primeiras insulinas não foram suficientes, apresentando contaminantes em sua constituição, consequentemente causando reações de sensibilidade. Com os avanços biotecnológicos

melhores formas de síntese e purificação da insulina foram sendo efetuados, como: por técnicas de DNA recombinante, não apresentando efeitos secundários associados a espécie de origem, mais pura e uma das mais empregada atualmente (LIMA, 2001; SILVA; RIBEIRO; FERREIRA, 2003; WALSH, 2003 DAVIS, 2005; REIS, 2008).

O tratamento utilizado para os pacientes de Diabetes Mellitus tipo I, além da inserção de um estilo de vida mais saudável, se dá pela administração do hormônio insulina sintético, utilizada como forma de tentar suprir os níveis fisiológicos, mantendo o controle metabólico. O hormônio pode ser administração por via intramuscular, intravenosa, mas predominantemente utiliza-se a via subcutânea. A insulinoaterapia por via subcutânea consiste em repor a insulina basal (normal, jejum, e entre as refeições) e a prandial – durante as refeições (RANG, 2003). A administração torna-se incomoda ao paciente, pois demanda de várias aplicações durante o dia, além de efeitos secundários como atrofia do tecido na área de injeção e acúmulo do fármaco não sendo distribuído de forma eficiente (LAUTERBACH; GOYMANN, 2015; ZHANG; XU; HUANG, 2015).

Como forma de contornar agravos relacionados a via parentérica diversos estudos têm sido focados em alternativas na administração da insulina por via oral, através de seu encapsulamento em nanoestruturas poliméricas para protegê-la dos fatores de degradação da molécula e permitir sua entrega direcionada a elevando sua biodisponibilidade (ANDREANI et al., 2014; PRINA et al., 2014; ALAI; LI; PINGALE, 2015; FONTE et al., 2015). Mukhopadhyay e colaboradores (2013) sintetizou nanopartículas a partir da interação do biopolímero quitosana e o TPP para encapsular a insulina, resultando na obtenção de estruturas com tamanhos médios de 200-550 nm, apresentou 85% de eficiência de encapsulação, através de modelos in vivo a administração oral demonstrou redução dos níveis de glicose no sangue por até 4 horas.

Morales e equipe (2014) desenvolveram filmes carregados com nanopartículas com insulina para permeação rápida através do epitélio bucal, com uma eficiência de encapsulação de 40% e tamanho de partícula em média 323 nm, apresentou excelentes propriedades de liberação mucoadesiva da insulina. No ano de 2015 Mukhopadhyay e colaboradores prepararam nanopartículas sensíveis ao pH utilizando os biopolímeros quitosana e alginato, através da formação por gelificação ionotrópica para aprisionamento da insulina, foi obtida uma resistência a níveis de pH gástrico por simulações in vitro e por meio de modelos in vivo

foi observado um efeito hipoglicemiante com melhoria significativa na biodisponibilidade da insulina.

3.7 DEGRADAÇÃO DA MOLÉCULA DE INSULINA HUMANA

Tendo em vista a grande importância da molécula de insulina a preservação de sua estrutura é fundamental para o desenvolvimento de sua ação biológica e estabilidade. O Hormônio apresenta característica hidrofílica, seu armazenamento deve estar entre 2° C a 8°C necessários para assegurar sua estabilidade, sendo bastante instável frente as exposições de agentes físicos e químicos. A degradação da molécula de insulina pode ser através de mecanismos de dimerização covalente ou principalmente reações hidrolíticas (desamidação). A desamidação ocorre pela perda progressiva do grupo NH₂, que pode ser dos resíduos dos aminoácidos glutamina nas posições 5 e 15, asparagina nas posições 18 e 21 da cadeia A da molécula, asparagina na posição 3 e glutamina na posição 4 da cadeia B (OLIVA; FARIÑA; LLABRÉS, 2000; XU et al., 2006).

Alterações de pH determinam a degradação de alguns resíduos, como: quando níveis altos de pH (meio alcalino ou neutro) tendem a um aumento do produto de degradação na posição 3 (da cadeia B, B-3), já em níveis de pHs baixos (ácidos) há uma maior ocorrência do aumento da degradação no aminoácido asparagina na posição 21 (cadeia A, A-21), a formação dos produtos de degradação causam no composto a redução da sua potência *in vivo*, apresenta uma cinética de reação irreversível de primeira ordem., bastante acentuada quanto mais baixos forem os níveis do pH (YOMOTA et al., 1996; MOSLEMI; NAJAFABADI; TAJERZADEH, 2003; ZHOU et al., 2004; SARMENTO et al., 2006; MOHAMMAD et al., 2014).

O mecanismo de reação da degradação da molécula de insulina em níveis ácidos de pH entre 2-5, envolve uma reação de ciclização anidrida na extremidade C-terminal da asparagina na posição 21 da cadeia A (A-21), é considerada como a principal reação de degradação, formada por ataque intramolecular do ácido carboxílico do C-terminal no grupo amida da carbonila de cadeia lateral. O anidrido cíclico forma dois produtos intermediários da reação, na presença de água ou com a amina livre de uma outra molécula de insulina na extremidade N-terminal para gerar o desamidação do A-21, ou a uma amida covalente ligada A21-B1 dímeros covalentes. Para a comercialização das formulações com insulina como critérios de aceitação pelos compêndios oficiais sua pureza deve ser maior que 98% e a

presença de desamidação do A-21 menor que 10,0% e 5,0% de outros compostos de insulina relacionada (NAJJAR et al., 2014).

3.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE INSULINA

Para realização de investigações analíticas na molécula de insulina ou para determinar seu teor e perfil de degradação diversas técnicas podem ser empregadas, como: eletroforese por capilaridade (YOMOTA et al., 1997; TONG; EDWARD, 1996; GERMAN; KENNEDY, 2000), radio imunoensaio (JARS; HVASS; WAABEN, 2002; YALOWA; BERSON, 1959; MILES; HALES, 1968), imunoensaio enzimático (WEBSTER et al., 1990; ANDERSEN et al., 1993; SHEN; ASPINWAL; KENNEDY, 1997; ZAITSU; KIMURA; OHBA, 1999), imunoensaio fluorescente (ARCELLONI; FALQUI; MARTINENGHI; PONTIROLI; PARONI, 1998) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (KHAKSA; NALINI; BHAT; UDUPA, 1998) dentre essas destaca-se a CLAE técnica analítica de separação, quantificação e purificação de variados tipos de substâncias presentes em uma mistura com o emprego de instrumentos automatizados, o que permite uma análise rápida, sensível, eficiente e com menor tempo de análise (CAROL H; GILBERTO; PIERINA, 2006; DE ARAGÃO; VELOSO; DE ANDRADE, 2009).

Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE, apresenta um efeito de separação alto de moléculas estruturalmente semelhantes da molécula de grande avalia para separação da insulina e também de seus produtos de degradação, simultaneamente, isso tem sido o foco de alguns estudos, que visam obter análises mais rápidas (que apresentem baixos tempos de retenção das moléculas), simples (sem muitas peculiaridades na execução), eficientes (valores obtidos dentro dos parâmetros cromatográficos) e que demonstrem uma boa resolução entre as moléculas em estudo, nesse contexto Oliva e colaboradores (2000) e Zhou et al (2004) realizaram estudo para análise concomitante da insulina e um de seus produtos de degradação (A-21), utilizando diferentes fases móveis, em pH ácido, em um comprimento de onda de 214 nm, obtendo como resultado um pico de insulina com um tempo de retenção de 7,8 e 10,23 minutos e para o pico do A-21 de 9 minutos e 13,01, respectivamente.

Como forma de obter análises mais seletivas, de forma a verificar além do composto principal, como realizado por Sarmento e colaboradores (2006) Mohammad e colaboradores (2014) analisaram apenas a determinação da insulina, que apresentou um tempo de retenção que foi de 5,6 minutos e 4,3 minutos, respectivamente, demais autores adicionam a análise a determinação de outras moléculas que podem estar na formulação, como: os conservantes, Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

que dependendo da formulação podem ser glicerina, meta cresol (m-cresol) entre outros. Molesmi e colaboradores (2003) e Najjar et al (2014) efetuaram análises para determinação do conservante m-cresol, onde foi verificado que seu tempo de retenção é sempre inferior ao da molécula da insulina e do seu principal produto de degradação o A-21.

3.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL

Tendo em vista a necessidade de sistemas cromatográficos cada vez mais eficientes, objetivando análises que podem fornecer os resultados desejados de forma simplificada e direta, as condições cromatográficas impostas ao sistema podem ser verificadas ao ponto de analisar quais influências tem sobre os resultados esperados. Como forma de realizar essas estudos tem-se o emprego do planejamento experimental (*DOE – Design of experiments*), no qual visa delinear um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer justamente o tipo de informação que se procura, através do uso de diversas ferramentas da estatística (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; CAROL H; GILBERTO; PIERINA, 2006; VICENTINI et al., 2011).

Através de inferências estatística pode-se analisar a influência de uma ou mais variáveis que podem ter participação significativa no método a ser desenvolvido, por conseguinte após este processo de seleção das variáveis mais expressivas, (escolha de um modelo matemático), são realizados experimentos que permitem refinamento e um melhor conhecimento do sistema em estudo, Ou seja, cada um desses experimentos, em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definido, é um ensaio experimental (XU et al., 2006; MOHAMMAD et al., 2014; OHNISHI et al., 2015).

O planejamento experimental pode ser do tipo fatorial, onde em geral, se houver n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2, ..., e n_k do fator k, o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. Isto não significa imprescindivelmente que serão realizados apenas $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ experimentos. Este é o número mínimo, para se ter um planejamento fatorial completo, como forma de prover antes da realização dos experimentos um quantitativo necessários de análises, escolha das melhores condições de operação do sistema e combinação de níveis dos fatores mais relevantes para a resposta que se deseja obter (CAROL H; GILBERTO L; PIERINA S, 2006; VICENTINI et al., 2011; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A busca da adição de dados que corroborem para a confiabilidade dos resultados obtidos de forma experimental tem sido alvo de estudos, seja na análise da melhor constituição da fase móvel para uma corrida cromatográfica de determinação de proteínas

(SARMENTO et al., 2006) ou na verificação da influência do solvente utilizado em um fingerprints vegetal (XIE et al., 2015), entre outros, com o fim de reduzir quantidades de experimentos realizados e otimizar as condições utilizadas (WOITISKI et al., 2009; VICENTINI et al., 2011; RAFAMANTANANA et al., 2012)

MATERIAL E MÉTODOS

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARTE I: PLANEJAMENTO FATORIAL COMO FERRAMENTA PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE INSULINA E O SEU PRINCIPAL PRODUTO DE DEGRADAÇÃO O A-21

4.1.1 Matéria prima, reagentes

Insulina regular HUMULIN R (Lote: C330000/2017, Lilly[®]). Solventes Acetonitrila (ACN) e metanol, ambos grau CLAE (Solusorb[®], USA); e ácido clorídrico (HCl) (Dinâmica[®], Brasil) e ácido fosfórico (Vetec[®], Brasil). Fosfato de potássio dibásico (Dinâmica[®], Brasil). Água ultrapura obtida em sistema Milli- Q (Smart[®], Ultra pure water system, Heal force[®]). Membranas filtrantes de porosidade 0,20 µm Millipore[®] também foi usado.

4.1.2 Equipamentos

CLAE – DAD Shimadzu[®] equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador DGU - 20A, detector PDA SPD - 20AVP, forno CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador SCL - 20AVP, e os dados foram analisados através do software Shimadzu[®] LC solution 1.0 (Japão).

4.1.3. Preparo da solução de insulina

A amostra de insulina regular foi obtida a partir da sua diluição em HCl (0,01 mol L⁻¹), adquirindo uma concentração final de 1,75 mg/mL, sendo esta solução previamente filtrada em filtro Millipore[®] e acondicionadas em vials para leitura no CLAE – DAD (USP, XXXVIII, 2015).

4.1.4 Preparo da solução de A-21

Os estudos de degradação forçada da molécula de insulina por hidrólise ácida para análise simultânea do seu principal produto de degradação A-21 foi conduzido adicionando 3,5 mg/mL de solução de insulina regular R diluída em HCl 1 mol L⁻¹ com um volume final de solução de 2 mL filtrado em filtro Millipore[®] de poro 0,20 µm para um vial e incubadas a 40°C numa estufa durante 3 dias para análise em CLAE – DAD (USP, XXXVIII, 2015).

4.1.5 Sistema e condições cromatográficas

Para a determinação da insulina e seu produto de degradação o A-21 utilizou-se inicialmente, o método descrito por Najjar et al (2014), que consiste em usar coluna Hypersil Gold - C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m, Thermo Fisher Scientific®, EUA), fase móvel de tampão aquoso (20 mM KH_2PO_4):acetonitrila:metanol (62%:26%:12%) a 1 mL.min⁻¹ com volume de injeção de 20 μ L e temperatura da coluna ambiente, tampão a pH 3,1 $\pm$ 0,1, ajustado utilizando ácido fosfórico. A análise foi realizada no comprimento de onda 214 nm e um modo de eluição isocrática. Alterações nos valores da proporção da fase móvel, fluxo e temperatura da coluna foram realizados durante o experimento.

4.1.6 Adequabilidade do sistema cromatográfico

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi analisada com o objetivo de verificar se os parâmetros estavam adequados para as análises realizadas, para isso, foram observados os valores obtidos:

Resolução: Calculada a partir da distância que separa os pontos máximos do pico e da média das larguras de suas bases ou das larguras na meia altura, indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura.

$$R = 2(t_2 - t_1) / W_1 + W_2 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, t_1 e t_2 : Tempos de retenção as duas substâncias da mistura;

W_1 e W_2 : Larguras dos picos da base.

Números de pratos teóricos: Representa a eficiência da coluna, quanto maior o seu valor mais equilíbrio há no sistema cromatográfico, maior será a eficiência e com isso melhor a separação, calculado seguindo a fórmula:

$$N: 16x (t/W)^2, \text{ termos da equação apresentam mesmo significado da equação 1} \quad (\text{Equação 2})$$

Assimetria ou pureza de pico: Calculado a 10% da altura do pico, verificar se existe superposição dos picos.

Fator de cauda: Indica a simetria do pico. Quando o pico é perfeitamente simétrico apresenta valor igual a 1. Calculado conforme a equação:

$$T: W_{0,05}/2f \quad (\text{Equação 3})$$

$W_{0,05}$: Largura do pico a 5% da altura;

f : Valor da porção anterior do pico, em relação a 5% da altura.

Dados serão obtidos através do software Shimadzu[®] LC solution 1.0 (Japão) e analisados tomando por base definições e valores indicativos presentes na USP, XXXVIII, (2015) e Neto, Scarminio e Bruns (2010).

4.1.7 Planejamento experimental e otimização do método analítico da insulina R por CLAE – DAD

Para a otimização do método de determinação da insulina R, avaliou-se a influência de três fatores (variáveis) independentes: temperatura da coluna, fluxo do eluente, % aquosa da fase móvel sobre os tempos de retenção da insulina na análise por CLAE-DAD (resposta), considerando três níveis: inferior, central e superior, codificados como -1, 0 e +1, (Tabela 1), planejamento fatorial 3^3 , sem repetições autênticas, realizados de forma aleatória (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MONTEGOMERY, 2003). As estimativas de todos os efeitos de cada fator sobre a resposta, (Tabela 2), foram calculadas e analisadas utilizando o programa STATISTICA[®] (Six sigma, Star Soft). A significância estatística de cada efeito foi estimada pelo erro residual, calculado a partir dos efeitos de interação de ordem superior.

Tabela 1: Variáveis independentes e níveis usados no Planejamento Fatorial 3^3 empregados no desenvolvimento do método analítico para análise da insulina.

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
(A) Temperatura da coluna, °C	25 ° C	30° C	35° C
(B) Fluxo da fase móvel, mL/min	0,6 mL.min ⁻¹	0,8 mL.min ⁻¹	1, 0 mL.min ⁻¹
(C) % Aquosa da fase móvel	52% KH ₂ PO ₄ , 31% acetonitrila e 17% metanol	62% KH ₂ PO ₄ , 26 % acetonitrila e 12% metanol	72% KH ₂ PO ₄ , 21% acetonitrila e 7% de metanol

Tabela 2: Matriz do planejamento 3^3 utilizada no desenvolvimento do método cromatográfico para insulina, Montgomery (2003).

Nº Experimento	(A) Fluxo mL.min ⁻¹	(B) Temperatura °C	(C) % da fase móvel
1	- 1	- 1	- 1
2	- 1	- 1	0
3	- 1	- 1	+ 1
4	- 1	0	- 1
5	- 1	0	0
6	- 1	0	+ 1
7	- 1	+ 1	- 1
8	- 1	+ 1	0
9	- 1	+ 1	+ 1
10	0	- 1	- 1
11	0	- 1	0
12	0	- 1	+ 1
13	0	0	- 1
14	0	0	0
15	0	0	+ 1
16	0	+ 1	- 1
17	0	+ 1	0
18	0	+ 1	+ 1
19	+ 1	- 1	- 1
20	+ 1	- 1	0
21	+ 1	- 1	+ 1
22	+ 1	0	- 1
23	+ 1	0	0
24	+ 1	0	+ 1
25	+ 1	+ 1	- 1
26	+ 1	+ 1	0
27	+ 1	+ 1	+ 1

No planejamento experimental fatorial os experimentos são representados por n^k , onde o número da base “n” indica a quantidade de níveis selecionados para a análise e “k” representa a quantidade de fatores avaliados. Com o propósito de observar os efeitos principais e os de interação, a equação a ser estimada obedece a seguinte estrutura de modelo da regressão dada por (Equação 4):

$$y_i: \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \varepsilon \quad (\text{Equação 4})$$

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

O tempo de retenção da insulina obtido pela análise cromatográfica por CLAE - DAD é representando por “y”. Nesta equação, β_0 é o valor populacional da média de todas as respostas obtidas; β_1 , β_2 , β_3 são os coeficientes relacionados com as variáveis. Os fatores fluxo do eluente, temperatura da coluna, % aquosa da fase móvel são os efeitos principais do modelo representados, respectivamente, por “ x_1 , x_2 e x_3 ”. Os coeficientes de interação desses fatores são representados por $\beta_{12} + \beta_{13} + \beta_{23}$, e o termo de erro aleatório associado ao modelo recebe a notação “ ε ” (PIMENTEL; NETO, 1996; TEÓFILO, FERREIRA, 2006; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Para verificar o ajuste do modelo e a falta de ajuste utilizou-se a análise da variância (ANOVA), por meio dos softwares Microsoft EXCEL e STATISTICA[®] (Six sigma, Star Soft).

4.2 PARTE II: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS OBTIDOS A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS

4.2.1 Substâncias, reagentes

Os biopolímeros goma de cajueiro e quitosana foram gentilmente cedidos pelo laboratório interdisciplinar de materiais avançados - LIMAV - UFPI, a quitosana foi fornecida com um grau de desacetilação 78% e a goma de cajueiro isolada e purificada pelo método previamente descrito por (RODRIGUES, DE PAULA E COSTA, 1993). Tripolifosfato de sódio obtido a partir da Sigma Aldrich. Ácido láctico (Puratec[®], Brasil) e ácido clorídrico (HCl) (Dinâmica[®], Brasil). Água ultrapura obtida em sistema Milli- Q (Smart[®], Ultra pure water system, Heal force[®]). Membranas filtrantes de porosidade 0,46 μm e 0,20 μm Millipore[®] também foi usado.

4.2.2 Preparação das soluções de quitosana, goma de cajueiro e tripolifosfato de sódio

A solução de quitosana (QT) (0,1% m/v) foi preparada em ácido láctico a 0,1% e a de goma de cajueiro (GC) (0,5% m/v) dissolvida em água ultrapura, sendo submetidas a agitação por overnight e após finalizadas filtradas através de filtro qualitativo (9 mm), utilizando as soluções em seus pHs iniciais que apresentaram pHs de 6,7 e 3,37 e os alterando para pH: 4,6 e 4,8, respectivamente. A solução de tripolisfosfato de sódio (TPP) 13,5 mM foi preparada dissolvendo-o em água ultrapura, submetida ao banho de ultrassom por cerca de 20 minutos e utilizando-a sem alterar seu pH inicial e modificando-o para pH:5,0. Todas soluções foram

filtradas por filtro de porosidade 0,45µm Millipore® e os pHs das soluções foram verificados e ajustados conforme valores citados acima com soluções de HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) (RODRIGUES et al., 2012).

4.2.3 Preparação de nanoesferas de goma de cajueiro/ quitosana por complexação polieletrólítica

Para a preparação das nanoesferas por complexação polieletrólítica foi adicionada por gotejamento a uma solução da goma de cajueiro (pH: 4,8) agitação por 300rpm a solução de quitosana (pH: 4,6), através de uma seringa acoplada a uma agulha de 21G, numa duração de 30 minutos, ao término a formulação foi filtrada em filtros de porosidade 0,20 µm Millipore®. Os produtos finais foram analisados referente ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta em diferentes proporções dos biopolímeros, com proporções de goma de cajueiro:quitosana (v/v) (1:1, 3:2, 2:3, 4:1 e 1:4) (SOARES et al., 2014).

4.2.4 Determinação das quantidades de goma de cajueiro e quitosana incorporadas nas nanoesferas

Para verificação das quantidades estequiométricas necessárias de biopolímeros na preparação das nanoesferas volumes conhecidos foram misturados até ser observada a turvação da solução (VOLOD'KO et al., 2016).

4.2.5 Preparação de nanoesferas de goma de cajueiro/ quitosana e agente de reticulação por complexação polieletrólítica

Sob a solução de goma de cajueiro a 300 rpm em agitação foi gotejada a solução do agente reticulante o TPP 13,5 mM, através de uma seringa acoplada a uma agulha de 21G e prosseguindo a agitação por mais 30 min, por conseguinte uma solução de quitosana também foi gotejada a preparação, seguindo a mesma forma da anterior, agitando por mais 30 minutos, ao término da agitação filtrada em filtros de porosidade 0,20 µm Millipore®, seguindo a metodologia descrita por Rodrigues, Costa e Grenha, 2012. Os estudos foram realizados mantendo-se fixo o volume da solução de goma de cajueiro utilizada para a formação das nanopartículas, porém alterando os volumes de quitosana e agente de reticulação. Como forma de analisar a influência das quantidades de agente reticulante adicionado para formação dos complexos, foram modificados os volumes da solução de TPP e quitosana gotejados sobre as soluções e os efeitos da ordem de gotejamento também foi observado, diferindo em gotejar

a solução de TPP sobre a solução de goma de cajueiro apenas e sobre a solução da goma após o gotejamento da solução da quitosana. Conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3: Representação da ordem de adição das soluções de quitosana (policátion) e Tripolifosfato de sódio (poliânion) sobre a solução de goma de cajueiro (GC) para obtenção das nanoesferas por complexação polieletrólítica.

Ordem de adição dos polieletrólitos	Ordem teórica da organização do polieletrólitos da nanoesfera
1ª Policátion	CG/QT/TPP
2ª Poliânion	
1ª Poliânion	CG/TPP/QT
2ª Policátion	

Fonte: Autoria própria

4.2.6 Avaliação analítica da formação das nanopartículas

4.2.6.1 Determinação de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta

Através do uso do equipamento zetasizer nano ZS 90, (MALVERN) foram determinados os tamanho de partícula, Pdi e seu potencial zeta. Através de varreduras nas amostras caracterizando-as através da média do raio hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI), tamanho da partícula (nm) determinados em uma temperatura de 25° C e um ângulo de dispersão de intensidade de luz de 90° fixo. A partir da equação de Smoluchowski foram calculados os valores do potencial zeta. Nas amostras analisadas a medição de tamanho, PDI e potencial zeta foram realizadas em triplicata.

4.2.6.2 Estudo de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Foi realizada nas amostras dos complexos eletrolíticos sem adição do crioprotetor, da goma de cajueiro, quitosana e tripolifosfato de sódio. Em um range entre 650 e 4000 cm⁻¹ em um equipamento PerkinElmer, Spectrum 400.

4.2.6.5 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise da morfologia das nanoesferas liofilizadas com e sem crioprotetor foi utilizado um equipamento de modelo SS-550 Sperscan ® (Shimadu). Antecedendo a análise

as amostras foram preparadas, sendo revestidas com uma película de ouro de aproximadamente 20 nm, por cerca de 2 minutos a uma amperagem de 5 mA, para uma melhor condução sobre material, utilizando o equipamento do modelo SC-701 Quick Coater®.

4.2.6.4 Análise termogravimétrica (TG)

O comportamento térmico das amostras do agente reticulante, biopolímeros e complexo polieletrólítico foram obtidas em equipamento PerkinElmer STA 6000, em atmosfera com nitrogênio numa taxa de aquecimento de 10°C/min. Análises realizadas em uma faixa de 25°C a 900°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE I: PLANEJAMENTO FATORIAL COMO FERRAMENTA PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE INSULINA E O SEU PRINCIPAL PRODUTO DE DEGRADAÇÃO O A-21

5.1.1 Análise da insulina e A-21 por CLAE-DAD

Por meio de pesquisas realizadas em bases bibliográficas, como: Science Direct[®], Pub Med – NCBI[®], Scopus[®], utilizando as palavras chaves: Insulin AND Determination AND HPLC, Insulin AND Determination AND degradation, Insulin AND degradation AND HPLC, Insulin AND A-21, Insulin AND HPLC, a fim de obter uma metodologia base para reprodução e otimização do método analítico para determinação da molécula de insulina e seu principal produto de degradação o A-21 por CLAE, foram encontrados dez trabalhos realizados, relacionados ao tema e que apresentam como principal diferencial seus sistemas cromatográficos utilizados (Constituição da fase móvel, fluxo, tipo da coluna, tamanho da coluna, temperatura) e as moléculas as quais se destinam determinar (apenas a insulina ou juntamente com seus produtos de degradação e conservante) conforme demonstrado na Tabela 4.

A metodologia descrita por Najjar et al., (2014) foi escolhida, pois destacou-se frente aos demais estudos por apresentar menor tempo de retenção para a molécula de insulina e o A-21, específicos do presente trabalho, um menor tempo de análise total, boa resolução entre os picos, modo de eluição isocrática, análise simultânea da insulina e A-21, realizado a temperatura ambiente.

Tabela 4: Condições cromatográficas realizadas por diversos autores e sistemas cromatográficos utilizados, juntamente com as respostas obtidas (tempo de retenção).

REFERÊNCIA	FASE MÓVEL	FLUXO/ COLUNA	PH, TEMPERATURA, AJUSTADOR DE PH, COMPRIMENTO DE ONDA	TEMPO DE RETENÇÃO
HOYER ET AL, 1995	0.05 M KH_2PO_4 : CH_3CN (75:25)	1mL/min 250 x 4.6 mm. 5 μm Vydac	pH: 2.4 Temperatura ambiente 230 nm	Insulina: 11,16 min
YOMOTA ET AL, 1996	Sulfato de sódio:acetonitrila (74:26)	0,8 mL/min Vydac Protein & Peptide C18 (250 mm x 4,6 mm) Develosil ODS-HG-5 (150x4.6 mm)	pH: 2.3 214 nm Temperatura 40 ° C Ácido fosfórico	Insulina: 29 min B3: 18 min A-21: 35 min m-cresol: 11 min
KUNKEL ET AL, 1997	240 g de acetonitrila + 760 g de tampão fosfato (9800 mg de 85% H_3PQ + 28,4 g de 4 NazSO em 1000.0 ml de água	1mL/min Coluna, Nucleosil RP C-18, 250 x 4 mm. 5 μm	pH:7-8 214 nm Temperatura 40 ° C	Insulina: 10,89 min A- 12,7 min M-cresol: 7,95 min
OLIVA ET AL, 2000	Tampão de sulfato (pH 2,3) e acetonitrila (74:26)	1mL/min C-18 Delta-Pack, C-18 column (300 x 7.8 mm, 5 μm), Waters, Milford	pH: 2,3 Temperatura ambiente 214 nm	Insulina: 7,8 min A-21: 9 min
MOLESMI ET AL, 2003	3,9% hidróxido de tetra-metilamonio em água e acetonitrila (70:30)	1 mL/min Waters Assoc. mBondapak C18 (300 mm x 3.9 mm. 10 μm).	pH: 2,5, Temperatura ambiente, ácido fosfórico, 214 nm	Insulina: 16,76 min A 21: 19,99 min m-cresol: 7,01 min
ZHOU ET AL, 2004	Etanol:água (29,8%: 70,2%)	1mL/min YMC, (150x4,6 mm, 5 μm)	pH: 3,5 25°C Tamponada com sulfato de amônio 50 mM 214nm	Insulina: 10.23 A-21: 13.01
XU ET AL, 2006	Sulfato de sódio: acetonitrila (73:27)	0,8 mL/min VP-ODS Shim-pack Shimadzu (150 mm x 4,6 mm,5 μm)	pH: 2,3 temperatura 40°C ácido fosfórico 214 nm	Insulina: 11,19 min A-21:14,59 min B3:9,85 min
SARMENTO ET AL, 2006	Acetonitrila: TFA 0,1% (30:70, depois de 5 min 40:60, após 5 min 40:60) eluição em gradiente	1 mL/min C-18 XTerra, Waters® (250 x4,6 mm. 5 μm)	pH: 4,7 Temperatura ambiente Ajustador de pH: Tampão acetato	Insulina: 5,6 min
MOHAMMAD ET AL, 2014	Sulfato de sódio 1 mmol e acetonitrila (55:45) Adição de trietanolamina Isocrático	1mL/min Symmetry RP-C18, (150 x 4,6 mm, 5 μm)	pH: 3,2 Temperatura ambiente Ácido fosfórico 214 nm	Insulina: 4,3 min
NAJJAR ET AL, 2014	62% de KH_2PO_4 tampão (0,1 M), 26% de ACN e 12% de MeOH; o pH final foi ajustado para 3,1.	1.0 mL/min 10mm x 4,6mm. 5 μm	pH: 3.1 214 nm Temperatura ambiente Ácido fosfórico	Insulina: 7,87 A-21: 9,36 m-cresol: 3,89

Inicialmente, partindo das condições cromatográficas de temperatura da coluna 30° C, usando fase móvel consistindo em tampão numa proporção de 62% aquoso (20 mM Fosfato de potássio dibásico anidro (KH₂PO₄)), 26 % de acetonitrila e 12% de metanol, fluxo da fase móvel 1 mL.min⁻¹ e com um volume de injeção de 20 µl (NAJJAR et al., 2014), foi realizada análise da solução de insulina regular R e A-21, obtendo um tempo de retenção de 9,1 minutos e com grau de pureza de 99 % para o pico da insulina, o pico do A-21 apresentou um tempo de retenção de 12,6, com grau de pureza de 99 % (Figura 6).

Picos representados nos tempos de retenção a partir de 6,2 min a cerca de 8,0 min não foram foco da análise, mas conforme evidenciado nos trabalhos de Yomota et al (1996), Kunkel et al (1997) Moslemi et al (2003) e Najjar et al (2014) são referentes aos conservantes presente na formulação de insulina regular, os compostos glicerina e m-cresol, os picos que representam esses conservantes são detectados antes do pico da insulina, apresentam um menor tempo de retenção, moléculas apresentam uma maior polaridade.

Figura 7: Cromatograma obtido evidenciando a formação do pico da insulina e seu produto de degradação o A-21 baseado no método de Najjar et al (2014).

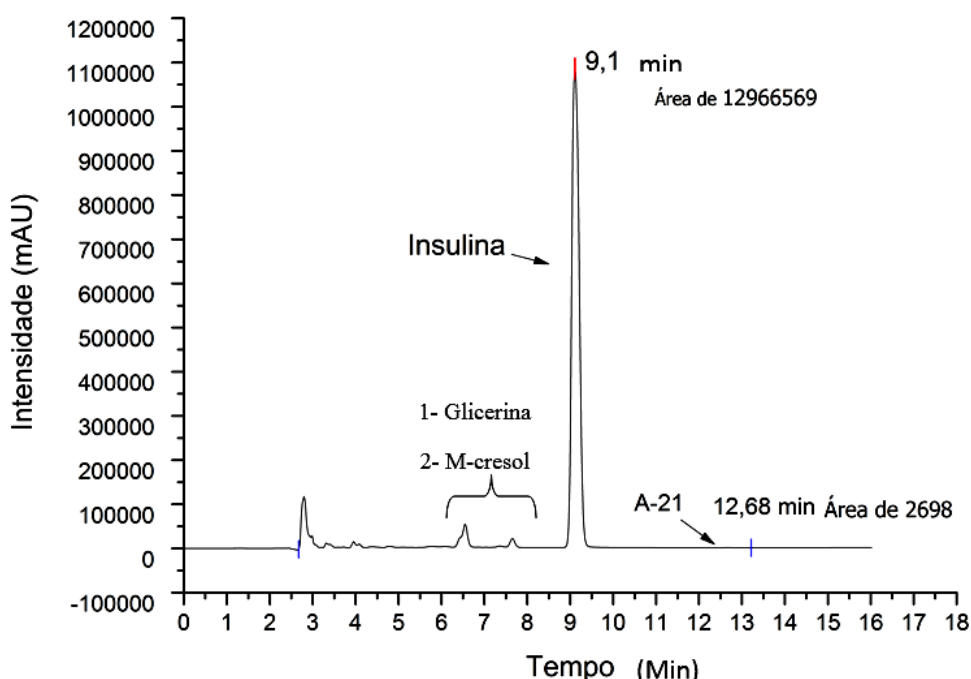
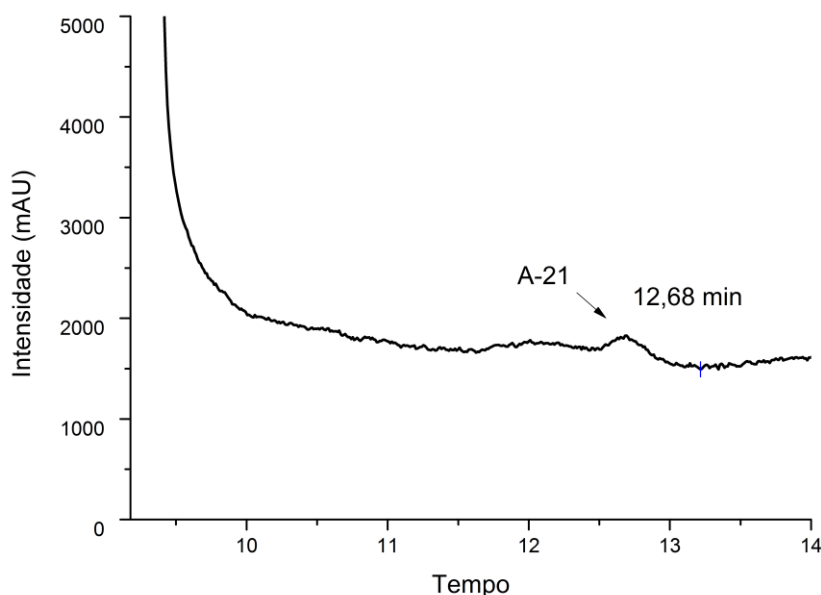


Figura 8: Adequação na escala do cromatograma para melhor visualização do pico do A-21 (aumento do zoom) referente a indicação na (Figura 9).

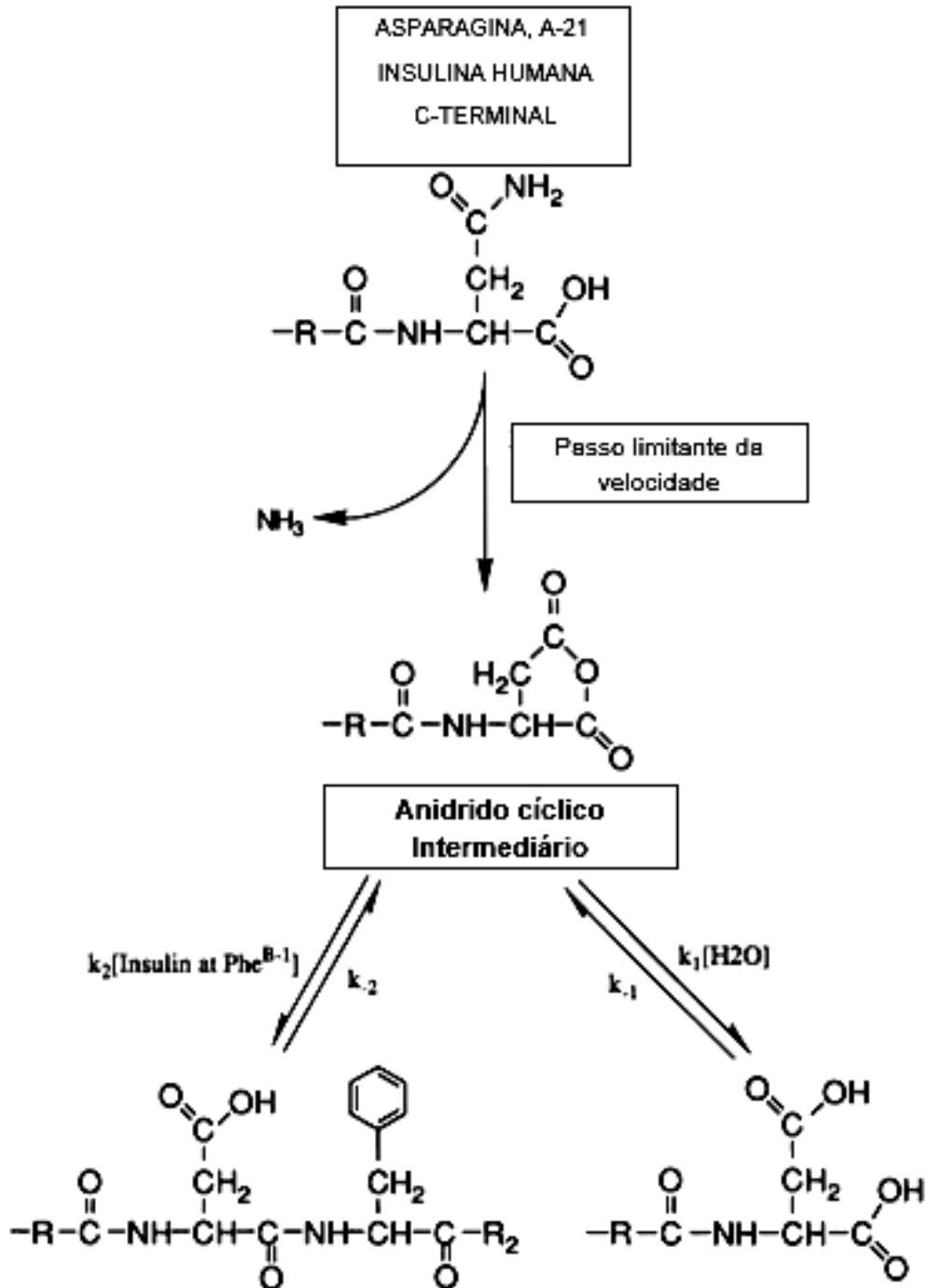


O pico do A-21 apresenta um tempo de retenção maior que o da molécula de insulina (Figura 7), devido a hidrólise ácida que ocorre no aminoácido asparagina presente na cadeia A que se encontra na posição 21 da estrutura proteica, sua conformação é alterada tornando a molécula mais hidrofóbica, sendo mais retida na fase reversar, interagindo mais com a fase estacionária (Figura 8), fato evidenciado pelo maior tempo de retenção observado na análise simultânea de insulina e A-21 e trabalhos anteriores realizados por Yomota et al (1996), Kunkel et al (1997), Oliva et al,(2000), Molesmi et al (2003), Zhou et al (2004), Xu et al (2006) e Najjar et al (2014) confirmam o maior tempo de retenção do A-21 referente a molécula de insulina.

Quando a solução de insulina foi submetida a uma temperatura de 40°C por cerca de 72 horas em pH ácido, verificou-se a degradação da molécula, conforme o mecanismo descrito na Figura 9. Neste caso, os elétrons do grupamento NH_3 atacam o hidrogênio do grupamento OH do carbono ácido terminal, onde há o rearranjo da molécula. Formação da ligação entre o carbono para estabilização dos elétrons do oxigênio, rompimento da ligação com o NH_3 , para estabilização do resíduo terminal, havendo a desamidação da molécula, resultando na formação de uma anidrido cíclico, diminuindo a polaridade da molécula (STRICKLEY, 1995). No presente trabalho, não foi obtido uma considerável degradação da molécula de insulina, visto que a área formada do pico do A-21 foi pequena (Figura 8),

possivelmente com uma maior exposição da molécula aos fatores necessários para sua degradação essa formação poderá aumentar, como demonstrado no trabalho de Xu e colaboradores (2006), onde foram necessárias 96 horas para formação em grande quantidade do produto de degradação.

Figura 9: Mecanismo de degradação da molécula de insulina humana em soluções de pH ácido.



Fonte: Strickley, (1995, p. 84)

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

5.2.2 Análise estatística das estimativas dos efeitos

A partir dos resultados das respostas (tempo de retenção da insulina) adquiridos nos vinte e sete experimentos realizados (Tabela 5), nas diferentes variações de temperatura da coluna, fluxo do eluente e proporções da fase móvel. Na tabela 6 são apresentados os resultados da análise estatística das estimativas dos efeitos, destacadas em vermelho aqueles que foram significativos, com oito graus de liberdade e erro residual de 1,62. A partir desses resultados, observa-se que apenas os fatores: fluxo (linear) e proporção aquosa da fase móvel foram significativos sobre o tempo de retenção da insulina (Tabela 6). Tal resultado é evidenciado a partir do gráfico de probabilidade normal dos efeitos (Figura 10).

Tabela 5: Matriz do planejamento fatorial 3^3 (27 experimentos) e os tempos de retenção (TR) obtidos após realização das análises.

<i>Número Experimento</i>	<i>Fluxo mL.min⁻¹</i>	<i>Temperatura °C</i>	<i>% da fase móvel</i>	<i>Tempo de retenção Minutos</i>
1	- 1	- 1	- 1	10,33
2	- 1	- 1	0	15,06
3	- 1	- 1	+ 1	24,93
4	- 1	0	- 1	10,04
5	- 1	0	0	14,39
6	- 1	0	+ 1	16,61
7	- 1	+ 1	- 1	9,64
8	- 1	+ 1	0	13,56
9	- 1	+ 1	+ 1	21,64
10	0	- 1	- 1	7,82
11	0	- 1	0	11,34
12	0	- 1	+ 1	18,77
13	0	0	- 1	7,53
14	0	0	0	10,83
15	0	0	+ 1	17,83
16	0	+ 1	- 1	7,22
17	0	+ 1	0	10,22
18	0	+ 1	+ 1	18,39
19	+ 1	- 1	- 1	6,26
20	+ 1	- 1	0	9,13

21	+ 1	- 1	+ 1	15,06
22	+ 1	0	- 1	6,04
23	+ 1	0	0	8,67
24	+ 1	0	+ 1	19,52
25	+ 1	+ 1	- 1	5,81
26	+ 1	+ 1	0	8,20
27	+ 1	+ 1	+ 1	13,10

Fonte: Programa Statistica®

Tabela 6: Efeitos estimados calculados para as variáveis independentes e as associações entre elas. Variáveis destacadas em vermelho são estatisticamente significativas.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	T(8) Graus de liberdade
Média das interações	12,35185	0,245595	50,29368
(1) Fluxo (L)	- 5,4288	0,601582	-9,02435
Fluxo (Q)	-0,20111	0,520986	-0,38602
(2) Temperatura (L)	-1,18889	0,601582	-1,97627
Temperatura (Q)	-0,72778	0,520986	-1,39692
(3) % Fase móvel (L)	9,99889	0,601582	16,62098
% Fase móvel (Q)	-1,55278	0,520986	-2,98046
1L e 2L	0,39000	0,736785	0,52933
1L e 2Q	1,20667	0,638075	1,89111
1Q e 2L	0,37167	0,638075	0,58248
1Q e 2Q	0,36833	0,552589	0,66656
1L e 3L	-1,46000	0,736785	-1,98158
1L e 3Q	-0,06833	0,638075	-0,10709
1Q e 3L	0,60333	0,638075	0,94555
1Q e 3Q	-0,43417	0,552589	-0,78570
2L e 3L	-0,62167	0,736785	-0,84376
2L e 3Q	0,00917	0,638075	0,01437
2Q e 3L	-1,24417	0,638075	-1,94988
2Q e 3Q	0,68458	0,552589	1,23887

Fonte: Programa Statistica®

A Temperatura da coluna não apresentou valor médio significativo, uma variável que não interfere no sistema dentro dos limites nos níveis analisados no presente trabalho, indicado pelos resultados obtidos a partir do cálculo dos efeitos estimados e corroborando para tal afirmação podem ser observado nos trabalhos dos autores Oliva et al (2000), Sarmiento et al (2006), Mohammad et al (2006), Najjar et al (2014) que obtiveram tempos de retenção reduzidos para a molécula de insulina mesmo com o uso da temperatura ambiente, demonstrando não ser um fator de grande interferência na análise (OLIVA; FARIÑA; LLABRÉS, 2000; SARMENTO et al., 2006; MOHAMMAD et al., 2014; NAJJAR et al., 2014).

Os efeitos mais significativos destacados foram o fluxo (Linear), % FM (Linear), como já relatado anteriormente, porém como não foram evidenciados efeitos significativos entre as interação dos fatores, a influência das duas variáveis foram interpretadas de forma isolada. Com isso, quando o fluxo aumenta do nível inferior para o superior tem uma redução média de 5,2% no tempo de retenção sendo mais favorável para o sistema o uso do fluxo no seu maior nível, evidenciado em grande parte dos trabalhos realizados para determinação de insulina por CLAE o uso do fluxo de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (OLIVA; FARIÑA; LLABRÉS, 2000; SARMENTO et al., 2006; MOHAMMAD et al., 2014; NAJJAR et al., 2014).

Em relação a variável porcentagem aquosa da fase móvel foi obtido um valor positivo no efeito 9,99% de forma linear. Partindo do nível superior para o inferior observa-se uma diminuição no tempo de retenção da insulina, o uso de uma menor porcentagem aquosa na fase móvel melhora a eluição da molécula de insulina, diminuição de pequenas interações com a coluna cromatográfica e reduzindo o seu tempo de retenção, onde foi evidenciado também por Xu et al, (2006) que o aumento de acetonitrila na constituição da fase móvel tende a diminuir a retenção da molécula de insulina pela fase estacionária(XU et al., 2006).

Através da obtenção dos termos significativos o modelo do planejamento foi ajustado formando a função 1, que expõe a estimativa dos parâmetros a partir dos experimentos, onde y_i : representa a resposta observada (tempo de retenção da molécula de insulina), b_0 : valor populacional da média global das respostas, b_1 , b_3 : valores populacionais dos principais efeitos, x_1 e x_3 : verdadeira média populacional da resposta. Substituição pelos valores reais demonstrados na equação 2 através do cálculos do coeficiente de regressão.

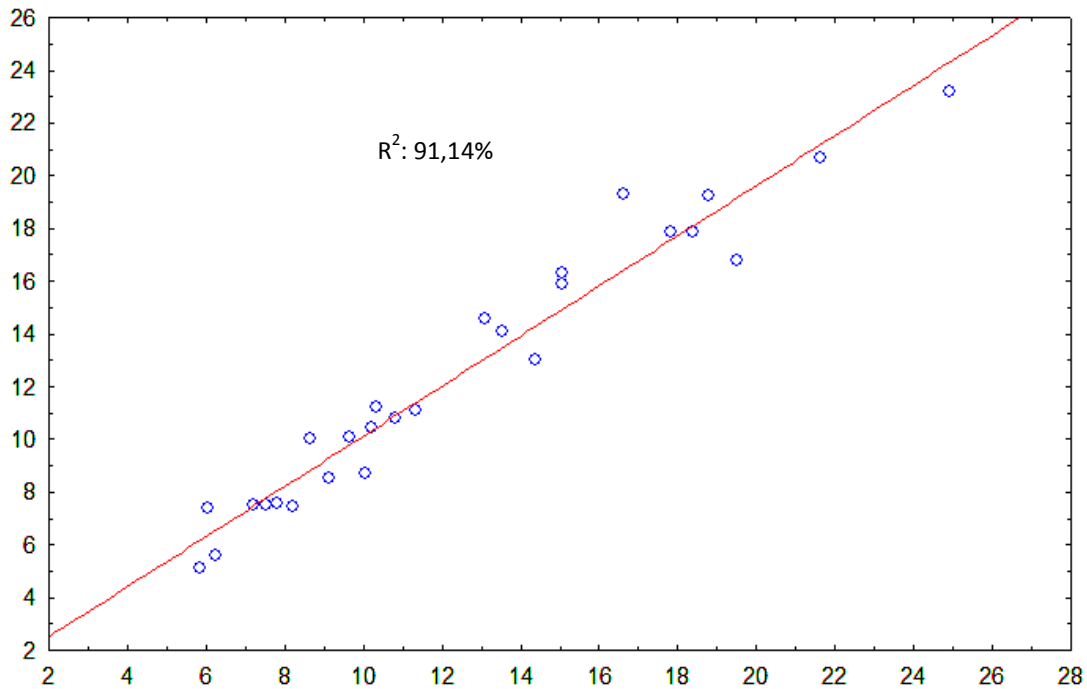
$$y_e: b_0 - b_1x_1 + b_3x_3 \quad (\text{Função 1})$$

ye: $12,35 - 2,6x + 4,99X_3$

(Substituindo os valores)

De forma adicional a analisar o comportamento matemático do modelo foi gerado o gráfico dos valores observados em relação aos valores preditos (figura 11) onde pode ser evidenciado um comportamento linear para o modelo, tendo em vista os pontos reais distribuídos de forma aleatória.

Figura 11: Gráfico dos valores observados (no eixo Y) versus valores previsto (eixo X) para predição do método ideal.



Fonte: Programa Statistica®

Por meio da análise de variância o modelo mostrou-se estar bem ajustado e através da função 1 a variância total calculada explica 91,14 % do modelo linear e deixa de explicar 8, 86%.

% variância explicada: $\text{Soma Quadrática Regressão} / \text{Soma quadrática total} \times 100 =$

% variância explicada: $588,8883 / 646,0866 \times 100 = 91,14\%$.

Tabela 8: Análise da variância para o modelo linear.

FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	F	P
REGRESSÃO	588,8883	3	196,2961	78,93261	$2,94 \times 10^{-12}$ P < 0,05
RESÍDUOS	57,1983	23	2,4869		
TOTAL	646,0866	26			

Fonte: Programa Statistica®

O teste F foi aplicado para o fim de observar a significância estatística da regressão, que segue uma distribuição normal com intervalo de confiança de 95%, considerando amostras aleatórias. Através da divisão da média quadrática da regressão sobre a média quadrática do valor dos resíduos com uma distribuição F com 3 (numerador), 23 (denominador) graus de liberdade foi obtido um F calculado maior que o F tabelado, descartando a hipótese nula e portanto o modelo é estatisticamente significativo (PIMENTEL; NETO, 1996; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

$MQ_{reg}/MQ_{res} \approx F(3,23, 0.95) = 8,65 \rightarrow F \text{ tabelado}$

$MQ_{reg}/MQ_{res}, 196,2961/ 2,4869 = 78,93 \rightarrow F \text{ calculado}$

F calculado > F tabelado = Modelo estatisticamente significativo.

5.2.3 Adequabilidade do sistema cromatográfico para determinação da insulina

Dentre as combinações propostas pela matriz de planejamento das condições cromatográficas ideais para obtenção de um menor tempo de retenção para molécula de insulina, destacou-se o experimento 25, com uma temperatura da coluna a 35°C, fluxo do eluente 1mL.min⁻¹ e proporção aquosa da fase móvel de 52% (20 mM KH₂PO₄), 31% de acetonitrila e 17% de metanol, variáveis independentes foram fundamentais para a detecção do menor tempo de retenção para a insulina (TR: 5,81 min) frente as demais combinações e também detecção do pico de formação do A-21 (TR: 9,10 min), em adição não foram verificadas a presença de interferentes em nenhuma das análises realizadas, de acordo com o grau de pureza 99,9% do pico da insulina e A-21 como destacado nas Figura 12 e Figura 13.

Figura 12: Cromatograma obtido após otimização do método evidenciando formação do pico de insulina (5.81 min) do A-21 (9,10 min).

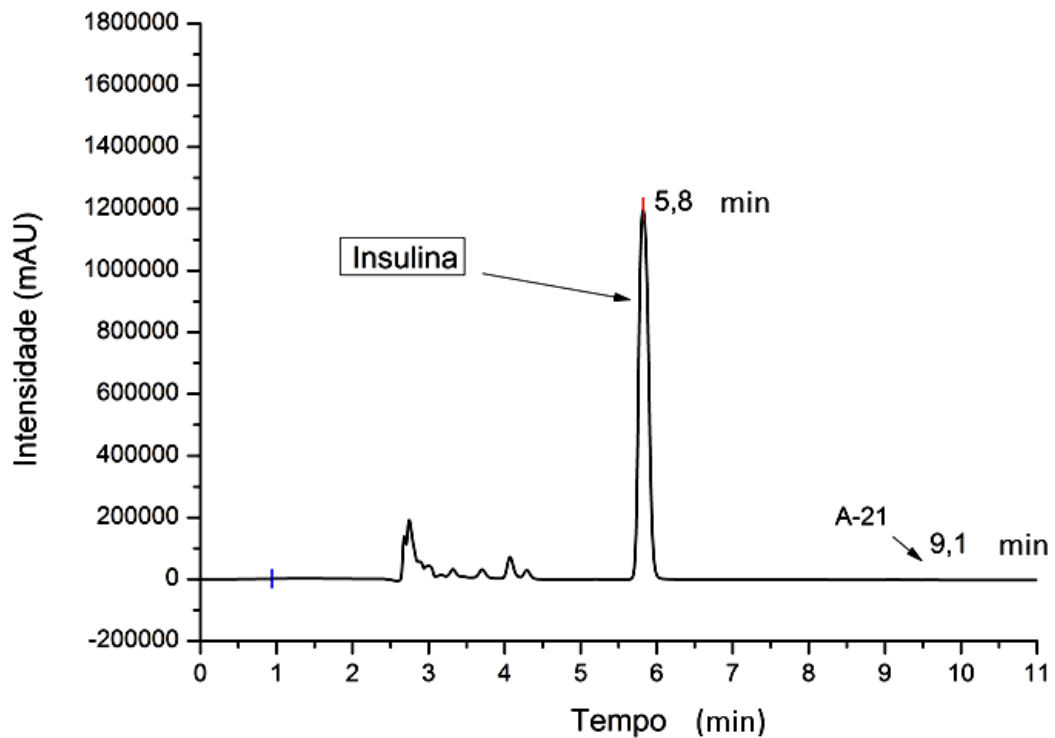
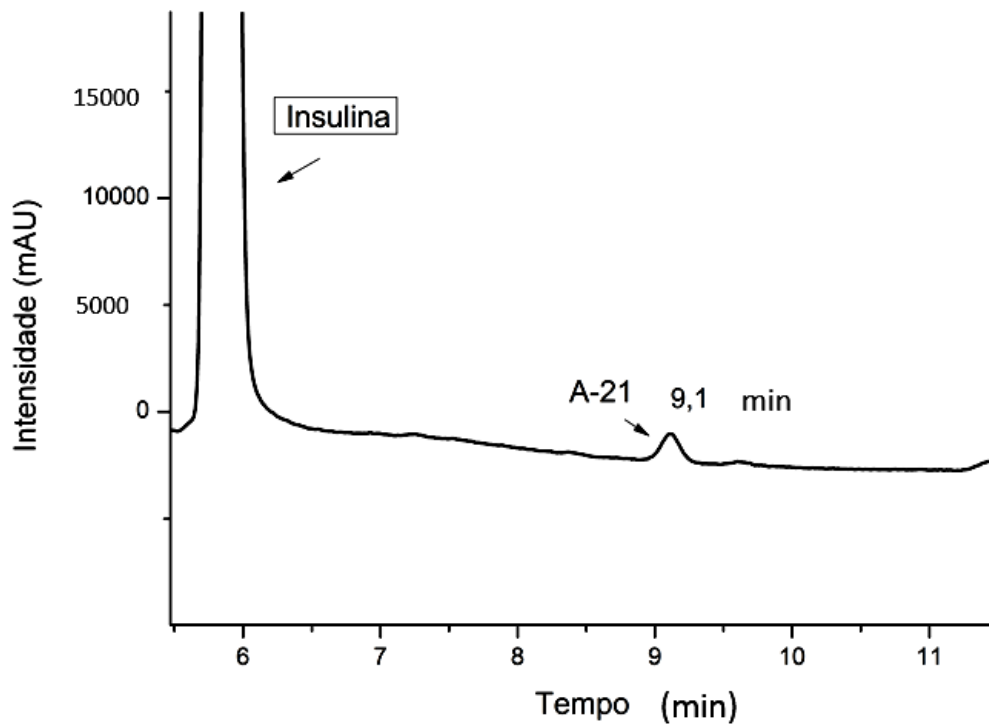


Figura 13: Adequação na escala do cromatograma para melhor visualização do pico do A-21 (aumento do zoom) referente a indicação na (Figura12).



Os picos da insulina e A-21 apresentaram pureza de 99,9%, não sendo verificado coeluição, evidenciando a presença apenas dos compostos em análise nos picos identificados, em contrapartida a pequena área de formação do pico do A-21 (13133) destaca a reduzida degradação da molécula quando submetida ao tempo proposto pelo estudo (72 horas), fato evidenciado na determinação da insulina e A-21 simultânea realizada por Xu et al (2006) onde foi necessário em seu trabalho aumentar para 96 horas o tempo para degradação da proteína (XU et al., 2006).

A resolução do pico da insulina foi calculada com o pico mais próximo, por meio do software Statistica®, calculada uma resolução de 6,738 com o pico do A-21 uma separação completa (CAROL H; GILBERTO L; PIERINA S, 2006), Uma resolução entre picos de 1,0, significa somente 2,3% de sobreposição, para resolução igual 1,5, somente 0,1% e nenhuma sobreposição a partir de resolução superior a 1,8 (CASS; DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001). destacando-se frente aos trabalhos realizados por Oliva et al (2000), Xu e colaboradores (2006) e Najjar et al (2014) que obtiveram resoluções entre os picos da insulina e A-21 de 1,8 3,10, 1,56, respectivamente (Tabela 9) (OLIVA; FARIÑA; LLABRÉS, 2000; XU et al., 2006; NAJJAR et al., 2014).

Como característico dos solventes utilizados foram observados entre os tempo de retenção 2,5 min a 3,5 picos referentes ao ácido usado para diluição da amostra e entre os tempos 3,5 a 4,5 min picos que não foram alvos do presentes trabalho e não interferem na determinação das moléculas em estudo (OLIVA; FARIÑA; LLABRÉS, 2000), mas como relatado anteriormente e já constatado nos trabalhos dos autores Molesmi et al (2003) e Najjar et al (2014) são referentes aos conservantes da formulação de insulina regular que apresentam menor tempo de retenção que a proteína (MOSLEMI; NAJAFABADI; TAJERZADEH, 2003; NAJJAR et al., 2014)

Tabela 9: Adequabilidade do sistema cromatográfico referentes ao pico da insulina e o A-21.

Picos	Tempo de retenção	Resolução	Área	Número de pratos teóricos	Pureza do pico	Fator de cauda
Insulina	5,8 min	6,738	10620377	65268,064	99,9%	1,22
A-21	9,1 min	6,738	13133	113620,155	99,9%	1,067

A combinação desses fatores em destaque na tabela 9, proporcionaram um menor tempo de retenção para os compostos em estudo e um tempo de análise final pequeno, cerca de 10 minutos, bastante significativo na redução do tempo de análises rotineiras. A coluna utilizada nos experimentos demonstrou ser eficiente com os números pratos teóricos para o pico da insulina e A-21 (65268,064 e 113620,155, respectivamente), o uso de uma coluna de tamanho considerável (250 x 4,6 mm, 5 μ m) proporcionou uma boa separação dos picos com um menor tempo de retenção, sobressaindo frente aos dados fornecidos pelo método proposto no estudo de Najjar et al (2014) que obteve um tempo de retenção para insulina de 7,87 e A-21 de 9,36 utilizando uma coluna de (100 x 4,6 mm, 5 μ m). Com estas condições, é possível separar a insulina e seu produto de degradação na mesma análise em um curto tempo de análise. O cálculo dos valores do fator de cauda obtidos de 1,22 e 1,067 para os picos da insulina e seu produto de degradação indicaram picos próximos da simetria perfeita, onde de acordo com a USP 38 (2015) valores de picos igual a 1 demonstram simetria perfeita, entretanto quanto maior esse valor mais assimétricos são e diminuem a confiabilidade da integração e precisão dos mesmos.

Em adição foram realizados mais experimentos, demonstrados na tabela 10, para testificar que os níveis escolhidos para realização dos experimentos eram os ideais, aumentando e reduzindo os níveis das variáveis independentes significativas como forma de comprovar que a combinação demonstrada no presente trabalho é a mais vantajosa, conforme exibido na tabela 9 combinações que foram utilizadas para realizar os ensaios e seus respectivos tempos de retenção para a molécula de insulina, entretanto foram obtidos picos impuros, havendo também coeluição com outras moléculas e resoluções apresentadas muito baixas, caracterizando picos não separados, embora tenham sido reduzidas as respostas, menores tempos de retenção para a molécula com a combinação em outros níveis, não foi evidenciada a adequabilidade do sistema, observado com a análise de alguns parâmetros, onde pode ser evidenciado pela realização dos experimentos adicionais que os níveis estudados anteriormente são mais adequados, tendo em vista que além de estar em uma faixa de tempo de retenção para análises de rotina bom, encontrou-se dentro dos parâmetros cromatográficos.

Tabela 10: Condições dos ensaios extras realizados, verificando a inadequabilidade do sistema cromatográfico no níveis testados.

Nº EXPERIMENTOS	FLUXO ML/MIN ⁻¹	TEMPERATURA DA COLUNA °C	PROPORÇÃO DA FASE MÓVEL	TEMPO DE RETENÇÃO DA INSULINA	RESOLUÇÃO
1	1 mL/min ⁻¹	35°C	42%:36%:22%	4,54 min	0,47
2	1 mL/min ⁻¹	40°C	52%:31%:17%	5,61 min	0,747
3	1,2 mL/min ⁻¹	35°C	52%:31%:17%	4,84 min	1,56
4	1,2 mL/min ⁻¹	35°C	62%:26%:12%	6,84 min	0,0
5	1,2 mL/min ⁻¹	35°C	72%:22%:7%	7,84 min	1, 3

5.2 PARTE II: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS OBTIDOS A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS

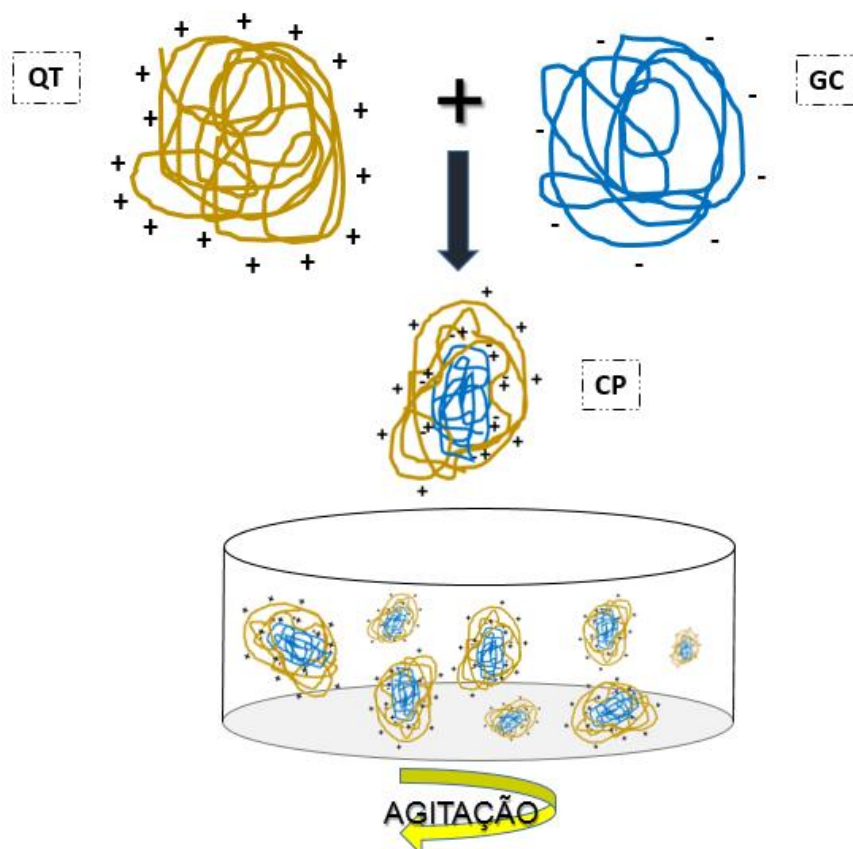
5.2.1 Formação de nanoesferas de goma de cajueiro e quitosana

5.2.2 Avaliação de diferentes proporções dos biopolímeros na obtenção de nanoesferas

Como pode ser demonstrado na figura 14 o processo de formação simples dos complexos polieletrólitos por meio das interações entre as cargas dos biopolímeros goma de cajueiro e quitosana. Já nos dados presentes na tabela 11 foi evidenciada a formação de nanoesferas de tamanhos heterogêneos, os complexos polieletrólitos apresentaram-se em média em um intervalo de tamanho de 150 nm a 300 nm, sempre com a formação de duas populações, onde acreditasse que a população em maior porcentagem sejam os complexos polieletrólitos e em menor porcentagem polímeros que não interagiram de forma eficiente. Nas preparações onde a maior proporção foi de goma de cajueiro pôde ser observada a formação de precipitado, devido a sua alta solubilidade em água e conforme relatado por Soares e colaboradores (2014) devido a esse fator não leva-se a formação de nanoestruturas pela incapacidade em absorver água do meio sem o polímero se dissolver (SOARES et al., 2014). Corroborando, Rodrigues e colaboradores (2012) destacam em seu trabalho que o excesso de cargas aniônicas provindas da maior concentração de goma no sistema neutralizaram as cargas positivas da quitosana, levando a precipitação em solução, vindo a reduzir ou eliminar a interação eletrostáticas entre os biopolímeros, causando a precipitação (RODRIGUES et al., 2012).

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

Figura 14: Ilustração do processo de interação eletrostática entre os biopolímeros, goma de cajueiro (GC) e quitosana (QT) para formação das nanoesferas.



Fonte: Autoria própria.

O aumento da proporção da solução de quitosana levou a uma elevação no tamanho das nanoesferas, como observados nas NP1, NP3 e NP5, demonstrando um aumento gradual de 150,2 nm, 197,9 nm e 276,7 nm, respectivamente (Tabela 11). A proporção de quitosana na matriz tem grande influência no tamanho dos complexos, de tal forma que há uma redução das interações quitosana-goma pela formação de aglomerados, devido a interação entre cadeias, que se realiza com os hidrogênios presentes em sua estrutura. A presença dos grupamentos amins positivamente carregados causam a repulsão entre as cadeias contribuindo para expansão da estrutura e aumento do tamanho das nanoesferas. Característica também observada nos trabalhos realizados por Hajdu e colaboradores (2008) e por Abreu e colaboradores (2012), com nanopartículas de quitosana e ácido poli- γ -glutâmico e nanogels de goma de cajueiro e quitosana, respectivamente (HAJDU et al., 2008; ABREU; OLIVEIRA; PAULA; DE PAULA, 2012).

Tabela 11: Determinação do tamanho, Pdi e potencial zeta das diferentes proporções de goma de cajueiro (GC) e quitosana (QT) misturados para obtenção de nanoesferas.

GC/QT (V/V)	TAMANHO INTENSIDADE (NM) PICOS	PDI	ZETA (MV)
GC	Pico 1: 67,07 nm – 68,4% Pico 2: 3,925 nm – 28,5% Pico 3: 3352 nm – 3,1%	0,822	- 4,46 mV
QT	Pico 1: 472,1 nm – 100%	0,320	31 mV
NP1 (1:1)	Pico 1: 150,2 – 67,7% 2: 22,73 – 29,5 % 3: 4822 – 2,5%	0,651	14,0 mV
NP2 (3:2)	Pico 1: 251,6 – 51,5 % 2: 35,97 – 46,6% 3: 4673 – 1,9%	0,514	10,3 mV
NP3 (2:3)	Pico 1: 197, 9 – 73,8% 2: 24,84 – 25,3 % 3: 5291 – 0,9%	0,673	17,4 mV
NP4 (4:1)	Pico 1: 2290 – 47,1% 2: 138 – 45% 3: 11,77 – 4,7%	0,494	3,39 mV
NP5 (1:4)	Pico 1: 276, 7 – 89,2% 2: 29,03 – 9,0% 3: 10,54 – 1,2%	0,537	25,5 mV

A quitosana apresenta em sua estrutura grupamentos aminas prontonados, quando em meio ácido, que conferem a molécula carga positiva acentuada, no presente trabalho com 78% de grau de desacetilação, quanto maior for o grau de desacetilação maior será o teor da quantidade de grupamentos amina positivos expostos para interagir (LUO & WANG, 2014), fatores essências que por si só já seriam suficientes para interações eficientes das moléculas, porém pela fraca carga negativa presente na goma de cajueiro, quase neutra, tem-se uma interação mínima entre os polímeros, insuficiente para formação de nanoesferas que se mantenham em um tamanho unimodal e perdurem formadas por longos períodos de tempo

As nanoesferas apresentaram cargas de superfície positivas para as misturas nas proporções NP1, NP2, NP3, NP5, com valores variando de 10,3 mV a 25,5 mV e neutra para NP4 com 3,39 mV. Evidentemente que as formulações com maiores proporções de quitosana se destacariam com uma carga de superfície maior, relativo ao maior quantitativo de aminas positivas na superfície dos complexos, referentes aos grupamentos protonados, fato que contribui para estabilização das nanopartículas. A baixa carga negativa apresentada pela goma

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

de cajueiro é neutralizada pelas elevadas quantidades de cargas positivas da quitosana e que somente em grandes quantidades da goma, como na NP4 tem-se uma influência maior para reduzir a carga de superfície da nanoesfera. Entretanto, em todos os complexos formados houve um alto índice de polidispersão, característico pela formação de mais de uma população de nanopartícula.

Os biopolímeros apresentam em suas estruturas grupamentos carregados, a goma de cajueiro apresenta uma porcentagem menor que 5% de grupamentos ácidos, que quando desprotonados deixam a exposição mínimas cargas negativas presentes na molécula, outra evidência que auxilia também para essa característica é o fato da goma ter presente em sua cadeia principal cerca de 60 a 72% galactose (PAULA; HEALTLEY; BUDD, 1998; DE PAULA et al., 2006; DE PAULA et al., 2011; DAS BISWARUP et al. 2014), de acordo com os autores Rodrigues e colaboradores (1995), De Paula e equipe (2005) e Soares e colaboradores (2014) os biopolímeros que possuem teores altos de unidades dos monossacarídeos manose e galactose, em média apresentam cargas entre -13,7 e 2,1 mV, fracamente negativos ou neutros, informações que corroboram para os resultados de potencial zeta obtidos na faixa neutra no presente trabalho, demonstrando a forte influência na carga de superfície da nanopartículas.

5.2.3 Avaliação de nanoesferas de goma de cajueiro, quitosana e TPP por complexação polieletrólítica

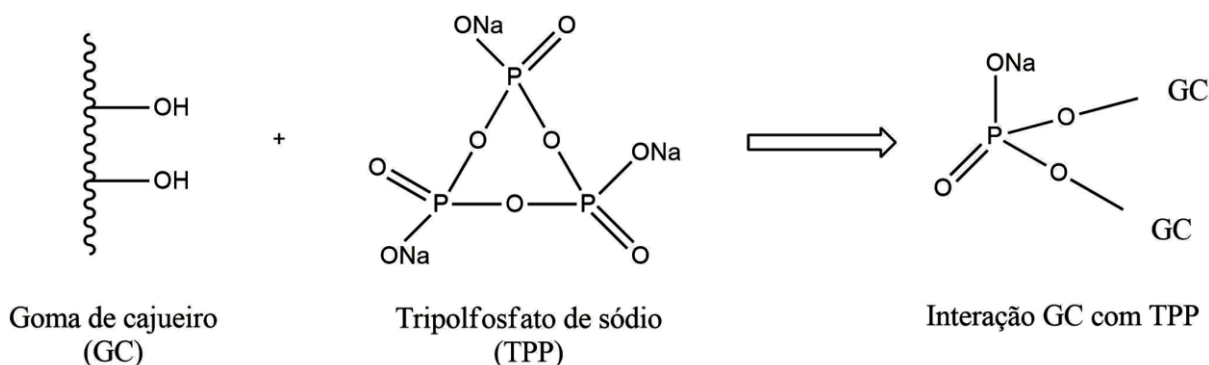
Foram analisadas as quantidades mínimas iniciais estequiometricamente dos biopolímeros que pode ser observada a turvação (opalescência) da mistura, característico para formação de nanopartículas a partir de biopolímeros segundo destacado nos trabalhos de Morris e colaboradores (2011), Fan et al (2012) e Rampino et al (2013), Volod'ko e colaboradores (2016). No presente trabalho essa observação foi evidenciada quando a cada 5mg/mL da solução de goma de cajueiro foi adicionado cerca de 1 mg/mL de quitosana e 2,97 mg/mL de TPP, o quantitativo de cargas fornecido por cada molécula demonstrou característica macroscópica de formação de nanopartículas, não necessariamente significa que houve a completa neutralização da carga positiva, mas indícios da proximidade das quantidades iniciais para o estudo.

A partir das misturas das soluções dos biopolímeros com o agente reticulante tem-se a formação espontânea de nanoesferas pela reação de complexação polieletrólítica/gelificação ionotrópica, através do estabelecimento de interações eletrostáticas, entre as moléculas carregadas positiva e negativamente, sob condições suaves de preparação, devido as interações intra e intermoleculares mediadas pelas moléculas aniônicas. O efeito de reticulação proporcionado pelo TPP fornece uma maior interação entre as moléculas (JANES; CALVO; ALONSO, 2001).

Os grupamentos de ácido urônico mínimos presentes na molécula da goma de cajueiro, além dos demais monossacarídeos, quando desprotonados disponibilizam grupamentos carboxílicos com cargas negativas, numa faixa muito pequena, semelhante a goma arábica, onde a energia para realizar ligações é muito baixa (PAULA & RODRIGUES, 1995), para auxiliar na sua interação com outros polissacarídeo pode-se utilizar agentes de reticulação, sem ser necessário modificar a molécula, como realizado por diversos trabalhos (SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2009; BISWARUP DAS et al., 2014; PITOMBEIRA et al., 2015).

O tripolifosfato de sódio um poliânion que apresenta em sua estrutura átomos de oxigênio susceptíveis a realizar ligações de hidrogênio, ligações iônica, de tal forma a realizar ligações cruzadas com os grupamentos hidroxilas das unidades monossacarídicas da goma de cajueiro (Figura 15), fato evidenciado no trabalho de Kabir e colaboradores (2000) que demonstrou tal interação do agente de reticulação com a goma guar, um polissacarídeo bastante rico em unidades de galactose. Os grupamentos aminas protonados da molécula de quitosana interagem ionicamente com os grupamentos negativos do poliânion TPP, resultando na formação de complexos e encapsulamento de fármacos e outras moléculas, demonstrado em estudos anteriores a proteção da molécula de insulina (MUKHOPADHYAY et al, 2013), vancomicina (CERCHIARA et al., 2015) genes (CSABA; HOGGARD; ALONSO, 2009; VIMAL et al., 2013). Sendo assim, o TPP interagem inter e intramolecularmente com a goma de cajueiro e a quitosana auxiliando na formação do complexo polieletrólítico, exemplo de interação demonstrado a partir da figura 15.

Figura 15: Representação da interação entre os átomos presentes nas moléculas de goma de cajueiro (GC) e tripolifosfato de sódio (TPP).



Fonte: Autoria própria.

5.2.4 Influência da proporção do agente reticulante na formação dos complexos

O uso do TPP como agente de reticulação demonstrou um eficaz efeito de interação intra e intermolecular nas matrizes dos complexos polieletrólítico entre os biopolímeros, a sua presença causou alterações nos parâmetros de caracterização própria, como: tamanho das nanoesferas, pdi e carga de superfície. Para tal, foram observados esses efeitos nas pequenas alterações na proporção do TPP com os biopolímeros que foram analisados numa proporção constante.

Na tabela 12 pode ser observado as quatro proporções de TPP que foram avaliadas (1,98 mg - (0,4), 2,97mg - (0,6), 3,47mg - (0,7), 3,96mg - (0,8)) onde pode ser demonstrado seu acentuado efeito sobre os três parâmetros analisados. Nos complexos polieletrólíticos NP1e NP2 não foi formada apenas uma população de nanopartículas, apresentou-se em caráter bimodal, com pdi acima de 0,3 característico de formulações bastante polidispersas, demonstrando que quanto menor o tamanho da partícula maior o índice de polidispersividade, evidenciando a influência do aumento de quitosana na formulação, levando ao aumento final dos complexos, ponto observado no trabalho de Rampino e colaboradores (2013) que além de demonstrar a influência proporção da quitosana a aumentar o tamanho final da nanoesfera, também houve a formação de duas populações de nanopartículas (RAMPINO et al., 2013). E o inverso para quando for elevada a quantidade de TPP adicionado, sendo maior o tamanho das nanopartículas com o aumento de sua eficiência de associação entre os biopolímeros e o agente reticulante, sendo menor a polidispersividade.

A quantidade de cargas da goma de cajueiro e a ação do agente reticulante não foram suficientes para neutralizar as cargas positivas da quitosana, não sendo completa a interação e restando excesso de polissacarídeo sem interagir, caracterizando a porcentagem menor da população formada (Tabela 12). O potencial zeta apresentou-se numa faixa neutra para todos os complexos, entretanto com o aumento da proporção de TPP observou-se um leve aumento na carga de superfície, evidenciando que houve uma menor neutralização das cargas da quitosana, havendo uma maior influência da sua carga positiva na carga de superfície final das nanoesferas (MKHOPADHYAY et al., 2013).

Tabela 12: Determinação do tamanho, Pdi e potencial zeta das diferentes proporções de goma de cajueiro (GC), quitosana (QT) e tripolifosfato de sódio (TPP), após formadas as nanoesferas.

	<i>Ordem</i>	<i>Proporção</i> v/v	<i>Tamanho (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>ZETA (mV)</i>
NP 06	GC/TPP/QT	10/0,4/0,6	P1: 136,4 – 90,4% P2: 7,51 – 9,6%	0,596	- 6,47
NP 07	GC/TPP/QT	10/0,6/0,6	P1:153,1 – 98,5% P2: 8,58 – 1,8%	0,354	- 5,12
NP 08	GC/TPP/QT	10/0,7/0,6	P1: 169,3 – 100%	0,293	- 4,23
NP 09	GC/TPP/QT	10/0,8/0,6	P1: 204,8 – 100%	0,243	- 2,94

Inversamente, com a crescente proporção de TPP houve uma maior ação reticulante frente aos biopolímeros, o resultado da síntese das nanoesferas NP8 e NP9 mostrou-se unimodal (tabela 12), com a formação de apenas uma população, corroborado também pela diminuição no índice de polidispersão obtido abaixo de 0,3, com reduzida polidispersividade entre as partículas. A eficiência das ligações cruzadas do TPP verificada com o aumento de sua proporção, mediu a melhores interações entre os biopolímeros, de tal forma, aumentando a suscetibilidade de ligações realizadas e compactando a estrutura a tamanhos menores pela menor disponibilidade de cargas expostas, havendo uma condensação das cadeias poliméricas.

Corroborando para anterior afirmação no trabalho de Rampino e colaboradores (2013) a elevação da proporção de TPP leva a maiores dimensões e formação de agregados, devido ao aumento das ligações cruzadas, expressamente, interações inter e intramoleculares. Opostamente aos resultados obtidos por Rodrigues e colaboradores (2012) onde a adição de uma maior proporção de TPP resultou em tamanho menores de partícula e diminuição no potencial zeta, no qual ele justifica ser pela indução da condensação das cadeias poliméricas e pelo menor número de grupos carregados, respectivamente, porém o biopolímero usado em conjunto com quitosana e TPP é a carragenana que apresenta uma elevada quantidade de grupos sulfatos carregados negativamente e alta força de interação por ligações iônicas e eletrostáticas (RODRIGUES et al., 2012).

5.2.5 Efeito da ordem de adição biopolímero/agente de reticulação

O tamanho das nanopartículas formadas, carga superficial e a reação de complexação polieletrólítica podem ser bastante influenciados pela ordem de adição. A partir da tabela 13 pode observar a notável influência da ordem de gotejamento na modificação dos tamanhos das nanoesferas, partículas sintetizadas com o TPP adicionado por último tendem a apresentar menores tamanhos, devido a sua maior interação entre cadeias, reduzindo os grupos carregados expostos, demonstrando que há uma maior interação quitosana com a goma de cajueiro, ocorrendo um aumento na contração da partícula, resultando em um tamanho dinâmico menor.

Contrariamente, quando a quitosana é adicionada por último tem-se um aumento significativo do tamanho das nanopartículas, característico da molécula que forma esse expansamento do complexo, pois ela tende a formar ligações intra cadeia com ela mesma, agregando mais moléculas a superfície da estrutura, consequentemente elevando o tamanho da nanoesfera.

Tabela 13: Representação dos efeitos causados no tamanho, pdi e potencial zeta das nanoesferas sintetizadas com diferentes ordens de adição do polímero (QT) e agente de reticulação (TPP).

	<i>ORDEM</i>	<i>PROPORÇÃO</i>	<i>TAMANHO (NM)</i>	<i>PDI</i>	<i>ZETA (MV)</i>
<i>NP 10</i>	GC/QT/TPP	<u>10/0,6/0,6</u>	P1: 83,63 – 78,7% P2: 7,77 – 21,3%	0,640	- 2,83
<i>NP 11</i>	GC/TPP/QT	<u>10/0,6/0,6</u>	P1: 153,1 – 98,5% P2: 8,58 – 1,8%	0,354	- 5,12
<i>NP 12</i>	GC/QT/TPP	<u>10/0,6/0,4</u>	P1: 63,41 – 74,3% P2: 6,87 – 25,7%	0,579	NÃO REPRODUZÍVEL
<i>NP 13</i>	GC/TPP/QT	<u>10/0,4/0,6</u>	P1: 136,4 – 90,4% P2: 7,51 – 9,6%	0,596	- 6,47

Além dos efeitos causados no tamanho da partícula é considerável sua influência na carga superficial da estrutura, evidenciado pela diminuição do potencial zeta, pela maior exposição de grupos negativamente carregados do TPP ou pela sua instabilidade em formação de uma carga final, não sendo eficiente a interação entre os dois polímeros com o agente de ligação cruzada. Notavelmente os grupos catiônicos da molécula de quitosana mais exposto na superfície tendem a fornecer a estrutura uma maior carga final resultante positiva ou aumentada, verificado nos casos onde a quitosana foi gotejada por último, aumentando a estabilidade da nanoesfera.

5.2.6 Efeitos da variação de pH das soluções na formação da nanoesferas

O efeito do pH das soluções sobre a formação das nanopartículas pela complexação da GC/TPP/QT foi analisada utilizando as soluções dos biopolímeros e agente de reticulação em seus pH's iniciais, após preparadas, sem ajuste apresentando os pH's: GC: 6,7, QT: 3,3 e TPP: 9,3 e após ajuste com NaOH 0,1M e HCl 0,1M para os pH's: GC: 4,8, QT: 4,6 e TPP: 5,0.

Os resultados indicaram que quando houve a diminuição da faixa de pH de todas as soluções foi reduzida a formação da suspensão opalescente, sendo observada a formação de agregados com população bimodal, heterogênea e altos índices de polidispersividade. Também foi verificada a dificuldade em medir o potencial zeta, demonstrando variações nas porcentagens de carga de superfície, quando adicionado o TPP em pH de 5,0. As soluções

usadas sem o ajuste do pH destacou-se pela formação de nanopartículas unimodais, com índices de polidispersividade abaixo de 0,3 e um potencial zeta na faixa neutra, caracterizando melhores condições ionizáveis dos materiais para formação dos complexos. A interação presente entre os grupos carboxílicos da goma de cajueiro com o grupamento amina da quitosana e a ocorrência das ligações cruzadas polímeros/TPP só se torna possível quando eles se encontram em seu melhor estado ionizável e com seus grupamentos altamente carregados (MARTINS et al., 2012).

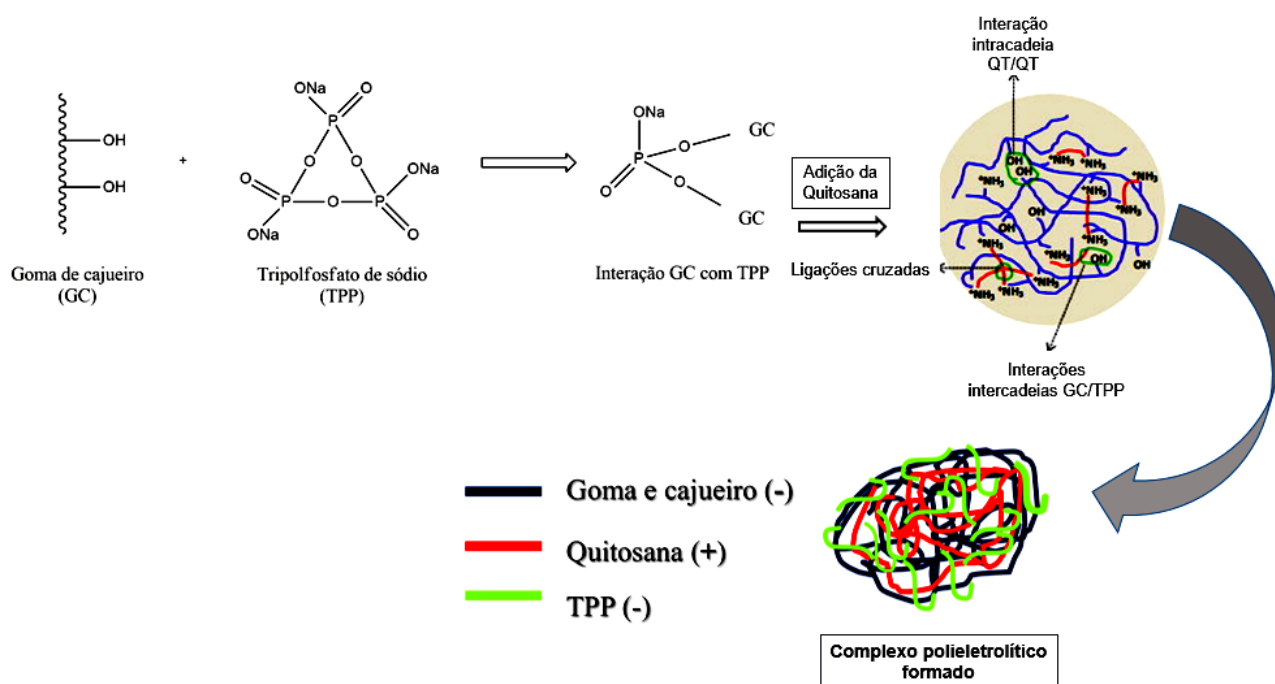
A quitosana é um polieletrólito insolúvel em faixas de pH neutro ou básico, apresenta um pKa de 6,5 caracterizada como uma base fraca, o polissacarídeo deve estar dissolvido em um meio ácido que aumenta o seu grau de protonação e eleva a densidade de cargas, tornando-a totalmente dependente do pH do meio para disponibilizar uma maior quantidade de grupamentos NH_3^+ para integrar com as demais moléculas opostamente carregadas (HASHAD et al., 2016), no presente trabalho essa melhor configuração da molécula se deu em pH na faixa de 3,3. Porém, para a goma de cajueiro a faixa abaixo de pH 5 é a qual a molécula encontra-se com seus grupamento carboxílicos $-\text{COO}^-$ mais ionizáveis e com melhores características reológicas de uma alta viscosidade (PAULA; RODRIGUES, 1995; ZAKARIA; RAHMAN, 1995; PAULA et al., 1998), mas no presente estudo foi pronunciada sua melhor interação com os demais materiais perto da faixa de pH neutro, mesmo já sendo pouca a densidade de cargas da goma em pH baixo nessa faixa ainda foi possível a realização de interação, acredita-se que seja pelo suporte fornecido pelas ligações de hidrogênio realizadas com os grupamentos $-\text{OH}$ do polímero com o TPP, como também foi evidenciada esse tipo de interação nos estudos de Kabir et al, (2000) e Rodrigues e colaboradores (2012) da goma guar, que apresenta constituição de polissacarídeos semelhante a goma de cajueiro.

O TPP como poliânion tem sua carga afetada pelo pH do meio, em condições iniciais, sem ajuste do pH na faixa de 9,8 há uma concentração elevada de íons tripolifosfórico ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$), entretanto com a presença também de íons hidróxidos que dependendo do pH do meio podem interagir de forma competitiva juntamente com o tripolifosfórico pelos grupamento amins da quitosana (FAN et al., 2012). Quando a solução de TPP é misturada a da goma de cajueiro os íons hidróxidos são parcialmente neutralizados pelos hidrogênios liberados dos grupamentos carboxílicos ou das hidroxilas do sacarídeos do polímero, ao ser adicionada a solução de quitosana em pH ácido, os grupamentos amins fortemente protonados se ligam aos íons tripolifosfórico, resultando na formação da estrutura do

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

complexo polieletrólítico. Com isso, foi demonstrado que as melhores condições para síntese de nanopartículas a partir desses materiais sejam em seus pH's sem ajuste, os iniciais (Figura 16).

Figura 16: Representação esquemática das possíveis interação entre os biopolímeros goma de cajueiro (GC), quitosana (QT) e tripolifosfato de sódio (TTP) para a formação de nanopartículas.



Fonte: Autoria própria e adaptado de Martins et al, (2012).

5.2.7 Avaliações analíticas da formação de nanopartículas

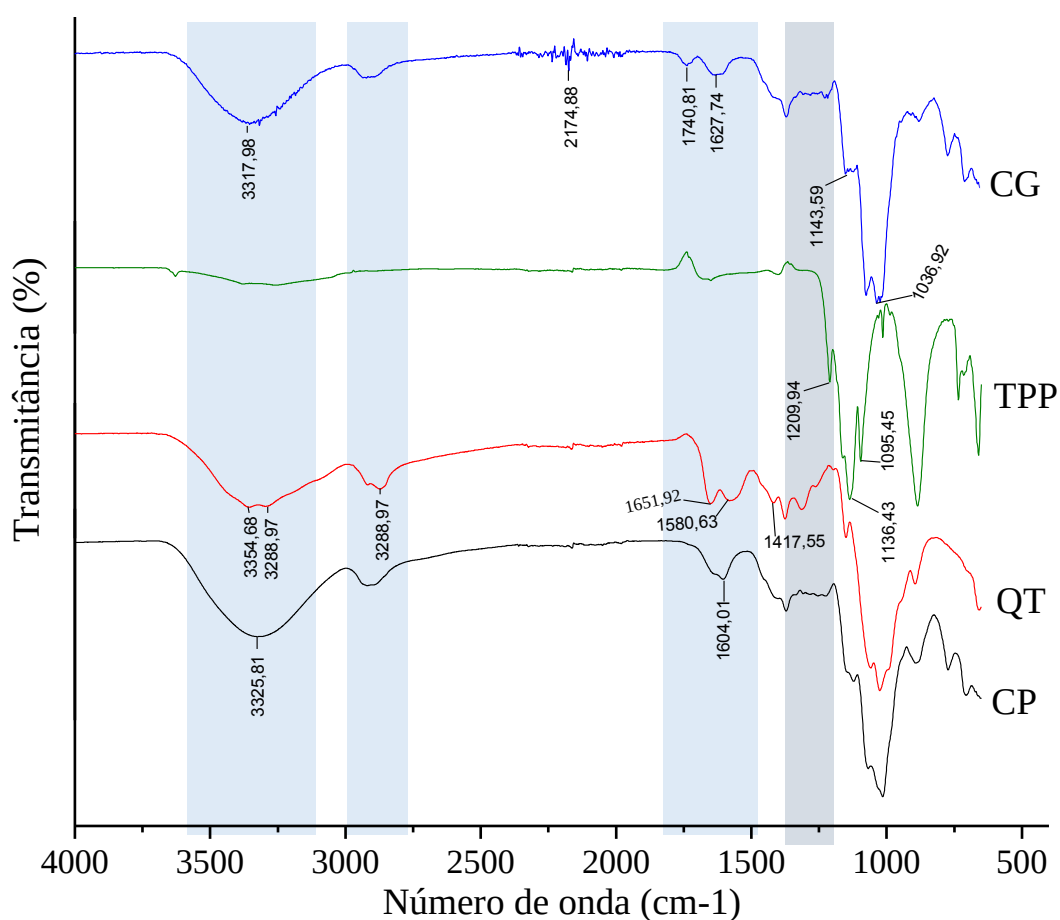
Para realização das caracterização foi escolhida a formulação nas proporções 10/0,8/0,6 GC/TPP/QT.

5.2.7.1 Estudo de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Representado na figura 17 o espectro de FTIR do complexo polieletrólítico GC/TPP/QT, juntamente com os espectros de cada material isoladamente. Os picos característicos básicos da quitosana encontrados em $3354,68 \text{ cm}^{-1}$ e $3288,97 \text{ cm}^{-1}$ foram atribuídos a um alongamento dos grupamentos O-H e N-H da matriz da quitosana, $2872,07 \text{ cm}^{-1}$ a vibrações de estiramento C-H. Um alongamento importante de $-\text{CH}_2-$ em $1417,55$ das estruturas piranosídicas evidenciado. As bandas $1651,92 \text{ cm}^{-1}$ e $1580,63 \text{ cm}^{-1}$ correspondem a vibrações de alongamento classificados como amida I (C-H) e amida II (N-H), as variações pertinentes a esses grupos funcionais presentes na constituição da superfície da quitosana Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

determinam a realização de interações com outras moléculas (MUKHOPADHYAY et al., 2013).

Figura 17: Espectros FTIR correspondente ao complexo polieletrólítico formado e o de cada constituinte: Quitosana, goma de cajueiro (GC), tripolifosfato de sódio (TPP).



Semelhantemente na goma de cajueiro foram detectados picos em $3317,98\text{ cm}^{-1}$ referentes a vibrações de alongamento de O-H e $2174,88\text{ cm}^{-1}$ ao alongamento de C-H. Característico desse biopolímero a banda em $1740,81$ de C=O indicativo do ácido glucurônico. Vibrações de O-H em comprimento de $1627,74\text{ cm}^{-1}$. Na faixa de $1143,59$ - $1036,92\text{ cm}^{-1}$ foram observados estiramento das vibrações de C-O-C devido as ligações glicosídicas (SILVA et al., 2006; SOARES et al., 2014). O TPP demonstrou bandas características em $1209,94\text{ cm}^{-1}$ que é atribuído a grupos =O. Apresentou picos intensos de absorção em $1136,43\text{ cm}^{-1}$ e $1095,45\text{ cm}^{-1}$ referentes a P=O e P-O-P, respectivamente (RODRIGUES et al., 2012).

Alterações nos espectros do complexo polieletrólítico foram observadas evidenciando as interações entre os materiais, como: em $3325,81\text{ cm}^{-1}$ na qual a banda tornou-se mais larga e se deslocou reduzindo o comprimento de onda, indicando um aumento das interações de hidrogênio (RAMPINO et al., 2013). Ausência da banda no comprimento de onda relacionando ao grupamento do ácido glucurônico da goma de cajueiro no complexo ($1740,81\text{ cm}^{-1}\text{ C=O}$), demonstrando que houve a interação eletrostática com a quitosana. Uma pequena mudança de direção na região amida I no espectro em $1651,92\text{ cm}^{-1}$ para $1604,01\text{ cm}^{-1}$, associado com a interação quitosana/TPP, comportamento semelhante foi observado nos trabalhos de Mukhopadhyay et al (2013), Vimal e colaboradores (2013) e Rampino et al (2013).

Também não foi observada a banda da amida II da quitosana, apontando a total interação dos grupamentos N-H, seja com a goma ou TPP. Outro ponto que caracteriza é a redução do pico em $1127,63\text{ cm}^{-1}$ indica a interação eletrostática entre o grupo fosfato carregado negativamente na molécula do TPP e o grupo amina carregado positivamente da quitosana, fato evidenciando também no trabalho realizado por Li e Huang (2012). Com isso, torna-se clara as interações existentes entre os grupamentos de cada constituinte da nanoesfera, que podem ser por interações eletrostática, ligações de hidrogênio, interações iônicas, favorecendo a formação do nano complexo.

5.2.7.2 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nanoesferas formadas a partir da complexação polieletrólítica dos polímeros com agente de reticulação, seguida de liofilização sem a adição de agente crioprotetor, apresentou superfície lisa, com formas esféricas, comprovando a formação das nanoesferas, (Figura 18), entretanto, evidenciou-se a presença de artefatos em diversos formatos (poliedros, cristalino, dispersões termodinamicamente instáveis) (Figura 19), característico de dispersões constituídas por TPP.

Corroborando para tal afirmativa o processo de liofilização gera algumas agregações de partículas, levando a formação de aglomerados grandes, analisado nas imagem destacadas no trabalho realizados por Gan e colaboradores (2005) que sintetizou nanopartículas de quitosana/TPP e pode evidenciar a presença de estruturas de variadas formas, ratificando tais evidências Abreu e colaboradores nas formulações de nanogels a partir da geleificação

ionotrópica entre a goma de cajueiro e quitosana pode observar a formação artefatos de agregados após processos de liofilização da preparação.

Figura 18: Morfologia das nanoesferas formadas, artefatos e agregados, numa formulação sem adição de crioprotetor, observadas por microscopia eletrônica de varredura.

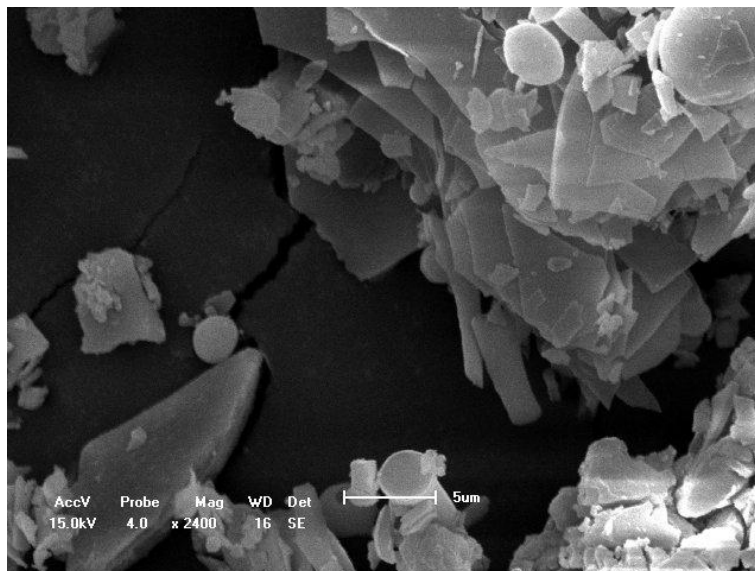
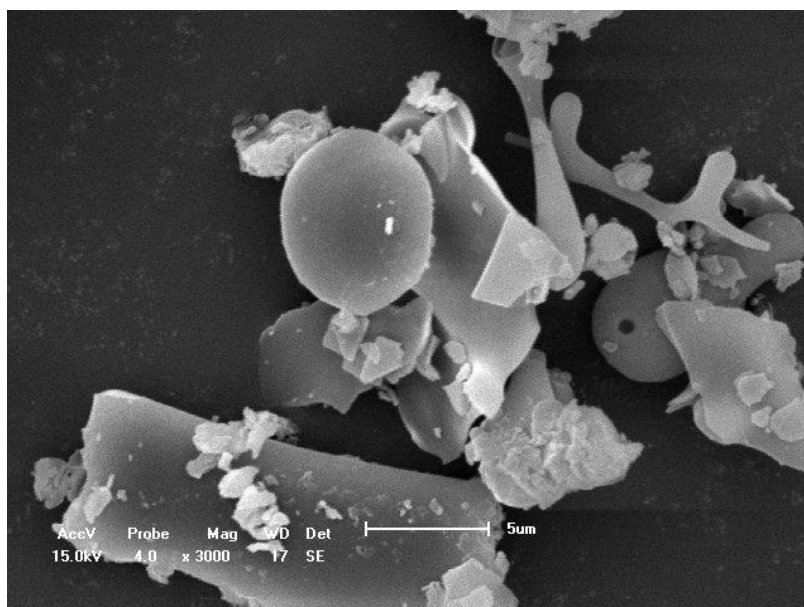


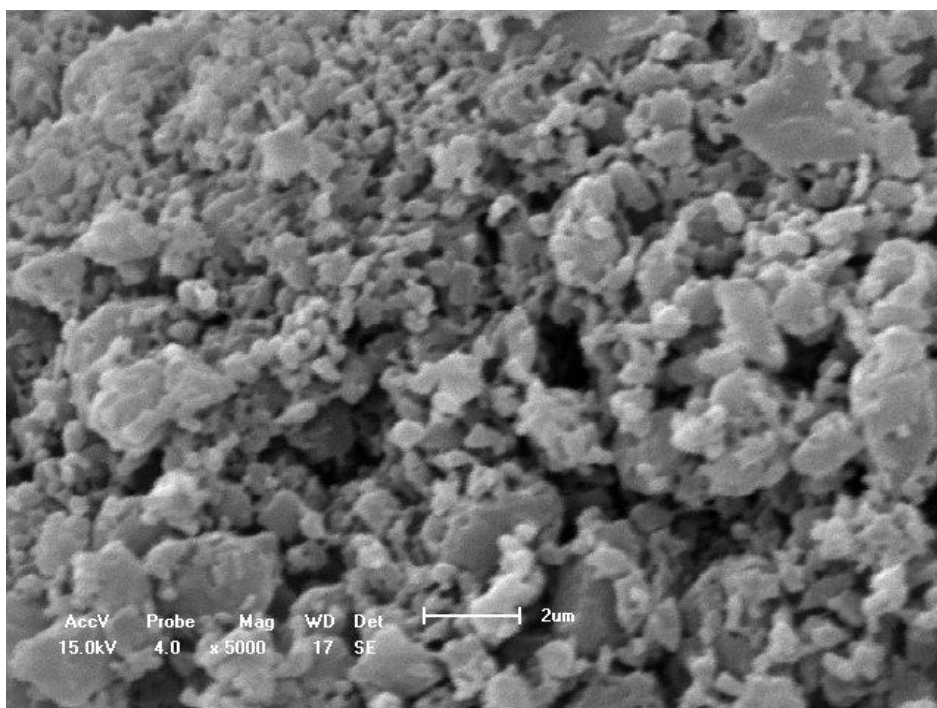
Figura 19: Morfologia do complexo polieletrólítico sem adição de crioprotetor visualizado por microscópio eletrônico de varredura (MEV).



Seguindo a mesma proporção de constituintes para produção das nanoesferas do caso anterior, porém com a adição de crioprotetor antes do processo de liofilização não foi evidenciada a eficiência no processo ao ponto de observar a formação das nanoesferas com

qualidade na sua formação (Figura 20), demonstrando ter influência negativa do manitol a 1% como agente crioprotetor, gerando um grande agregado de partículas, não sendo mostrado nanoesferas isoladamente ou se agregados intensos.

Figura 20: Imagem do agregado formado do complexo polieletrólítico com a adição de crioprotetor (Manitol 1%).



No trabalho realizado por Diop e colaboradores (2015) opostamente ao presente trabalho, pode ser observada a morfologia das nanopartículas em formado esférico, em seu estudo foi realizada uma análise para verificar a influência no tamanho, carga superficial e pdi de nanopartículas sintetizadas a partir de quitosana e TPP, porém passando pelo processo de liofilização com e sem crioprotetor (manitol).

A interação manitol e o processo de liofilização nos complexos polieletrólíticos tendem a forma agregados em quantidade superior as nanoesferas sem crioproteção, demonstrando que o uso de manitol como crioprotetor nesse caso não foi eficiente e pode ser notado que sem sua presença foi mantida a conservação maior das nanoesferas obtidas.

5.2.7.3 Análise termogravimétrica (TGA)

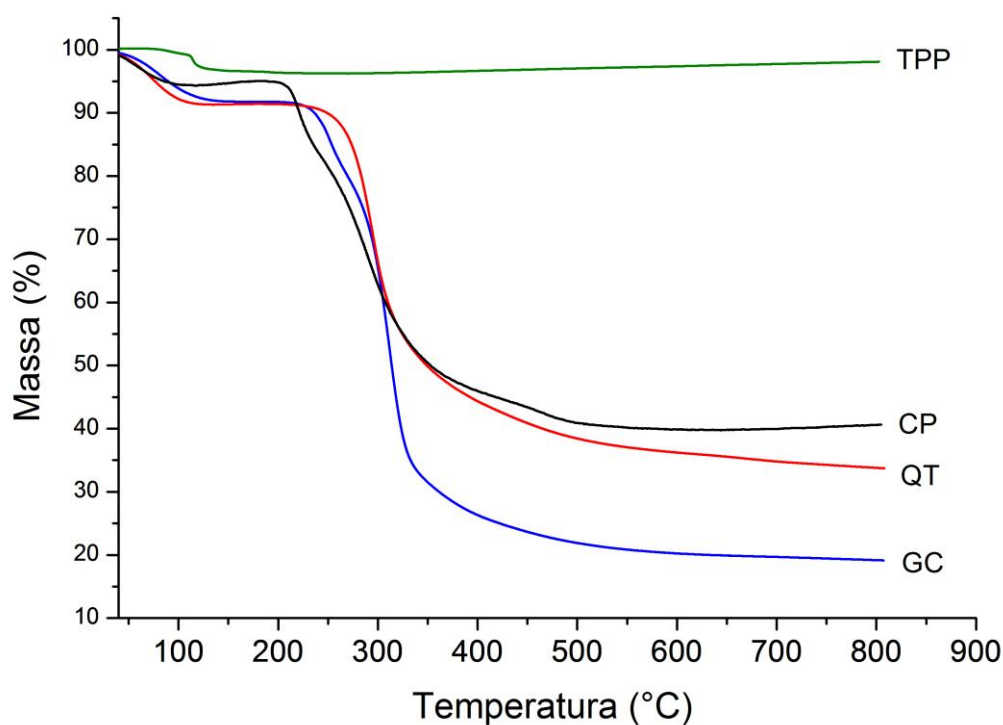
As interações entre a água e polissacarídeos são complexas e podem ser analisadas com a finalidade de demonstrar o quão estáveis são os constituintes isolados ou em formulação final diante de variadas faixas de temperatura, de modo a observar o quanto

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

percentualmente foi gerada uma perda progressiva de massa com a elevação de temperatura (ZOHUNAAN; SHOKROLAHI, 2004; OLIVEIRA et al., 2014)

As curvas termogravimétricas do complexo polieletrólítico, goma de cajueiro, quitosana e agente de reticulação podem ser observados na figura 21. O principal efeito de perda de água inicia-se acima de 100°C para o TPP e como evidenciado no trabalho de Hashad e colaboradores (2016) o agente não apresenta transições térmicas específicas, estável ao aumento gradativo de temperatura, não se decompõe acentuadamente diante de altas temperaturas.

Figura 21: Curva de TGA demonstrado os eventos observados no complexo polieletrólítico (CP), Goma de cajueiro (GC), Tripolifosfato de sódio (TPP) e a quitosana (QT).



Para os biopolímeros e complexo polieletrólítico o primeiro evento de perda de massa (30 – 200°C) é menor e é atribuído a dessorção de humidade referente a água (MARCIEL ET AL, 2005) por ligações de hidrogênio a estrutura do polissacarídeo, os principais eventos de decomposição em polissacarídeos começa acima de 200°C, característica não só comum aos polímeros do presente trabalho, como para outros biopolímeros: goma arábica, goma guar,

goma de tragacanto (ZOHUNAAN; SHOKROLAHI, 2004; SILVA ET AL, 2010; OLIVEIRA ET AL, 2014)

Para a goma de cajueiro a decomposição ocorreu em dois eventos, o primeiro representa a perda de água de humidade, já o segundo é referente a despolimerização por formação de água, CO, CH₂ numa faixa acima de 231 -237°C, o mesmo foi observado no estudo de Silva e colaboradores (2010) a fase de decomposição oxidativa. Diferentemente no trabalho de Silva et al (2006b) foi evidenciada a ocorrência da decomposição da goma em três etapas, sendo sugerido ser pela diferença nas taxas de aquecimento utilizadas nos demais trabalhos.

Na amostra do complexo polieletrólítico (CP) três eventos foram evidenciados, sendo notável como demonstrado na figura 21 que a temperatura de decomposição inicial é menor em relação as dos biopolímeros, indicando que a amostra do CP é termicamente menos estável, o mesmo evento foi evidenciado no trabalho de Marciel e colaboradores (2005) que observou a mesma redução de temperatura de complexos obtidos a partir da goma de caju carboximetilada e quitosana.

A ocorrência da terceira etapa pode ser atribuída pelo uso de um agente de reticulação na síntese da nanopartícula que se decompôs numa faixa média de 431°C, entretanto numa menor porcentagem de perda de massa em relação aos biopolímeros isolados. Silva e colaboradores (2006) destacou também que complexos obtidos por reticulação apresentam menor estabilidade térmica comparando aos polímeros isolados e Paula e colaboradores (2011) destacou que produtos reticulados resultantes da reação de glutaraldeído para formação de complexos apresentou-se mais susceptível de ocorrer em faixas médias de próximas de 504°C.

CONCLUSÃO

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

6. Conclusão

✓ A otimização método analítico para determinação da insulina e de seu produto de degradação (A-21) demonstrou ser simples, sensível e rápido, com um tempo de retenção de 5,81 min para insulina e 9,10 para o A-21 um tempo de execução total da análise de cerca de 10 minutos. Destacando a melhor condição quando a temperatura de coluna estiver 35°C, fluxo do eluente 1 mL.min⁻¹ e proporção do tampão de 52% fosfato de potássio dibásico anidro (KH₂PO₄), 31% acetonitrila e 17% metanol na obtenção do menor tempo de retenção da insulina e A-21. E por meio das inferências estatísticas foi evidente que o emprego do planejamento experimental adicionou ao trabalho observar um sistema mais eficiente quando em determinados níveis, condizendo em relação ao que foi realizado experimentalmente. Pontos em conjunto que corroboraram para a otimizando do método para a análises de rotina da molécula de insulina o A-21 em formulações.

✓ As nanoesferas de GC/TPP/QT foram obtidas com êxito através de uma metodologia simples, rápida e sem a utilização de solventes orgânicos ou tóxicos. As nanopartículas foram sintetizados na proporções 10/08/06 de(GC/TPP/QT). A adição do TPP foi de grande importância para obtenção das características físicas perto do ideal para as nanoesferas. A confirmação da interação entre biopolímeros e o agente de reticulação foi verificada e confirmada pelas análises de tamanho, pdi, potencial zeta, FTIR, MEV e TG.

✓ As características e propriedades físicas apresentadas pelas nanoesferas formadas por interações eletrostáticas, iônicas, ligações de hidrogênio através da mistura GC/TPP/QT, resultaram na formação de um complexo promissor para entrega de drogas, atuando de tal forma a direcionar a molécula a seu local de ação ou como proteção aos ambientes ácidos e básicos dos meio gastrointestinal, além dos materiais utilizados para sua síntese não causarem dano ao organismo, devido as característica de biocompatibilidade, biodegradabilidade e não tóxicos, pontos de grande importância nas formulações atuais que visam eficiência de administração e segurança do paciente.

PERSPECTIVAS

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

7 PERSPECTIVAS

- Validação do método analítico otimizado para quantificação de insulina e A-21;
- Realizar estudos de estabilidade para as nanopartículas;
- Realizar o encapsulamento da molécula da insulina a partir das nanopartículas desenvolvidas e avaliar sua eficiência de encapsulação por CLAE – DAD;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. S. et al. Chitosan / cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1277–1282, 2012.

ABU HESHMEH, N.; SALLAM, A.; MATER, Y.; ALAWI, M. A new method for determination of human insulin in aqueous injections. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, vol. 4, no. 2, pp. 428–435, 2013.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery B. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5–28, 2004.

AGRAWAL, U. et al. Is nanotechnology a boon for oral drug delivery? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 10, p. 1530–1546, 2014.

AKL, M. A. et al. Factorial design formulation optimization and in vitro characterization of curcumin-loaded PLGA nanoparticles for colon delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 10–20, 2016.

ALAI, M. S.; LIN, W. J.; PINGALE, S. S. Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 351–358, 2014.

ANDERSEN, L.; DINESEN, B.; JORGENSEN, P. N.; POULSEN, F.; RODER, M. E. Enzyme immunoassay for intact human insulin in sérum or plasma, **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 578–582, 1993.

ANDREANI, T. et al. Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1-2, p. 627–635, 2014.

ARCELLONI, C.; L. FALQUI, L.; MARTINENGHI, S.; PONTIROLI, A. E.; PARONI, R. Capillary electrophoresis for simultaneous quantification of human pro-insulin, insulin and intermediate forms. **Electrophoresis**, v. 19, n. 8-9, p. 1475–1477, 1998.

BANERJEE, T.; MITRA, S.; KUMAR, A. Preparation , characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics** v. 243, p. 93–105, 2002.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 463–469, 2012.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**, v. 12, n. 7, p. 620–636, 2011.

CALADO, V; MONTGOMERY, D. C. Planejamento experimentos utilizando o Statistica. Rio de Janeiro. p. 260. 2003.

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

CAROL H, C.; GILBERTO L, B.; PIERINA S, B. Fundamentos de CROMATOGRAFIA. Editora Un ed.Campinas, São Paulo: [s.n.].

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação. Ed. UFSCar. Universidade Federal de São Carlos, Série apontamentos, São Paulo: 2001

CAVALLARO, G. et al. PHEA-PLA biocompatible nanoparticles by technique of solvent evaporation from multiple emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 2, p. 719–727, 2015.

CENTEMERO, M. P.; CHEROBIN, J. C.; CONTI, K. V. F.; OHE, L. N.; MALLMANN, N.; ABIZAID, A.; FARKOUH, M. E.; FUSTER, V. Doença arterial coronária e diabetes: do tratamento farmacológico aos procedimentos de revascularização. **Revista brasileira de cardiologia invasiva**, vol. 17, n o 3, p. 398-413, 2009.

CERCHIARA, T. et al. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Chitosan based micro- and nanoparticles for colon-targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS**, v. 92, p. 112–119, 2015.

COOPER, C. L. et al. Polyelectrolyte-protein complexes. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 1-2, p. 52–78, 2005.

CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, M. J. Ionically crosslinked chitosan / tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics** v. 382, p. 205–214, 2009.

DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DAWUD, E. R.; SHAKYA, A. K. HPLC-PDA analysis of ACE-inhibitors , hydrochlorothiazide and indapamide utilizing design of experiments. **Arabian journal of chemistry**, 2014.

DE ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. D. C.; DE ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise- Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida DE alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476–2481, 2009.

DELAIR, T. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 1, p. 10–18, 2011.

DIAO, J. et al. PEG-PLA nanoparticles facilitate siRNA knockdown in adult zebrafish heart. **Developmental Biology**, v. 406, n. 2, p. 196–202, 2015.

DIAS, S. F. L. et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 254–261, 2016.

DIOP, M. et al. Design , characterisation , and bioefficiency of insulin – chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1-2, p. 402–408, 2015.

DOUBLIER, J. L. et al. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5, n. 3-4, p. 202–214, 2000.

ELSABEE, M. Z.; ABDOL, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 1819–1841, 2013.

FAN, W. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Formation mechanism of monodisperse , low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21–27, 2012.

FONTE, P. et al. Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery : Revisited approaches. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1342–1354, 2015.

FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 225, p. 75–86, 2016.

GAN, Q. et al. Modulation of surface charge , particle size and morphological properties of chitosan – TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 44, p. 65–73, 2005.

GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 496–504, 2012.

GLIKO-KABIR, I. et al. Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery I . Preparation and physicochemical characterization. **Journal of Controlled Release**. v. 63, p. 121–127, 2000.

GOWTHAMARAJAN, K. et al. Preliminary study of Anacardium occidentale gum as binder in formulation of paracetamol tablets. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 506–511, 2011.

GUCHT, J. VAN DER et al. Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 2, p. 407–422, 2011.

HAGGAG, Y. et al. Preparation and in vivo evaluation of insulin-loaded biodegradable nanoparticles prepared from diblock copolymers of PLGA and PEG. **International journal of pharmaceutics**, v. 499, n. 1-2, p. 236–246, 2015.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RA, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. v. 60, p. 1638–1649, 2008.

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.

- HASHAD, R. A et al. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: Optimization of formulation parameters for improving process yield at a novel pH using artificial neural networks. **International journal of biological macromolecules**, v. 86, p. 50–58, 2016.
- HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, v. 16, n. 7-8, p. 262–271, 2013.
- HYUNG, J. et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 28–41, 2010.
- HVASS, A.; SKELBAEK-PEDERSEN, B. Determination of protamine peptides in insulin drug products using reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 3, p. 551–557, 2005.
- JI, Y.-B. et al. Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography. A**, v. 1066, n. 1-2, p. 97–104, 2005.
- KATAS, H.; ALPAR, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 115, p. 216–225, 2006.
- KIZILAY, E.; KAYITMAZER, A. B.; DUBIN, P. L. Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, n. 1-2, p. 24–37, 2011.
- KREUTER, J. Nanoparticles-a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 1–10, 2007.
- KUMAR, L. et al. Full factorial design for optimization, development and validation of HPLC method to determine valsartan in nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, p. 1–7, 2015.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.
- KUNKEL, A. et al. Quantitation of insulin by capillary electrophoresis and high- performance liquid chromatography Method comparison and validation 1. **Reproduction**, v. 781, p. 445–455, 1997.
- LAUTERBACH, A.; MILLER-GOYMANN, C. C. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 152–163, 2015.
- LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 259–269, 2007.

LI, J.; HUANG, Q. Rheological properties of chitosan – tripolyphosphate complexes: From suspensions to microgels. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, p. 1670–1677, 2012.

LI, X. et al. Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 1, p. 1–6, 2009.

LIU, J.; WILLFO, S.; XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides : Biological activities , functionalization , and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 31–61, 2015.

LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008.

LOPES, M. A. et al. Probing insulin bioactivity in oral nanoparticles produced by ultrasonication-assisted emulsification/internal gelation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. SEPTEMBER, p. 5865–5880, 2015.

LÓPEZ-LEÓN, T. et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 283, p. 344–351, 2005.

LUO, Y.; WANG, Q. International Journal of Biological Macromolecules Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 353–367, 2014.

MACIEL, J. S. et al. Chitosan / carboxymethyl cashew gum polyelectrolyte complexes: synthesis and thermal stability. **European polymer** v. 41, p. 2726–2733, 2005.

MALIK, R.; ROY, I. Probing the mechanism of insulin aggregation during agitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 73–80, 2011.

MARTINS, A. F. et al. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1127–1133, 2012.

MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 569–578, 2015.

MI, F. et al. Synthesis and characterization of biodegradable TPP / genipin co- crosslinked chitosan gel beads. v. 44, p. 6521–6530, 2003.

MIN, C. K. et al. Insulin related compounds and identification. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 908, p. 105–112, 2012.

MOGOŞANU, G. D. et al. Polymeric protective agents for nanoparticles in drug delivery and targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 2015, 2016.

MOHAMMAD, J. A. et al. Development and validation of simple and rapid high performance liquid chromatographic method for routine analysis of human insulin in formulations. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 40, p. 1018–1024, 2014.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113–142, 2010.

MORALES, J. O. et al. Films loaded with insulin-coated nanoparticles (ICNP) as potential platforms for peptide buccal delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 38–45, 2014.

MORRIS, G. A. et al. The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) – chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1430–1434, 2011.

MUKHOPADHYAY, P.; SARKAR, K.; CHAKRABORTY, M. Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, n. 1, p. 376–382, 2013.

MUKHOPADHYAY, P. et al. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 11, p. 1457–1475, 2013.

MUKHOPADHYAY, P. et al. PH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 640–648, 2015.

MOSLEMI, P.; NAJAFABADI, A. R.; TAJERZADEH, H. A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 1, p. 45–51, 2003.

NAJJAR, A. et al. A Rapid , Isocratic HPLC Method for Determination of Insulin and Its Degradation Product. **Advances in Pharmaceutics**. v. 2014.

NAKAZAWA, S. et al. Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 420, n. 1, p. 61–67, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principios da Bioquímica 3ª Edição, 2002.

NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Bookman ed.Porto Alegre: [s.n.].

OHNISHI, N. et al. Characterization of insulin-loaded liposome using column-switching HPLC. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, n. 2, p. 302–305, 2015.

- OLIVA, A; FARIÑA, J.; LLABRÉS, M. Development of two high-performance liquid chromatographic methods for the analysis and characterization of insulin and its degradation products in pharmaceutical preparations. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 749, p. 25–34, 2000.
- OLIVEIRA, W. T. P. DE; MOURA, R. C. R. DE. Insulina uma abordagem terapêutica, biotecnológica e sanitária. p. 20, 2006.
- OLIVEIRA, L. A. et al. Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol – cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 766, n. 2001, p. 27–36, 2002.
- PALACIO, J.; AGUDELO, N. A; LOPEZ, B. L. PEGylation of PLA nanoparticles to improve mucus-penetration and colloidal stability for oral delivery systems. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 11, p. 14–19, 2016.
- PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. **Tuberculosis**, v. 85, n. 5-6, p. 415–420, 2005.
- PANDEY, S. K. et al. Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 521–529, 2015.
- PAULA, H. C. B. et al. Preparation and characterization of chitosan / cashew gum beads loaded with Lippia sidoides essential oil. **Materials Science & Engineering C**, v. 31, n. 2, p. 173–178, 2011.
- PAULA, H. C. B. et al. Alginate / cashew gum floating bead as a matrix for larvicide release. **Materials Science & Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1421–1427, 2012.
- PAULA, H. C. B.; GOMES, F. J. S.; PAULA, R. C. M. DE. Swelling studies of chitosan / cashew nut gum physical gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 313–318, 2002.
- PHILIPP, B. et al. Polyelectrolyte complexes — recent developments and open problems. **Progress in Polymer Science**, v. 14, n. 1, p. 91–172, 1989.
- PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. B. Calibração: Uma Revisão Para Químicos Analíticos. **Química Nova**, 1996.
- PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.
- PITOMBEIRA, N. A O. et al. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610–615, 2015.

PRAJAPATI, V. D. et al. Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1685–1699, 2013.

RAFAMANTANANA, M. H. et al. Application of design of experiments and design space methodology for the HPLC-UV separation optimization of aporphine alkaloids from leaves of *Spirospermum penduliflorum* Thouars. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 62, p. 23–32, 2012.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles : Preparation , size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1-2, p. 219–228, 2013.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RAO, M. A. Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending. **Food Hydrocolloids**. v. 13, p. 501–506, 1999.

REIS, C. P. Novel therapeutic strategies for oral administration of insulin. n. 5, p. 174–205, [s.d.].

RIBEIRO, A. J. et al. **Gums' based delivery systems: review on cashew gum and its derivatives**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2016.

RITA, M. et al. Diabetes gene therapy by means of nanoparticles Terapia gênica do diabetes por meio de nanopartículas. **Gene Therapy Progress and Prospects**. p. 100–112, 2014.

RODRIGUES, S.; ROSA, A. M.; GRENHA, A. Chitosan / carrageenan nanoparticles : Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 282–289, 2012.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014.

SÆTHER, H. V. et al. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 813–821, 2008.

SARMENTO, B. et al. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 9, p. 898–903, 2006.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 1, p. 4–14, 2010.

SHAH, B. R. et al. Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 369–377, 2016.

SHUKLA, R. K.; TIWARI, A. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 399–416, 2012.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D. Administração oral de peptídios e proteínas: III . Aplicação à insulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 39, 2003.

SILVA, D. A. et al. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers** v. 58, p. 163–171, 2004.

SILVA, D. A. et al. Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. **Carbohydrate Polymers**. v. 66, p. 16–26, 2006.

SINHA, V. R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1–33, 2004.

SOARES, P. A. G. et al. Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Policaçu and chitosan. **Materials Science & Engineering C**, v. 42, p. 219–226, 2014.

SONG, W. et al. Stable loading and delivery of disulfiram with mPEG-PLGA/PCL mixed nanoparticles for tumor therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, p. 1–10, 2015.

TAKEUCHI, H.; TAHARA, K.; ONODERA, R. Recent advances in particulate drug delivery systems: Oral, pulmonary, and ophthalmic administrations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 3–4, 2016.

TAN, C. et al. Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 236–245, 2016.

TANG, E. S. K.; HUANG, M.; LIM, L. Y. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces A**. v. 265, n. April, p. 103–114, 2003.

THU, H. P. et al. In vitro and in vivo targeting effect of folate decorated paclitaxel loaded PLA-TPGS nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 6, p. 683–688, 2015.

TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, n. 4-5, p. 166–178, 2007.

VICENTINI, F. C. et al. Factorial design and response surface: voltammetric method optimization for the determination of Ag(I) employing a carbon nanotubes paste electrode. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 825–830, 2011.

VIMAL, S. et al. Synthesis and characterization of CS / TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish. **Aquaculture**, v. 358-359, p. 14–22, 2012.

VIMAL, S. et al. Acta Tropica Chitosan tripolyphosphate (CS / TPP) nanoparticles: Preparation , characterization and application for gene delivery in shrimp. **Acta Tropica**, v. 128, n. 3, p. 486–493, 2013.

VOLOD, A V et al. International Journal of Biological Macromolecules Influence of structural features of carrageenan on the formation of polyelectrolyte complexes with chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 434–441, 2016.

WOITISKI, C. B. et al. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 25–33, 2009.

WOITISKI, C. B. et al. Colloidal carrier integrating biomaterials for oral insulin delivery: Influence of component formulation on physicochemical and biological parameters. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2475–2484, 2009.

WOITISKI, C. B. et al. Pharmacological effect of orally delivered insulin facilitated by multilayered stable nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3-4, p. 556–563, 2010.

XIE, R.-F. et al. Optimization of high pressure machine decocting process for Dachengqi Tang using HPLC fingerprints combined with the Box-Behnken experimental design. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 110–119, 2015.

XU, X. et al. Quantitative determination of insulin entrapment efficiency in triblock copolymeric nanoparticles by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 266–273, 2006.

YANG, J. et al. Preparation and application of micro / nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 53–66, 2015.

YIP, C. M. et al. Structural studies of a crystalline insulin analog complex with protamine by atomic force microscopy. **Biophysical journal**, v. 78, n. 1, p. 466–473, 2000.

YOMOTA, C. et al. Separation of B-3 monodesamidoinsulin from human insulin by high-performance liquid chromatography under alkaline conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 1, p. 89–96, 1996.

ZAKARIA, M. B.; RAHMAN, Z. A. Rheological properties of cashew. **Carbohydrate Polymers**. v. 29, n. 1, p. 25–27, 1996.

ZHANG, H. et al. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 60, p. 560–568, 2016.

ZHANG, P. et al. Goblet cell targeting nanoparticle containing drug-loaded micelle cores for oral delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 993–1005, 2015.

ZHOU, Y. et al. Human insulin and desamido human insulin isotherms in ethanol-water reversed phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1061, n. 2, p. 141–148, 2004.

ZHU, D. et al. Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. **Acta Biomaterialia**, v. 30, p. 144–154, 2015.

APÊNDICE

Bezerra, J.M.N.A. Avaliação de aspectos analíticos e tecnológicos para obtenção de sistemas nanoestruturados poliméricos para administração oral de insulina.



Boletim
Informativo
Geum
Informative Geum Bulletin

Boletim Informativo Geum, v. 5, n. 2, p. 100-112, abr./jun., 2014
ISSN 2237-7387 (Impresso)

Diabetes gene therapy by means of nanoparticles

Terapia gênica do diabetes por meio de nanopartículas

Maria Rita Campante Moreira Prina^{*1}; Janira Maria Alves², José Lamartine Soares Sobrinho², Antonio José Ribeiro¹

¹*College of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.*

²*Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, Pernambuco Brasil.*

* Correspondência:
E-mail: aribeiro@ff.uc.pt

RESUMO

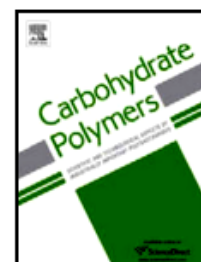
O desenvolvimento tecnológico anda de mãos dadas com uma necessidade crescente de melhores soluções terapêuticas. Quando aplicado a diabetes mellitus (DM), terapia gênica oferece uma alternativa mais promissora para o que diz respeito ao controlo dos sintomas, ou mesmo a cura desta doença metabólica. Têm sido feitos esforços no sentido de encontrar a melhor maneira de aplicar a terapia genética para DM. Ele pode ser aplicado para melhorar os resultados de transplante de ilhéus, a administração do gene da insulina em um nível gastrointestinal ou mesmo através de silenciamento de genes como maneira de manter os níveis sanguíneos de glicose perfeitos. Apesar do potencial terapêutico da terapia gênica, para a sua aplicação vários fatores devem ser considerados. Sistemas de distribuição constituem um desses fatores sendo decisivo para a eficácia da terapia genética. Vetores não virais têm grande importância neste domínio devido à sua essencial características *in vivo*, tais como baixa imunogenicidade e conseqüente segurança. Nanopartículas à base de quitosano têm sido utilizados como vetores não virais e estudados para aplicação em terapia gênica no diabetes tipo 2 de tipo 1.

Palavras-chave: diabetes mellitus; gene terapia; vetores não viral; nanopartícula

Accepted Manuscript

Title: Gums' based delivery systems: review on cashew gum and its derivatives

Author: Antônio J. Ribeiro Flávia R. Lucena de Souza Janira M.N.A. Bezerra Claudia Oliveira Daniela Novotny Monica Fde La Roca Soares Lívio C.C. Nunes Edson C. Silva-Filho Francisco Veiga José L. Soares Sobrinho



PII: S0144-8617(16)30107-2
 DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.042>
 Reference: CARP 10797

To appear in:

Received date: 9-11-2015
 Revised date: 6-2-2016
 Accepted date: 14-2-2016

Please cite this article as: Ribeiro, Antônio J., de Souza, Flávia R Lucena., Bezerra, Janira MNA., Oliveira, Claudia., Novotny, Daniela., Soares, Monica Fde La Roca., Nunes, Lívio CC., Silva-Filho, Edson C., Veiga, Francisco., & Soares Sobrinho, José L., Gums' based delivery systems: review on cashew gum and its derivatives. *Carbohydrate Polymers* <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.042>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.