



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELIADNA DE LEMOS VASCONCELOS SILVA

**SISTEMA DE LIBERAÇÃO NANOESTRUTURADO PARA ADMINISTRAÇÃO
ORAL DE INSULINA**

Recife
2019

ELIADNA DE LEMOS VASCONCELOS SILVA

**SISTEMA DE LIBERAÇÃO NANOESTRUTURADO PARA ADMINISTRAÇÃO
ORAL DE INSULINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produção e controle de medicamentos.

Orientador: Prof^o. Dr. Almir Gonçalves Wanderley.

Coorientador: Prof^o. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho.

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

S586s Silva, Eliadna de Lemos Vasconcelos.
Sistema de liberação nanoestruturado para administração oral de insulina / Eliadna de Lemos Vasconcelos Silva. – 2019.
112 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Insulina. 2. Nanopartículas. 3. Toxicidade. 4. Goma de cajueiro acetilada. 5. Via oral. I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-161)

ELIADNA DE LEMOS VASCONCELOS SILVA

**SISTEMA DE LIBERAÇÃO NANOESTRUTURADO PARA ADMINISTRAÇÃO
ORAL DE INSULINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 21/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Durcilene Alves da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Piauí

Profº. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal do Piauí

Profº. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profº. Dr. Lívio César Cunha Nunes (Examinador Externo)
Universidade Federal do Piauí

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem o qual nada seria possível, pela presença constante em minha vida e por me capacitar a alcançar meus objetivos.

A toda a minha família, aos meus pais José Eraldo e Laudicéia de Lemos e aos meus irmãos Elidiane, Elidiel e Elielton, por toda ajuda e compreensão. Amo vocês.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley, pela confiança, orientação e oportunidade de desenvolver mais um trabalho em conjunto, obrigada!

Ao Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho, por me receber em seu laboratório, pela confiança e pela orientação neste trabalho. Obrigada!

A Prof^a. Dr^a. Monica Felts de La Roca Soares por toda ajuda, apoio e colaboração. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Francisco José de Baptista Veiga, pela colaboração na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo acolhimento, pela confiança e por me receber em seus laboratórios e ao Prof. Dr. José António Ribeiro pela colaboração, por todos os ensinamentos e pela indispensável orientação neste trabalho. Muito obrigada!

A toda a equipe do laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelo compartilhamento de conhecimentos e pelo convívio salutar durante o período de intercâmbio. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Edson Cavalcanti e a todos do laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV da Universidade Federal do Piauí, pela colaboração neste trabalho. Muito obrigada!

Aos professores: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva-Neto e Prof. Dr. Fernando Hallwass pelas colaborações no trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves e alunos Caio Cezar e Caroline Soares do laboratório de cultura de células da Universidade Federal de Pernambuco pela parceria no trabalho.

A todos os colegas do laboratório do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos – NCQMC da UFPE por toda ajuda e convivência salutar, em especial a Antônia Carla de Jesus Oliveira e Yuri Basílio Gomes Patriota, pela parceria de trabalho, pela imensa ajuda e colaboração, pela convivência diária e pela amizade construída. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos da pós-graduação Lucas Danda, Raudiney, Cybelle, Kayque e Maxwelline por toda ajuda e troca de conhecimentos durante os experimentos, pela convivência salutar e amizade. Muito obrigada a todos!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE e funcionários em geral, em especial a Nerilin Trajano e Rilvan pelo excelente trabalho e atenção. Obrigada!

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo. E ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de intercâmbio na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra em Portugal.

RESUMO

A insulina administrada pela via subcutânea tem sido o tratamento para milhões de diabéticos no mundo. No entanto, tal tipo de tratamento além de ser invasivo e causar desconforto ao paciente pela necessidade de várias injeções diárias, não mimetiza a ação da insulina fisiológica devido à má distribuição no organismo, podendo causar efeitos colaterais como hiperinsulinemia periférica, lipoatrofia e lipodistrofia. Dentre as vias alternativas para a administração de insulina, a via oral seria a mais confortável e fisiológica para o diabético, após absorção gastrointestinal, a insulina passaria pelo efeito da primeira passagem hepática, desencadeando uma distribuição mais homogênea, mimetizando os efeitos endógenos. Entretanto, a biodisponibilidade oral da insulina é baixa, principalmente devido à alta atividade proteolítica e redução da permeabilidade do trato gastrointestinal. Como abordagem promissora para a terapia de insulina por via oral, encontram-se os sistemas nanoestruturados que incorporam a insulina em nanopartículas biocompatíveis à base de polímeros que protegem e promovem a absorção. A goma de cajueiro é um biopolímero que apresenta estrutura química favorável para modificações, o que leva a sistemas coloidais mais estáveis e resistentes. A goma foi submetida a uma nova reação de acetilação utilizando uma metodologia rápida, simples, isenta de solventes e de baixo custo. O derivado foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN ^1H), análise elementar, coeficiente de solubilidade e potencial zeta. O biopolímero modificado foi utilizado para a preparação de um sistema de liberação nanoestruturado para administração de insulina por via oral. As nanopartículas (NPs) foram desenvolvidas através da técnica de complexação polieletrólítica e foram caracterizadas por tamanho, carga superficial, eficiência de incorporação e perfil de liberação gastrointestinal. As NPs apresentaram tamanho de 460 nm com eficiência de incorporação de insulina de 52,5% e potencial zeta de +30,6 mV sugerindo estabilização eletrostática. A liberação sustentada de insulina foi observada por até 24 horas. O ensaio de citotoxicidade demonstrou que a goma de cajueiro acetilada (GCA) e as nanopartículas não apresentaram efeito significativo sobre a viabilidade celular, verificando sua biocompatibilidade. As NPs (50 UI/kg) administradas por via oral a ratos diabéticos reduziu a glicemia em 51% dos níveis basais após 12 horas de administração. O tratamento com as NPs com e sem insulina, durante 15 dias,

não produziu sinais significativos de toxicidade ou mortes, o consumo de água e ração não foi alterado e a variação de massa corporal não foi afetada durante o tratamento. Os perfis bioquímico e hematológico não foram clinicamente modificados e estão dentro dos limites de referência para a espécie. As massas absolutas e relativas dos órgãos analisados, bem como a morfologia macroscópica e microscópica dos mesmos, não indicaram sinais de toxicidade. Os resultados mostraram que o sistema nanoestruturado à base de (GCA) apresentou-se como potencial veículo para liberação sustentada de insulina por via oral.

Palavras-chave: Insulina. Nanopartículas. Toxicidade. Goma de cajueiro acetilada. Via oral.

ABSTRACT

Insulin administered subcutaneously has been the treatment for millions of diabetics in the world. However, this type of treatment, besides being invasive and causing discomfort to the patient due to the need for several daily injections, does not mimic the action of the physiological insulin due to the maldistribution in the organism, and may cause side effects such as peripheral hyperinsulinemia, lipoatrophy and lipodystrophy. Among the alternative routes for insulin administration, the oral route would be the most comfortable and physiological for the diabetic, after gastrointestinal absorption, the insulin would undergo the effect of the first hepatic passage, triggering a more homogenous distribution, mimicking the endogenous effects. However, oral bioavailability of insulin is low, mainly due to high proteolytic activity and reduced permeability of the gastrointestinal tract. As a promising approach to oral insulin therapy are nanostructured systems that incorporate insulin into biocompatible polymer-based nanoparticles that protect and promote absorption. Cashew gum is a biopolymer that has a favorable chemical structure for modifications, which leads to more stable and resistant colloidal systems. The gum was subjected to a new acetylation reaction using a fast, simple, solvent-free and low cost methodology. The derivative was characterized by infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance (^1H NMR), elemental analysis, solubility coefficient and zeta potential. The modified biopolymer was used for the preparation of a nanostructured delivery system for oral insulin administration. The nanoparticles (NPs) were developed through the polyelectrolytic complexation technique and were characterized by size, surface charge, incorporation efficiency and gastrointestinal release profile. The NPs presented a size of 460 nm with efficiency of incorporation of insulin of 52.5% and zeta potential of +30.6 mV suggesting electrostatic stabilization. Sustained insulin release was observed for up to 24 hours. The cytotoxicity assay showed that acetylated cashew gum (ACG) and nanoparticles had no significant effect on cell viability, verifying their biocompatibility. NPs (50 IU / kg) administered orally to diabetic rats reduced blood glucose by 51% of baseline levels after 12 hours of administration. Treatment with NPs with and without insulin for 15 days did not produce significant signs of toxicity or death, water and feed intake was not altered and body mass variation was not affected during treatment. The biochemical and hematological profiles were not clinically modified and are within the

reference limits for the species. The absolute and relative masses of the organs analyzed, as well as the macroscopic and microscopic morphology of the same did not indicate signs of toxicity. The results showed that the nanostructured (GCA) system presented as a potential vehicle for sustained oral insulin release.

Keywords: Insulin. Nanoparticles. Toxicity. Acetylated cashew gum. Oral delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura da molécula pró-pré-insulina	24
Figura 2 –	Divisão das nanopartículas em nanocápsulas e nanoesferas.....	31
Figura 3 –	<i>Anacardium occidentale</i> L. e seu exsudato.....	36
Figura 4 –	Fragmento estrutural da goma de cajueiro.....	39
Figura 5 –	Estrutura química da quitosana.....	42
Figura 6 –	Exsudato extraído de cajueiro e goma de cajueiro após purificação.....	58
Figura 7 –	Goma de cajueiro acetilada.....	60
Figura 8 –	Esquema simplificado da reação de acetilação da GC.....	60
Figura 9 –	Espectros de FTIR para GC e GCA.....	61
Figura 10 –	Espectro de NMR ¹ H para GC e GCA.....	62
Figura 11 –	Esquema de preparação das nanopartículas de GCA.....	64
Figura 12 –	Distribuição do tamanho de partícula (determinada por DLS) de nanopartículas de GCA sem (A) e com insulina (B).....	66
Figura 13 –	Nanopartículas com insulina (A-C) e sem insulina (B-D) analisadas por MFA e NPGCA INS analisada por SEM (E).....	68
Figura 14 –	Perfil de liberação de insulina das nanopartículas <i>in vitro</i> em fluido gástrico simulado de pH 1,2 por 120 minutos seguido de meio intestinal em pH 6,8 a 37 °C (A) e mecanismo associado à liberação <i>in vitro</i> do fármaco de acordo com o modelo de Peppas-Sahlin(B).....	71
Figura 15 –	Ausência de efeito citotóxico da GCA sobre a linhagem HT-29 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT.....	72
Figura 16 –	Viabilidade celular de HT-29, CT: controle; INS: Insulina livre; NPGCA: nanopartículas de GCA sem insulina; NPGCA INS: nanopartículas de GCA com insulina.....	73

Figura 17 –	Glicemia após administração oral única de NPGCA com insulina (50 UI/kg) e sem insulina.....	75
Figura 18 –	Níveis de glicemia de ratos diabéticos recebendo NPGCA com insulina (50 UI/kg, v.o.); insulina não estruturada (4 UI/kg, s.c.) ou veículo.....	76
Figura 19 –	Efeito das nanopartículas de goma de cajueiro acetilada administradas por via oral sobre a variação de massa corporal (g) em ratos Wistar machos tratados durante 15 dias consecutivos. NPGCA: nanopartículas de GCA; NPGCA INS: nanopartículas de GCA com insulina.....	80
Figura 20 –	Efeito das nanopartículas de goma de cajueiro acetilada administradas por via oral sobre o consumo de água (A) e ração (B) em ratos Wistar machos tratados por via oral durante 15 dias consecutivos. NPGCA: nanopartículas de GCA; NPGCA INS: nanopartículas de GCA com insulina. Os valores representam as médias \pm e.p.m. (n = 6/grupo).....	82
Figura 21 –	Cortes histológicos dos fígados (HE, ampliação 10x) de ratos Wistar machos tratados oralmente por 15 dias. Controle sadio (A); Controle diabético (B), grupo tratado com nanopartículas de GCA sem insulina (B) e grupo tratado com nanopartículas de GCA com insulina 50 UI/kg (D).....	87
Figura 22 –	Cortes histológicos dos rins (HE, ampliação 10x) de ratos Wistar machos tratados oralmente por 15 dias. Controle sadio (A); Controle diabético (B), grupo tratado com nanopartículas de GCA sem insulina (B) e grupo tratado com nanopartículas de GCA com insulina 50 UI/kg (D).....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Pesos moleculares médios (M_n e M_w) e polidispersão (D) da goma de cajueiro.....	59
Tabela 2 –	Dados de análise elementar e solubilidade aquosa de GC e GCA.....	63
Tabela 3 –	Estabilidade coloidal de nanopartículas de GCA com insulina.....	67
Tabela 4 –	Dados do modelo cinético para avaliação da liberação de insulina das nanopartículas.....	70
Tabela 5 –	Efeito das nanopartículas de GCA administradas por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 15 dias consecutivos.....	83
Tabela 6 –	Efeito das nanopartículas administradas por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos tratados por 15 dias consecutivos.....	85
Tabela 7 –	Efeito das nanopartículas administradas por via oral sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de ratos Wistar tratados por 15 dias consecutivos.....	90

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	DIABETES <i>MELLITUS</i>	19
2.1.1	Modelo experimental do diabetes <i>mellitus</i> por uso de estreptozotocina	22
2.2	INSULINA	23
2.2.1	Desafios na administração de insulina por via oral.....	27
2.3	NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	28
2.3.1	Nanopartículas Poliméricas.....	29
2.3.2	Métodos de preparo de nanopartículas poliméricas.....	33
2.3.2.1	<i>Complexação Polieletrólítica</i>	33
2.3.3	Biopolímeros utilizados na preparação de nanopartículas	34
2.3.3.1	<i>Goma de cajueiro</i>	36
2.3.3.2	<i>Goma de cajueiro acetilada</i>	40
2.3.3.3	<i>Quitosana</i>	42
2.3.4	Nanotoxicologia	44
3	OBJETIVOS	46
3.1	Geral	46
3.2	Específicos.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	MATERIAL	48
4.2	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA GOMA DE CAJUEIRO POR CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO	48
4.3	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA GOMA DE CAJUEIRO ACETILADA	49
4.3.1	Caracterização por Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR).....	49
4.3.2	Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN ¹ H)	49

4.3.3	Análise Elementar	50
4.3.4	Determinação da solubilidade em água	50
4.4	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	50
4.4.1	Análise do tamanho das partículas e Índice de polidispersão (pdl)	51
4.4.2	Potencial Zeta	51
4.4.3	Análise morfológica	51
4.4.4	Eficiência de incorporação de insulina	52
4.4.5	Teste de liberação <i>in vitro</i>	52
4.4.6	Quantificação de insulina	53
4.5	CITOTOXICIDADE	53
4.6	ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SISTEMA <i>IN VIVO</i>	54
4.6.1	Animais	54
4.6.2	Indução do diabetes <i>mellitus</i>	54
4.6.3	Tratamento	55
4.7	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS <i>IN VIVO</i>	55
4.7.1	Parâmetros hematológicos	56
4.7.2	Parâmetros bioquímicos	56
4.7.3	Análise morfológica	56
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	OBTENÇÃO DA GOMA DE CAJUEIRO	58
5.2	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA GOMA DE CAJUEIRO POR CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO	59
5.3	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA GOMA DE CAJUEIRO ACETILADA	59
5.4	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	64
5.5	EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE INSULINA E ESTUDOS DE	68

	LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	
5.6	CITOTOXICIDADE	72
5.7	ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SISTEMA <i>IN VIVO</i>	74
5.8	AValiação TOXICOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS <i>IN VIVO</i>	78
5.8.1	Parâmetros Hematológicos	83
5.8.2	Parâmetros Bioquímicos	84
5.8.3	Análise morfológica.....	86
6	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: SOLVENT- FREE SYNTHESIS OF ACETYLATED CASHEW GUM FOR ORAL DELIVERY SYSTEM OF INSULIN	111
	ANEXO A – OFÍCIO COMITÊ DE ÉTICA	112

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica que requer rigoroso controle glicêmico para reduzir a sua progressão e as complicações. Atualmente estima-se que 425 milhões de pessoas no mundo sejam diabéticas podendo chegar a 629 milhões em 2015 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). O Brasil está entre os cinco países com maior número de habitantes com diabetes. Em 2017, cerca de 12 milhões de brasileiros foram diagnosticados diabéticos e este número poderá aumentar atingindo cerca de 19,2 milhões de pessoas em 2035 (GUARIGUATA et al., 2014; ATLAS MUNDIAL DE DIABETES, 2017).

Os custos médios com o tratamento do diabetes tipo 1, que inclui gastos com insulinoterapia e monitorização intensiva da glicemia capilar (contabilizando-se fitas, seringas descartáveis e materiais de desinfecção do frasco e antissepsia da pele), respondem por um aumento em torno de 56% da renda de famílias em relação a famílias que não possuem pessoas diabéticas. A literatura cita, para os Estados Unidos e a Austrália, custos familiares anuais elevados da ordem de U\$ 2.500,00 e U\$ 2.770,00, respectivamente. O paciente diabético retira mensalmente uma parte do orçamento familiar para tratar da doença o que representa grandes impactos nos aspectos pessoal, social e financeiro, reduzindo de forma drástica, o nível de vida e se estabelece, provavelmente, percepção negativa da doença com manifestações de tristeza, estresse e ansiedade que afetam toda a família (CASTRO; GROSSI, 2008).

A terapia dos diabéticos tipo 1 assenta na administração exógena de insulina e existe a tendência para a introdução da insulina no tratamento do diabetes tipo 2. A administração da insulina é essencialmente realizada por via subcutânea sendo, dessa forma, invasiva e não mimetiza a ação fisiológica da insulina, o que acarreta vários efeitos secundários. Entre as vias alternativas para a administração de insulina, a via oral seria a mais fisiológica e mais cômoda para o diabético. Com efeito, podendo ser administrada por via oral, a insulina sofre, após absorção gastrointestinal, o efeito da primeira passagem hepática, podendo desencadear assim um efeito primário de inibição da produção hepática da glicose (OWENS et al., 2003). No entanto a biodisponibilidade oral da insulina é baixa, principalmente devido à elevada atividade proteolítica e permeabilidade reduzida do trato gastrointestinal (DELIE; BLANCO-PRIETO, 2005). Entre as abordagens mais

promissoras para a terapia de insulina oral encontram-se os sistemas nanoestruturados, nomeadamente nanopartículas (NPs), as quais são produzidas por incorporação da insulina em nanopartículas biocompatíveis, biodegradáveis e mucoadesivas, que protegem e promovem a absorção da insulina no trato gastrointestinal (TGI) (RIBEIRO et al., 2013). Estas NPs são à base de biopolímeros tais como alginato, sulfato de dextrano, quitosana e albumina os quais protegem a insulina durante a formulação (SANTOS et al, 2013) e da degradação proteolítica no TGI (WOITISKI et al, 2009a). Diante do exposto, a via oral se apresenta como uma alternativa promissora para o sistema de liberação de fármacos que utilizam biopolímeros como nanocarreadores de fármacos com o intuito de melhorar a biodisponibilidade dos mesmos.

A goma de cajueiro (GC) caracterizada também como um polissacarídeo, é oriunda da *Anacardium occidentale* (árvore do cajueiro), podendo ser empregada como agente encapsulante em sistemas de liberação de princípios ativos com aplicações variadas nas indústrias de alimentos, médica e farmacêutica. A GC é constituída por vários açúcares simples e por ácido glucurônico (RIBEIRO et al., 2016).

No entanto, a goma apresenta baixa viscosidade com uma energia de ativação com poucas interações intra e intermoleculares e seu uso pode ser limitado pela possibilidade de queda na viscosidade de armazenamento e contaminação microbiana (PAULA; RODRIGUES, 1995). A modificação química pode ser utilizada para solucionar esses problemas, além de melhorar as propriedades funcionais facilitando interações e eficiência de associação de fármacos na matriz (RANA et al., 2011; ZHANG et al., 2009).

A acetilação de GC tem sido realizada com o objetivo de melhorar a estrutura para aplicação em sistemas nanoestruturados biodegradáveis, buscando uma liberação mais controlada do fármaco e sua proteção gastrointestinal (DIAS et al., 2016). No entanto, muitas das metodologias existentes para a acetilação de polissacarídeos envolvem a presença de solventes tóxicos, como piridina e formamida (SONG et al., 2013; ZHANG et al., 2014a)

Com isso, visando uma abordagem tecnológica inovadora, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema nanoestruturado a partir de goma de cajueiro acetilada por meio de uma nova síntese livre de solventes e desenvolver nanopartículas à base de goma de cajueiro acetilada para incorporação de insulina e

sua liberação por via oral, tornando a adesão do paciente ao tratamento mais eficaz e melhorando significativamente a qualidade de vida dos mesmos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Diabetes mellitus*

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não é capaz de produzir insulina, ou quando os níveis produzidos são insuficientes e/ou quando a insulina não pode ser processada adequadamente no organismo (KATZUNG, 2014). O médico grego Areteu, no ano 200 d.C., nomeou “diabetes” o estado doentio observado nos pacientes com sede e micção excessivas, que em grego significa “sifão”. Posteriormente foi acrescentado “*mellitus*” ao nome da doença, que em latim significa “melado, doce”, após ser observado que os pacientes apresentavam urina contendo açúcar (GOLAN, 2009).

Alguns sintomas associados ao diabetes são: fraqueza muscular, emagrecimento, polifagia (fome excessiva que contribui ainda mais para a elevação da glicemia), polidipsia, poliúria, hálito cetônico (provocado pela produção de corpos cetônicos provenientes da queima de gorduras para gerar energia) e nas fases mais avançadas da doença pode-se observar casos de arteriopatia periférica, acidente vascular encefálico (AVE), nefropatia, neuropatia, micro angiopatia, infarto do miocárdio, aterosclerose, necrose isquêmica das extremidades dos órgãos internos, obstrução microvascular ocasionando lesões na retina, nos glomérulos renais e nos nervos periféricos e doenças cardiovasculares (SHOELSON, 1995; SAID et al., 2002; CENTEMERO et. al, 2009; ANAD, 2017).

Existem três tipos principais de diabetes: tipo 1, tipo 2 e Diabetes gestacional. O diabetes tipo 1, conhecido como diabetes insulino dependente ou diabetes de início juvenil, é uma síndrome metabólica caracterizada por estado hiperglicêmico resultante da ausência total de insulina no organismo, é causado por uma reação autoimune de destruição nas células Beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, tais células são responsáveis pela produção de insulina no organismo, como consequência da destruição, a insulina não é sintetizada e conseqüentemente não é liberada, como resultado pessoas com diabetes tipo 1, apresentam concentração de insulina circulante próxima a zero acarretando em altos níveis sanguíneos de glicose que são característicos da doença (OLIVEIRA; MOURA, 2006; GOLAN, 2009).

Tais pacientes necessitam de um escrupuloso controle da glicemia ao longo do dia para que se possa obter uma redução da progressão e complicações da patologia, necessitando da administração exógena de insulina sintética. O início da doença clínica no diabetes tipo 1 comumente ocorre de forma súbita, normalmente em crianças ou adolescentes, porém também pode afetar pessoas de qualquer idade (OLIVEIRA; MOURA, 2006); a predisposição genética é um importante fator para o desenvolvimento da síndrome (GOLAN, 2009).

O tipo 2 da doença, normalmente conhecido como o diabetes do adulto, é uma doença crônica progressiva, sendo o tipo de maior ocorrência e é caracterizado por resistência à insulina e/ou deficiência relativa de insulina no organismo (CLARK, 2008). Fatores internos e ambientais associados a aumentos pontuais de secreção de insulina pós-prandial podem influenciar a ação do receptor de insulina levando à insensibilidade do mesmo, causando resistência à ação insulínica, tornando-a inativa no organismo. Como resposta, ocorre uma hipersecreção de insulina através do pâncreas visando normalizar os níveis de glicose, o que pode causar disfunção pancreática nas células β (BOGHOSSIAN et al., 2006; KALRA, 2009).

Este tipo de transtorno pode permanecer sem ser detectado por muitos anos e seu desenvolvimento está relacionado a distúrbios metabólicos crônicos que envolvem fatores como dieta e o estilo de vida. Quando descoberto em fases iniciais através de exames de rotina, a condição pode ser controlada através de exercícios físicos e dieta, porém ao longo do tempo a maioria das pessoas passa a exigir uso medicamentos e/ou uso de insulina (OWENS et al., 2001; TAUBES, 2008). É estimado que 46% dos casos de diabetes em adultos ainda não foram diagnosticados e 83,8% destes casos estejam em países em desenvolvimento (BEAGLEY et al., 2014).

O diabetes *mellitus* gestacional trata-se de uma intolerância a carboidratos iniciada durante a gestação, sem ter ocorrência prévia a este estado. Apresenta gravidade variável tanto para a mãe quanto para o feto, tendo diagnóstico mais comum no segundo ou terceiro trimestres da gravidez. Alguns fatores de risco são associados ao desenvolvimento do diabetes gestacional, tais como: Idade avançada; obesidade ou excesso de ganho de peso durante a gravidez; condições genéticas; crescimento fetal excessivo, hipertensão ou pré-eclâmpsia; síndrome de ovários policísticos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

Na gestação, a placenta produz hormônios hiperglicemiantes e enzimas que degradam a insulina, como resposta a isto, um aumento compensatório na produção de insulina é iniciado além da resistência à insulina o que pode provocar uma disfunção das células β pancreáticas. Tal condição pode se apresentar de forma passageira ou persistente após o parto, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 no futuro (NEGRATO; MONTENEGRO, 2016).

Os hormônios hiperglicemiantes produzidos por gestantes e responsáveis pela resistência à insulina são: hormônio lactogênico placentário, cortisol, estrógeno, progesterona e prolactina (MIRANDA; REIS, 2006). O diabetes gestacional ocorre entre 1% a 14% das mulheres grávidas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

O diabetes é um transtorno metabólico de grande ocorrência no mundo, sua ocorrência tem aumentado nas últimas décadas e estimativas mostram que continuará a crescer nos próximos anos (SHAW et al., 2010; GUARIGUATA et al., 2014). A Federação Internacional de Diabetes estima que 425 milhões de pessoas no mundo tem diabetes e que este número pode chegar a 629 milhões em 2045 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Segundo o Atlas Mundial de Diabetes (2017) mais de meio milhão de crianças e adolescentes foram diagnosticadas com diabetes tipo 1 no mundo, as causas para o aumento na incidência deste tipo de diabetes ainda não são claras.

A incidência deste tipo de diabetes mostra-se crescente em diversos países, incluindo o Brasil (SHAW et al., 2010). O Brasil é um dos países com maior número de diabéticos. Em 2017 estimou-se cerca de mais de 12 milhões de brasileiros acometidos por esta patologia e pesquisas apontam que o Brasil estará em 2035, na escala mundial, como o quarto país com maior número de habitantes com diabetes, afetando cerca de 19,2 milhões de pessoas, o equivalente a um aumento de 61,1% (GUARIGUATA et al., 2014; ATLAS MUNDIAL DE DIABETES, 2017).

Ademais, vários fatores contribuem para o desenvolvimento do diabetes na vida adulta, os níveis elevados de urbanização que tem causado grandes mudanças no estilo de vida da população, principalmente nos países em desenvolvimento que trouxeram transições rápidas em fatores de risco para doenças, tais como má-alimentação, sedentarismo e obesidade, além do envelhecimento populacional (GUARIGUATA et al., 2014).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2019) os critérios para diagnóstico clínico do diabetes *mellitus* indica pelo menos uma das seguintes condições: hemoglobina glicada (Hb A1c) $\geq 6,5\%$, glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL (sendo considerado jejum calórico de no mínimo 8h), glicemia ≥ 200 mg/dL duas horas após a administração de uma sobrecarga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra em água e, por último, a dosagem de uma glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia.

Os custos médios com o tratamento do diabetes dependente de insulina, que inclui gastos com insulino terapia e monitorização intensiva da glicemia capilar, respondem por um aumento em torno de 56% no consumo da renda de famílias que possuem pessoas diabéticas. A literatura cita para os Estados Unidos e a Austrália custos familiares anuais elevados da ordem de U\$ 2.500,00 e U\$ 2.770,00, respectivamente (CASTRO; GROSSI, 2008). Além de apresentar-se como uma relevante carga financeira, o diabetes também apresenta importante impacto nos custos dos sistemas de saúde, 12% dos gastos globais com saúde estão relacionados ao diabetes - U\$ 673 bilhões (ATLAS MUNDIAL DE DIABETES, 2017).

Tais custos afetam o nível de vida dos diabéticos, tendo impacto no aspecto financeiro e orçamento familiar pelo direcionamento de parte da renda familiar para o tratamento da doença, o que estabelece uma percepção negativa da doença com manifestações de tristeza, estresse e ansiedade que afetam toda a família (CASTRO; GROSSI, 2008).

2.1.1 Modelo experimental do diabetes *mellitus* por uso de estreptozotocina.

O diabetes pode ser induzido para fins de pesquisa por meio de vários em modelos experimentais. Um dos modelos mais utilizado é através do uso de estreptozotocina (STZ) em ratos de laboratório (MARLES; FARNSWORTH, 1995). A STZ é uma alquil nitrosuréia isolada da bactéria *Streptomyces achromogenes* que apresenta toxicidade pancreática. Por sua semelhança com a molécula de glicose, consegue ser internalizada nas células β pancreáticas, por meio do receptor de glicose tipo 2 (GLUT 2) (SCHNEDL et al., 1994). No intervalo de uma a sete horas após ser administrada, já podem ser observadas evidências de lesões histológicas no pâncreas e após 24, a reserva de insulina celular é reduzida em até 95% (JUNOD et al., 1969).

A STZ gera radicais hidroxila e espécies reativas de oxigênio quando metabolizada no interior celular, causando danos nas células β -pancreáticas; além disso, a formação de óxido nítrico decorrente do metabolismo da STZ no interior da célula foi possível observar alquilação e fragmentação do DNA resultando em apoptose (KRÖNCKE et al., 1995; GILLE et al., 2002). Isto resulta no aumento da poli polimerase com redução dos estoques de ATP, causando redução da síntese de insulina (LENZEN, 2008). A administração de apenas uma única dose de STZ é capaz de causar diabetes *mellitus* como modelo experimental em roedores (MARLES; FARNSWORTH, 1995).

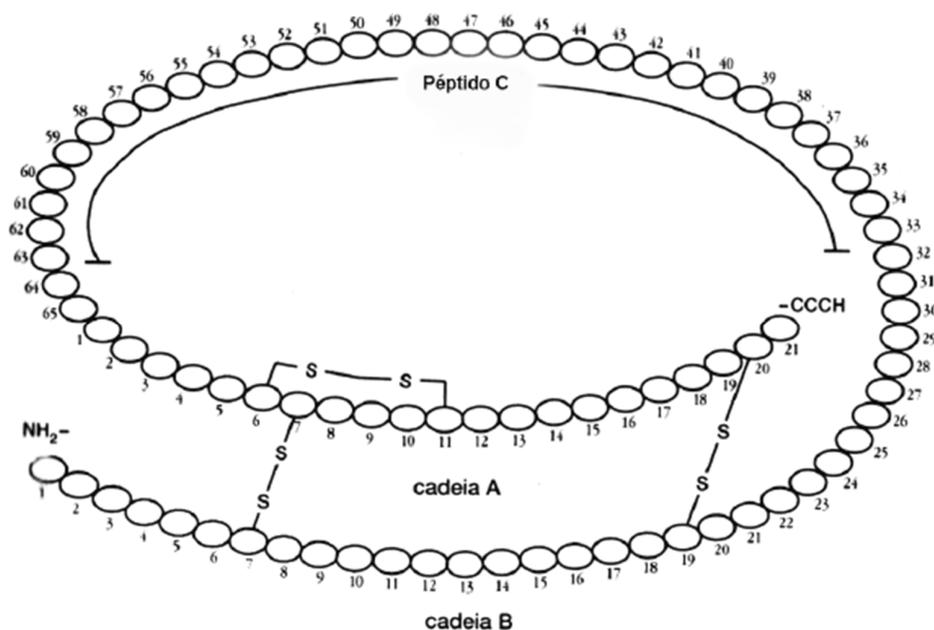
2.2 Insulina

A insulina é uma proteína de massa molecular de 5,808 KDa, é formada por 51 aminoácidos (a.a.) dispostos em duas cadeias peptídicas contendo 21 e 30 a.a., interligadas por duas pontes de dissulfeto que determinam, primariamente, a estrutura tridimensional da insulina, tal conformação é extremamente importante na atividade hipoglicemiante da proteína (CHIEN, 1996; SILVA et al., 2003).

A insulina é o hormônio responsável pelo controle do transporte e utilização da glicose no organismo, através da ligação a receptores localizados nas células musculares, a insulina sinaliza às células para a captação de glicose. É secretada na forma de pré-pró-insulina pelas células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas, apresentando uma grande cadeia polipeptídica (Figura 1).

A pré-pró-insulina é clivada e armazenada na forma de pró-insulina, uma longa molécula de cadeia simples que é processada no interior do complexo de Golgi sendo hidrolisada em peptídeo C (segmento de conexão residual) e insulina, que será secretada (Figura 2).

Figura 1 - Estrutura da molécula pró-pré-insulina



Fonte: Reis, 2008a.

A secreção de insulina pelo pâncreas é regulada em resposta aos níveis plasmáticos de glicose. A glicose, proveniente da alimentação, é resultado da digestão de alimentos ricos em carboidratos e quando atinge a corrente sanguínea necessita da insulina que é responsável pela absorção desta glicose pelas células. Quando ocorre uma elevação na concentração de glicose, as células pancreáticas desenvolvem um aumento no metabolismo através de maior produção de ATP, causando o fechamento dos canais de potássio e consequente despolarização. Em consequência, os canais de cálcio abrem-se permitindo maior influxo de cálcio na célula e maior secreção de insulina (KATZUNG, 2014).

Após ser sintetizada e secretada, a insulina é difundida através da veia porta em direção ao fígado. Durante o metabolismo de primeira passagem hepático, cerca de metade da quantidade de insulina é removida (HOFFMAN; ZIV, 1997). Após penetrar na circulação, a insulina é difundida pelos tecidos, ligando-se a receptores específicos presentes nas membranas das células alvo da maioria dos tecidos. Os

principais tecidos-alvo da insulina, que expressam maiores níveis de receptores são o fígado, músculo e tecido adiposo (KATZUNG, 2014).

O receptor da insulina consiste em uma glicoproteína transmembrana constituída de quatro subunidades ligadas por ligações dissulfeto, duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β . A subunidade β é formada por uma parte curta extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular que contém a molécula tirosina-quinase (GOLAN, 2009).

Quando a insulina liga-se ao receptor a tirosina-quinase intracelular é ativada, desencadeando a auto fosforilação da tirosina na subunidade β adjacente e a fosforilação de outras proteínas intracelulares entre as quais, as mais importantes são as proteínas de substrato do receptor de insulina proteínas-IRS, que recrutam uma variedade de segundos mensageiros proteicos, ativando o transporte de glicose do sangue para o interior das células. Quando ocorre a interação da insulina a estes por meio de um sinal intracelular há a ativação do transporte de glicose do sangue para o interior das células, por meio da translocação dos transportadores de glicose GLUT4 para a superfície celular. Após penetração celular, a glicose é rapidamente fosforilada pela hexocinase e utilizada o metabolismo ou é armazenada sob a forma de glicogênio ou triglicerídeos (GOLAN, 2009).

Como no diabetes a produção de insulina é deficiente ou ausente, a absorção de glicose pelas células é afetada, levando a falta de energia no organismo, o que desencadeia uma reação de produção intrínseca de energia levando o fígado e o tecido adiposo a produzirem glicose. Além de metabolizar, o fígado também é responsável pela produção e liberação de glicose para corrente sanguínea durante o jejum, via gliconeogênese (síntese de glicose hepática). Tal mecanismo provoca ainda mais um aumento da hiperglicemia piorando o quadro clínico do paciente por gerar os sintomas associados à doença causando danos ao corpo e afetando o funcionamento normal de vários órgãos (ANAD, 2017).

A insulina influencia na produção de glicose pelo fígado, após ligar-se aos receptores de insulina hepáticos, ativa as vias de sinalização que impedem a gliconeogênese (CLAUS; PILKIS, 1976). Nos pacientes diabéticos, a falta de insulina causa uma elevação da gliconeogênese hepática (LOPASCHUK; DYCK, 2005). Dessa forma a hiperglicemia de jejum nos pacientes diabéticos é resultante tanto da redução da utilização de glicose quanto da produção excessiva de glicose (DE FRONZO, 1992).

A terapia com insulina, portanto, é fundamental para controlar os níveis glicêmicos, aumentando a utilização da glicose pelos tecidos e síntese de glicogênio, além de inibir a gliconeogênese no fígado. Desta forma, a administração exógena de insulina é o tratamento base para o diabetes tipo 1 e também pode beneficiar na terapia do diabetes tipo 2 (CHIEN, 1996; TREHAN; ALI, 1998; WHITE, 1996).

A administração da insulina é essencialmente realizada por via subcutânea, o que ainda gera muita insatisfação pelos diabéticos, por ser uma via invasiva e incômoda ao paciente que necessita realizar várias injeções diárias, além de não mimetizar a ação da insulina endógena, o que acarreta vários efeitos secundários como perda do tecido subcutâneo e lipodistrofia (alteração do tecido adiposo) nas áreas das injeções repetidas, além do acúmulo do fármaco que não é distribuído de forma eficiente (OWENS et al, 2003; LAUTERBACH; GOYMANN, 2015; ZHANG et al., 2015).

O tempo de ação da insulina regular é curto, atingindo 4-8 horas, isto implica na necessidade de 2-4 injeções diárias para um controle adequado dos níveis glicêmicos (CHIEN, 1996; TREHAN; ALI, 1998). Embora o prolongamento da atividade da insulina tenha sido desenvolvido, a administração continua a ser pela via subcutânea não mimetizando a ação da insulina fisiológica (SILVA et al., 2003).

Em um indivíduo sadio, como em resposta ao aumento dos níveis glicêmicos no estado pós-prandial, a insulina é liberada imediatamente para a veia porta e enviada para o fígado, as concentrações hepáticas de insulina são superiores às sistêmicas (RAMKISSOON-GANORKAR et al., 1999). Quando a insulina é injetada pela via subcutânea expõe todos os tecidos à mesma concentração onde os músculos e o tecido adiposo respondem à insulina sem a monitorização hepática, pois o fígado recebe apenas uma fração da dose administrada, cerca de 20% da insulina inicial atinge o fígado (SAFFRAN et al., 1997; REIS, 2008a).

A distribuição não uniforme da insulina no organismo, diferente da ação da insulina secretada pelo pâncreas, pode causar hiperinsulinemia periférica, superestimulação da vasculatura e outras respostas metabólicas como a estimulação para o crescimento e divisão celular, além de outros efeitos associados ao progresso da doença. Dessa forma, podem ocorrer os casos de hipoglicemia (HIRAI et al., 1978).

Diante disso, visando atender a necessidade dos pacientes diabéticos para diminuição das injeções diárias e buscando proporcionar um funcionamento de insulina

de forma mais fisiológica, sistemas de liberação têm sido desenvolvidos para a administração por outras vias (TREHAN; ALI, 1998). Entre as vias alternativas para a administração de insulina, a via oral é a mais fisiológica e mais cômoda para o diabético (OWENS et al., 2003).

2.2.1 Desafios na administração de insulina por via oral

A insulina administrada por via oral, além de ser menos incômoda que a via subcutânea, é a mais fisiológica para o diabético. Após absorção gastrointestinal, a insulina sofre o efeito da primeira passagem hepática, podendo desencadear um efeito primário de inibição da produção hepática da glicose e mimetizar a ação da insulina endógena tendo uma distribuição mais homogênea nos tecidos com menor incidência de fenômenos de hiperinsulinemia periférica (OWENS et al., 2003).

Portanto, por via oral, a insulina proporcionaria homeostase glicêmica além de diminuir os efeitos secundários observados na administração subcutânea (AGARWAL; KHAN, 2001).

Entretanto, a administração oral de insulina é um desafio devido seu tempo de vida muito curto nos fluidos gástrico e intestinal, além de apresentar baixa taxa de absorção através da barreira intestinal (LEE; ROBINSON, 1988). A biodisponibilidade oral da insulina é baixa, principalmente devido à elevada atividade proteolítica (DELIE; BLANCO-PRIETO, 2005).

Quando administrados oralmente, os peptídeos e proteínas sofrem a ação das proteases, enzimas presentes nos sucos gástrico e intestinal, dessa forma, não são capazes de atingir os enterócitos para serem absorvidos via intestinal. Portanto, um dos maiores desafios para administrar a insulina por via oral é obter medidas para evitar a sua degradação enzimática ao longo do trato gastrointestinal (TGI) (DELIE; BLANCO-PRIETO, 2005; MORISHITA et al., 1992).

A degradação da insulina é iniciada no estômago pela ação da pepsina, é continuada no duodeno pela combinação das enzimas pancreáticas, principalmente pela ação da tripsina e quimiotripsina, e finalmente é inativada pela ação das peptidases presentes nas células absorptivas no meio intestinal (BAI; CHANG, 1995). A função biológica da insulina é diretamente dependente da sua integridade estrutural, qualquer desorganização causa sua inativação (DAMGÉ et al., 2008).

Além da degradação enzimática da insulina no TGI, a insulina também apresenta permeabilidade extremamente reduzida no trato gastrointestinal (SINKO et al., 1993) e baixa estabilidade físico-química (REIS, 2008a).

Um dos estudos pioneiros na tentativa de administrar a insulina por via oral foi realizado por Saffran et al. (1997), administrando altas doses de soluções de insulina a ratos diabéticos, onde foi observado que as concentrações elevadas de insulina no TGI causaram redução do fluxo sanguíneo no local, diminuindo a motilidade e consequente absorção de glicose, tal mecanismo causou diminuição temporária da glicose sanguínea, no entanto os animais perderam massa corpórea, além de tornarem-se polifágicos pela absorção inadequada de nutrientes.

A absorção de insulina através do trato gastrointestinal tem sido um considerável objeto de pesquisa nas ciências farmacêuticas. Avanços nas pesquisas para administrar a insulina oralmente têm incluído diversas estratégias tais como inibidores enzimáticos (MORISHITA et al., 1992); promotores de absorção (MESIHA et al., 1994); modificação química da molécula (ASADA et al., 1995); conjugação com ciclodextrina (SAJEESH; SHARMA, 2006); lipossomas (ZHANG et al., 2005) e sistemas poliméricos (DELIE; BLANCO-PRÍETO, 2005; MORISHITA et al., 2006).

Entre as abordagens mais promissoras para a terapia de insulina oral encontram-se os sistemas nanoestruturados, os quais são produzidos por incorporação da insulina em nanopartículas biocompatíveis, biodegradáveis e mucoadesivas, que protegem e promovem a absorção da insulina no trato gastrointestinal (TGI) elevando sua biodisponibilidade (RIBEIRO et al., 2013).

2.3 Nanotecnologia Farmacêutica

A nanotecnologia é uma área de estudo multidisciplinar emergente dedicada ao desenvolvimento de estruturas em nanoescala com propriedades físicas e químicas passíveis de aplicações clínicas (ANDRONESCU; GRUMEZESCU, 2017).

Em 1959, o físico Richard Feynman ministrou uma palestra considerada como o marco inicial da nanotecnologia, sugerindo a manipulação dos átomos para construção de novos materiais (FEYNMAN, 1960). Em 1974, o termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez por Taniguchi, quando observou que materiais em nano escala apresentam propriedades diferentes e aprimoradas em comparação com materiais de tamanho maior (TANIGUCHI, 1974).

A nanotecnologia tem sido estudada e aplicada cada vez na nanociência em perspectivas em exames de imagens biomédicas, diagnóstico, terapia genética e entrega direcionada de fármacos (ANDRONESCU; GRUMEZESCU, 2017).

O conceito de direcionamento de fármacos para locais específicos de ação foi introduzido por Paul Ehrlich em 1909 com o desenvolvimento do antibiótico arsfenamina, utilizado para o tratamento de sífilis que atuou inibindo os patógenos sem afetar as células do hospedeiro, sendo nomeado de bala mágica (BOSCH; ROSICH, 2008).

A nanociência tem sido estudada possibilitando a entrega específica de fármacos para o local de ação, com aplicação direcionada reduzindo a possibilidade de efeitos colaterais; permitindo o desenvolvimento de nanoformulações utilizadas como sistemas de liberação controlada; além de promover o aumento da penetração intracelular a partir de nanomateriais (AGRAWAL et al., 2013).

Em perspectiva, um nanômetro é um bilionésimo de um metro, e neste tamanho os nanomateriais apresentam propriedades físico-químicas diferentes. Os nanocarreadores podem transportar o fármaco podendo atingir áreas inacessíveis, como tecidos cerebrais, células cancerígenas e outros tecidos, evitando efeitos colaterais potenciais para o tecido normal (THE ROYAL SOCIETY, 2004, ANDRONESCU; GRUMEZESCU, 2017).

Os sistemas nanoestruturados para entrega de fármacos são capazes de proteger o fármaco das possíveis instabilidades tais como variação de pH e ação enzimática no TGI promovendo a redução da instabilidade e degradação de fármacos sensíveis. Também atuam na diminuição da dose terapêutica e do número de administrações pela liberação progressiva e controlada do fármaco favorecendo a terapia clínica (PIMENTEL, et al., 2007).

Vários tipos de sistemas poliméricos têm sido utilizados em sistemas de liberação de fármacos, tais como micelas, dendrímeros, pontos quânticos, lipossomas e nanopartículas (ANDRONESCU; GRUMEZESCU, 2017).

2.3.1 Nanopartículas poliméricas

O termo nanopartículas (NPs), em nanotecnologia farmacêutica, designa sistemas na ordem submicrômica, menores que 1 μm (DELIE; BLANCO-PRIETO, 2005). Nanopartículas poliméricas são sistemas com dimensão na ordem de

nanômetros à base de polímeros que podem ser de natureza sintética, semi-sintética ou natural, biodegradável ou não e que podem ser utilizadas como veículos para fármacos (COUVREUR et al., 1995). As nanopartículas poliméricas serão o foco deste trabalho.

As NPs podem variar de tamanho entre 10 e 1000 nm (DAMGÉ et al., 2008). Devido à pequena dimensão, as nanopartículas oferecem diversas vantagens terapêuticas e tecnológicas sendo empregadas para facilitar a passagem pelas barreiras biológicas conferindo maior biodisponibilidade das substâncias ativas e sua captação intracelular, além disso, são utilizadas para a administração de substâncias direcionadas aos locais de ação e também são empregadas para proteger moléculas instáveis da ação do pH do meio, da atividade das enzimas ou do sistema imunológico (WOITISKI et al., 2009b; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Os sistemas de administração de fármacos por via oral através de nanopartículas representam uma área promissora no campo farmacêutico, sendo capazes de aumentar a solubilidade, biodisponibilidade e permeabilidade no TGI dos fármacos difíceis de administração oral (KUMARI, et al., 2010). A escala manométrica dos sistemas promove fácil absorção celular (VINAGRADOV, et al., 2002).

O estudo de nanopartículas (NPs) em sistema de liberação de fármacos tem sido objeto de várias pesquisas (LANGER; TIRRELL, 2004; UHRICH et al., 1999; SOPPIMATH et al., 2001; WOITISKI et al., 2009a; KUMARI et al., 2010).

Nanopartículas poliméricas não biodegradáveis podem ser utilizadas para entrega controlada de fármacos, além de serem aplicadas em diagnóstico por imagem. Alguns polímeros sintéticos não biodegradáveis aplicados em nanopartículas são polimetilmetacrilato e partículas de poliestireno, utilizados para diagnósticos (NEFZGER, 1984).

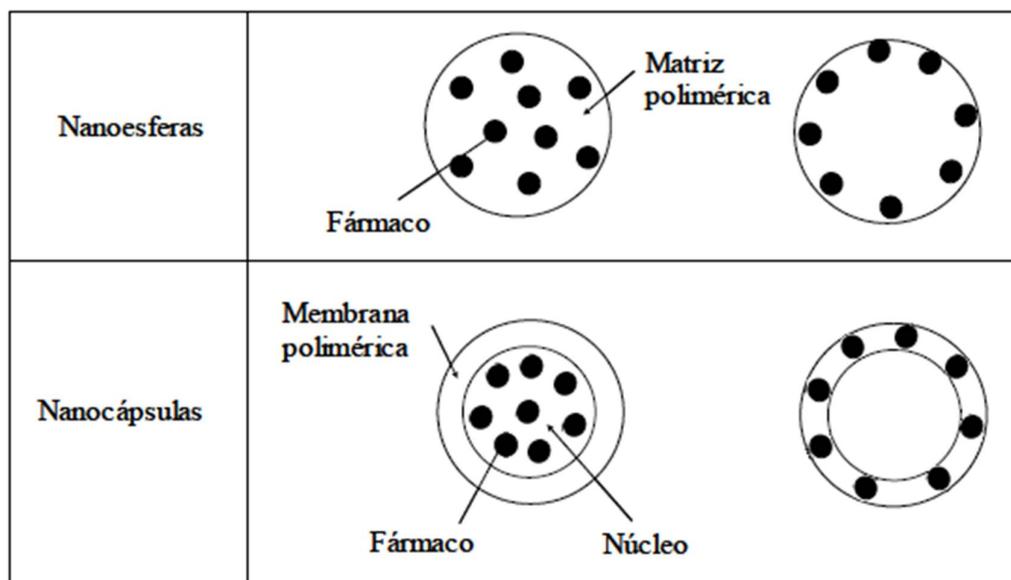
Nanopartículas, biodegradáveis e biocompatíveis, podem ser aplicadas para proteger o fármaco no meio gastrointestinal, promovendo a absorção do mesmo pela via oral de administração e melhorando a adesão do paciente à terapia, além de serem utilizadas para sistemas de liberação controlada de fármacos (WOITISKI et al, 2009a).

A captação intestinal das nanopartículas também é influenciada por outros fatores como a natureza do polímero, que sendo hidrofóbico é mais facilmente absorvido (JUNG et al., 2000) e pela carga elétrica da superfície que confere

mucoadesividade aos polímeros junto ao epitélio intestinal, recoberto com uma camada de muco (REIS, 2008a). Polímeros carregados positivamente atribuem propriedades mucoadesivas às nanopartículas aumentando seu tempo de retenção e favorecendo sua captura no trato intestinal (SHENG, 2016).

De acordo com a estrutura, as nanopartículas podem ser classificadas em nanocápsulas e nanoesferas (DAMGÉ et al., 2008). As nanoesferas possuem estrutura do tipo matriz, onde o fármaco ou a substância ativa pode estar adsorvido à superfície da nanoesfera ou distribuído em seu interior de forma homogênea ou heterogênea. As nanocápsulas são sistemas vesiculares contendo um núcleo hidrofílico ou lipofílico circundado por uma membrana polimérica. A substância a ser encapsulada pode estar adsorvida à membrana ou presente no núcleo (Figura 2) (ANTON et al., 2008; MORA-HUERTAS et al., 2010). Conhecer as propriedades físico-químicas da substância ativa da nanopartícula possibilita a escolha do polímero apropriado e conseqüentemente o melhor método de preparo.

Figura 2 - Ilustração da divisão das nanopartículas em nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nanopartículas poliméricas isolam o fármaco encapsulado do meio externo, protegendo-o da ação enzimática, permitindo sua captação pelos enterócitos. As partículas poliméricas são capazes de proporcionar uma liberação sustentada e

controlada do fármaco. O tamanho das partículas, bem como a natureza do polímero, são parâmetros críticos envolvidos na captação de partículas pelo trato gastrointestinal. (ALLÉMANN et al., 1998; RIBEIRO et al., 2013).

Em estudo realizado em 1982 por Oppenheim e colaboradores, a insulina foi nanoestruturada em nanoesferas com média de 200 nm por reticulação com glutaraldeído. No estudo da bioatividade em ratos por via oral, foi observada que o sistema não protegeu a insulina da elevada atividade proteolítica no TGI. A necessidade de elevadas doses de NPs inviabilizaram a comercialização do sistema (OPPENHEIM et al., 1982).

Posteriormente, nanopartículas de poli(isobutilcianoacrilato) (PIBCA), um polímero biocompatível e biodegradável, foram preparadas para administração oral de insulina, apresentando diminuição da glicemia em jejum em 50-60%. No entanto o efeito só foi percebido 2 dias após a administração das NPs (DAMGÉ et al., 1990).

Com tais resultados já foi possível observar um aumento da proteção da insulina contra a degradação enzimática no TGI. Tal comprovação foi afirmada por Aboubakar e colaboradores (1999), em estudo que mostrou que as interações químicas entre polímero e insulina no processo de nanoencapsulação não tem influência sobre seu efeito biológico.

Para a eficácia de administração oral de insulina além das propriedades de preparação do sistema nanoestruturado, vários fatores necessitam ser observados tais como tamanho das nanopartículas, cinética de liberação, bioadesividade e capacidade de atravessar o epitélio intestinal (CARINO et al., 2000).

Nanopartículas de alginato e sulfato de dextrano, complexado com um revestimento de quitosana-polietilenoglicol-albumina administradas por via oral a ratos diabéticos reduziram a glicemia com um efeito máximo após 14 h. Após quatro dias de administração oral (50 UI/kg), os animais apresentaram melhora de sinais clínicos com redução na ingestão de água, excreção de urina e proteinúria (REIS et al., 2008a).

Nanoesferas carregadas de insulina (25, 50, 100 UI / kg) administradas por via oral a ratos diabéticos reduziram a glicemia de maneira dose-dependente. Este efeito durou mais de 24 h com um efeito máximo após 14 h. As nanoesferas aumentaram o nível plasmático de insulina, melhoraram a resposta glicêmica e o estado metabólico de ratos diabéticos reduzindo a ingestão de água, excreção de

urina e proteinúria, após quatro dias de administração oral (50 UI / kg / dia) (REIS et al., 2008b).

Novas alternativas visando obter o desenvolvimento nanopartículas que promovam a absorção da insulina por via oral a partir de baixo custo de obtenção tem sido o objeto de pesquisa crescente.

2.3.2 Métodos de preparo de nanopartículas poliméricas

Existem diferentes métodos de preparação de nanopartículas tais como polimerização por meio de emulsões (EL-SAMALIGY et al., 1986; GULSEN; CHAUHAN, 2004); polimerização interfacial (COUVREUR et al., 2002); policondensação interfacial (BOUCHEMAL et al., 2004); emulsão/evaporação do solvente (UEDA; KREUTER, 1997; MEI et al., 2007); deslocação do solvente e deposição interfacial (GALINDO-RODRIGUEZ, 2004; GANACHAUD; KATZ, 2005); emulsificação/difusão do solvente (QUINTANAR-GUERRERO, 1998; ITALIA et al., 2007); dessolvatação de macromoléculas (COESTER, 2000; REIS et al., 2007); gelificação ionotrópica (RAJAONARIVONY, 1993; WOITISKI, et al., 2009a); complexação polieletrólítica (SARMENTO et al., 2007a); homogeneização de alta pressão (MEHNERT; MADER, 2001); nebulização (tecnologia supercrítica) (CALICETI et al., 2004), entre outras. Neste trabalho foi utilizada a técnica de complexação polieletrólítica para a preparação das nanopartículas.

2.3.2.1 Complexação polieletrólítica

A técnica de complexação polieletrólítica para formação de nanopartículas consiste na mistura de soluções aquosas de polímeros opostamente carregados (policátions e poliânions), através de interações eletrostáticas, resultando em partículas coloidais sem a necessidade de adição de substâncias químicas ou solventes orgânicos (GUCHT et al., 2011).

Uma solução de polímero é gotejada sobre a solução de outro polímero de carga oposta, sob agitação (LUO; WANG, 2014). Além da carga dos polieletrólitos, outros fatores são importantes para a formação e preparação dos complexos dos sistemas nanoestruturados tais como o peso molecular dos polímeros, densidade de carga, pH das soluções poliméricas, concentração, temperatura, volume das

soluções a ser adicionado e agitação (KIZILAY et al., 2011). Esta metodologia possibilita a reticulação por diferentes cargas opostas, sendo de fácil realização (GUCHT et al., 2011).

A resistência mecânica e a barreira de permeabilidade das nanopartículas podem ser aprimoradas através da complexação pela interação entre polímeros possuindo cargas opostas possibilitando a formação de camadas subsequentes (SARMENTO et al., 2006a).

As nanopartículas são estabilizadas pela adição da solução do polímero com um polication ou poliânion que é gotejado na dispersão contendo as nanopartículas carregadas opostamente (LUO; WANG, 2014). Nanopartículas de alginato (polímero aniônico) foram estabilizadas com a adição gota a gota de quitosana (polímero catiônico) dissolvida em solução ácida pela interação entre as cargas opostas dos biopolímeros (RAJAONARIVONY et al., 1993).

Nanopartículas de quitosana e goma arábica (polímero aniônico) foram preparadas por meio de complexação polieletrólítica para incorporação de curcumina com ação antioxidante (TAN et al., 2016).

Nanopartículas à base de biopolímeros tais como alginato, sulfato de dextrano, quitosana e albumina têm sido preparadas através do método de gelificação ionotrópica seguido pela técnica de complexação polieletrólítica conseguindo proteger a insulina durante a formulação (SANTOS et al., 2013), da degradação proteolítica no trato gastrointestinal (WOITISKI et al., 2009a) e após a sua administração oral em ratos observou-se uma redução de 70% da glicemia (WOITISKI et al., 2010).

2.3.3 Biopolímeros utilizados na preparação de nanopartículas

Os polímeros naturais e seus derivados têm sido bastante utilizados nas pesquisas farmacêuticas para a preparação de nanopartículas em sistemas de entrega de fármacos, por serem biodegradáveis, biocompatíveis, não apresentar toxicidade e ser de fácil obtenção (YANG et al., 2015). Dentre os biopolímeros utilizados e estudados para tais formulações estão como exemplos alginato, sulfato de dextrano (WOITISKI et al. 2009a; REIS et al., 2008b), quitosana (CHRONOPOULOU et al., 2012; NASKAR et al., 2019), celulose (LI et al., 2015),

ciclodextrina (KRAULAND; ALONSO, 2007) e gomas naturais (PAULA et al., 2011; ABREU et al., 2012).

Estudos *in vitro* (ANTUNES et al., 2013) e *in vivo* (Reis et al., 2008c) têm revelado várias vias de absorção intestinal de insulina incorporada em NPs favorecendo a utilização de sistemas nanoestruturados obtidos a partir de biopolímeros. A variedade de grupos funcionais presentes nos biopolímeros possibilita seu uso em sistemas nanoestruturados potencializando a absorção de insulina por via oral (ANTUNES et al., 2013; REIS et al., 2008b).

Por outro lado, essa diversidade funcional apresenta o inconveniente da menor reprodutibilidade na obtenção dos lotes o que exige um delineamento experimental na formulação dos sistemas (WOITISKI et al., 2009b) e uma caracterização pormenorizada de forma a dar seguimento às vantagens da utilização dos polissacarídeos naturais.

Entre os polímeros naturais, os polímeros de carboidratos ou polissacarídeos têm sido utilizados para sistemas de entrega de compostos para tratamento de diversas patologias, entre elas o diabetes (RIBEIRO et al., 2016).

As gomas naturais são polissacarídeos que apresentam solubilidade em água e que após sofrer hidratação formam soluções viscosas em concentrações baixas, dispersões coloidais ou géis. São obtidas de exsudatos de sementes, algas, árvores ou através de fermentação microbológica (COSTA et al., 1996). Algumas espécies vegetais liberam exsudatos em seus caules em resposta a fatores físicos externos como ferimentos ou como mecanismo de defesa contra patógenos ou predadores. As gomas naturais são extraídas de tais exsudatos e possuem diferentes aplicações, dentre elas são comumente utilizadas como espessantes e estabilizantes na indústria alimentícia e farmacêutica. Exemplos de tais gomas são a goma arábica, caraia, ghatti, tragacanto, entre outras (CUNHA et al., 2009; PRAJAPATI et al., 2013).

Visando uma abordagem tecnológica inovadora, este trabalho utilizou o biopolímero extraído da goma de cajueiro (GC) oriundo da planta *Anacardium occidentale* (cajueiro) que vem sendo estudado para aplicação na nanotecnologia farmacêutica por apresentar características que o possibilita ser empregado como agente encapsulante de substâncias ativas. A goma de cajueiro é constituída por vários açúcares simples e pelo ácido glucurônico, seu leve caráter aniônico permite que a goma se complexa com outros polímeros catiônicos através de interações

eletrostáticas, ligando-se a grupos funcionais e formando complexos nanoestruturados (PAULA; RODRIGUES, 1995; COSTA et al., 1996; PAULA et al., 1998; SILVA et al., 2006).

Dentre as vantagens apresentadas para o uso das gomas naturais estão o baixo custo, baixo risco de efeitos colaterais, processamento ecologicamente sustentável e boa disponibilidade (RIBEIRO et al., 2016).

2.3.3.1 Goma de Cajueiro

A goma de cajueiro (GC) é um exsudato extraído da *Anacardium occidentale* L., pertencente à família Anacardiaceae, uma árvore de clima tropical conhecida popularmente como cajueiro (Figura 3A). É uma espécie de porte alto que pode chegar até 12 metros de altura, extensamente cultivada no Brasil tendo predominância nas regiões norte e nordeste, tendo destaque em estados como o Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí (MOURA, 2007). O exsudato é produzido pelas células epiteliais da casca do caule da planta em resposta a estímulos mecânicos ou contra ataque de patógenos (KUMAR et al., 2012) (Figura 3 B, C, D).

Figura 3 - *Anacardium occidentale* L. (A) e seu exsudato (B, C e D)



Fonte: Silva, 2013.

Para obtenção do exsudato pode-se utilizar a adição de substâncias químicas no caule, como o óxido de etileno, derivados de ácido benzoico e ácido 2-cloroetilfosfônico ou realizar incisões na casca mimetizando a extração do látex para produção da borracha (ARAUJO, 1991). *In natura* é obtida uma resina de cor marrom que após submetida ao processo de purificação, resulta em um pó branco rico em polissacarídeos, denominado goma de cajueiro (RODRIGUES et al., 1993).

A goma GC é parcialmente solúvel em água a temperatura ambiente e apresenta menor viscosidade a pH 5,5 que é aumentada à medida que os valores de pH são diminuídos (PAULA; RODRIGUES, 1995; ZAKARIA; RAHMAN, 1996; PAULA et al., 1998). A goma apresenta-se como um heteropolissacarídeo ácido ramificado e apresenta a estrutura composta por galactose (72-73%), glicose (11-14%), arabinose (4,6-5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glucurônico (4,7-6,3%) (PAULA; RODRIGUES, 1995; RIBEIRO et al., 2016) (Figura 4).

Alguns efeitos farmacológicos da GC têm sido estudados tais como potencial ação anti-inflamatória (YAMASSAKI et al., 2015); cicatrizante (SHIRATO et al., 2006); antitumoral (FLORÊNCIO et al., 2007); atividade antibacteriana (TORQUATO, 2004) e gastroprotetor (CARVALHO et al., 2015). Além de apresentar-se como material formador de filme podendo ser aplicada em dispositivos nanobiomédicos (ARAÚJO et al., 2012), tem sido relatado seu uso como agente gelificante em formulação tópica (KUMAR, et al., 2009) e como agente aglutinante de comprimidos (GOWTHAMARAJAN et al., 2011). Ainda em comprimidos, o uso da goma foi capaz de aumentar a resistência mecânica dos mesmos, levando a uma desintegração tardia e promovendo a liberação controlada do fármaco (OFORI-KWAKYE et al., 2010).

A GC apresenta potencial aplicação em sistema de liberação prolongada. Géis de GC e quitosana acetilada apresentaram liberação controlada de pilocarpina na presença da goma (MACIEL et al., 2006).

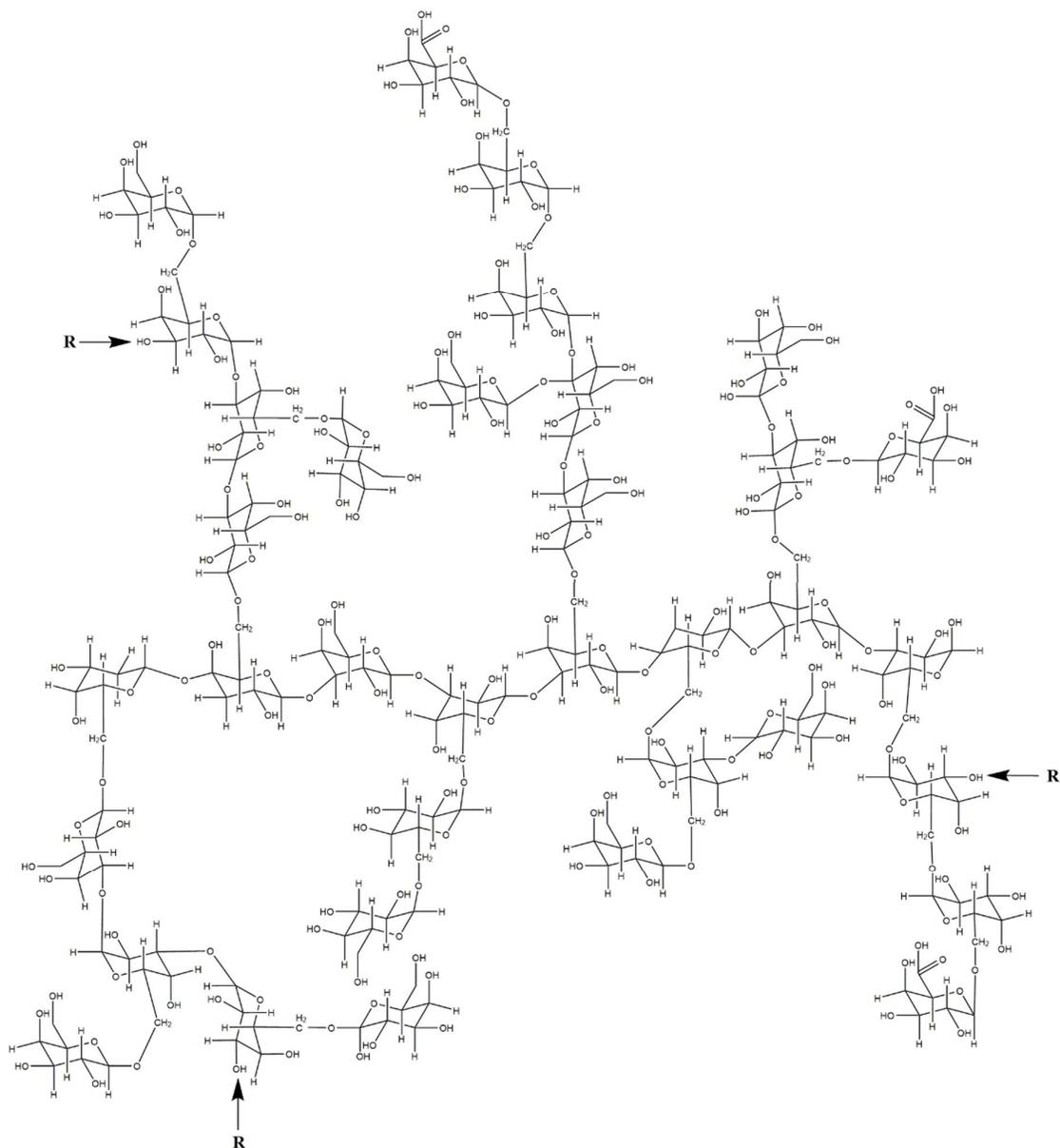
A presença de ácido glucurônico na estrutura da GC confere à estrutura da goma, leve grau aniônico, possibilitando uma tendência de interação com polications e possibilitando a interação com outros polímeros no desenvolvimento dos sistemas poliméricos (GUILHERME et al., 2005; OKOYE et al., 2012; FURTADO et al., 2013).

Por ser um biopolímero biodegradável, biocompatível, diversos estudos têm aplicado à goma de cajueiro na nanotecnologia, nanopartículas à base de goma de cajueiro e quitosana foram preparadas por complexação iônica em meio aquoso por

Oliveira et al. (2009). Matrizes poliméricas compostas de quitosana e goma de cajueiro foram preparadas para encapsular o óleo essencial das folhas de *Lippia sidoides*, que mostrou ter efeito larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* (PAULA et al., 2011; ABREU et al., 2012.).

Em outra abordagem também utilizando o óleo essencial de *Lippia sidoides*, a goma de cajueiro foi utilizada com alginato para formação de um sistema polimérico por gelificação ionotrópica apresentando potencial atividade larvicida (PAULA et al., 2012). Hidrogéis aplicados como curativos para absorção de exsudatos inflamatórios foram preparados à base de goma de cajueiro, quitosana e cloreto de cálcio, este último adicionado para favorecer a reticulação entre os polímeros (SOARES et al. 2014).

Figura 4 - Fragmento estrutural da goma de cajueiro. R representa D-manose, L-ramnose, L-arabinose ou 1,2-arabinose ligados às cadeias



Fonte: Ribeiro et al., 2016.

Entretanto as características e o efeito *in vivo* de nanopartículas desenvolvidas a partir de polímeros naturais podem ser menos previsíveis, pois tais polímeros podem variar em composição química e propriedades físicas. Por outro lado, é possível modificar tais polímeros com composição química mais precisa com

propriedades físicas, solubilidade, permeabilidade e biodegradação previsíveis (RANA et al., 2011).

Por apresentar baixo percentual de ácido glucurônico na estrutura, a GC apresenta-se como um polieletrólito aniônico fraco. Por apresentar leve caráter aniônico as interações entre a goma de cajueiro e insulina seriam insuficientes para formar interações fortes na formulação de nanopartículas, sendo incapaz de proteger a insulina em meio gástrico. Dessa forma, a inserção de outros grupamentos é necessária a fim de fortalecer tais ligações e conferir estabilidade ao sistema (SILVA et al., 2006).

A goma é um polissacarídeo de baixa viscosidade com uma energia de ativação com poucas interações intra e intermoleculares e seu uso pode ser limitado pela possibilidade de queda na viscosidade de armazenamento e contaminação microbiana (PAULA; RODRIGUES, 1995). A modificação química pode ser utilizada para solucionar esses problemas, além de melhorar as propriedades funcionais facilitando as interações e a eficiência da associação de fármacos na matriz (RANA et al., 2011; ZHANG et al., 2009). Polissacarídeos hidrofílicos podem ser modificados em biopolímeros anfifílicos para ser empregados como agentes encapsulantes em sistemas de liberação de princípios ativos (PITOMBEIRA et al., 2015).

Devido ao fato de que o uso de GC *in natura* na formação de complexos é limitado por sua baixa carga aniônica, a goma foi acetilada como alternativa neste trabalho visando colmatar esta insuficiência e melhorar as interações para a formação de nanopartículas por complexação polieletrólítica. A acetilação do GC tem por objetivo conferir um caráter aniônico maior do que o encontrado na goma nativa, permitindo melhor interação com polímeros catiônicos para formação de nanopartículas.

2.3.3.2 Goma de cajueiro acetilada

As gomas naturais têm sido utilizadas em sistemas de liberação de fármacos e seu uso apresenta vantagens devido o baixo custo de obtenção e disponibilidade, além da biocompatibilidade (RANA et al., 2011). No entanto, esses materiais apresentam algumas desvantagens, como baixa taxa de controle de hidratação,

espessamento, viscosidade e suscetibilidade à contaminação microbiana (SINGH; SHARMA, 2008).

A GC *in natura* apresenta alta solubilidade em água e seu uso na formação de complexos para formação de nanopartículas é limitado, além de apresentar queda na viscosidade durante o armazenamento e possibilidade de contaminação microbiana. A modificação química da goma não apenas minimiza essas desvantagens, mas também permite uma entrega mais específica do medicamento (RANA et al., 2011) podendo melhorar a eficiência da incorporação do fármaco na matriz (ZHANG et al., 2009).

Polissacarídeos sendo hidrofílicos podem ser modificados a partir da inserção de moléculas tornando-se mais hidrofóbicos como na acetilação (PITOMBEIRA et al., 2015). A acetilação de GC tem sido realizada com o objetivo de melhorar a estrutura para aplicação em sistemas nanoestruturados biodegradáveis, buscando uma liberação mais controlada do fármaco e sua proteção gastrointestinal (DIAS et al., 2016).

A goma de acetilada (GCA) foi sintetizada e utilizada na formação de nanopartículas por automontagem para liberação controlada de indometacina que foi observada por até 72h (PITOMBEIRA et al., 2015).

Nanopartículas de GCA tem sido aplicadas com eficácia em sistemas de liberação prolongada de fármacos, a goma modificada foi utilizada na síntese de sistema de liberação nanoestruturado para incorporação de tamoxifeno para o tratamento de queiloide (MACEDO, 2015). NPs utilizando a goma modificada foram desenvolvidas para incorporação de diclofenaco de dietilamina, apresentando-se como sistema de liberação controlada do fármaco, bem como promotor de permeação *in vitro* (DIAS et al., 2016).

Em estudo realizado por Lima et al., 2018, a GCA foi aplicada em NPs para encapsulação de anfotericina B, com perfil de incorporação de 70% do fármaco e liberação sustentada por até 72h.

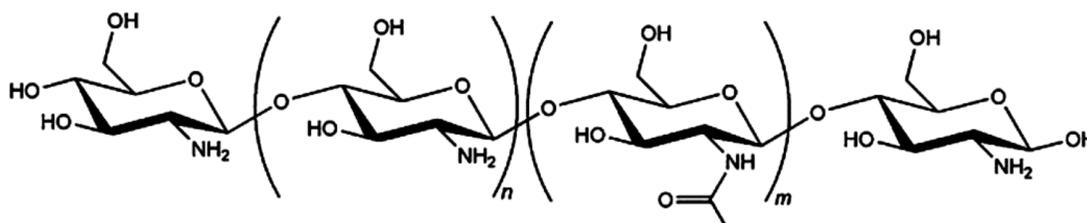
Apesar da melhora estrutural através da modificação, muitas das metodologias existentes para a acetilação de polissacarídeos envolvem a presença de solventes tóxicos, como piridina e formamida (SONG et al., 2013; ZHANG et al., 2014a).

Neste trabalho buscou-se desenvolver uma nova síntese de GCA por meio de uma reação livre de solvente.

2.3.3.3 Quitosana

A quitosana (QTS) é um polímero catiônico que possui grupamentos amins na estrutura responsáveis por conferir carga positiva à molécula. Sua principal forma é obtida a partir da desacetilação da quitina de crustáceos e trata-se de um polissacárideo polimérico linear constituído por moléculas de D-glucosamina e N-acetilglucosamina (ROBERTS, 1992; SHEPHERD et al., 1997) (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura química da quitosana



Fonte: Rodrigues et al., 2012.

A QTS é metabolizada por enzimas humanas como a lisozima sendo, dessa forma, considerada biodegradável, além de possuir propriedades mucoadesivas e biocompatíveis (MUZZARELLI, 1997; KOGA, 1998), apresenta solubilidade em pH baixo devido à protonação dos grupos amino e torna-se insolúvel em valores mais altos de pH (GEORGE; ABRAHAM, 2006; ILLUM, 1998). É um biopolímero com potencial para afetar temporariamente a estrutura das proteínas das junções entre as células no epitélio intestinal promovendo a absorção da insulina via paracelular e auxilia no prolongamento dos níveis sanguíneos da insulina pela superação da fagocitose pelo sistema mononuclear fagocitário (ARTUSSON et al., 1994; SCHIPPER et al., 1997; SARMENTO et al., 2011).

Em decorrência da presença de cargas negativas no muco intestinal, se faz necessário que as nanopartículas apresentem cargas opostas para que, através da interação, possa aumentar o tempo de permanência no local e conseqüentemente, obter uma maior absorção do fármaco (GEORGE; ABRAHAM, 2006). NP de

quitosana geralmente apresentam carga superficial positiva (MA et al., 2005; QIAN et al., 2006; LIN et al., 2007, REIS et al., 2008b).

A utilização de polímeros catiônicos no preparo de nanopartículas potencializa a captação paracelular, possibilitando o transporte de macromoléculas. Em estudo *in vitro* realizado com células do tipo Caco-2 (derivada de um adenocarcinoma de colón), utilizadas como modelo experimental bem aceito para mimetizar a barreira epitelial, foi observado que a QTS diminui a resistência elétrica trans-epitelial entre as células (VAN DER MERWE et al., 2004).

A QTS é considerada um promotor da absorção de fármacos, pois além da mucoadesividade, é capaz de alterar as junções paracelulares promovendo sua abertura transitória (FERNÁNDEZ-URRUSUNO et al., 1999; DYER et al., 2002), mecanismo explorado na administração de fármacos hidrofílicos (GEORGE; ABRAHAM, 2006). Acredita-se que a QTS também possa interagir eletrostaticamente com componentes das membranas celulares do epitélio. Foi observado sua atuação na translocação das proteínas ZO-1 e ocludina das membranas plasmáticas (SMITH et al., 2004; SHENG et al., 2016).

QTS tem sido utilizada na encapsulação de fármacos convencionais (MISIRLI et al., 2005); enzimas (TAQIEDDIN; AMIJI, 2004); anticorpos (ALBARGHOUTHI et al., 2000) e proteínas (CHEN et al., 2007; PORTERO et al., 2007).

Em meio ácido os grupamentos amina são protonados conferindo carga positiva à QTS; por outro lado em valores de pH superiores ao seu pK_a (6,2 – 7,0), adquire carga negativa e torna-se insolúvel (MANSOURI et al., 2004; SINHA et al., 2004).

Por possuir caráter catiônico, a QTS é capaz de interagir com outros polímeros que possuem caráter aniônico, sendo já utilizada no preparo de estruturas por complexação polieletrólítica como, por exemplo, com a goma de cajueiro (PAULA et al., 2011), o alginato e o sulfato de dextrano (WOITISKI et al., 2009a).

Em complexação polieletrólítica de QTS com alginato em sistemas para administração oral de proteínas, foi observado que a solubilização da QTS em meio ácido é inibida pela presença do alginato, uma vez que o alginato é insolúvel neste pH. Por outro lado a dissolução do alginato em pH elevado é controlada pela presença da QTS que mostra-se estável (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

A QTS é um biopolímero de considerável aplicação na proposta para o desenvolvimento de nanopartículas para sistemas de entrega de insulina por via

oral, uma vez que aumenta a permeabilidade de proteínas e peptídeos através das células epiteliais. Diante disso, tem sido utilizada como polímero único, copolímero, ou como revestimento para NPs poliméricas (DAMGÉ et al., 2008).

NPs de quitosana foram preparadas para administração de insulina por via oral por MA et al. (2005), a bioatividade das NPs em ratos diabéticos, na dose de 100 UI/kg, diminuiu acentuadamente os níveis glicêmicos de forma sustentada a partir de 10 h após a administração, com ação até 24 h. QTS também foi utilizada para o preparo de nanopartículas com o polímero sulfato de dextrano, a ação do sistema *in vivo* nas doses de 50 e 100 UI/kg foi capaz de controlar a glicemia reduzindo os níveis em até 22 e 27% com máxima ação após 14 horas (SARMENTO et al., 2007b).

Lin et al. (2007) utilizaram QTS e poli (ácido γ -glutâmico) na formação de NPs por gelificação ionotrópica, quando administradas a animais diabéticos foram capazes de reduzir os índices glicêmicos de forma dose-dependente (15 ou 30 UI/kg) de 2 a 10 horas após administração. QTS também tem sido aplicada como polímero de revestimento de NPs de PLGA (PAN et al., 2003); alginato e sulfato de dextrano (WOITISKI et al., 2009a).

2.3.4 Nanotoxicologia

O estudo toxicológico de uma substância avalia sua capacidade de causar dano ou morte a um organismo, isto ocorre através da interação entre a substância e o organismo vivo resultando em alterações reversíveis ou não, com efeito molecular, celular ou tissular e que podem até causar a morte do indivíduo (LOOMIS; HAYES, 1996; DRAIZE et al., 1944). Toda substância pode ser um agente tóxico, dependendo de variáveis de uso tais como dose, via de administração e frequência de exposição (CASTRO, 1993).

A avaliação dos dados toxicológicos possibilita a classificação toxicológica da substância analisada nas condições do teste, permitindo verificar se foram mantidas condições de exposição sob níveis de tolerância seguros nas condições avaliadas (BOELSTERLI, 2003); com isso indicando informações de sua forma adequada de uso, além de possibilitar o conhecimento de medidas preventivas e curativas em relação ao uso inadequado (TAHRAOUI et al., 2010).

O entendimento dos processos fisiológicos das nanopartículas após exposição ao trato gastrointestinal é fundamental para que a nanomedicina possa ser um tratamento seguro. Por apresentar tamanho em escala nanométrica, as nanopartículas são bastante úteis na medicina, entretanto tal característica pode ter importância toxicológica, pois quanto menor o tamanho da partícula, mais reativas e tóxicas podem ser, podendo alcançar locais-alvo sensíveis (OBERDÖRSTER et al., 2005a).

A escolha de materiais biocompatíveis e processos de produção livre de solventes é importante do ponto de vista toxicológico já que as características físico-químicas, estrutura e composição dos nanomateriais tem influência direta na atividade biológica dos mesmos (OBERDÖRSTER et al., 2005b). A determinação dos níveis tóxicos é de extrema importância no desenvolvimento e avaliação de uma formulação farmacêutica e para estabelecer o potencial *in vivo* na nanotecnologia e nanomedicina em particular (KAGAN et al., 2005; GARNETT; KALLINTERI, 2006), no entanto tais estudos em humanos ainda é limitado devido aspectos éticos, morais e legais.

Os protocolos de testes de toxicidade para NPs incluem, para além da análise estrutural, ensaios *in vitro* com testes de citotoxicidade (LEWINSKI et al., 2008; KONG, et al., 2011), seguidos de avaliação *in vivo* para corroboração dos resultados por meio de testes toxicológicos não clínicos com animais de laboratório sob condições padronizadas, tais experimentos são passíveis de valor de aplicação em humanos desde que realizados sob condições adequadas, com a escolha correta de dosagens, via de administração, linhagem animal e espécie (KYUNGEUN; MYUNG, 2007; MORTON, 1998; BOELSTERLI, 2003).

O teste toxicológico inicialmente realizado com uma nova substância é o estudo de toxicidade aguda que objetiva identificar efeitos tóxicos detectados após dose única múltipla de um agente (OECD, 2001), a fim de determinar os sintomas em curto prazo após a administração de um composto e os efeitos apresentados 14 dias após a administração (LARINI; OLIVEIRA, 1993); sendo efetuado na mesma via de administração utilizada para os humanos, sendo a via oral a mais usada (KLAASSEN et al., 1996). As informações obtidas são utilizadas em estudos subsequentes de toxicidade prolongada (LOOMIS; HAYES, 1996).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver um sistema nanoestruturado à base de goma de cajueiro acetilada, para administração oral de insulina.

3.2 ESPECÍFICOS

- Isolar e purificar a goma do cajueiro;
- Determinar o peso molecular da goma de cajueiro purificada;
- Acetilar a goma de cajueiro a partir de uma nova síntese por meio de uma reação livre de solventes;
- Caracterizar a goma de cajueiro acetilada por:
 - Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR);
 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H);
 - Análise elementar e solubilidade.
- Desenvolver nanopartículas a partir de goma de cajueiro acetilada para incorporação e liberação controlada de insulina;
- Caracterizar as nanopartículas de goma de cajueiro acetilada carregadas com insulina quanto aos parâmetros:
 - Medida de tamanho;
 - Índice de polidispersão;
 - Potencial zeta;
 - Morfologia.
- Quantificar a eficiência de incorporação da insulina nas NPs.
- Avaliar a liberação de insulina a partir das NPs *in vitro*.
- Verificar a atividade do sistema *in vivo* em ratos Wistar diabéticos.
- Avaliar a citotoxicidade da goma de cajueiro acetilada e das NPs desenvolvidas.
- Avaliar a toxicidade das NPs *in vivo* mediante tratamento por via oral durante 15 dias em ratos Wistar, sobre os parâmetros:
 - Perda de massa corporal;
 - Consumos de água e ração;

- Hematológicos e bioquímicos;
- Massa dos órgãos absoluta e relativa;
- Morfologia macro e microscópica dos órgãos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A GC foi isolada do exsudato coletado de árvores nativas em Parnaíba, Piauí, Brasil. Foi realizada a purificação da goma como um sal de sódio pelo método descrito por (PAULA et al., 1998). Quitosana de baixo peso molecular (50 kDa) foi adquirida da Sigma-Aldrich Chemie (França), Ácido láctico 90% adquirido da VWR BDH Prolabo (França); anidrido acético de grau analítico obtido da Dinâmica[®], Brasil; ácido trifluoroacético (TFA) 99% e acetonitrilo (LiChrosolv) foram obtidos da Sigma-Aldrich Company. (St Louis, MO, EUA). Insulina Humulin R[®] (100 UI/mL) foi comprada da empresa farmacêutica Lilly (São Paulo, Brasil). Estreptozotocina proveniente da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

A quitosana foi dissolvida em 0,5% (v/v) de solução de ácido láctico. As soluções foram preparadas em água ultrapura e filtrada em papel de filtro (Whatman, qualitativo 1), sob vácuo.

4.2 Determinação do peso molecular da goma de cajueiro por Cromatografia por exclusão de tamanho

O polímero foi analisado por um sistema de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) equipado com um desgaseificador *on-line*, um detector de índice de refração (RI) e um conjunto de colunas que inclui um protetor de coluna Shodex OHpak SB-G e as colunas OHpak SB-SB-802.5HQ e OHpak SB-804HQ. O polímero foi eluído com um fluxo de 0,5 mL/min com 0,1 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ (aq) / 1% ácido acético / 0,02% NaN₃ a 40 °C. Antes da injeção (50 µL), a amostra foi filtrada através de uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com tamanho de poro 0,45 µm. O sistema foi calibrado com cinco padrões estreitos de PEG e o peso molecular do polímero (M_nSEC) e Đ (M_w/M_n) foram determinados pela calibração convencional usando clareza software versão 2.8.2.648.

4.3 Síntese e caracterização da goma de cajueiro acetilada

As porções acetil foram introduzidas quimicamente no polissacarídeo GC, utilizando uma metodologia livre de solvente, adaptada do método descrito por (RIBEIRO et al., 2017). GC (1 g) foi suspenso em 8 mL de anidrido acético sob agitação magnética durante 5 min. Foi adicionado 6 mL de solução aquosa de NaOH a 50% sob agitação contínua por 90 min a 90 °C. A suspensão obtida como produto da reação foi dialisada utilizando uma membrana de acetato de celulose com um limite de peso molecular de 14000 Da, durante 48 horas a 25 °C, após foi congelada e liofilizada.

4.3.1 Caracterização por Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

GC e GCA foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho usando um espectrofotômetro FT-IR PerkinElmer, espectro 400, no módulo ATR, na faixa de 4000 a 700 cm^{-1} .

4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN ^1H)

A amostra de GC foi dissolvida em óxido de deutério (D_2O). A GCA foi dissolvida em uma mistura de D_2O (0,4 mL) e acetona- d_6 (0,3 mL). Os espectros foram obtidos no espectrômetro de RMN Agilent a 400 MHz a 50 °C. O sinal HDO foi usado como referência. O sinal foi deconvoluído e as integrações foram computadas de acordo com o protocolo GSD (BERNSTEIN et al., 2013), utilizando o software Mnova 11.04.

O grau de substituição (GS) dos grupamentos acetil foi calculado de acordo com a Equação 1, onde A é a área integral dos prótons acetil (1,8 a 2,4 ppm), B é a área integral de 3,0 a 5,5 ppm e n é a média ponderada da composição de GC pelo número de hidrogênios que não sofrem processo de troca química em cada monossacarídeo.

$$GS = \frac{A n}{3 B}$$

Equação. 1

4.3.3 Análise Elementar

A composição elementar foi obtida usando um analisador Perkin Elmer 2400 usando o método Pregl-Dumas em atmosfera de oxigênio puro e um detector de condutividade térmica.

4.3.4 Determinação da solubilidade em água

GC e GCA foram dissolvidas em água ultrapura em pH 7,4 em um estado supersaturado mantido a 25 °C por 24 horas sob agitação. Seguido por centrifugação a 3600 rpm por 30 minutos. A massa resultante foi seca em estufa e pesada (massa recuperada). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A solubilidade foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$S = \frac{m \times 100}{m_i} \quad \text{Equação. 2}$$

m = massa inicial (m_i) – massa recuperada

S = coeficiente de solubilidade

4.4 Preparação e caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas utilizando a técnica de complexação polieletrólítica de biopolímeros com cargas opostas. A GCA (0,1%) (p/v) foi dissolvida em água ultrapura *overnight* e filtrada através de papel de filtro Whatman 2, em seguida foi adicionada insulina 0,006% (p/v). Para obter a solução de quitosana, o polímero foi dissolvido em solução de ácido láctico a 0,5% (p/v) com agitação por 12 h, devido à sua baixa solubilidade. A complexação envolve a adição gota a gota de uma solução a pH 4,6 contendo 0,07% (p/v) de quitosana à primeira solução contendo GCA e insulina. Preparou-se uma formulação à temperatura ambiente sob agitação magnética a 800 rpm durante 40 min.

4.4.1 Análise do tamanho das partículas e Índice de polidispersão (pdl)

As medidas do tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram realizados através do espalhamento dinâmico de luz (espectroscopia de correlação de fótons) utilizando um analisador de partícula Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). As medições foram realizadas em triplicata a 25 °C com uma detecção de ângulo de 90°. Dados da espectroscopia foram apresentados como a distribuição média do tamanho da intensidade da partícula e o desvio padrão da média das medições do tamanho das partículas.

4.4.2 Potencial zeta

A carga superficial das nanopartículas foi determinada por eletroforese doppler laser, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). As medições foram realizadas em uma célula de eletroforese capilar dobrada (Malvern Instruments Ltd., UK) a 25 °C utilizando água ultrapura como diluente para uma concentração adequada. A análise dos dados do potencial zeta foi apresentada como média e desvio padrão de corridas triplicadas. O potencial zeta das soluções de GC (0,1%, p/v) antes e após a modificação também foi avaliado. As soluções foram preparadas em água ultrapura sob agitação overnight e filtradas através de papel de filtro (Whatman, qualitativo 1) sob vácuo. A estabilidade coloidal das nanopartículas foi monitorada por 4 meses. A análise estatística foi realizada usando o GraphPad Prism 6.0[®]. As diferenças entre os grupos foram determinadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak, ($p < 0,05$). Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P. M).

4.4.3 Análise morfológica

A morfologia das nanopartículas foi analisada por Microscopia de Força Atômica (MFA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A análise por MFA foi realizada com o auxílio de um microscópio de força atômica TTAFM (AFM Workshop, EUA) em modo vibratório (tapping). As áreas de

varreduras foram de 20 μm e foram realizadas após a deposição de 10 μL de nanopartículas em uma superfície limpa de mica, a amostra foi seca à temperatura ambiente. As imagens representativas secas foram realizadas usando cantilevers ACT-20 (AppNano - EUA) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 367 kHz. As imagens foram analisadas usando o software Gwyddion 2.47.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada utilizando um microscópio FEI Quanta 250 FEG (FEI Company, Holanda) operando entre 1 e 30 kV. As amostras liofilizadas foram fixadas a suportes de alumínio através de fita adesiva dupla face e revestidas com ouro.

4.4.4 Eficiência de incorporação de insulina

A eficiência da retenção de insulina foi determinada pela diferença entre a quantidade total de insulina usada para preparar as nanopartículas e a quantidade de insulina livre por quantidade total de insulina. Nanopartículas contendo insulina foram separadas do sobrenadante aquoso contendo insulina livre por centrifugação (10.000 rpm por 30 min a 4 °C), a quantidade de insulina livre foi determinada em triplicata por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A diferença entre a quantidade inicial de insulina e a insulina no sobrenadante corresponde à quantidade de insulina retida nas partículas.

4.4.5 Teste de liberação *in vitro*

Para caracterizar o perfil de liberação de insulina em condições que simulam o gradiente de pH no trato gastrointestinal (TGI), 12,5 mL de suspensão aquosa de nanopartículas foram incubadas em 25 mL de tampão HCl/KCl de pH 1,2 sem pepsina (USP 34) a 37 °C por 120 min sob agitação, seguido de incubação de partículas em 25 mL de tampão fosfato pH 6,8 sem pancreatina (USP 34) até 24h. As amostras foram recolhidas e substituídas pelo mesmo volume de meio de incubação fresco em tempos pré-determinados. Para determinação da insulina liberada das nanopartículas, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4 °C por 30 min, e o sobrenadante foi analisado por HPLC.

4.4.6 Quantificação de insulina

A insulina foi quantificada de acordo com a metodologia adaptada do método descrito por (SARMENTO et al., 2006b). A insulina foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência usando um sistema HPLC LC-10AD VP (Shimadzu, Japão) equipado com uma bomba quaternária, um detector de conjunto de fotodiodos UV/VIS ajustado a 214 nm e uma coluna de fase reversa C18 Ascentis[®], 5 µm, 25 cm x 4.6 mm (Supelco, USA). A fase móvel foi composta de acetonitrila (Ac) e solução aquosa de ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA) operada em modo gradiente a vazão de 1.0 mL min⁻¹ inicialmente ajustada na razão de 30:70 (Ac: TFA), que foi alterada para 40:60 (Ac : TFA) em 5 min para eluição ao longo de 5 min, e alterado para 30:70 (Ac: TFA) para eluição ao longo de 15 min. Os cromatogramas foram registrados e as respostas da área do pico foram medidas utilizando um integrador automático.

4.5 Citotoxicidade

A linhagem de células utilizada neste estudo foi adenocarcinoma colorretal humano (HT-29) obtido do Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil e mantida em cultivo no Laboratório de Bioprospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX) do Departamento de Antibióticos da UFPE.

As células foram cultivadas em frascos de cultura utilizando meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas a 37° C em atmosfera com 5 % de CO₂. Para o plaqueamento, as células foram tratadas com tripsina a 1% para desaderência da superfície dos frascos de cultura.

A atividade citotóxica foi determinada pelo método do MTT, pela redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazol pela atividade de enzimas desidrogenases, resultando em cristais de formazan de cor púrpura. Em uma placa de 96 poços foram adicionados, em cada poço, 100µL de uma solução de meio de cultura contendo 3 x 10⁵ células/mL e aguardado um período overnight para aderência das células à superfície da placa. Após a aderência, as amostras foram adicionadas aos poços em diferentes concentrações e as placas foram mantidas em

estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 72 h. Após o tempo de tratamento, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço e, após 3 h de incubação, todo o sobrenadante foi aspirado e adicionado 100 µL de DMSO a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi obtida por espectrofotometria em leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Foram realizados dois experimentos independentes, sendo cada amostra testada em três replicatas. A significância na redução da viabilidade foi calculada a partir da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism, v. 7.0.

4.6 Atividade biológica do sistema *in vivo*

4.6.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) entre 2-3 meses de idade, com massa corporal entre 280-320 g, provenientes do Biotério do Depto. de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE. Os animais receberam água e dieta (Presence[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro), umidade (55%) e temperatura (22 ± 2 °C). Todos os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, processo nº 0041/2018.

4.6.2 Indução do Diabetes *Mellitus*

O Diabetes *mellitus* foi induzido em ratos Wistar pela administração de estreptozotocina (STZ, 50 mg/kg, i.p.) dissolvida em 3% (p/v) de tampão citrato 0,1M (pH = 4,5). Os animais foram submetidos ao jejum de 12 h com livre acesso à água e divididos em quatro grupos (n=6). A glicemia de todos os animais foi aferida antes da administração de STZ, utilizando um glicosímetro On Call Plus[®] (Acon Biotech Co., Ltda). Três dias após a administração da STZ, os animais com glicemia de jejum maior do que 200 mg/dL e mostrando sinais de poliúria e polidipsia foram considerados diabéticos e incluídos no estudo (VASCONCELOS et al., 2011).

4.6.3 Tratamento

Após a confirmação do diabetes, os animais foram alocados randomicamente em quatro grupos (n = 6/grupo):

Grupo I - Diabético tratado por via oral com água (Controle diabético).

Grupo II - Diabético tratado por via oral com nanopartículas de GCA sem insulina (NPGCA).

Grupo III - Diabético tratado por via oral com nanopartículas de GCA com insulina na dose de 50 UI/kg (NPGCA INS).

Grupo IV - Diabético tratado por via subcutânea com insulina regular na dose de 4 UI/kg (INS sc) – referência.

As nanopartículas foram suspensas em água de modo a obter uma concentração de 50 UI/mL. No caso das nanopartículas sem insulina, utilizou-se uma concentração de NPGCA equivalente às correspondentes NPGCA contendo insulina. As nanopartículas com ou sem insulina foram administradas oralmente por meio de gavagem utilizando uma sonda endogástrica. As administrações foram realizadas após um período de 12 h de jejum e após confirmação do estado hiperglicêmico dos ratos diabéticos. Foram recolhidas amostras sanguíneas da ponta da cauda dos animais para determinação glicêmica em intervalos pré-determinados (0,5; 1; 2; 3; 6; 12 h após a administração das formulações).

4.7 Avaliação toxicológica das nanopartículas *in vivo*

Os animais foram tratados durante 15 dias consecutivos. Durante o tratamento, a massa corporal, ingestão de alimentos e água dos animais foram registrados diariamente. Sinais clínicos de toxicidade e mortalidade foram registrados diariamente (MALONE, 1977). Os resultados foram comparados a animais saudáveis sem indução de diabetes (grupo controle sadio, n=6).

Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 h, com água *ad libitum* e em seguida, anestesiados com xilazina (6 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg, i.p.). Após a anestesia, procedeu-se a coleta de sangue por punção da veia cava inferior. O sangue foi coletado em dois tubos: o tubo 1 contendo ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA), um anticoagulante para parâmetros hematológicos e o tubo 2 sem anticoagulante, para parâmetros bioquímicos.

4.7.1 Parâmetros Hematológicos

As análises hematológicas foram determinadas imediatamente após a coleta através do analisador hematológico automático (Micro-60, Horiba®). Foram determinados os parâmetros de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição das hemácias (RDW - red cell distribution width) e volume plaquetário médio (VPM). A contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos e granulócitos) foi realizada com May-Grünwald-Giemsa, em cada caso, 100 células foram contadas.

4.7.2 Parâmetros Bioquímicos

Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 1480 × g durante 10 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado a -20 °C até serem determinados os seguintes parâmetros: glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina e Gama glutamil transferase (GGT). As dosagens foram feitas usando sistemas comerciais de diagnóstico padronizados da Boehringer Ingelheim® (COSTA-SILVA et al., 2008).

4.7.3 Análise morfológica

Após a anestesia e coleta de sangue pela veia cava inferior (para a remoção do sangue), a necropsia foi realizada nos animais (n=6) para analisar as características externas macroscópicas do fígado, rins e pâncreas. Os órgãos foram cuidadosamente removidos e pesados individualmente. As massas dos órgãos foram expressas em termos absolutos e relativos (g e g/100g de massa corporal, respectivamente).

Foi realizado o exame histológico nos animais (n=6). Os mesmos órgãos foram cuidadosamente removidos e fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água e imersas em álcool a 70% até a realização da análise histológica. Em seguida, os órgãos foram impregnados e incluídos em parafina, de onde foram obtidos cortes com espessura de 5 μ m. As lâminas histológicas foram analisadas após coloração com hematoxilina-eosina (HE). A análise histológica dos órgãos foi feita utilizando um sistema de captura de imagens Nikon/Motic®/ImageJ.

4.8 Análise estatística

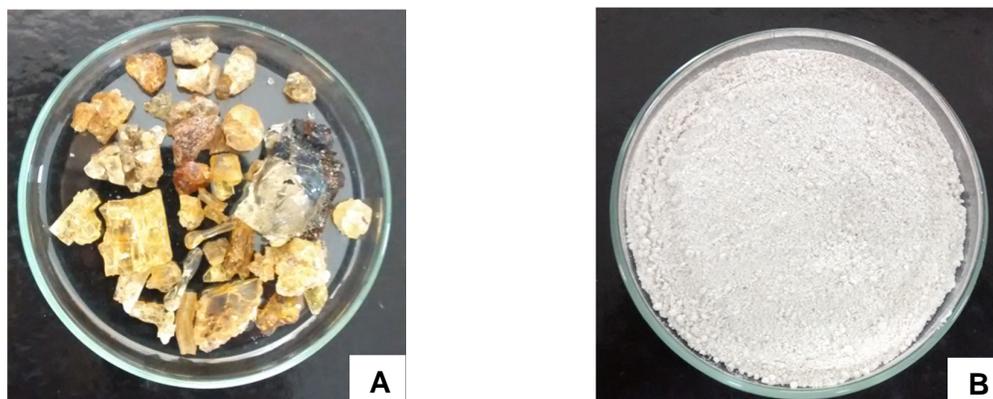
Os valores dos grupos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). As diferenças entre os grupos foram verificadas, por meio da análise de variância (ANOVA), seguida, pelo teste de Newman-Keuls ou pelo teste *t* de Student para amostras não pareadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism® 7.0. O nível de significância para rejeição da hipótese nula foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da goma do cajueiro

O exsudato do cajueiro *in natura*, uma resina de cor marrom (Figura 6A) foi submetido ao processo de purificação resultando na goma de cajueiro, um pó branco (Figura 6B), assim como referido previamente por Rodrigues et al., (1993).

Figura 6 - Exsudato extraído de cajueiro (A) e goma de cajueiro após purificação (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

O método utilizado foi descrito por Rodrigues et al. (1993) como o melhor método de isolamento e purificação da goma de cajueiro. Além das boas características observadas na goma obtida pelo método (sólido branco, boa solubilidade em água e transparência da solução), é um método relativamente rápido, com bom rendimento, apresenta menor possibilidade de contaminação, além de proporcionar maior homogeneidade do material isolado.

Os polissacarídeos naturais brutos normalmente apresentam sais inorgânicos e outros materiais de baixo peso molecular misturados à sua composição, tais como lignina, proteínas e ácidos nucléicos que são retirados durante o processo de isolamento e purificação do material (KENNEDY; WHITE, 1983; ASPINALL, 1982).

5.2 Determinação do peso molecular da goma de cajueiro por Cromatografia por exclusão de tamanho

O peso molecular da GC foi determinado pela técnica de cromatografia de exclusão de tamanho, usando os marcadores de caracterização da distribuição de peso molecular, M_n (peso molecular numérico médio), M_w (peso molecular ponderal médio) e \mathcal{D} (polidispersividade) calculada pelo quociente M_w/M_n (tabela 1). Durante o processo de purificação do material, é de extrema importância que os tratamentos aplicados ao polissacarídeo não o descaracterizem, garantindo a manutenção intacta da sua estrutura e/ou massa molar média.

Tabela 1 - Pesos moleculares médios (M_n e M_w) e polidispersão (\mathcal{D}) da goma de cajueiro.

M_n	M_w	\mathcal{D}
19700	23500	1,20

Valores semelhantes de massa molar ponderal foram verificados em outros estudos. No estudo realizado por Moura (2009), a goma do cajueiro apresentou massa molar estimada de $2,32 \times 10^4$ g/mol, valor aproximado ao apresentado em nosso estudo, corroborando os resultados. Dados semelhantes também foram observados em estudo realizado por Neto et al. (2011), onde a goma do cajueiro apresentou massa molar de pico igual a $2,3 \times 10^4$.

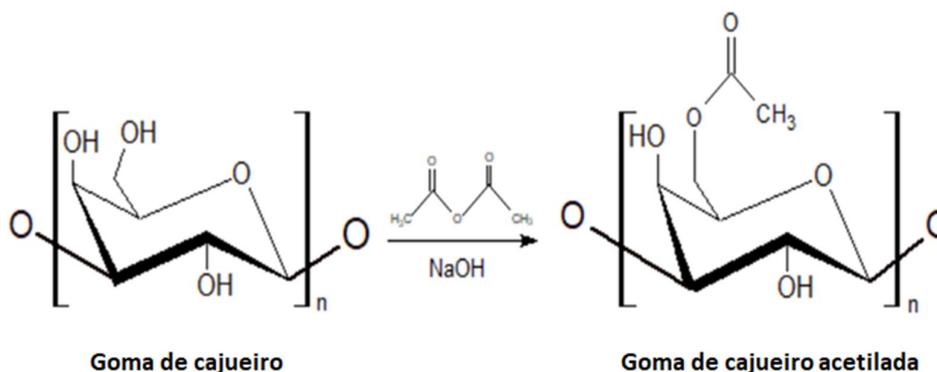
5.3 Síntese e caracterização da goma de cajueiro acetilada

No presente estudo, a GC foi submetida a um processo de modificação química, onde os grupamentos acetil foram introduzidos em sua estrutura em um processo livre de solventes, utilizando apenas NaOH e anidrido acético, resultando na goma de cajueiro acetilada (Figura 7).

Figura 7 - Goma de cajueiro acetilada

Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido à alcalinidade do NaOH ocorre-se um enfraquecimento das ligações de hidrogênio intermoleculares, o que permite uma maior acessibilidade à estrutura do polímero, aumentando a área superficial e diminuindo o grau de polimerização (RODRIGUES, 2016). Isto facilita a reação de acetilação entre as hidroxilas reativas da goma e o anidrido acético (Figura 8).

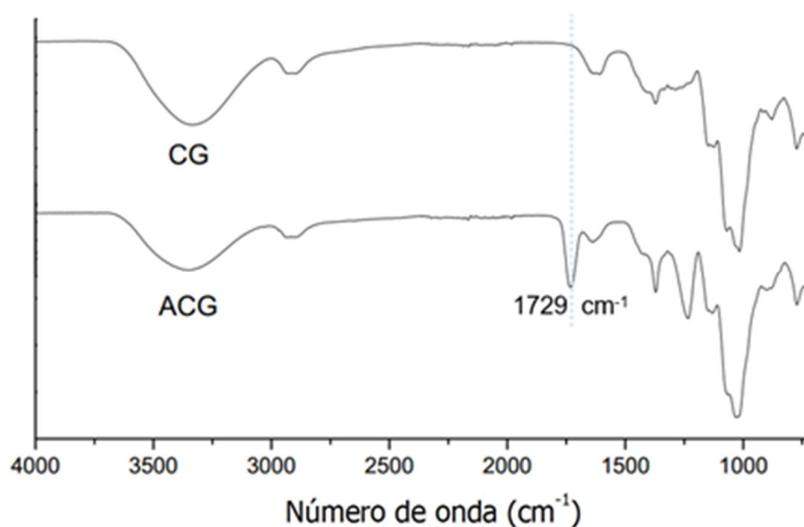
Figura 8 - Esquema simplificado da reação de acetilação da GC

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de FTIR de GC e GCA estão representados na Figura 9. O espectro de FTIR para GC mostrou uma banda a 3336 cm^{-1} devido à vibração de alongamento de O-H, uma banda a 2916 cm^{-1} de vibrações de C-H e bandas a 1145 , 1070 e 1022 cm^{-1} devido a vibrações do C-O-C de ligações glicosídicas e O-H de álcoois (PITOMBEIRA et al., 2015). Em contraste com o espectro de GC bruta, a

GCA apresenta bandas de vibração nas regiões de 1729 cm^{-1} em relação a C=O e em 1239 cm^{-1} característica de C-O. Essas bandas são atribuídas ao grupo éster carbonílico do grupamento acetil e demonstram a acetilação do polímero (RIBEIRO et al., 2017).

Figura 9 - Espectros de FTIR para GC e GCA

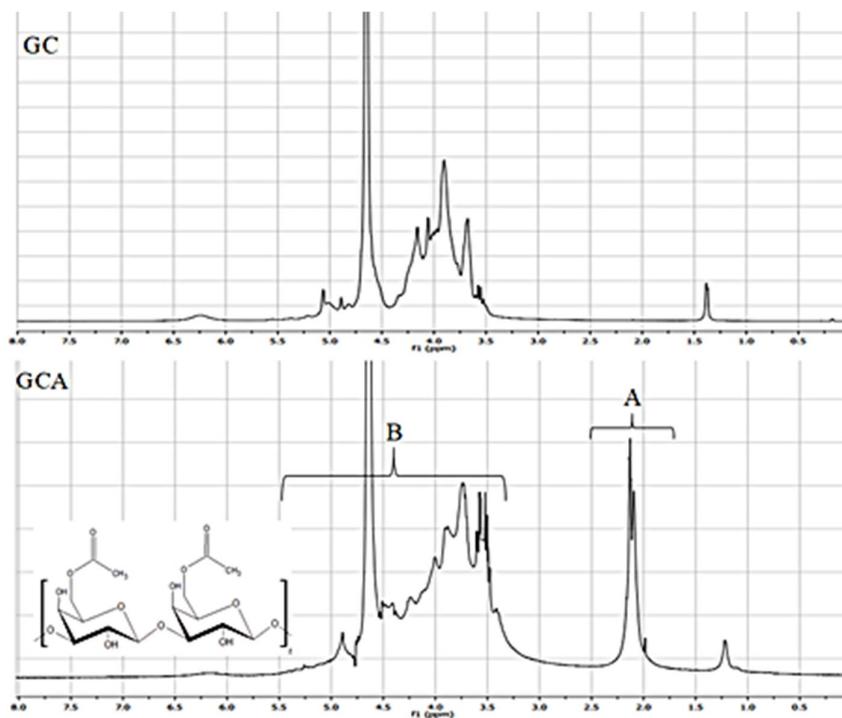


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de ^1H NMR para GC e GCA são apresentados na Figura 10. O espectro de GC mostra um sinal a 1,1 ppm característico da presença de CH_3 de ramnose. Os sinais a 3,0 e 5,5 ppm são característicos dos prótons H-1 a H-6 presentes no polissacarídeo. O espectro de GCA mostra um novo sinal em 1,8 a 2,4 ppm devido ao grupo acetil inserido (LIMA et al., 2018; PITOMBEIRA et al., 2015). O grau de substituição (GS) da GC foi calculado utilizando o espectro de ^1H NMR. Teramoto; Shibata (2006) derivaram uma equação para calcular o GS em pululano acetilado, usando DMSO-d_6 como solvente. A área integral dos grupos H1 e OH do monossacarídeo e a área integral do grupo acetil foram usados para calcular GS. No presente trabalho, as gomas foram solúveis em água e D_2O foi usado como solvente para experimentos de RMN. É bem conhecido que os grupos OH trocam o hidrogênio por deutério em meio D_2O . Os núcleos de deutério não são detectáveis no espectro de ^1H . Portanto, a Eq. 1 levou em conta apenas os hidrogênios que não

passaram pelo processo de troca química (ou seja, H1 a H6). Aplicando a Eq. 1 o GS foi medido para a GCA sendo igual a 0,33.

Figura 10 - Espectro de ^1H NMR para GC e GCA



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise elementar houve um pequeno aumento na razão C/H devido ao grupo acetil inserido e a presença de mais C promoveu pequenas alterações no GS e solubilidade como podemos observar na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados de análise elementar e solubilidade aquosa de GC e GCA.

	C (%)	H (%)	mmol (C)	mmol (H)	C/H	Solubilidade (g/100g H ₂ O)
GC	39,01	6,60	32,51	66,0	0,49	97,7 (± 0,42)
GCA	40,09	6,67	33,41	66,7	0,50	82,3 (± 2,52)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A solubilidade da GCA e da GC foi avaliada através do coeficiente de solubilidade. Ambos os polímeros foram dissolvidos em água ultrapura com pH 7,4. Devido o baixo GS, a GCA apresentou solubilidade em água menor que a GC, porém mantendo-se ainda com boa solubilidade aquosa. Trabalho realizado por (KIM et al, 2018), mostrou a agregação de água na GC em função do pH, quando a goma foi dissolvida na faixa de pH de 6,2 - 9, apresentou melhor solubilidade.

A literatura relata reações de acetilação realizadas com diferentes tipos de catalizadores como NaOH (COLUSSI et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017), piridina (PITOMBEIRA et al., 2015; DIAS et al., 2016) e ácido sulfúrico (LIMA et al., 2018). O tipo e a concentração dos catalizadores, bem como as variações de tempo e temperatura de reação, podem promover modificações nas hidroxilas livres das unidades monossacarídicas, resultando em polissacarídeos com baixo, médio e alto grau de substituição (COLUSSI et al., 2014).

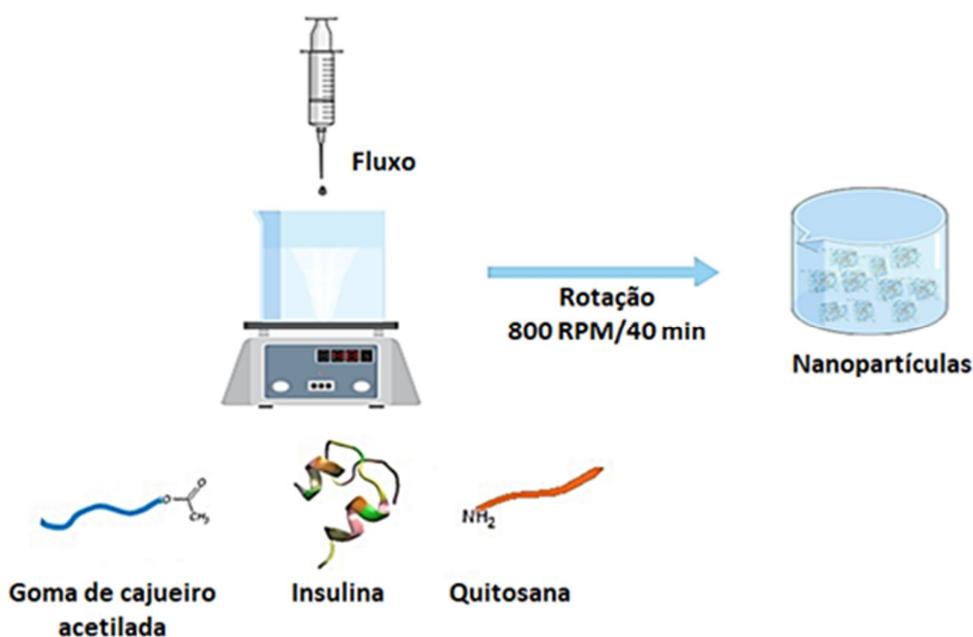
Em nosso estudo, o baixo GS obtido garante ao polímero boa solubilidade em água, permitindo assim o transporte e a liberação de fármacos solúveis em meio aquoso. Outros estudos têm promovido uma alta hidrofobização da GCA direcionando seu uso para o transporte de substâncias ativas hidrofóbicas (PITOMBEIRA et al., 2015, LIMA et al., 2018).

Avaliando a carga superficial do GCA, observou-se um aumento no potencial zeta (-22,8 mV), indicando que o modificado se comporta como bom polieletrólito, devido a presença dos grupamentos acetil. Enquanto a GC apresentou carga (-9,26 mV), sendo considerado um polieletrólito fraco por apresentar poucos grupos ácidos cerca de 4,5% (RIBEIRO et al., 2016). Com base nas suas características GCA apresenta um ambiente favorável para a obtenção de sistemas de liberação de fármacos.

5.4 Preparação e caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram formuladas pela adição gota a gota de solução aquosa de quitosana em solução contendo GCA e insulina (Figura 11). As nanopartículas do complexo polieletrólítico foram formadas pela interação das cargas opostas dos biopolímeros.

Figura 11 - Esquema de preparação das nanopartículas de GCA



Fonte: Elaborado pelo autor.

O tamanho médio de partícula do sistema nanoestruturado determinado por espalhamento de luz dinâmico foi de 470 nm para nanopartículas de GCA sem insulina (NPGCA) e 460 nm para nanopartículas com insulina (NPGCA INS). A confirmação da formação das nanopartículas foi dada pela presença do efeito de Tyndall, através da visualização da suspensão opalescente.

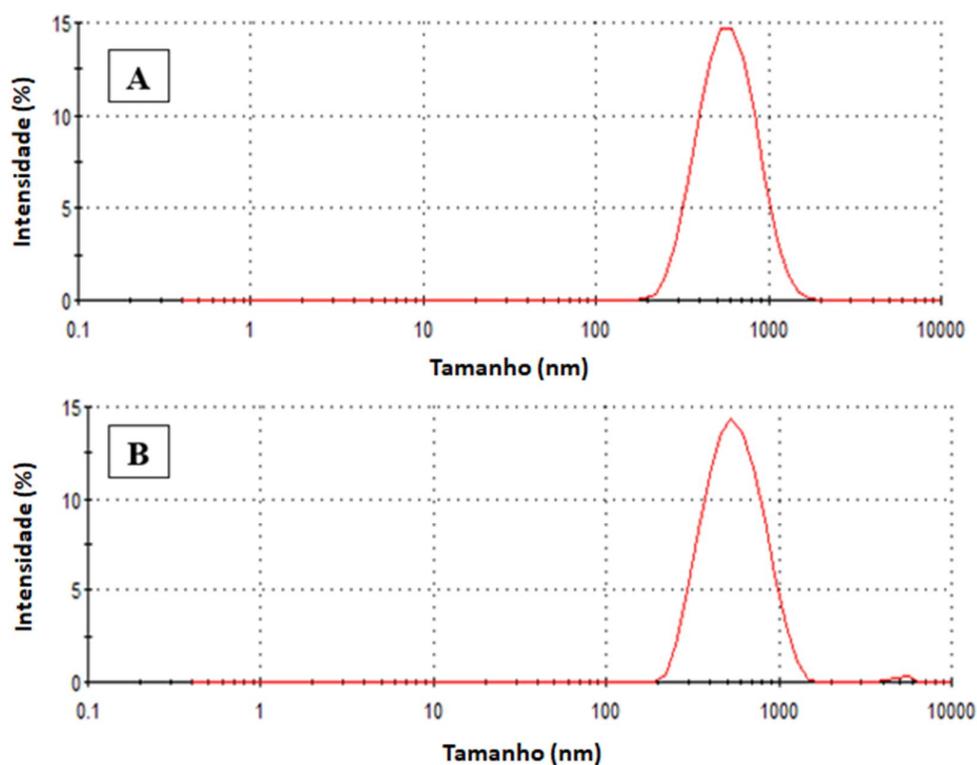
A distribuição granulométrica das nanopartículas foi unimodal, como mostra a figura 12.

Sistemas com GC *in natura* também foram preparados, variando as concentrações de goma e quitosana. No entanto, não houve formação de

nanopartículas com boa qualidade, pois os sistemas apresentaram alta polidispersão, alto tamanho e baixa estabilidade. Este fato ocorre devido à baixa carga superficial disponível na estrutura da goma que não pode interagir proporcionalmente com as cargas presentes na quitosana, o que influencia diretamente na não formação do complexo polieletrólítico.

O tamanho das nanopartículas é um fator importante para a absorção gastrointestinal (NORRIS et al., 1998; DESAI et al., 1996; SAEZ et al., 2000), além de influenciar outros fatores como a distribuição corporal (JANI et al., 1990), mucoadesão (TAKEUCHI et al., 1996; GOTO et al., 2006) e perfil de liberação (RITGER; PEPPAS, 1987). O limite máximo de diâmetro para que as partículas possam ser absorvidas no meio intestinal é 10 μm (ELDRIDGE et al., 1986; DESAI et al., 1997; JUNG et al., 2000). Um estudo anterior relatou que nanopartículas menores que 1000 nm permitiram a absorção de insulina através da atividade de transcitose das placas de Peyer, que são ricas em células-M no epitélio intestinal (LOPES et al., 2014).

Figura 12 - Distribuição do tamanho de partícula (determinada por DLS) de nanopartículas de GCA sem (A) e com insulina (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

As nanopartículas apresentaram índice de polidispersão de 0,3 e 0,2 para NPGCA e NPGCA INS, respectivamente, indicando boa distribuição do tamanho das partículas, que por se apresentar $\leq 0,3$ indica reduzida polidispersividade entre as partículas. A estabilidade coloidal das nanopartículas foi verificada por 4 meses, sem alterações estatísticas no tamanho das partículas, como visto na Tabela 3.

Tabela 3 - Estabilidade coloidal de nanopartículas de GCA com insulina.

Tempo (meses)	Tamanho Média (nm)	Índice de Polidispersão (pdl)	Potencial zeta (mV)
0	460 ± 11,0	0,2 ± 0,021	30,6 ± 0,48
1	447 ± 8,3	0,2 ± 0,009	30,3 ± 0,95
2	442 ± 14,8	0,2 ± 0,010	30,0 ± 0,14
3	434 ± 7,3	0,3 ± 0,026	30,2 ± 0,82
4	385 ± 6,5	0,3 ± 0,054	30,5 ± 0,34

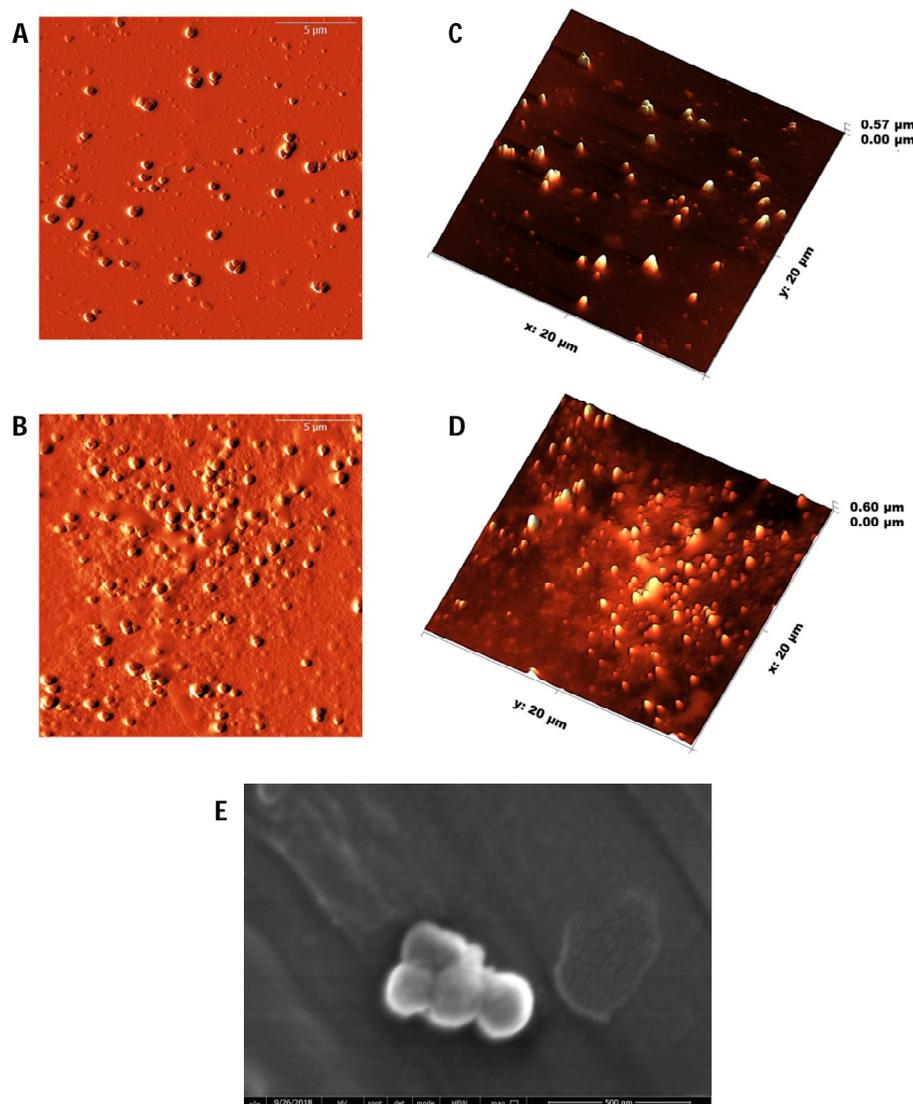
Fonte: Elaborado pelo autor.

O potencial zeta caracteriza a carga elétrica global da superfície de uma partícula, determinando a mobilidade eletroforética das partículas que é mensurada pela sua velocidade por unidade de campo elétrico que é aplicado sobre a dispersão de íons no diluente com força iônica. Os resultados do potencial zeta indicam a estabilidade eletrostática das nanopartículas com valores superiores a 30 mV ou inferiores a 30 mV, relacionados à nanopartículas com menor tendência de formação de agregados (BENITA; LEVY, 1993). Os resultados mostram que as nanopartículas são positivamente carregadas com valores de potencial zeta de 30,6 mV para as nanopartículas carregadas com insulina e 30,3 para as nanopartículas sem insulina, indicando um sistema estável (MOHANRAJ; CHEN, 2006). A carga superficial da nanopartícula medida pelo potencial zeta é um parâmetro importante para a caracterização dos sistemas de liberação de fármacos, pois determina a interação e penetração através das barreiras fisiológicas de absorção intestinal (KUMARI et al., 2010).

O resultado indica uma elevada estabilidade, quando grandes forças repulsivas impedem a agregação pelo impacto aleatório de partículas adjacentes, ocasionando maior repulsão entre as mesmas (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

Devido à presença de cargas negativas no muco intestinal, é necessário que as nanopartículas tenham cargas opostas para que, através da interação, possa aumentar o tempo de permanência no local e conseqüentemente obter uma maior absorção do fármaco (GEORGE; ABRAHAM, 2006). A morfologia das nanopartículas de GCA pode ser vista na figura 13, na qual pode-se observar nanopartículas esféricas.

Figura 13 - Nanopartículas com insulina (A-C) e sem insulina (B-D) analisadas por MFA e NPGCA INS analisada por SEM (E)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Eficiência de incorporação de insulina e estudos de liberação *in vitro*.

A eficiência da retenção de insulina indica a quantidade de insulina aprisionada e retida no sistema de nanopartículas. O valor da eficiência de incorporação da insulina nas nanopartículas foi de 52,5%. A liberação de insulina *in vitro* a partir de nanopartículas foi determinada em meio gástrico mimetizado,

seguido de transferência para fluido intestinal mimetizado para melhor simular condições de correlação *in vitro* / *in vivo*. Como pode ser visto na Figura 14A, a liberação de insulina das NPs a pH 1,2 após 2 horas foi de 34%. Neste pH, a insulina é carregada positivamente e portanto, as interações com os grupos carboxílicos da GCA supostamente impedem a liberação de insulina. Em comparação com nanopartículas de alginato contendo insulina, que possui maior quantidade de grupos carboxílicos, a GCA formou uma matriz polimérica mais fraca, não sendo capaz de reter tanta insulina e limitar sua liberação das nanopartículas sob condições de pH gástrico simuladas (LOPES et al., 2015).

Quando adicionado ao meio intestinal simulado, o aumento do efeito do pH desencadeou a liberação de insulina das nanopartículas. A liberação de insulina no meio intestinal está relacionada à dissolução da GC devido à repulsão eletrostática desestabilizadora da matriz de nanopartículas entre a goma carregada negativamente e a insulina em pH 6,8. A insulina apresenta um ponto isoelétrico em pH aproximado de 5,3. Quando o pH está acima do ponto isoelétrico, a insulina apresenta carga negativa e estando abaixo deste ponto, apresenta carga positiva (CHIEN, 1996).

Por outro lado em pH 6,8, a quitosana se torna insolúvel, desestabilizando a estrutura das nanopartículas e a liberação de insulina das NPs ocorreu principalmente dentro de 2 horas em meio intestinal simulado, seguido por uma liberação lenta de até 24 horas, com 51% de liberação de insulina. Estudos prévios com nanopartículas de biopolímero também preparadas por complexação de polieletrólito mostraram um perfil de liberação de insulina que atingiu a liberação máxima após 30 min em contato com o pH intestinal, alcançando equilíbrio após 150 min de estudo em condições gastrointestinais sem liberação posterior (WOITISKI et al., 2009a).

As nanopartículas de GCA forneceram uma liberação sustentada de insulina. Lima et al. (2018) desenvolveu nanopartículas de GCA carregadas com anfotericina b apresentando liberação controlada, que atingiu 70% de liberação, após 35 h.

O mecanismo pelo qual a insulina foi liberada das nanopartículas foi analisado com modelos matemáticos de cinética de ordem zero; de primeira ordem (BRAVO et al., 2002); Higuchi (HIGUCHI, 1963); Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER; PEPPAS, 1981); Hixson-Crowell (HIXSON; CROWELL, 1931) e Peppas-Sahlin (PEPPAS; SAHLIN, 1989). Os parâmetros para a determinação do mecanismo de

liberação foram analisados estatisticamente pelo Software DDSolver (ZHANG et al., 2010) e apresentados na Tabela 4. O modelo de Peppas-Sahlin foi melhor para descrever o mecanismo de liberação de insulina baseado no critério estatisticamente baixo (akaike information criteria-AIC) e maior R^2 (coeficiente de correlação) quando comparado aos outros modelos que apresentaram má adaptação de curva com valores relativamente baixos de coeficiente de correlação.

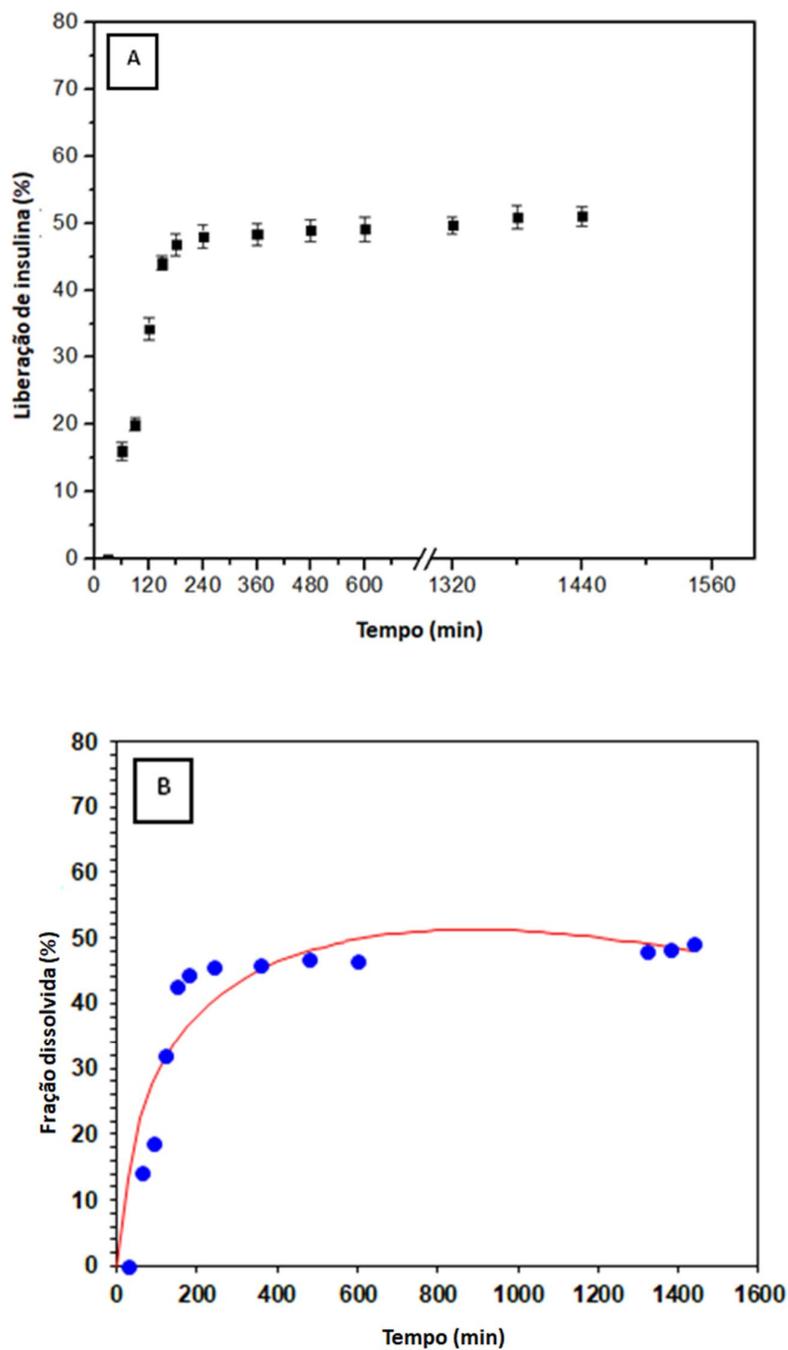
A equação de Peppas-Sahlin foi aplicada (PEPPAS; SAHLIN, 1989): $M_t / M_\infty = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$, onde k é uma constante de liberação incorporando características do sistema polimérico e do fármaco; m é o expoente de difusão fickiano; $k_1 t^m$ é a contribuição fickiana; $k_2 t^{2m}$ é a contribuição do relaxamento e inchaço da matriz polimérica (ZARZYCKI et al., 2010). A curva ajustada com o modelo Peppas-Sahlin é mostrada na Figura 14B. O coeficiente de correlação (R^2) = 0,94 obtido sugere que o comportamento de liberação *in vitro* pode ser descrito por tal equação, este resultado indica que a liberação de insulina ocorre como um processo de duas etapas que consiste na combinação de difusão Fickiana e relaxamento das cadeias poliméricas (EBADI et al., 2018; LYRA et al., 2007; ZHANG et al., 2014b).

Table 4 - Dados do modelo cinético para avaliação da liberação de insulina das nanopartículas.

Modelo Cinético	Equação	R^2	AIC	K_1	K_2	m	n
Peppas-Sahlin	$M_t/M_\infty = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$		89,83	4,87	-	0,45	
Ordem zero	$Q = Q_0 - k_0 t$	0,9400	119,13	-	0,1	-	
Primeira ordem	$\ln Q_t = -kt + \ln Q_0$	0,5830	114,07	0,0009	1	-	
Higuchi	$M_t/M_\infty = kt^{0,5}$	0,6696	105,37	-	-	-	
Korsmeyer-	$M_t/M_\infty = kt^n$	0,7058	97,54	-	-	-	0,2617
Peppas	$(1 - M_t/M_\infty)^{1/3} = 1 - kt$	0,8059	116,43	-	-	-	
Hixson-Crowell		0,6454			-		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Perfil de liberação de insulina das nanopartículas *in vitro* em fluido gástrico simulado de pH 1,2 por 120 minutos seguido de meio intestinal em pH 6,8 a 37 °C (A) e mecanismo associado à liberação *in vitro* do fármaco de acordo com o modelo de Peppas-Sahlin (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Citotoxicidade

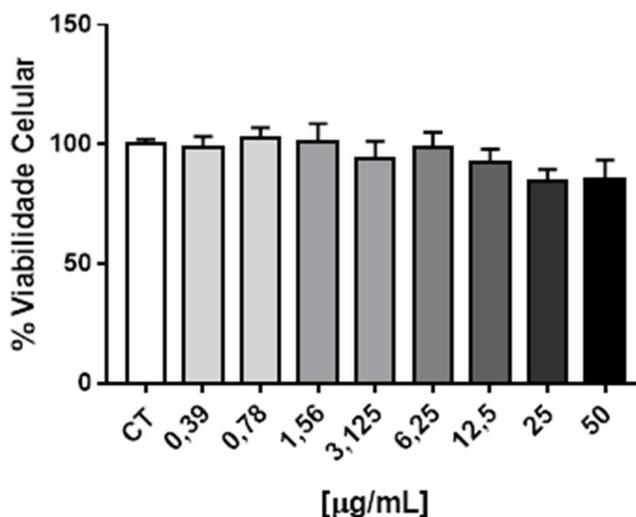
A atividade citotóxica foi determinada pelo método do MTT, que consiste na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazol pela atividade de enzimas desidrogenases, resultando em cristais de formazan de cor púrpura. Esta redução ocorre de acordo com a viabilidade metabólica das células. Logo, quanto maior o valor da absorbância óptica do formazan, maior é a viabilidade celular (MOSMANN, 1983; LIU et al, 1997).

A Figura 15 mostra a ausência de citotoxicidade *in vitro* da GCA e das NPs de GCA utilizando a linha celular HT-29 (adenocarcinoma colorretal humano).

A goma modificada por acetilação não apresentou toxicidade até a concentração testada de 50 µg/mL. Em estudo realizado com micelas conjugadas de goma arábica-curcumina, a avaliação da citotoxicidade pelo teste de MTT, apresentou citotoxicidade para as células MCF-7 e ausência de citotoxicidade para os tipos de células HepG2 na mesma concentração testada (3,125 g/mL).

Estudo realizado por Dias et al., (2016) em teste de citotoxicidade com goma de cajueiro acetilada, também apresentou ausência de toxicidade para as células escamosas de carcinoma oral até a dose testada de 150 µg/mL.

Figura 15 - Ausência de efeito citotóxico da GCA sobre a linhagem HT-29 após 72 h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± e.p.m (n = 3), analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. CT: Controle



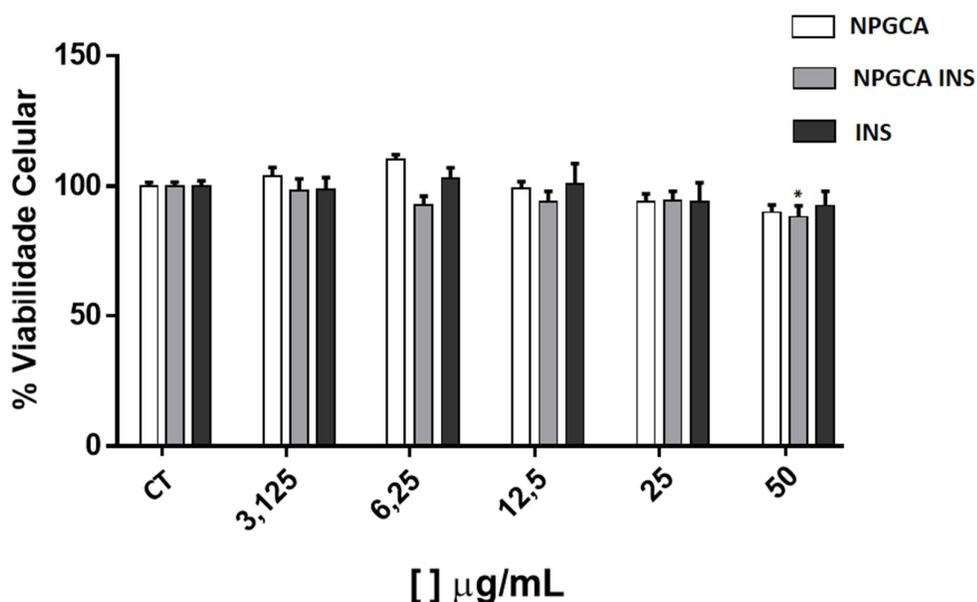
Fonte: Elaborado pelo autor.

As nanopartículas (com ou sem insulina) não apresentaram citotoxicidade até uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16). Apesar da diferença estática em relação ao controle ser observada para as nanopartículas contendo insulina na dose de 50 $\mu\text{g/mL}$, tal diferença não foi considerada efeito citotóxico visto que manteve a viabilidade acima de 70%. Viabilidade celular acima de 70% é considerada como indicativo de ausência de toxicidade (SEVERINO et al., 2014).

Nanopartículas à base de goma de cajueiro acetilada desenvolvidas para incorporação de diclofenaco de dietilamina, também não apresentaram citotoxicidade para células escamosas de carcinoma oral (OSCC). As nanopartículas (com ou sem o fármaco) não apresentaram toxicidade basal até uma concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ (DIAS et al., 2016).

Figura 16 - Viabilidade celular de HT-29, CT: controle; INS: Insulina livre; NPGCA: nanopartículas de GCA sem insulina; NPGCA INS: nanopartículas de GCA com insulina. Valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 3).

*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Atividade biológica do sistema *in vivo*.

Atualmente a administração da insulina é realizada por via subcutânea sendo invasiva pela necessidade das várias injeções diárias, além de não mimetizar a ação da insulina endógena e causar vários efeitos secundários. A via oral seria a mais fisiológica e mais cômoda para o diabético, além de mimetizar a ação da insulina endógena tendo uma distribuição mais homogênea no organismo após efeito da primeira passagem hepática (OWENS et al., 2003). No entanto, a biodisponibilidade oral da insulina é baixa pela elevada atividade proteolítica e baixa permeabilidade no trato gastrointestinal (DELIE; BLANCO-PRIETO, 2005). Estudos *in vivo* com administração de solução de insulina não encapsulada por via oral em ratos diabéticos demonstrou que a insulina sozinha não pode ser absorvida de forma suficiente para induzir um efeito biológico, não reduzindo a glicemia dos animais (REIS et al., 2007; WOITISKI et al., 2010).

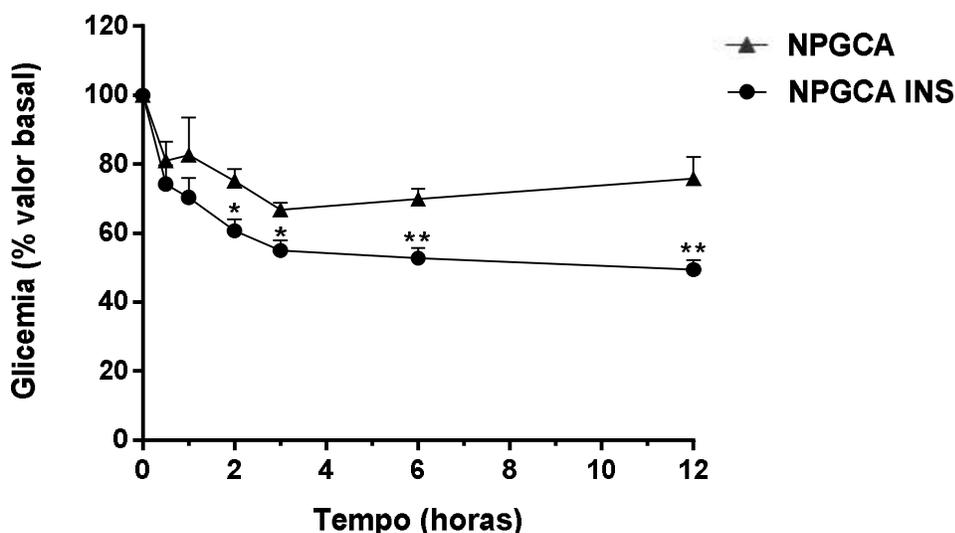
A resposta glicêmica das nanopartículas carregadas com insulina foi examinada por administração oral em ratos diabéticos em jejum de 12 h na dose de 50 UI/kg ou nanoesferas vazias como controle. Como ilustrado na Figura 17, as nanopartículas carregadas com insulina (50 UI/kg) diminuíram a glicemia de forma significativa quando comparadas com os ratos tratados com as nanopartículas vazias, apresentando diferença significativa a partir de 2 horas (-40%, $p < 0,05$), após esta fase inicial, os níveis de glicemia diminuíram até 12 h após administração das nanoesferas atingindo 49% da glicemia basal. Foi observado que a administração das nanopartículas sem insulina também reduziu a glicemia atingindo o valor de 67% da glicemia basal após 3 h de administração e 75% após 12 h.

O exsudato da goma de cajueiro é rico em fibras capazes de se ligar à água formando géis que resulta em uma camada superficial ao longo do epitélio intestinal capaz de estabilizar o metabolismo energético e controlar os aumentos bruscos dos níveis glicêmicos nos diabéticos (ANDRADE et al., 2013). CG em preparações solúveis em água apresentou propriedades antidiabéticas (LIMA et al., 2006; SILVA et al., 2018).

Nanopartículas de alginato e sulfato de dextrano contendo insulina revestidas com quitosana e albumina quando administradas a ratos diabéticos na dose de 50 UI/kg, reduziram os níveis de glicemia para 40% do valor basal com efeito hipoglicemiante sustentado ao longo de 24 horas (WOITISKI et al., 2010).

Estudo anterior realizado com nanopartículas de alginato revestidas com quitosana contendo insulina, na dose de 50 UI/kg, mostrou resultado de eficácia a partir de 2 horas após administração das nanopartículas, reduzindo de forma constante os níveis de glicemia, alcançando 36% da glicemia basal, 14 h após administração (REIS, 2007).

Figura 17 - Glicemia após administração oral única de NPGCA com insulina (50 UI/kg, ●) e sem insulina (NPGCA, ▲). Os valores representam as médias \pm e.p.m. (n = 6/grupo). *Estatisticamente diferente das nanopartículas sem insulina, Teste *t* de Student para amostras não pareadas

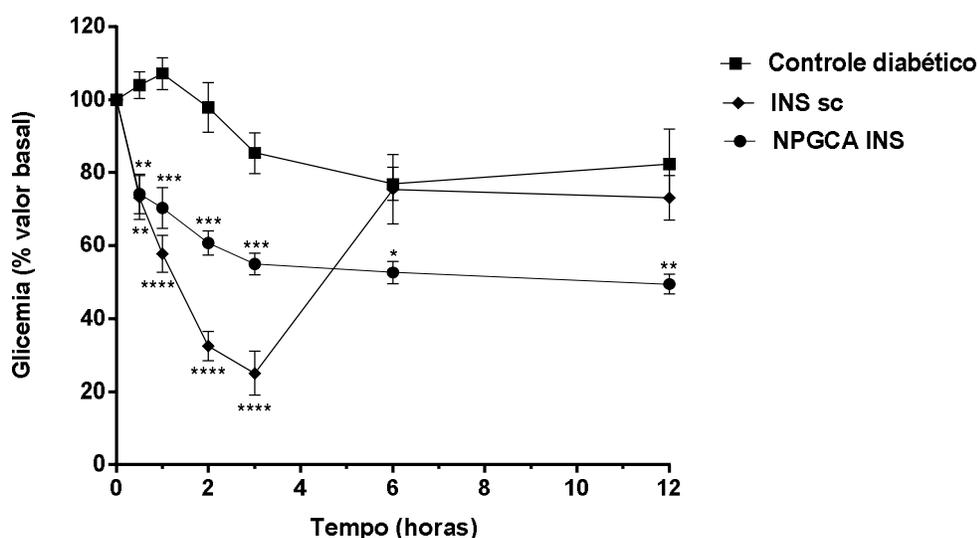


Fonte: Elaborado pelo autor.

O efeito das nanopartículas foi comparado ao efeito da insulina subcutânea utilizada comercialmente (Figura 18). O grupo controle não tratado, apresentou redução lenta da glicemia de 2 para 6 horas. Resultados semelhantes foram observados por Reis et al., 2007., nesse período de tempo, devido possivelmente a gliconeogênese. Em contraste, um efeito de redução da glicose plasmática foi observado para a insulina injetada por via subcutânea a partir de meia hora após administração, alcançando maiores níveis de diminuição após 3 h atingindo 25% do valor inicial. Os valores basais de glicemia foram retomados após 6 horas, assim como observado em estudos anteriores (SHENG et al., 2016; LOPES et al., 2015).

As NPs com insulina, administradas por via oral, reduziram o aumento inicial dos níveis de glicemia observado nas primeiras horas de forma significativa quando comparado com o grupo diabético não tratado mantendo o controle dos níveis glicêmicos como observado até 12 h. A redução glicêmica atingida pelo sistema nanoestruturado foi de 51% após 12 horas. O sistema composto por GCA e quitosana mostrou-se estável ao longo do TGI, protegendo a insulina que pode ser liberada de forma sustentada ao longo do tempo estudado.

Figura 18 - Níveis de glicemia de ratos diabéticos recebendo NPGCA com insulina (50 UI/kg, v.o., ●); insulina regular – referência – INS (4 UI/kg, s.c., ◆) ou veículo (controle diabético, ■). Os dados representam as médias \pm e.p.m. (n=6/grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle não tratado. ANOVA seguido pelo teste de Newman-keuls



Fonte: Elaborado pelo autor.

A influência da ação mucoadesivas da quitosana é capaz de conferir mucoadesividade das NPs em meio intestinal, aumentando o tempo de permanência das mesmas no epitélio intestinal favorecendo a absorção e o aumento da biodisponibilidade oral da insulina; além de ser utilizada para aumentar a estabilidade das nanoesferas por minimizar a perda de material incorporado (REIS et al., 2008b; HUGUET et al., 1994).

Além disso, a quitosana funciona como um potenciador de permeabilidade, pois é capaz de alterar reversivelmente as junções apertadas entre células intestinais, pela sua ação despolimerizante sobre a F-actina celular e a proteína ZO-1 da junção, permitindo a passagem de partículas (SCHIPPER et al., 1997).

Em adição a isto, a GC é conhecida também por sua aplicação em sistemas de liberação controlada. Em trabalho realizado por Maciel et al. (2006), géis de GC e quitosana acetilada foram desenvolvidos para liberação de cloridrato de pilocarpina; onde foi observado uma desaceleração na liberação de pilocarpina em géis contendo GC, comprovando seu potencial efeito de liberação controlada. A liberação de pilocarpina a partir da matriz apresentou-se de forma independente de pH (MACIEL et al., 2006).

Tal propriedade também foi observada na GC modificada por acetilação, estudos empregando a GCA por diferentes vias de modificação, mostraram o potencial uso da goma acetilada em sistemas de liberação de fármacos controlados.

Nanopartículas compostas essencialmente por GCA via automontagem para incorporação de indometacina, apresentaram liberação controlada do fármaco por um período de até 72h (PITOMBEIRA et al., 2015).

Em estudos posteriores, a GCA foi empregada para o desenvolvimento de NPs em sistemas de liberação prolongada de fármacos como diclofenaco de dietilamina (DIAS et al., 2016) e anfotericina B (LIMA et al., 2018), este último apresentando liberação sustentada observada por até 72h.

O tempo de ação da insulina regular administrada pela via subcutânea, em geral varia de 2-4 horas, este tempo curto de efeito resulta na necessidade de várias injeções ao longo do dia para controle glicêmico (CHIEN, 1996; TREHAN; ALI, 1998). Além disso, pela via subcutânea a insulina não é distribuída de forma adequada no organismo, por não ter o monitoramento hepático que ocorre com a distribuição da insulina endógena, isso acarreta, em alguns casos, efeitos de hiperinsulinemia periférica, além de causar alterações nos tecidos nos locais das injeções repetidas tais como lipodistrofia e lipoatrofia (OWENS et al, 2003; LAUTERBACH; GOYMANN, 2015; ZHANG et al., 2015).

Em contraste a isto, as NPs desenvolvidas a partir de GCA conseguiram controlar a liberação de insulina por mais tempo no organismo na dose testada, apresentando-se como um potencial sistema para administração de insulina por via

oral, sem a necessidade das injeções subcutâneas, trazendo um tratamento mais cômodo e melhorando a qualidade de vida do diabético.

5.8 Avaliação toxicológica das nanopartículas *in vivo*

A segurança de uso de substâncias químicas e formulações para humanos é comumente realizada em animais objetivando prever níveis de toxicidade e fornecer orientações para a seleção de uma dose confiável para administração (RHIOUANI et al., 2008). Estudos toxicológicos pré-clínicos apresentam boa correlação e valor de aplicação na espécie humana (MORTON, 1998; OLSON et al., 2000).

Apesar dos vários benefícios da nanomedicina, se faz necessário avaliar os desafios quanto ao aspecto toxicológico, portanto, é importante utilizar materiais de mínimo risco toxicológico no desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados visando evitar possíveis efeitos tóxicos (DONALDSON et al., 2004).

A avaliação toxicológica das nanopartículas é fundamental para fornecer informações de segurança de uso ou riscos; determinar o nível de exposição em seres humanos e outros organismos e avaliar o impacto ambiental dos produtos nanotecnológicos (CHAN, 2006).

O presente trabalho pretendeu avaliar o efeito das nanopartículas de goma de cajueiro acetilada com ensaios toxicológicos baseados na avaliação de sinais clínicos de toxicidade, variação de massa corporal; consumo de água e ração; além de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos, após administração oral, em dose única diária, da formulação a ratos diabéticos, durante o período de 15 dias. O tempo de ensaio foi baseado em estudos anteriores que avaliaram os efeitos tóxicos de nanopartículas de alginato e quitosana (REIS, 2007) e polialquilcianoacrilato (FERNÁNDEZ-URRUSUNO et al., 1995). As formulações não produziram morte em nenhum grupo no período de 15 dias de observação.

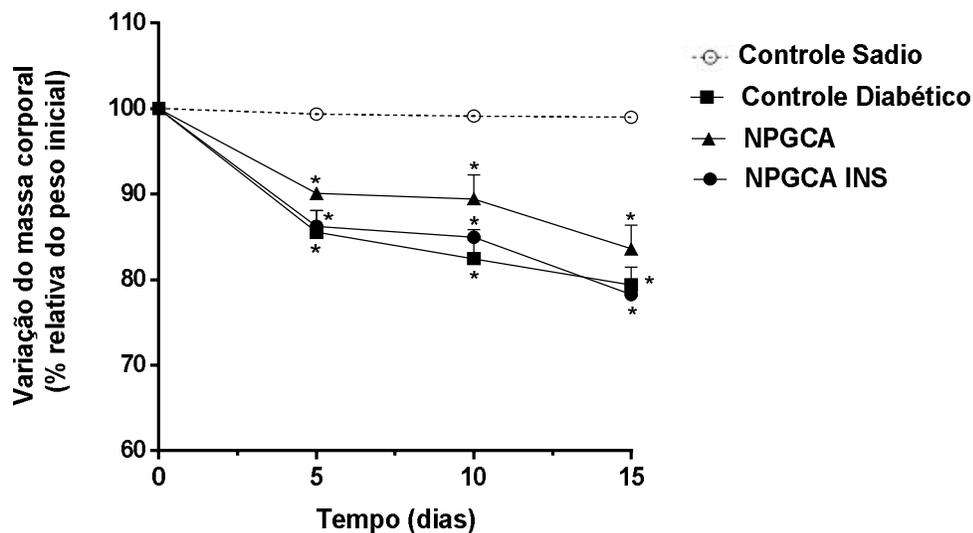
Alteração no ganho de massa corporal no estudo de toxicidade é considerado um parâmetro importante a ser avaliado, mudanças nesses valores podem indicar um efeito tóxico do fármaco, podendo ser um indicador de efeito colateral (RAZA et al., 2002).

A variação de massa corporal foi avaliada ao longo do experimento e calculada de acordo com a porcentagem de variação em relação a massa corporal inicial dos animais. Os resultados obtidos demonstraram que os animais diabéticos

perderam massa corporal independente do tratamento recebido quando comparados com o grupo controle sadio (Figura 19). O diabetes *mellitus* é uma doença crônica que induz alterações metabólicas alterando o metabolismo proteico, resultando na diminuição da massa muscular e conseqüentemente massa corporal (WORKENEH; BAJAJ, 2013). Além disso, a administração de estreptozotocina causa efeito redutor de massa corpórea nos animais (AL-ACHI; GREENWOOD, 2001).

O grupo diabético não tratado apresentou perda de massa corporal durante todo o período do tratamento, alcançando 79% do valor inicial após 15 dias. Não foram observadas perda de massa corporal nos grupos tratados com as nanopartículas com e sem insulina (% relativa do peso inicial de 78 e 83%, respectivamente) quando comparados com o grupo diabético não tratado, demonstrando que a diminuição da massa corporal provavelmente está relacionada com o próprio diabetes. No grupo tratado com as NPs contendo insulina, após 15 dias foi observada uma diminuição de massa (78% relativo ao peso inicial); diante dos resultados de controle glicêmico descritos anteriormente pelas NPs com insulina, era esperado que a perda de massa corpórea do grupo tratado fosse minimizada em comparação com animais não tratados, tal resultado não foi observado provavelmente por insuficiência da dose administrada (uma dose diária), uma vez que os animais tiveram livre acesso à comida. Na condição diabética, apesar do apetite ser estimulado, perde-se peso, visto que os nutrientes da dieta não podem ser armazenados (GOLAN et al., 2009).

Figura 19 - Efeito das nanopartículas de goma de cajueiro acetilada administradas por via oral sobre a variação de massa corporal (g) em ratos Wistar machos tratados durante 15 dias consecutivos. NPGCA: nanopartículas de GCA; NPGCA INS: nanopartículas de GCA com insulina. Os valores representam as médias \pm e.p.m. (n = 6/grupo). *Estatisticamente diferente do controle sadio (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$)



Fonte: Elaborado pelo autor.

O monitoramento do consumo de alimentos e água em estudos com animais pode ser um indicador sensível de toxicidade na avaliação toxicológica nos animais (BORZELLECA, 1996). Os animais diabéticos não tratados apresentaram aumento no consumo de água durante todo o estudo, resultado esperado pelas condições de polidipsia e poliúria apresentadas no diabetes (GOLAN et al., 2009). No entanto não foram observadas diferenças significativas no consumo de água dos animais diabéticos tratados com as nanopartículas com e sem insulina quando comparados com o grupo não tratado (Figura 20A), o tratamento com a dose testada (50 UI/kg) não demonstrou influência sobre o quadro de polidipsia apresentado pelos animais.

Os resultados mostrados na Figura 20B também revelam que não houve uma redução significativa na ingestão de alimentos nos grupos que receberam as nanopartículas desde a primeira semana do estudo até o final do tratamento, quando comparado com o grupo diabético não tratado. O efeito polifágico observado nos animais diabéticos, quando comparado ao grupo sadio, não foi revertido com o tratamento utilizando as nanopartículas com insulina na dose em teste. No entanto, a ausência de aumento polifágico dos animais tratados com NPs contendo insulina,

sugere ausência de efeitos tóxicos pela formulação além de evidenciar que a insulina encontra-se incorporada e protegida no TGI.

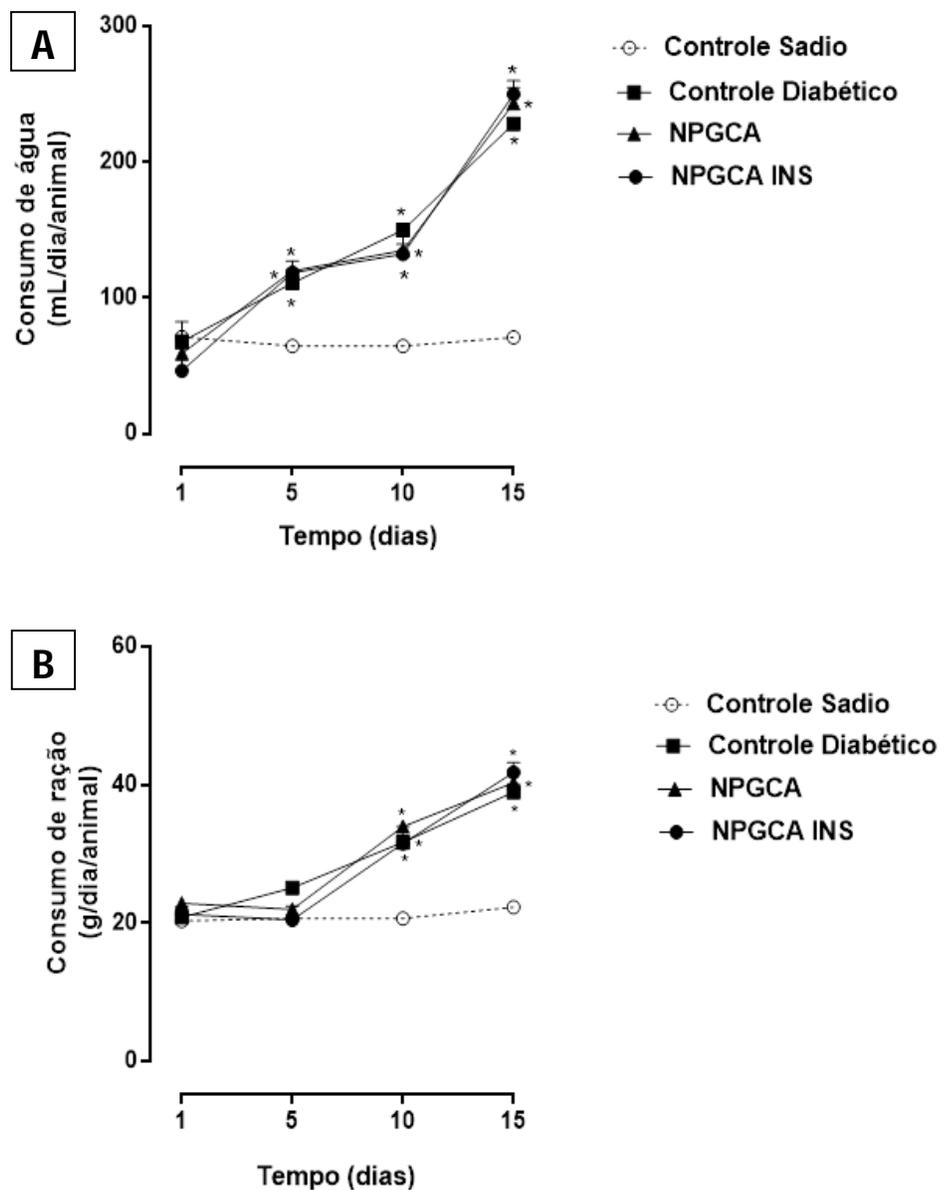
Em estudos realizados apenas com a solução de insulina administrada por via oral, foi observado que a insulina isolada no TGI é capaz de reduzir o fluxo sanguíneo no local e conseqüente fluxo para o fígado, diminuindo a motilidade e afetando a absorção de nutrientes, como conseqüência, os animais apresentaram aumento na polifagia além de apresentar perda de massa corpórea (SAFFRAN et al., 1997).

A polifagia é um dos sintomas conhecidos do diabetes, a incapacidade de utilização adequada dos nutrientes provenientes da dieta, provoca o estímulo do apetite resultando em fome excessiva (GOLAN et al., 2009). As células não apresentam funcionamento normal de recebimento de glicose, o que ativa no sistema nervoso central, o mecanismo de resposta de falta de energia conduzindo a condição polifágica (SINDELAR et al., 2002).

A ingestão de água e sua excreção através dos rins são reguladas por um mecanismo homeostático, o centro da sede é estimulado por quimiorreceptores das regiões supraótica e paraventricular do hipotálamo ajustando o equilíbrio de osmolaridade corporal (MAGALDI, 1996).

Nos pacientes diabéticos, o fenômeno de polidipsia já é bastante conhecido, os níveis sanguíneos de glicose aumentados induzem o aumento da osmolaridade plasmática, promovendo a passagem da água do meio intracelular para o meio extracelular, o centro da sede é ativado para restabelecer o equilíbrio de osmolaridade plasmática provocando a polidipsia (LERCO et al., 2003). Os níveis glicêmicos ultrapassam a capacidade dos rins de reabsorver a glicose através do filtrado glomerular, a glicose permanente na urina provoca a diurese osmótica causando a poliúria (GOLAN et al., 2009). Apesar do efeito de redução da glicemia observado nos animais tratados com as nanopartículas com insulina, tal efeito não foi suficiente para restabelecer a homeostase e regular a osmolaridade plasmática nos animais diminuindo a ingestão de água na dose testada.

Figura 20 - Efeito das nanopartículas de goma de cajueiro acetilada administradas por via oral sobre o consumo de água (A) e ração (B) em ratos Wistar tratados durante 15 dias consecutivos. NPGCA: nanopartículas de GCA; NPGCA INS: nanopartículas de GCA com insulina. Os valores representam as médias \pm e.p.m. (n = 6/grupo). *Estatisticamente diferente do Controle sadio (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8.1 Parâmetros Hematológicos

O perfil hematológico dos grupos controles e tratados são mostrados na tabela 5. Para todos os grupos, nenhuma diferença clínica significativa foi registrada em qualquer um dos parâmetros analisados.

Tabela 5 - Efeito das nanopartículas de GCA administradas por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 15 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle Sadio	Controle Diabético	NPGCA	NPGCA INS
Eritrócitos ($10^9/\mu\text{L}$)	6,03 \pm 0,35	7,48 \pm 0,68	6,05 \pm 1,68	7,79 \pm 0,10
Hemoglobina (g/dL)	10,06 \pm 0,64	12,34 \pm 0,86	9,77 \pm 2,63	12,38 \pm 0,15
Hematócrito (%)	32,46 \pm 2,17	40,86 \pm 3,88	32,73 \pm 5,92	41,97 \pm 0,71
VCM (fL)	53,80 \pm 0,80	54,40 \pm 0,60	53,67 \pm 0,56	53,83 \pm 0,48
HCM (pg)	16,62 \pm 0,14	16,68 \pm 0,42	16,23 \pm 0,13	15,92 \pm 0,12
CHCM (g/dL)	30,94 \pm 0,34	30,58 \pm 0,94	30,20 \pm 0,51	29,55 \pm 0,26
RDW (%)	13,20 \pm 0,18	13,92 \pm 0,45	13,30 \pm 0,20	13,55 \pm 0,19
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	215,6 \pm 46,2	399,4 \pm 138,4	371,7 \pm 89,9	390,0 \pm 45,0
VPM (fL)	8,64 \pm 0,21	8,34 \pm 0,76	8,03 \pm 0,35	7,93 \pm 0,25
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	3,36 \pm 0,67	4,48 \pm 1,05	2,90 \pm 0,06	3,45 \pm 0,81
Linfócito (%)	69,54 \pm 2,19	65,80 \pm 1,46	64,65 \pm 2,40	61,98 \pm 4,13
Monócito (%)	12,56 \pm 2,54	12,86 \pm 1,13	12,60 \pm 1,73	17,22 \pm 1,47
Granulócito (%)	17,90 \pm 0,73	21,34 \pm 1,42	22,75 \pm 0,66	20,80 \pm 3,11

Valores representam a média \pm erro padrão da média (n = 6/grupo). VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias e VPM: Volume Plaquetário Médio.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise dos parâmetros sanguíneos é de grande importância para a avaliação de risco e as mudanças no sistema hematológico têm grande valor preditivo para a toxicidade humana, quando os dados são convertidos de estudos com animais (OLSON et al., 2000). No presente estudo, o tratamento com NPGCA com e sem insulina não alterou o perfil hematológico.

5.8.2 Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos dos grupos controles e tratados são apresentados na tabela 6. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis séricos de ureia, creatinina, AST, ALT, colesterol total; triglicerídeos e GGT.

Todos os grupos diabéticos apresentaram diferença significativa nos níveis glicêmicos quando comparados com o grupo controle sadio, indicando aumentos dos índices em 528,9% para o controle diabético; 512,7% em animais tratados com NPGCA e 248,6% para os ratos tratados com NPGCA INS na dose de (50 UI/kg, uma dose diária). As nanopartículas com insulina apresentou redução significativa nos índices glicêmicos de 44,5% quando comparado com os animais diabéticos não tratados e 43,1% quando comparado à nanoesferas vazias.

Em comparação com o grupo sadio observou-se um aumento no nível de fosfatase alcalina nos animais diabéticos não tratados (144,2%) e diabéticos tratados com as NPs com e sem insulina (152,1 e 141,3%, respectivamente). Diferenças significativas também foram observadas entre os grupos tratados com as nanopartículas em relação ao grupo diabético, apresentando um aumento nos níveis de fosfatase alcalina de 35,2 % para o grupo NPGCA e 21,47% para o grupo NPGCA INS.

Tabela 6 - Efeito das nanopartículas administradas por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos tratados por 15 dias consecutivos

Parâmetros	Controle Sadio	Controle Diabético	NPGCA	NPGCA INS
Glicose (mg/dL)	81,8 ± 1,8	514,4 ± 44,6 ^a	501,0 ± 46,4 ^a	285,2 ± 11,0 ^{ab}
Ureia (mg/dL)	9,75 ± 1,11	45,26 ± 15,26	28,33 ± 13,45	47,00 ± 13,3
Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,03	0,60 ± 0,06	0,51 ± 0,003	0,60 ± 0,05
AST (U/L)	247,63 ± 25,10	210,58 ± 27,46	207,23 ± 33,77	211,27 ± 50,11
ALT (U/L)	60,71 ± 9,78	76,89 ± 13,99	82,47 ± 32,66	85,33 ± 24,62
Colesterol total (mg/dL)	91,00 ± 13,44	79,20 ± 22,26	87,67 ± 15,97	54,50 ± 5,90
Triglicerídeos (mg/dL)	50,17 ± 5,84	127,20 ± 27,73	59,67 ± 20,20	62,67 ± 23,52
Fosfatase alcalina (U/L)	224,7 ± 29,37	548,8 ± 36,07 ^a	542,2 ± 31,47 ^a	566,6 ± 46,12 ^a
GGT (U/L)	7,15 ± 1,71	15,37 ± 3,49	13,98 ± 4,88	18,90 ± 6,97

NPGCA: nanopartículas de GCA; NPGCA INS: nanopartículas de GCA com insulina. Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 6/grupo). AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina-aminotransferase e GGT: Gama glutamil transferase. ^a Estatisticamente diferente do Controle Sadio; ^b estatisticamente diferente do Controle Diabético. (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p <0,05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Metabólicos provenientes da biotransformação de polímeros podem ser em alguns casos hepatotóxicos, causando o aumento dos níveis de enzimas hepáticas além de outros componentes bioquímicos. A fosfatase alcalina é uma enzima em nível de membrana localizada em vários tecidos com maior expressão no epitélio biliar, osso e fígado onde atua como indicadora de colestase hepática e hepatopatia (REIS, 2007).

O aumento das enzimas hepáticas nos animais diabéticos pode estar relacionado ao uso de estreptozotocina nos mesmos (REIS, 2007); pelos resultados obtidos, devido à ausência de resultados significativos em relação ao grupo diabético não tratado, é sugerido que o sistema nanoestruturado desenvolvido à base de GCA não apresentou hepatotoxicidade.

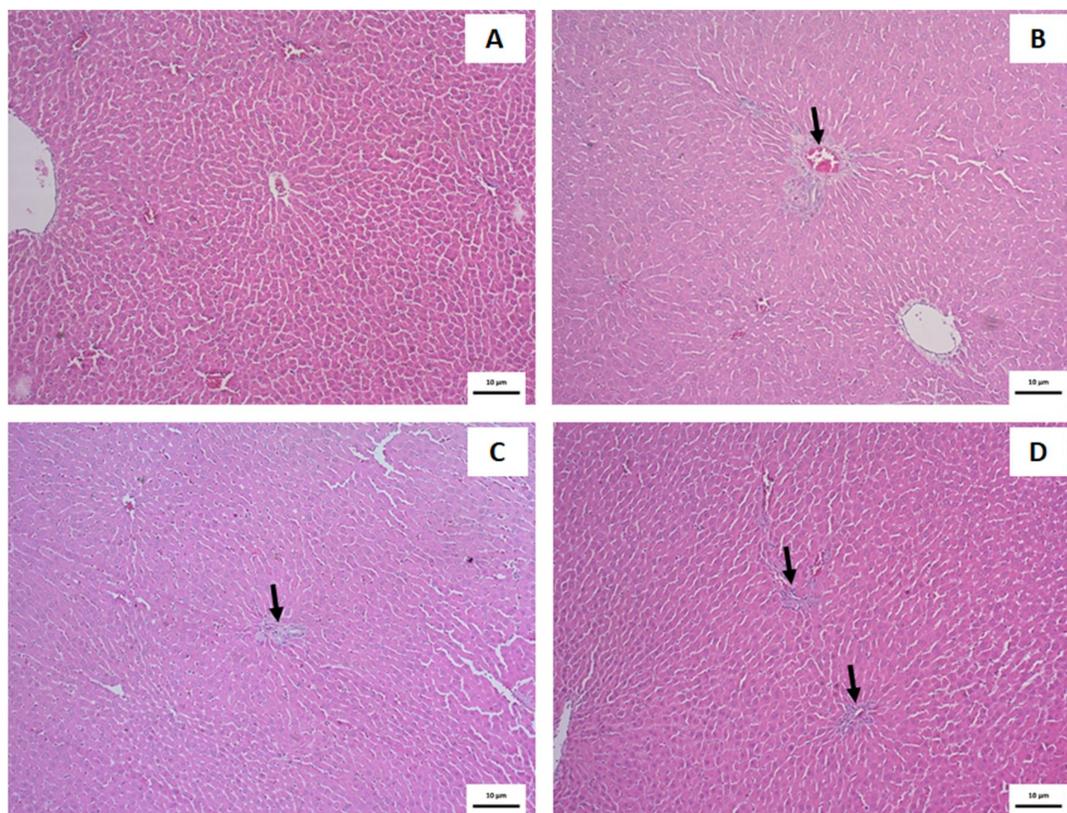
Uma tendência de efeito terapêutico foi observada com a administração das nanopartículas contendo insulina, sendo capaz de reduzir os níveis glicêmicos dos animais diabéticos de forma significativa, no entanto os índices normoglicêmicos ainda não foram atingidos, provavelmente por insuficiência da dose testada e condições do tratamento (uma dose diária).

5.8.3 Análise morfológica

A análise microscópica dos órgãos mostrou um discreto infiltrado linfocitário no fígado dos ratos de todos os grupos diabéticos (grupo controle diabético e grupos tratados com as NPs com e sem insulina) (Figura 21), no entanto não foram observadas alterações degenerativas, nem focos hemorrágicos ou necrose.

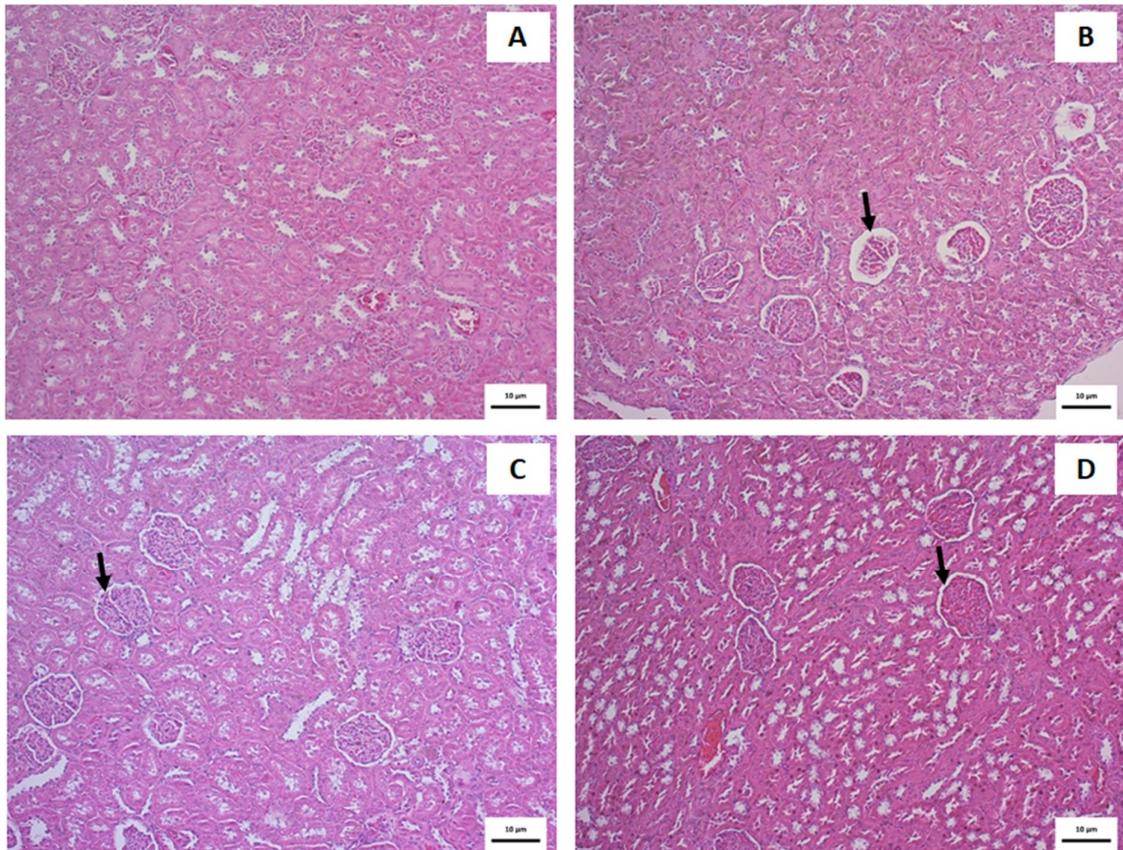
Em relação à observação microscópica dos rins, não foram observados sinais de necrose tubular aguda ou nefrite intersticial, no entanto nos rins dos ratos diabéticos foi observado um discreto aumento do espaço capsular renal em todos os grupos diabéticos em relação ao grupo controle sadio (Figura 22).

Figura 21 - Cortes histológicos dos fígados (HE, ampliação 10x) de ratos Wistar machos tratados oralmente por 15 dias. Controle sadio (A); Controle diabético (B), grupo tratado com nanopartículas de GCA sem insulina (C) e grupo tratado com nanopartículas de GCA com insulina 50 UI/kg (D). As setas indicam discreto infiltrado inflamatório



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Cortes histológicos dos rins (HE, ampliação 10x) de ratos Wistar machos tratados oralmente por 15 dias. Controle sadio (A); Controle diabético (B), grupo tratado com nanopartículas de GCA sem insulina (C) e grupo tratado com nanopartículas de GCA com insulina 50 UI/kg (D). As setas indicam discreto aumento do espaço da cápsula de Bowman



Fonte: Elaborado pelo autor.

O fígado e o rim são os principais órgãos associados ao metabolismo da insulina. Após administração por via oral, a insulina absorvida sofre o efeito da primeira passagem hepática onde inicia-se o *clearance* com o primeiro metabolismo hepático (OWENS et al., 2003). O fígado é responsável por cerca de 70% da extração de insulina em apenas uma passagem enquanto os rins são responsáveis por 10 a 40% do metabolismo diário da insulina. A enzima insulinase catalisa as ligações de pontes de dissulfureto existentes na molécula de insulina e posteriormente as cadeias reduzidas são hidrolisadas em fragmentos menores (CHIEN, 1996).

A *clearance* metabólica de insulina é variável de acordo com as condições fisiológicas, apresentando-se mais baixa em pacientes diabéticos, a função hepática de *clearance* é diminuída nos diabéticos (MICHEL, 1991).

Embora na análise microscópica tenha sido observada a presença de discreto infiltrado linfocitário no fígado dos ratos diabéticos (grupo controle e tratados com as NPs), nenhum efeito adverso sobre os marcadores bioquímicos usuais de fígado (enzimas hepáticas ALT e AST) foi observado, indicando que o tratamento com as NPs não provocou danos significativos no período estudado. Os valores obtidos das enzimas que indicam lesão hepática (ALT e AST), em todos os grupos dos animais, apresentaram-se dentro dos valores de referência descritos para a espécie (HARKNESS et al., 2010; INAL et al., 2006).

O aumento dos valores de fosfatase alcalina nos animais diabéticos pode estar relacionado com a condição diabética e administração de estreptozocina, como visto em trabalhos anteriores (REIS, 2007). Visto que as alterações detectadas não se encontram relacionadas ao tratamento com as NPs, é sugerido que as diferenças observadas estejam, de fato, relacionadas com o estado diabético dos animais.

Em relação à observação microscópica dos rins, o ligeiro aumento do espaço da cápsula de Bowman foi observado em todos os animais diabéticos, grupo controle e tratados com NPs. Tal alteração foi independente do tipo de tratamento dos animais com diabetes o que indica que a formulação, por si só, não apresentou nefrotoxicidade no período de estudo. Além disso, não foram observados sinais de efeitos adversos sobre os marcadores usuais de toxicidade renal (creatinina e ureia), indicando que o tratamento com as NPs não causou danos significativos indicadores de toxicidade.

As alterações observadas estão relacionadas com a fisiopatologia da doença e com o método de indução por uso da estreptozotocina como verificado em estudos anteriores (REIS, 2007). O estado diabético está associado com disfunção, deficiência de alguns órgãos e funções tais como comprometimento dos vasos sanguíneos, nervos e rins (ORTIZ-ANDRADE et al., 2005). A nefropatia diabética é uma situação patológica renal que se desenvolve tanto nos estados iniciais como nos estados avançados do diabetes (BARBAS, 1997). As disfunções observadas nos animais diabéticos estão de acordo com a fisiopatologia da doença, indicando de uma maneira geral que a análise histológica não apresentou efeitos toxicológicos significativos nos órgãos analisados.

As massas absoluta e relativa dos tecidos de todos os grupos são apresentadas na tabela 7. Foram observadas diferenças significativas entre as massas dos órgãos analisados (fígado, rins e pâncreas) dos animais diabéticos de todos os grupos, tratados e não tratados, quando comparados com o grupo sadio. O aumento significativo de massa do fígado e rins em todos os grupos diabéticos quando comparados com animais não diabéticos, pode ser justificado pelo infiltrado inflamatório presente no fígado e pelo espessamento da cápsula de Bowman presente nos rins desses animais vistos anteriormente nas alterações histológicas. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os animais diabéticos tratados com as nanopartículas com e sem insulina, quando comparados com os animais não tratados, tal ausência de diferença entre os grupos indica que o tratamento com as NPs não apresentou sinais de toxicidade.

A análise macroscópica externa dos órgãos dos animais não mostrou alterações significativas na cor ou textura em todos os grupos.

Tabela 7 - Efeito das nanopartículas administradas por via oral sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de ratos Wistar tratados por 15 dias consecutivos.

Tecidos	Controle Sadio	Controle Diabético	NPGCA	NPGCA INS
Rim (g)	2,29 ± 0,14	3,03 ± 0,21*	3,15 ± 0,12*	2,78 ± 0,07*
Rim (%)	0,62 ± 0,02	0,99 ± 0,08*	0,99 ± 0,04*	1,01 ± 0,03*
Fígado (g)	9,12 ± 0,42	9,88 ± 0,84	10,44 ± 0,29	9,42 ± 0,27
Fígado (%)	2,48 ± 0,04	3,22 ± 0,26*	3,29 ± 0,09*	3,43 ± 0,09*
Pâncreas (g)	3,83 ± 0,20	2,39 ± 0,33*	2,12 ± 0,06*	2,23 ± 0,20*
Pâncreas (%)	1,06 ± 0,08	0,78 ± 0,11*	0,67 ± 0,02*	0,55 ± 0,07*

Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média (n = 6/grupo). * Estatisticamente diferente do Controle sadio (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p <0,05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem constatar os seguintes aspectos:

- A análise do peso molecular da goma de cajueiro por Cromatografia por exclusão de tamanho revelou o resultado de M_w 23500.
- Uma nova síntese de GCA foi desenvolvida com a introdução de grupos acetil através de uma reação sem solventes.
- A acetilação da GC foi confirmada por FT-IR, espectroscopia de RMN e análise elementar e o derivado apresentou baixo grau de substituição, adequado para sua solubilização em meio aquoso.
- Foram obtidas NP de GCA e quitosana apresentando tamanho médio de 460 nm e potencial zeta de +30,6 mV, com eficiência de incorporação de insulina de 52,5% e liberação prolongada por até 24h.
- A citotoxicidade demonstrou que a GCA e as nanopartículas não apresentaram efeito significativo sobre a viabilidade celular, verificando sua biocompatibilidade.
- As NPs contendo insulina (50 UI/kg) administradas por via oral a ratos diabéticos reduziu a glicemia em 51% dos níveis basais após 12 horas.
- Os ensaios de toxicidade clínica mediante tratamento com NPs na dose de insulina de 50 UI/kg, por via oral em ratos diabéticos, durante 15 dias não demonstraram sinais tóxicos para os parâmetros avaliados de perda de massa corpórea, consumo de água e ração e parâmetros hematológicos e bioquímicos. As alterações histológicas ocasionais vistas no fígado e rins não apresentaram relevância clínica, uma vez que ocorreram de forma generalizada com os demais testes de toxicidade.
- Os resultados mostraram que o sistema nanoestruturado à base de goma de cajueiro acetilada (GCA) apresentou-se como potencial veículo para liberação sustentada de insulina por via oral.

REFERÊNCIAS

- ABOUBAKAR, M. et al. Study of the mechanism of insulin encapsulation in poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization. *J. Biomed. Mater Res.*, v. 47, p. 568-576, 1999.
- 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.
- AGARWAL, V.; KHAN, M.A. Current status of the oral delivery of insulin. *Pharmaceutical Technology*, October: p. 76-90, 2001.
- AGRAWAL, U. et al. Multifunctional nanomedicines: potentials and prospects. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 3, n. 5, p. 479-497, 2013.
- ALBARGHOUTH, M. et al. Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 206, n. 1-2, p. 23-34, 2000.
- AL-ACHI, A.; GREENWOOD, R. A brief report on some physiological parameters of streptozotocin-diabetic rat. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 27, p. 465-468, 2001.
- ALLÉMANN, E.; LEROUX, J.C.; GURNY, R. Polymeric Nano- and Microparticles for the Oral Delivery of Peptides and Peptidomimetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 34, p. 171-189, 1998.
- ANAD – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE ATENÇÃO AO DIABETES. Disponível em <http://www.anad.org.br/o-que-deve-saber-sobre-diabetes>. Acesso em 12/02/2017.
- ANDRADE, K.C.S. et al. Goma de Cajueiro (*Anacardium occidentale*): Avaliação das Modificações Químicas e Físicas por Extrusão Termoplástica. *Polímeros*, v. 23, n. 5, p. 667-671, 2013.
- ANDRONESCU, E.; GRUMEZESCU, A.M. *Nanostructures in Therapeutic Medicine Series: Nanostructures for Drug Delivery*. Elsevier, 2017.
- ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *Journal of Controlled Release*, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.
- ANTUNES, F. et al. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 83, n. 3, 427-435, 2013.
- ARAÚJO, I. M. S. et al. Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) for development of layer by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. v. 32, n. 6, p. 1588-1593, 2012.

ARAUJO, J. Programa Nacional de Pesquisa do Caju. Fortaleza: Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Caju – CNPCa, 1991.

ARTUSSON, P. et al. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharmaceutical Research*. v.111, p. 1358-61, 1994.

ASADA, H. et al. Absorption characteristics of chemically modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, p. 682–687, 1995

ASPINALL, G.O. *The Polysaccharides*, Academic Press, Editor GO Aspinall, New York, vol. 1, cap. 2, 1982.

ATLAS MUNDIAL DE DIABETES. v .8, p.9, 2017.

BAI, J.P.; CHANG, L.L. Transepithelial transport of insulin. I. Insulin degradation by insulin-degrading enzyme in small intestinal epithelium. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 8, p. 1171- 1175, 1995.

BARBAS, J. Nefropatia diabética. *Diabetologia Clínica*. Lidel-Edições Técnicas, p. 255-269, 1997.

BEAGLEY, J. et al. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 103, n. 2, p. 150-60, 2014.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 82, p. 1069–79, 1993.

BERNSTEIN, M. A. et al. Optimization and Automation of Quantitative NMR Data Extraction. *Analytical Chemistry*, v. 85, p. 5778–5786, 2013.

BOELSTERLI, U.A. Animal models of human disease in drug safety assessment. *The Journal of Toxicological Sciences*, v. 28, n. 3, p.109-121, 2003.

BOGHOSSIAN, S. et al. Hypothalamic clamp on insulin release by leptin-transgene expression. *Peptides*, v. 27, n. 12, p.3245-3254, 2006.

BORZELLECA, J.F. A proposed model for safety assessment of macronutrient substitutes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* v. 23, p. 15-18, 1996.

BOUCHEMAL, K. et al. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 269, p. 89-100, 2004.

BOSCH, F.; ROSICH, L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*, v. 82, 171–179, 2008.

- BRAVO, S. A., LAMAS, M. C., SALOMÓN, C. J. *In-vitro* studies of diclofenac sodium controlled release from biopolymeric hydrophilic matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 5, p. 213-219, 2002.
- CALICETI, P. et al. Effective protein release from PEG/PLGA nanoparticles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques. *Journal of Controlled Release*, v. 94, p. 195-205, 2004.
- CARINO, G. P.; JACOB, J. S.; MATHIOWITZ, E. Nanosphere based oral insulin delivery. *Journal Controlled Release*, Amsterdam, v. 65, p. 261-269, 2000.
- CARVALHO, N. S. et al. Gastroprotective Properties of Cashew Gum, a Complex Heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats. *Drug Development Research*, 76, 143-151, 2015.
- CASTRO, J.A. Toxicología básica: mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. *Acta Bioquímica clínica latinoamericana*, v.2, p. 197-206, 1993.
- CASTRO, A.R.V.; GROSSI, S.A.A. Custo do tratamento do diabetes *mellitus* tipo 1: dificuldades das famílias. *Acta Paulista de Enfermagem*, São Paulo, v. 21, n. 4, 2008.
- CENEMERO, M.P. et al. Doença arterial coronária e diabetes: do tratamento farmacológico aos procedimentos de revascularização. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*. v. 17, n. 3, p.398-413, 2009.
- CHAN, V.S.W. Nanomedicine: An unresolved regulatory issue. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 46, n. 3, p. 218-224, 2006.
- CHEN, F.; ZHANG, Z.R.; HUANG, Y. Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 336, n. 1, p. 166-73, 2007.
- CHIEN, Y.W. Human insulin: Basic sciences to therapeutic uses. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, New York, v. 22, n. 8, p. 753-789, 1996.
- CHRONOPOULOU, L. et al. PLGA-based nanoparticles: Effect of chitosan in the aggregate stabilization. A dielectric relaxation spectroscopy study. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 97, p. 117–23, 2012.
- CLARK, M. G. Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 295, n. 4, p. 732–750, 2008.
- CLAUS, T.H.; PILKIS, S.J. Regulation by insulin of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 421, p. 246-262, 1976.

- COESTER, C.J. et al. Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*, v. 17, n. 2, p. 187-193, 2000.
- COLUSSI, R. et al. Acetylated rice starches films with different levels of amylose: Mechanical, water vapor barrier, thermal, and biodegradability properties. *Food Chemistry*, v. 221, p. 1614–1620, 2017.
- COLUSSI, R. et al. Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. *Carbohydrate Polymers*, v. 103, n. 1, p. 405–413, 2014.
- COSTA, S.M.O.; RODRIGUES, J.F.; PAULA, R.C.M. Monitorização do processo de purificação de gomas naturais: goma do cajueiro. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 2, p. 49-55, 1996.
- COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 19, p. 99-134, 2002.
- COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.41, p. 2-13, 1995.
- CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos na biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, v. 32, p. 649-660, 2009.
- DAMGÉ, C.; MICHEL, C. et al. Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *Journal of Controlled Release*, Amsterdam, v. 13, p. 233-239, 1990.
- DAMGÉ, C.; REIS, C.P.; MAINCENT, P. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert opinion on Drug Delivery*, v. 5, n 8, p. 1-24, 2008.
- DE FRONZO, R.A., Pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes *mellitus*: A balanced overview. *Diabetologia*, v. 35, p. 389-397, 1992.
- DELIE, F.; BLANCO-PRIETO, M.J. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules* 10: 65-80, 2005.
- DESAI, M. P. et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharmaceutical Research*, v. 13, p. 1838-1845, 1996.
- DESAI, M.P. et al. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependente. *Pharmaceutical Research*, v. 14, p. 1568-1573, 1997.
- 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.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 82, p. 337-390, 1944.

DYER, A.M. et al. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 7, p. 998-1008, 2002.

DONALDSON, K. et al. Nanotoxicology. *Occupational. Environmental Medicine*, v. 61, p. 727-728, 2004.

EBADI, A. et al. Kinetic study, structural analysis and computational investigation of novel xerogel based on drug-PEG/SiO₂ for controlled release of enrofloxacin. *Journal of Molecular Liquids*, 2018.

ELDRIDGE, J.H. et al. Polyalkyl cyanoacrylate nanocapsules. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 38, n. 3, p. 216-218, 1986.

EL-SAMALIGY, M.S., ROHDEWALD, P.; MAHMOUD, H.A. Polyalkyl cyanoacrylate nanocapsules. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 38, n. 3, p. 216-218, 1986.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R. et al. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 16, p. 1576-1581, 1999.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R. et al. Evaluation of liver toxicological effects induced by poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 130, p. 272-279, 1995.

FEYNMAN, R.P. There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, v. 23, n. 5, p. 22-36, 1960.

FLORÊNCIO, A.P.S. et al. Estudo da atividade anti-tumoral do polissacarídeo (PJU) extraído de *Anacardium occidentale* frente a um modelo experimental do sarcoma 180. *Revista Eletrônica de. Farmácia*. v. 4, 1, 61-65, 2007.

FURTADO, R. et al. Modificação Química de Goma de Cajueiro: Novas Características e Potencialidades de Aplicações. (Vol. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 86). Fortaleza, Brazil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013.

GALINDO-RODRIGUEZ, S. et al. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, v. 21, p. 1428-1439, 2004.

GANACHAUD, F.; KATZ, J.L. Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. *Chem. Phys. Chem.*, v. 6, p. 209-216, 2005.

GARNETT, M.C.; KALLINTERI, P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occupational Medicine*, v. 56, n. 5, p 307-311, 2006.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 114, 2006.

GILLE, L.; SCHOTT-OHLY, P.; FRIESEN, N. Generation of hydroxyl radicals mediated by streptozotocin in pancreatic islets of mice *in vitro*. *Pharmacology and Toxicology*, v. 90, n. 6, p. 317-326, 2002.

GOTO, M. et al. Gastrointestinal transit and mucoadhesive characteristics of complexation hydrogels in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 95, p.462-469, 2006.

GOLAN, D.E. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

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

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, p. 103, n. 2, p. 137-49, 2014.

GUILHERME, M. R. et al. Morphology and water affinity of superabsorbent hydrogels composed of methacrylated cashew gum and acrylamide with good mechanical properties. *Polymer*, v. 46, p. 7867-7873, 2005.

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

GULSEN, D.; CHAUHAN, A. Ophthalmic drug delivery through contact lenses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.45, p. 2342-2347, 2004.

HARKNESS, J.E. et al. Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents, Wiley-BlackWell. 5 ed., 2010.

HIGUCHI, T. Mechanisms of sustained action mediation. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, p. 1145–1149, 1963.

HIRAI, S.; YASHIKI, T.; MIMA, H. Nasal absorption of insulin in dogs. *Diabetes*, v. 27, p. 296-299, 1978.

HIXSON, A.; CROWELL, J. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation, *Industrial Engineering Chemistry*, v. 23, p. 1160-1168, 1931.

HOFFMAN, A.; ZIV, E. Pharmacokinetic considerations of new insulin formulations and routes of administration. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 33, p. 285-301, 1997.

HUGUET, M.L. et al. Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 51, p. 1427–1432, 1994.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Disponível em <http://www.idf.org/about-diabetes>. Acessado dia 17/01/2019.

INAL, S. et al. Biochemical and histopathological findings of N-Butyl-2- Cyanoacrylate in oral surgery: an experimental study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*, v. 102, n. 6, p. 14-17, 2006.

ILLUM, L. Chitosan and its use a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 1326-31, 1998.

ITALIA, J.L. et al. Nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral[®], *Journal of Controlled Release*, v. 119, p. 197-206, 2007.

JANI, P. et al. Nanoparticle uptake by rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particles size dependency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 42, p. 821-826, 1990.

JUNG, T. et al. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, p.147-160, 2000.

JUNOD, A. et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation*, v. 48, n. 11, p. 2129-2139, 1969.

KAGAN, V.E.; BAYIR, H.; SHVEDOVA, A.A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. *Nanomedicine*, v. 1, n. 4, p. 313-316, 2005.

KALRA, S. P. Central leptin gene therapy ameliorates diabetes type 1 and 2 through two independent hypothalamic relays: a benefit beyond weight and appetite regulation. *Peptides*, v. 30, n. 10, p. 1957-1963, 2009.

KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KAUFMAN, R.J. Beta-cell failure, stress, and type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 20, p. 1931-1933, 2011.

KENNEDY, J.F.; WHITE, C.A. *Bioactive Carbohydrates: In Chemistry, Biochemistry and Biology*. Ellis Horwood Ltda, Inglaterra, cap. 4, 1983.

KIM, S. et al. Solubilization of cashew gum from *Anacardium occidentale* in aqueous médium. *Carbohydrate Polymers*, v. 199, p. 205-209, 2018.

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.

KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.A.; DOULL, J. Casarett and Doull's: toxicology the basic science of poisons, 5ed. New York: McGraw Hill, 1996.

KOGA, D.; CHEN, R.; CHEN, H.C. (EDs). Chitin enzymology—chitinase. *Advances in Chitin Science*, v. 3, p. 16-23, 1998.

KONG, B. et al. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles, v. 6(5), p. 929-941, 2011.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of Membrane Science*, v. 9, p. 211–227, 1981.

KRAULAND, A.H.; M.J. ALONSO, Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 340, p. 134-142. 2007.

KRÖNCKE, K. D. et al. Nitric oxide generation during cellular metabolization of diabetogenic streptozotocin contributes to islets cell DNA damage. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v. 376, n. 3, p. 179-185, 1995.

KUMAR, A. et al. Cashew Gum A Versatile Hydrophilic Polymer: A Review. *Current Drug Therapy*, v. 7, p. 2-12, 2012.

KUMAR, R. et al. Evaluation of *Anacardium occidentale* gum as gelling agent in aceclofenac gel., *International Journal of PharmTech Research*. v.1, n. 3, p. 695–704, 2009.

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.

KYUNGEUN, C.; MYUNG, H.; Cytotoxic Effects of Nanoparticles Assessed *In Vitro* and *In Vivo*, v. 17(9), p. 1573-1578, 2007.

LANGER, R.; TIRRELL, D.A. Designing materials for biology and medicine., *Nature*. v. 428, p. 487-492, 2004.

LARINI, L.; OLIVEIRA, G. H. Avaliação toxicológica. 2ª edição, São Paulo: Manole, 1993. 54p.

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.

- LEE, V. H. L.; ROBINSON, J. R. Enzymatic Barriers to Peptide and Protein Absorption. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 5, 69-97, 1988.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan – and streptozotocin – induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.
- LERCO, M.M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes *Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, p. 136-142, 2003.
- LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R., Cytotoxicity of Nanoparticles, v. 4(1), p. 26-49, 2008.
- LI, M.C. et al. Cellulose Nanoparticles: Structure–Morphology–Rheology Relationships. *ACS Sustainable Chemistry & Engineerin.*, v. 3 n. 5, p. 821–832, 2015.
- LIMA, J.L.S. et al. Plantas Medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2006.
- LIMA, M.R. et al. Hydrophobization of cashew gum by acetylation mechanism and amphotericin B encapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 523-530, 2018.
- LIN, Y.H. et al. Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 1, p. 146-52, 2007.
- LIU, Y. et al.. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*, v. 69, p. 581–593, 1997.
- LOOMIS, M.D.; HAYES, A.W. Loomis's Essentials of toxicology. 4 ed. California: Academic Press, 1996.
- LOPASCHUK, G.D.; DYCK, J.R.B. Glycolysis Regulation, in *Encyclopedia of Life Sciences*, p. 1-8, 2005.
- LOPES, M. A. et al. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: contribution of M cells. *Nanomedicine*, v. 10, n. 6, p. 1139–1151, 2014.
- 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. 1, p. 5865-5800, 2015.
- LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 64, p. 353–367, 2014.

LYRA, M. A. M. et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, p. 784-793, 2007.

MA, Z.; LIM, T.M.; LIM, L.Y. Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 293, n. 1-2, p. 271-80, 2005.

MACEDO, K. C. M. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE GOMA DO CAJUEIRO ACETILADA COM INCORPORAÇÃO DE TAMOXIFENO PARA O TRATAMENTO DE QUELOIDE. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

MACIEL, J. S. et al. Reacetylated chitosan/cashew gum gel: Preliminary study for potential utilization as drug release matrix. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 99, p. 326-334, 2006.

MAGALDI, A.J.B. Revisão/atualização em fisiologia e fisiopatologia renal: regulação hormonal da reabsorção de água no ducto colector. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 18, p. 401-404, 1996.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciences*, v.1, p. 221–41, 1991.

MANSOURI, S. et al. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2004.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. Review. *Phytomedicine*, v. 2, n. 2, p. 137-189, 1995.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles-production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-196, 2001.

MEI, L. et al. Modified paclitaxel-loaded nanoparticles for inhibition of hyperplasia in a rabbit arterial balloon injury model. *Pharmaceutical Research*, v. 24, p. 955-962, 2007.

MESIHA, M.; PLAKOGIANNIS, F.; VEJOSOTH, S. Enhanced oral absorption of insulin from desolvated fatty-acid sodium glycocholate emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 111, p. 213–216, 1994.

MICHEL, C. Administration orale d'insuline par les nanocapsules et nanoparticules d'alkylcyanoacrylate. Tese de Doutorado – Universidade Loius Pauster, Strasbourg, 1991.

MISIRLI, Y. et al. Preparation and characterization of mitomycin-C loaded chitosan-coated alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v. 22, p. 167-178, 2005.

MIRANDA, P.A.C.; REIS, R. Diabetes *Mellitus* gestacional. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 54, n. 6, p. 471-86, 2008.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 5, p. 561-573, 2006.

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.

MORISHITA, M. et al. Novel oral insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: Single and multiple administration studies in type 1 and 2 diabetic rats. Journal of Controlled Release, v. 110, p. 587-594, 2006.

MORISHITA, M. et al. Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam, v. 78, p. 1-7, 1992.

MORTON, D.M. Importance of species selection in drug toxicity testing. Toxicology Letters, v. 102-103, p. 545-550, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, D. Castanha de caju proposta de preço mínimo safra 2006/2007. http://www.conab.gov.br/conabweb/download/precos_minimos/proposta_de_precos_minimos_safra_2006_07_castanha_de_caju.pdf. Acessado dia 15 de fevereiro de 2017.

MOURA, R.E. Síntese de nanopartículas à base de goma de cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MUZZARELLI, R.A.A., Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 53, p. 131-140, 1997.

NASKAR, S.; SHARMA, S.; KUOTSU, K. Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 49, p. 66-81, 2019.

NEFZGER, M. et al. Distribution and elimination of polymethyl methacrylate nanoparticles after peroral administration to rats. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 73, n. 9, p. 1309-1311, 1984.

NEGRATO, C.A. et al. Diabetes melito e gestação. In: Vilar L, editor. Endocrinologia clínica. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 716-29, 2016.

NETO, E. D. et al. Preparation and Characterization of a Chemically Sulfated Cashew Gum Polysaccharide. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 1953-1960, 2011.

NORRIS, D. A.; PURI, N.; SINKO, P.J. Effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 34, p. 135-154, 1998.

OBERDÖRSTER, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy, v. 2, n. 8, 2005b.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E., OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, v.113, p. 823-839, 2005a.

OFORI-KWAKYE, K.; ASANTEWAA, Y.; KIPO, S. Physicochemical and binding properties of cashew tree gum in metronidazole tablet formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 2, p. 105-109, 2010.

OLIVEIRA, M.A. et al. Chitosan/angico gum nanoparticles: Synthesis and characterization *Materials Science Engineering C*, v. 29, p. 448-451, 2009.

OLIVEIRA, W.T.P.; MOURA, R.C.R. Insulina uma abordagem terapêutica, biotecnológica e sanitária. p. 20, 2006.

OLSON, H. et al. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 32, p. 56-67, 2000.

OKOYE, E., ONYEKWELI, A.; KUNLE, O. Solid State Characterization of *Anacardium occidentale* Gum. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, v. 4, p. 3709-3716, 2012.

OPPENHEIM, R. C. et al. Production and evaluation of orally administered insulin nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 8, p. 531-546, 1982.

ORTIZ-ANDRADE, V. et al. Anti-diabetic effect on alloxanized and normoglycemic rats and some pharmacological evaluations of *Tournefortia hartwegiana*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 101, n. 1, p. 37-42, 2005.

OWENS, D.R.; ZINMAN, B.; BOLLI, G. Alternative routes of insulin delivery. *Diabetic Medicine*, v. 20, p. 886-898, 2003.

OWENS, D. R.; ZINMAN, B.; BOLLI, G. B. Insulins today and beyond. *Lancet*, v. 358, n. 9283, p.739–746, 2001.

PAN, Y. et al. Enhancement of gastrointestinal absorption of chitosan-coated insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Yao Xue Xue Bao*, v. 38, n. 6, p. 467-70, 2003.

PAULA, R. C. M., HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. *Polymer International*, 45, 27–35, 1998.

PAULA, H.C.B. et al. Alginate/Cashew Gum Floating Bead as a Matrix for Larvicide Release. *Materials Science and Engineering: C*, v. 32, n. 6, p. 1421-1427, 2012.

PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum: the exudate polysaccharide from *Anacardium-Occidentale* L. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p. 177–181, 1995.

PAULA, H.C.B. et al. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, p. 173-178, 2011.

PEPPAS, N.A.; SAHLIN, J.J.. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal Pharmaceutical*, v. 57, p. 169–172, 1989.

PIMENTEL, L.F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo, v.43, n.4, 2007

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.

PORTERO, A. et al. Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 4, p. 617-625, 2007.

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.

QIAN, F. et al. Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization. *Biomacromolecules*, v. 7, n. 10, p. 2722-7, 2006.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, p.1113-1128, 1998.

RAJAONARIVONY, M. et al. Development of a new drug carrier made from alginate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 82, n. 9, p. 912-917, 1993.

RAMKISSOON-GANORKAR, C. et al. Modulating insulin-release profile from pH/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 59, p. 287-298, 1999.

RANA, V. et al. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1031–1047, 2011.

- REIS, A. C. B. P. Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 2007.
- REIS, C. P. Novas alternativas terapêuticas para a administração oral da insulina, v. 2, n. 5, p. 174-205, 2008a.
- REIS, C.P. et al. Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 12, p. 5290-5305, 2008b.
- REIS, C.P. et al. Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery. *Drug Delivery*, v. 15, p. 127-139, 2008c.
- RIBEIRO, A. C. et al. Synthesis and characterization of acetylated amylose and development of inclusion complexes with rifampicin. *Carbohydrates Polymers*, v. 157, p. 267-274, 2017.
- RIBEIRO, A.J. et al. Gums' based delivery systems: review on cashew gum and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, v. 147, p. 188-200, 2016.
- RIBEIRO, A.; SEIÇA, R.; VEIGA, F. Nanoparticles for Oral Delivery of Insulin. In *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment*, Coelho Jorge (ed), Vol. 4, 4, pp 109-125. Springer Netherlands, 2013.
- RHIOUANI, H. et al. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 118, p. 378-386, 2008.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release i. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, v. 5, p. 23-36, 1987.
- ROBERTS, G.A.F. Chitin Chemistry. The Mac Millan Press, London, v. 1-110, p.274-315, 1992.
- RODRIGUES, C. I. S., JACKSON, J. J.; MONTROSS, M. D. A molar basis comparison of calcium hydroxide, sodium hydroxide, and potassium hydroxide on the pretreatment of switchgrass and miscanthus under high solids conditions. *Industrial Crops and Products*, v. 92, p. 165-173, 2016.
- RODRIGUES, J., DE PAULA, R.; COSTA, S. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 3, p. 33-36, 1993.
- 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.

SAFFRAN, M. et al. Insulin and the gastrointestinal tract. *Journal Control Release*, v. 46, p. 89-98, 1997.

SAEZ, A. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly (D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, p. 379-387, 2000.

SAID, O. et al. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, n. 3, p. 251-265, 2002.

SANTOS, A.C. et al. Ultrasonication of insulin-loaded microgel particles produced by internal gelation: Impact on particle's size and insulin bioactivity. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 1397-1408, 2013.

SARMENTO, B. et al. Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 919–925, 2011.

SARMENTO, B. et al. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 53, n. 2, p. 193-202, 2006a.

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

SARMENTO, B. et al. Insulin loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 7, p. 1-9, 2007a.

SARMENTO, B. et al. Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 10, p. 3054-60, 2007b.

SAJEESH, S.; SHARMA, C.P. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 325, p. 147–154, 2006.

SCHIPPER, N.G. et al. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical Research*, v. 14, p. 923–929, 1997.

SCHNEDL, W. J. et al. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. *Diabetes*, v.43, p. 1326-1333, 1994.

SEVERINO, P. et al. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: Optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.81, p. 28–34, 2014.

SHIRATO, G. V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de camundongos. *Ciência rural*, v. 36, p. 149-154, 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, p. 4-14, 2010.

SHENG, J. et al. Enhancing insulin oral absorption by using mucoadhesive nanoparticles loaded with LMWP-linked insulin conjugates, *Journal of Controlled Release*, v. 233, p.181-190, 2016.

SHEPHERD, R.; S. READER; A. FALSHAW. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, v. 14, p. 535-542, 1997.

SHOELSON, S. E. Insulin and other antidiabetic agents. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, New York: John Wiley, p. 676, 1995.

SINDELAR, D. K. et al. Attenuation of diabetic hyperphagia in neuropeptide Y-deficient mice. *Diabetes*, v. 51, p. 778-783, 2002.

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.

SINGH, B.; SHARMA, N. Modification of sterculia gum with methacrylic acid to prepare a novel drug delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, p. 142-150, 2008.

SINKO, P. J.; LEESMAN, G. D.; AMIDON, G. L. Mass balance approaches for estimating the intestinal absorption and metabolism of peptides and analogues: Theoretical development and applications. *Pharmaceutical Research*, v. 10, p. 271-275, 1993.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: Aplicação à insulina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, p. 21-40, 2003.

SILVA, C.M. et al. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p. 148-159, 2006.

SILVA, D.P.B. et al. Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 213, p. 395-402, 2018.

SILVA, D.R. Obtenção e caracterização de micropartículas utilizando goma de cajueiro. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, p.109, 2013.

SMITH, J.; WOOD, E.; DORNISH, M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharmaceutical Research*, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2004.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>. Acessado dia 17/01/2019.

SONG, Y. et al. Effect of acetylation on antioxidant and cytoprotective activity of polysaccharides isolated from pumpkin (*Cucurbita pepo*, lady godiva). *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 686–691, 2013.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices., *Journal of Control Release.*, v. 70, p. 1, 2001.

TAHRAOUI, A.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSI, B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaureum erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v.132, p. 48-55, 2010.

TAKEUCHI, H. et al. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharmaceutical Research*, v. 13, p. 896-901, 1996.

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.

TANIGUCHI, N. On the Basic Concept of Nano-Technology. *Proceedings of the International Conference on Production Engineering*, p. 18-23, 1974.

TAQIEDDIN, E.; AMIJI, M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, v. 25 n. 10, p. 1937-45, 2004.

TAUBES, G. Diabetes. Paradoxical effects of tightly controlled blood sugar. *Science*, v. 322, p.365–367, 2008.

TERAMOTO, N.; SHIBATA, M. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. *Carbohydrate Polymer*, v. 63, p. 476–481, 2006.

THE ROYAL SOCIETY, *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. Vol. 4. 2004, London: Royal Society.

TREHAN, A.; ALI, A. Recent approaches in insulin delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, New York, v. 24, p. 589-597, 1998.

TORQUATO, D. S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v. 20, p. 505-507, 2004.

UEDA, M.; KREUTER, J. Optimization of the preparation of loperamideloaded poly (l-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation*, v. 4, p. 593-605, 1997.

UHRICH, K.E. et al. Polymeric systems for controlled drug release., *Chemical Review*. v. 99, p. 3181–3198, 1999.

VASCONCELOS, C.F.B. et al. Hypoglycemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia férrea* Martius bark extracton streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 137, p. 1533-1541, 2011.

VAN DER MERWE, S.M. et al. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 58, n. 2, p. 225-35, 2004.

VINAGRADOV, S.V.; BRONICH, T.K.; KABANOV, A.V. Nanosizedcationichydrogels for drug delivery: preparation, properties the blood- and interactions with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 223–233, 2002.

WHITE, J.R. The pharmacologic management of patients with type II diabetes *mellitus* in the era of new oral agents and insulin analogs. *Diabetes Spectrum*, v. 9, p. 227-234, 1996.

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, p. 2475-2484, 2009a.

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, 2009b.

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

WORKENEH, B.; BAJAJ, M. The regulation of muscle protein turnover in diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. v. 45, p. 2239–2244, 2013.

YAMASSAKI, F. T. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. *Carbohydrate Polymers*, v. 125, p. 241-248, 2015.

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

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

ZHANG, N. et al. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, p. 247–259, 2005.

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.

ZHANG, J. et al. Synthesis of oxidized glycerol monooleate-chitosan polymer and its hydrogel formation for sustained release of trimetazidine hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 465, p.32-41, 2014b.

ZHANG, Z. et al. O-acetylation of low-molecular-weight polysaccharide from *Enteromorpha linza* with antioxidant activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 39–45, 2014a.

ZHANG, H. Z. et al. Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, v. 71, p. 19–26, 2009.

ZHANG, Y. et al. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS Journal*, v. 12, p. 263–271, 2010.

ZARZYCKI, R.; MODRZEJEWSKA, Z.; NAWROTEK, K. Drug release from hydrogel matrices. *Ecological Chemistry and Engineering S.*, v. 17, p. 9–28, 2010.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO: SOLVENT- FREE SYNTHESIS OF ACETYLATED CASHEW GUM FOR ORAL DELIVERY SYSTEM OF INSULIN

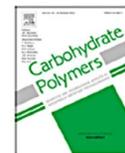
Carbohydrate Polymers 207 (2019) 601–608



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Solvent-free synthesis of acetylated cashew gum for oral delivery system of insulin



Eliadna de Lemos Vasconcelos Silva^a, Antônia Carla de Jesus Oliveira^a,
Yuri Basílio Gomes Patriota^a, Antônio José Ribeiro^b, Francisco Veiga^b, Fernando Hallwass^c,
Edson Cavalcanti Silva-Filho^d, Durcilene Alves da Silva^e, Monica Felts de La Roca Soares^a,
Almir Gonçalves Wanderley^f, José Lamartine Soares-Sobrinho^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^b Laboratory of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Portugal

^c Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^d Department of Chemistry, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

^e Research Center on Biodiversity and Biotechnology, Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

^f Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cashew gum
Acetylation
Nanoparticle
Insulin
Oral delivery
Drug release

ABSTRACT

Cashew gum (CG) is a biopolymer that presents a favorable chemical environment for structural modifications, which leads to more stable and resistant colloidal systems. The gum was subjected to an acetylation reaction using a fast, simple, solvent-free and low cost methodology. The derivative was characterized by infrared and NMR spectroscopy, elemental analysis, coefficient of solubility and zeta potential. The modified biopolymer was used as a platform for drug delivery systems using insulin as a model drug. Nanoparticles were developed through the technique of polyelectrolytic complexation and were characterized by size, surface charge, entrapment efficiency and gastrointestinal release profile. The nanoparticles presented size of 460 nm with a 52.5% efficiency of entrapment of insulin and the electrostatic stabilization was suggested by the zeta potential of + 30.6 mV. Sustained release of insulin was observed for up to 24 h. The results showed that acetylated cashew gum (ACG) presented potential as a vehicle for sustained oral insulin release.

ANEXO A - OFÍCIO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 19 de novembro de 2018

Ofício nº 102/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**
 Centro de Biociências
 Departamento de Fisiologia e Farmecologia
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 0041/2018

Certificamos que a proposta intitulada “**Sistemas de Liberação Nanoestruturados para Administração Oral de Insulina.**” registrada com o nº **0041/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Almir Gonçalves Wanderley** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/10/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Novembro de 2018 a março de 2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	24
Peso/Idade	280-320g/ 2 a 3 meses
Sexo	(24) Macho
Origem	Bioterio do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFPE).

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

