

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CARREGADAS COM LIRAGLUTIDA PARA USO ORAL

ISABELA HASTENREITER GONÇALVES DE OLIVEIRA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CARREGADAS COM LIRAGLUTIDA PARA USO ORAL

ISABELA HASTENREITER GONÇALVES DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Professor Dr

Luiz Henrique Guerreiro Rosado

e Coorientação do Professor Dr.

Luís Maurício Trambaioli Da Rocha e Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2020

O48d

Oliveira, Isabela Hastenreiter Gonçalves, 1993-

Desenvolvimento de micropartículas poliméricas carregadas com liraglutida para uso oral/ Isabela Hastenreiter Gonçalves de Oliveira. – Seropédica, 2020.

90 f.: il.

Orientadora: Luiz Henrique Guerreiro Rosado

Coorientador: Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2020.

1. Liraglutida, 2. Diabetes, 3. Controle Glicêmico, 4. Formulação, 5. Micropartículas I. Rosado, Luiz Henrique Guerreiro, 1981-, orient. II. Lima, Luis Mauricio Trambaioli da Rocha,-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA QUÍMICA CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA

ISABELA HASTENREITER GONÇALVES DE OLIVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 21/12/2020.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações às assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca

Luiz Henrique Guerreiro Rosado. Dr. UFRRJ (Orientador/Presidente da banca).

Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva. Dr. UFRJ.

Renata Nunes de Oliveira. Dra. UFRRJ.



Emitido em 2020

TERMO N° 587/2020 - PPGEQ (12.28.01.00.00.00.42)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 28/12/2020 14:15)

LUIZ HENRIQUE GUERREIRO ROSADO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

CoordCGF (12.28.01.00.00.00.39)

Matricula: 1809376

(Assinado digitalmente em 28/12/2020 20:24)

RENATA NUNES OLIVEIRA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DEQ (12.28.01.00.00.00.45)

Matricula: 1898760

(Assinado digitalmente em 28/12/2020 12:44)

Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 111.113.497-97

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:
587, ano: **2020**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **28/12/2020** e o código de verificação: **6e767fc125**

Dedico este trabalho aos meus pais,
que sempre estiveram presente me
incentivando em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que nunca me desamparou e sempre me deu força e sabedoria para vencer todas as dificuldades.

Aos meus pais, André e Patrícia por todo incentivo e motivação e por sempre acreditarem no meu crescimento profissional.

A minha avó Elza, minha irmã Letícia e minha prima Amanda por ser meu refúgio em todos os momentos.

Ao Vinícius por todo apoio, companheirismo e principalmente, por agüentar todas as minhas reclamações diariamente.

Ao meu orientador Luiz Henrique, por toda paciência, amizade e conhecimentos transmitidos durante todos esses anos.

Ao meu co-orientador Luis Maurício, que me acompanhou e ajudou em todas as etapas do projeto e por todo conhecimento transmitido.

Aos amigos que ganhei durante o mestrado e que me acompanharam durante essa trajetória Alessandra, Felipe, Gleice e Taiane.

Aos meus amigos da UFRRJ, Daniela, Júlia, Gabriela, Melina e Augusto que mesmo com toda distância sempre estiveram presente.

A toda equipe do pbiotech, em especial à Celimar, Luis e Thayna, pela amizade e pelo trabalho em equipe que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

“Não há limites quando você está rodeado de pessoas que acreditam em você, ou por pessoas que ajudam a abrir portas de oportunidades e não as fechar” – Neil De Grasse Tyson

RESUMO

Oliveira, Isabela Hastenreiter Gonçalves. **Desenvolvimento de micropartículas poliméricas carregadas com Liraglutida para uso oral**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

O Liraglutida é um peptídeo análogo do hormônio GLP-1 que promove reduções clinicamente significativas tanto na hemoglobina glicada (HbA1c) quanto na perda de peso e, por isso, vem sendo utilizado no tratamento de uma das principais causas de morbidade e mortalidade do mundo, a Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2). O presente estudo se refere ao desenvolvimento de micropartículas poliméricas carregadas com Liraglutida, para uso oral, com o objetivo de promover a liberação controlada do peptídeo, conferindo proteção aos efeitos gastrointestinais e aumentando a adesão do paciente ao tratamento. As formulações foram desenvolvidas através do método de emulsificação dupla seguido de extração do solvente, utilizando o polímero Eudragit® S100 e o fármaco Victoza® (Liraglutida 6mg/mL). As formulações foram avaliadas quanto ao rendimento e a eficiência de encapsulação, análise morfológica através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, distribuição de tamanho de partículas, análise termogravimétrica e perfil de liberação *in vitro*. Após a caracterização, as formulações apresentaram rendimento de aproximadamente 55%, com 91,4% de eficiência de encapsulação e formato esférico. Na análise de distribuição de tamanho, as micropartículas inseridas em pH 4,5, apresentaram concentração suficiente para a realização da letiura no aparelho até o tempo de 40 minutos, comprovando a solubilização nesta faixa de pH. Com a análise de liberação *in vitro*, pode-se afirmar que o polímero auxiliou na proteção do peptídeo em meio ácido (pH 4,5) e que as micropartículas foram solubilizadas em meio básico (pH 8,0), apresentando uma cinética de pseudo primeira ordem com 75% de liberação do peptídeo em 4,5 horas. No entanto, os resultados deste trabalho sustentam a continuidade do estudo para o desenvolvimento da formulação de Liraglutida para uso oral.

Palavras chave: Liraglutida, Diabetes, Eudragit, Microencapsulação.

ABSTRACT

Oliveira, Isabela Hastenreiter Gonçalves. **Desenvolvimento de micropartículas poliméricas carregadas com Liraglutida para uso oral**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Liraglutide is a peptide similar to the hormone GLP-1 that clinically promotes significant reductions both in glycated hemoglobin (HbA1c) and in weight loss, has been used in the treatment of one of the main causes of morbidity and mortality in the world, Diabetes Mellitus type 2 (DM2). The present study refers to the development of polymeric microparticles loaded with Liraglutide, for oral use, with the aim of promoting the controlled release of the peptide, providing protection from gastrointestinal effects and increasing patient compliance with treatment. The formulations were developed using the double emulsification method followed by solvent extraction, using the polymer Eudragit® S100 and the drug Victoza® (Liraglutide 6mg/mL). The formulations were evaluated according to yield and encapsulation efficiency, morphological analysis (SEM), particle size distribution, thermogravimetric analysis and *in vitro* release profile. After characterization, the formulations showed a yield of approximately 55%, with 91.4% encapsulation efficiency and spherical shape. In the size distribution analysis, the microparticles inserted in pH 4,5 medium showed sufficient concentration to carry out the readiness in the device up to 40 minutes, proving the solubilization in this pH range. With the *in vitro* release analysis, it can be said that the polymer helped to protect the peptide in a simulated acid medium and that the microparticles were solubilized in a simulated basic medium, presenting a pseudo first order kinetics with 75% of the peptide release in 4.5 hours. However, the results of this work support the continuity of the study for the development of the formulation of Liraglutide for oral use.

Keywords: Liraglutide, Diabetes, Eudragit, Microencapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeitos do GLP-1.....	26
Figura 2	Estutura Química do GLP-1humano ativo e inativo.....	27
Figura 3	Estrutura química dos análogos do GLP-1 humano e a ação da enzima DPP-4.....	29
Figura 4	Esturuta Química Liraglutida	30
Figura 5	Esquema representativo microcápsulas e microesferas	39
Figura 6	Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação.....	41
Figura 7	Esquema representativo no método de polimerização in situ e interfacial.....	41
Figura 8	Esquema representativo da técnica de spray drying	42
Figura 9	Esquema representativo do método de emulsão dupla com extração do solvente	43
Figura 10	Representação esquemática dos principais tipos de Eudragit.....	46
Figura 11	pH e local da solubilidade dos tipos de Eudrgit	46
Figura 12	Estrutura Química do Eudragit S-100.....	47
Figura 13	Curva de Calibração do Liraglutida e coeficiente e correlação linear.....	58
Figura 14	Microscopia Eletrônica de Varredura de partículas poliméricas contendo Liraglutida.....	61
Figura 15	Distribuição de tamanho de micropartículas de EudragitS100, % volume	63
Figura 16	Distribuição de tamanho de micropartículas de Eudragit S100 em % cumulativa.....	64
Figura 17	Distribuição de tamanho de micropartículas de Eudragit S100 em % cumulativa ampliada.....	64
Figura 18	Micropartículas de Eudragit S100 em tampão fosfato de sódio pH8,0.....	65
Figura 19	Análise Termogravimétrica.....	67
Figura 20	Análise Termogravimétrica – Derivada.....	67

Figura 21	Distribuição de tamanho de micropartículas de Eudragit S100 em % cumulativa ampliada.....	70
------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios de Diagnósticos utilizados segundo a Associação Americana de Diabetes.....	22
Tabela 2	Antidiabéticos orais disponíveis no Brasil.....	24
Tabela 3	Formulações comercializadas pela FDA contendo agonistas do receptor do GLP-1.....	28
Tabela 4	Medicamentos contendo peptídeo administrado por via oral.....	35
Tabela 5	Lista de pró fármacos de proteínas e peptídeos.....	36
Tabela 6	Estudos de medicamentos protéicos com inibidores de protease.....	37
Tabela 7	Principais estratégias desenvolvidas para formulações de peptídeos e proteínas	38
Tabela 8	Rendimento das micropartículas de Eudragit S100 carregadas com Liraglutida.....	56
Tabela 9	Eficiência de Encapsulação das respectivas micropartículas de Eudragit S100 carregadas com Liraglutida.....	59
Tabela 10	Perfil de liberação cumulativa in vito de micropartículas de Eudragit S100 contendo Liraglutida	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
CAPIC	Fosfato de Cálcio PEG-insulina-caseína
DDAVP	Desmopressina
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DPP-4	Enzima Dipeptidil Peptidase-4
EA	Acrilato de Etila
EE	Eficiência de Encaosulação
ES100	Eudragit do tipo S100
GLP-1	Peptídeo semelhante ao Glucagon 1
GLP-2	Peptídeo semelhante ao Glucagon 2
GIP	Peptídeo Insulinotrópico Dependente
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HCV	Vírus da hepatite C
hGH	Hormônio de Crescimento Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG4	Imunoglobulina Humana classe 4
IMC	Índice de massa corporal
KDa	Kilo Dalton
MA	Ácido Metacrílico
MMA	Metacrilato de Metila
MP	Micropartícula
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCL	Policaprolactona

PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVA	Álcool Poli Vinílico
TGI	Trato Gastrointestinal
VO	Via Oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Prevalência Diabetes <i>Mellitus</i>	20
2.2 Definição de Diabetes <i>Mellitus</i>	20
2.3 Tipos Diabetes <i>Mellitus</i>	20
2.4 Diagnóstico	21
2.5 Tratamento.....	22
2.5.1 Antidiabéticos Orais.....	22
2.5.2 Peptídeos Utilizados para o Tratamento da Diabetes <i>Mellitus</i>	24
2.5.2.1 <u>Insulina</u>	24
2.5.2.2 <u>Incretinas</u>	24
2.6 Vias de Administração.....	30
2.6.1 Via Subcutânea.....	30
2.6.2 Via Oral.....	31
2.7. Formulações de Peptídeos Oral.....	31
2.8 Estratégias de Formulação.....	34
2.8.1 Pró Fármacos.....	34
2.8.2 Inibidores de Proteases.....	35
2.8.3 Intensificadores de Permeação.....	36
2.8.4 Sistemas Transportadores.....	36
2.9 Abordagens de Formulação.....	37
2.10 Microencapsulação	38
2.10.1 Coacervação.....	39
2.10.2 Polimerização.....	40
2.10.3 Spray Drying.....	42
2.10.4 Emulsão/Extração do Solvente.....	42
2.11 Materiais Utilizados para Revestimento.....	42
2.12 Eudragit ®.....	44
2.13 Propriedades do Eudragit ®.....	44

3 JUSTIFICATIVA.....	48
4 OBJETIVOS.....	49
4.1 Objetivo Geral.....	49
4.2 Objetivos Específicos.....	49
5 MATERIAIS.....	50
5.1 Materiais e Reagentes.....	50
5.2 Equipamentos e Acessórios.....	50
6 MÉTODOS.....	51
6.1 Preparo de Micropartículas.....	51
6.2 Caracterização das Micropartículas.....	52
6.2.1 Rendimento e Eficiência de Encapsulação.....	52
6.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	52
6.2.3 Distribuição de Tamanho de Partículas (DLS).....	53
6.3 Análise Termogravimétrica (TGA).....	53
6.4 Liberação <i>in vitro</i>	53
6.5 Quantificação do Peptídeo por Fluorescamina.....	54
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
7.1 Caracterização das Micropartículas.....	55
7.1.1 Rendimento.....	55
7.1.2 Eficiência de Encapsulação.....	57
7.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	59
7.1.4 Distribuição de Tamanho de Partículas (DLS).....	61
7.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	65
7.3 Liberação <i>in vitro</i>	67
8 CONCLUSÃO.....	71
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) tipo 2 é uma grande preocupação global de saúde e uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo. Em 2014, cerca de 387 milhões de pessoas eram portadoras da diabetes e este número pode alcançar 592 milhões no ano de 2035, além disso 4,9 milhões de mortalidade foram associados com diabetes no mundo. O diabetes tipo 2 é responsável por aproximadamente 90% de todos os casos e acarreta ao aumento do risco de distúrbios cardiovasculares, cegueira, insuficiência renal e amputação, além disso, está associado ao aumento do risco de câncer, declínio cognitivo e doença hepática crônica.

Os hormônios da incretina, como peptídeo inibitório gástrico e peptídeo semelhante ao Glucagon 1 (GLP-1) são produzidos no intestino e potencializam a secreção de insulina quando a glicose é ingerida por via oral, conhecido como efeito incretina. O GLP-1 aumenta a secreção de insulina, inibe a secreção pós-prandial de glucagon, inibe a apoptose de células β e proliferação das ilhotas pancreáticas. No entanto o GLP-1 nativo é rapidamente degradado pela enzima Dipeptidil peptidase-4 (DPP-4).

A ação da enzima DPP-4 forma fragmentos sem efeito insulínico que são susceptíveis a uma rápida depuração renal, tendo o tempo de meia vida de cerca de 2 minutos após administração. Entretanto, não é uma opção prática para terapia exógena sendo necessário o desenvolvimento de formulações baseadas em agonistas sintéticos do receptor GLP-1 com propriedades farmacocinéticas mais adequadas, com maior tempo de meia vida

Sabendo disso, alternativas foram investigadas com o objetivo de aumentar o tempo de meia vida e conseqüentemente a biodisponibilidade desse hormônio. O Liraglutida é um análogo do GLP-1 com ação prolongada. Sua estrutura é baseada no GLP-1 nativo mas difere na substituição na posição 34 de arginina por lisina e na adição de um ácido glutâmico no carbono 16. Este peptídeo é administrado por via subcutânea sendo absorvido lentamente, possuindo um tempo de meia vida em torno de 13 horas o que o torna adequado para injeção uma vez ao dia.

Além de estimular a secreção de insulina, também promove o aumento da saciedade, aumento da concentração de leptina pós-prandial no cérebro e retarda o esvaziamento gástrico o que auxilia na perda de PE so. Sendo assim, o Liraglutida é uma opção atraente para o tratamento do DM tipo 2 e também para o tratamento da obesidade.

Apesar da administração de GLP-1 e análogos pela via subcutânea ser eficaz em termos de biodisponibilidade, é invasivo, causando desconfortos (dor), infecção local, reações cutâneas, além do alto custo no mercado, ocasionando a diminuição da adesão do paciente ao tratamento.

Uma maneira de solucionar este problema pode ser utilizando sistemas microparticulados que aprisionam os fármacos em uma matriz polimérica, oferecendo proteção contra a degradação enzimática, além do benefício da relação com sistemas monolíticos, com uma distribuição mais homogênea sobre o trato gastrointestinal e tempo de trânsito mais previsível, o que promove uma absorção mais regular.

As micropartículas podem ser preparadas usando diferentes tipos de materiais, que podem ser divididos em três grandes grupos: lipídios, proteínas e polímeros. O Eudragit é um copolímero derivado do ácido metacrílico e metilmetacrilato, e etilmetacrilato, dependendo de sua composição, começam a dissolver em valores de pH entre 5, e 7,0. O Eudragit® S-100 (ES100) possui características relevantes para via oral. É um polímero sintético aplicado na indústria farmacêutica, na formulação de sistemas gastrorresistentes, dissolve-se facilmente em soluções aquosas com pH superior a 7,0, conforme encontrado no intestino e cólon.

Desta forma, micropartículas preparadas com este polímero podem ser fabricadas na forma de comprimidos para administração por via oral sendo indolor, apresentando maior segurança, economia, facilidade de armazenamento, além das vantagens das formas de dosagem de liberação controlada como proteção gastroresistente.

No entanto, o projeto busca desenvolver e caracterizar as micropartículas poliméricas carregadas com Liraglutida para uso oral, permitindo o delineamento do perfil de liberação e seu efeito no organismo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Prevalência da Diabetes *Mellitus*

A mudança na prevalência de diabetes em muitos países e regiões foi impulsionada pela rápida urbanização e mudanças drásticas em relação ao estilo de vida sedentário (CHO et al., 2018). A expectativa média de vida de um indivíduo de 50 anos, com diabetes é de 6 anos mais curto do que seria sem a doença .

Em 1980, a Organização Mundial de Saúde (OMS) avaliou que havia 108 milhões de pessoas com diabetes no mundo e este número quadruplicou nas estimativas de 2014. Em 2017, a Federação Internacional de Diabetes estimou 425 milhões de pessoas com diabetes no mundo, e deve atingir 629 milhões de pessoas até 2045 (CHO et al., 2018).

Atualmente o Brasil é o 4º país do mundo com maior incidência de diabetes com 12, 5 milhões de pessoas diagnosticadas até 2018, o que representa um gasto anual de 24 bilhões de dólares para o tratamento desta doença (CHO et al., 2018).

2.2 Definição Diabetes *Mellitus*

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica definida pela produção insuficiente de insulina pelas células betas das ilhotas pancreáticas, que ocasiona o aumento dos níveis de glicose na corrente sanguínea (hiperglicemia), ou pode ocorrer devido à resistência do hormônio insulina no organismo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Ainda segundo a Associação Americana de Diabetes, o termo Diabetes Mellitus (DM) representa um grupo de doenças crônicas e complexas que requerem cuidados contínuos com estratégia de redução de risco multifatoriais além do controle glicêmico. Pessoas portadoras do diabetes possuem maior risco de amplificar uma série de graves problemas a saúde, o que resulta em maior custo a assistência médica, qualidade de vida reduzida e aumento da mortalidade. (CHO et al., 2018; (ASSOCIATION, 2018).

2.3 Tipos de Diabetes *Mellitus*

A doença é classificada de acordo com sua patogênese, os três tipos mais prevalentes são: diabetes *mellitus* tipo 1 (ou insulina-dependente), diabetes *mellitus* tipo 2 (ou insulina-independente) e diabetes gestacional. Além desses, existem outros tipos menos predominantes como diabetes monogênico e secundário (FIGUEIREDO; RABELO, 2009).

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DMI) é definido pela destruição autoimune das células beta pancreáticas causando deficiência ou ação inadequada da insulina, os portadores se tornam mais susceptíveis a infecções e podem sofrer complicações crônicas como

ateroesclerose e infarto do miocárdio. O Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DMII) é causado, principalmente pelo fator hereditário e obesidade, é caracterizado pela resistência a insulina. Os pacientes produzem o hormônio, mas suas células são incapazes de utilizar toda insulina secretada pelo pâncreas fazendo com que seus níveis no sangue aumentem e permaneçam elevados. Os sintomas mais comuns do DMII são: alterações visuais, feridas de difícil cicatrização, polidipsia, poliúria e polifagia (SCHWARTZ et al., 2016).

O Diabetes Mellitus tipo 2 representa cerca de 90% de todos os casos de Diabetes sendo uma preocupação global de saúde e uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (CHO et al., 2018; JACOBSEN et al., 2016).

2.4 Diagnóstico

O DM é diagnosticado quando ocorrem quadros de hiperglicemia ou alterações de outros parâmetros glicêmicos como hemoglobina glicada, glicosúria e poliúria que ocorrem quando o organismo não pode produzir quantidades suficientes de insulina (SCHWARTZ et al., 2016).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA) e Organização Mundial de Saúde (OMS), os critérios de diagnósticos se baseiam na detecção de altos níveis de glicose no sangue: glicemia de jejum, glicemia de duas horas após uma carga oral de glicose e hemoglobina glicada (HbA1c) (Tabela 1) (ASSOCIATION, 2018; SEINO et al., 2010). 7

Glicose plasmática de jejum > 126mg/dL (7mmol/L);
ou
2 horas após ingestão oral de 75g de glicose em água, glicemia > 200mg/dL (11mmol/L);
ou
Hemoglobina glicada > 6,5% (48mmol/mol);
ou
Paciente com sintomas de hiperglicemia ou em crise hiperglicêmica, com glicose plasmática aleatória > 200mg/dl (11mmol/L)

Tabela 1: Critérios de Diagnósticos utilizados segundo a Associação Americana de Diabetes.

Esses Critérios de diagnósticos são considerados tardios porque só apresentam eficiência quando os sintomas clínicos e complicações metabólicas são evidentes, o que explica o aumento de números de pessoas portadoras da doença no mundo com o passar dos anos (ASSOCIATION, 2019).

2.5 Tratamento

Atualmente, as alternativas não farmacológicas para o tratamento de pacientes com DM2 são exercício físico e dieta balanceada (hipocalórica). A alteração do estilo de vida é muito importante para o controle da doença (CHAMBERLAIN et al., 2017).

2.5.1 Antidiabéticos orais

Os antidiabéticos orais são a primeira escolha para o tratamento quando as alternativas não farmacológicas isoladamente não surtem o efeito desejado. São classificados de acordo com seu mecanismo de ação, demonstrado na Tabela 2 (LOPES et al., 2012).

- Hipoglicemiantes orais propriamente ditos: sulfoniluréias e as metiglinidas;
- Sensibilizadores da ação da insulina: tiazolidinodionas;
- Redutores da Neoglicogênese: Biguanidinas;
- Redutores da velocidade de absorção dos glicídeos: inibidores da α - glicosidase.

Medicamento	Mecanismo de ação	Contra-indicações	Efeitos indesejáveis	Outros benefícios
Sulfonilúria	Aumento da secreção de insulina	Gravidez, lactação, insuficiência renal e hepática grave	Hipoglicemia e ganho de peso	
Metiglinida	Aumento da secreção de insulina	Gravidez, lactação, insuficiência renal e hepática grave	Hipoglicemia e leve ganho de peso discreto	
Biguanida	Reduz a produção de glicose com menor ação sensibilizadora da ação da insulina	Gravidez, lactação, insuficiência renal, cardíaca, hepática, pulmonar e risco aumentado de acidose láctica	Desconforto abdominal, diarreia e náuseas	Diminuição de eventos cardiovasculares, melhora do perfil lipídico e diminuição do peso
Inibidores da α glicosidade	Retardo da absorção de carboidratos	Gravidez, lactação, doença intestinal inflamatória e grave insuficiência hepática e renal	Desconforto abdominal, diarreia e flatulências	Diminuição de eventos cardiovasculares, melhora do perfil lipídico
Glitazonas	Aumento da sensibilidade a insulina em músculos, hepatócitos e adipócitos	Gravidez, lactação, insuficiência hepática e insuficiência cardíaca das classes III e IV	Edema, anemia e ganho de peso	Melhora o perfil lipídico, redução da gordura hepática

Tabela 2: Antidiabéticos orais disponíveis no Brasil (LOPES et al., 2012).

Apesar dos antidiabéticos orais possuírem boa aceitação pelos paciente e fácil administração, também apresentam desvantagens variando de acordo com as classes: A Metformina (biguanida) é o fármaco de primeira linha para o tratamento de DM2, mas após vários anos de uso a metformina limita a produção de glicose hepática, amplia a captação de glicose no músculo esquelético além de aumentar à sensibilidade a insulina (INZUCCHI et al., 1998). Sulfonilurías podem causar hipoglicemia, ganho de peso além de apresentarem toxicidade cardiovascular (ASSOCIATION 2019; INZUCCHI et al., 1998). Os Tiazolidinodionas induzem grandes danos ao fígado (efeito hepatotóxico), além disso, pode promover ganho de peso, anemia e maior incidência de fraturas ósseas (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ; AGUILAR-SALINAS; GÓMEZ-PÉREZ, 2002). As Glicosidasas apresentam limitações relacionadas ao retardo da digestão e absorção de carboidratos intestinais provendo efeitos gastrointestinais. (SILVEIRO; SATLER, 2015).

Apesar da Associação Americana de Diabetes indicar a metformina como tratamento de primeira linha, somente a metformina é insuficiente para atingir o os altos níveis de glicose no sangue dos pacientes (PRASAD-REDDY; ISAACS, 2015). Atualmente, os medicamentos para diabetes são recomendados de acordo com as necessidades específicas do paciente considerando as reações adversas. Existem no mercado peptídeos em formulações variadas para o controle glicêmico, entre eles a insulina e os agonistas do receptor (GLP-1) peptídeo do tipo glucagon 1, são utilizados para tratar a DMII. Estes agonistas são benéficos para o controle da glicemia além de melhorar a função das células beta pancreáticas e promover a

perda de peso (problemas não solucionados pelo uso dos antidiabéticos orais). Além disso, esses agonistas diferem em relação a maior eficácia, tolerabilidade e frequência de dosagem (BUSE et al., 2009; DRUCKER et al., 2008).

2.5.2 Peptídeos Utilizados para o Tratamento da Diabetes

2.5.2.1 Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido e secretado pelas células beta das ilhotas pancreáticas na forma de pré-pró-insulina que, posteriormente sofre clivagem gerando a pró-insulina, esta é transportada para o complexo de Golgi onde ocorre a conversão da pró-insulina em insulina, através da remoção do peptídeo C (peptídeo de conexão) (KATZUNG, et. al, 2012).

O avanço na terapia com insulina deu origem aos seus análogos, com o objetivo de melhorar o tempo de ação do medicamento (ZAYKOV, et. al. 2016). Atualmente, no mercado existem diferentes tipos de insulinas listadas a seguir:

- Insulinas de ação ultrarrápida: acelera a absorção da insulina pelo organismo, minimizando as variações de glicemia após as refeições (HIRSCH, 2005).
- Insulinas regulares: formam uma estrutura hexamérica que proporciona um início de ação tardio e um maior tempo de ação em comparação aos análogos de ação ultrarrápida.
- Insulina NPH (Neutral Protamine Hagedorn): possui a sua absorção e início de ação retardado pela presença de protamina em sua composição. (KATZUNG, et. al, 2012).
- Insulinas de ação prolongada: atua na manutenção dos níveis basais de insulina (KATZUNG, et. al, 2012).

A insulino terapia é indicada quando os antidiabéticos orais não fazem mais o controle glicêmico necessário ou quando há complicações associadas, tais como infecções graves e comprometimento cardiovascular. Apesar da insulina ser um medicamento com grande eficácia no controle glicêmico, ela promove ganho de peso e hipoglicemia. (LOPES et al., 2012).

2.5.2.2 Incretinas

Hormônios da incretina, são produzidos no intestino e potencializam a secreção de insulina quando a glicose é ingerida por via oral, o que é conhecido como efeito incretina (CROOM; MCCORMACK, 2009). Este efeito corresponde 50 a 70% da insulina total secretada após sobrecarga oral de glicose. A diminuição do efeito incretina é causada pela redução na secreção ou por insensibilidade das células beta à ação insulínica das incretinas o que leva a contribuição para o desenvolvimento de DMII (PRASAD-REDDY; ISAACS, 2015).

As principais incretinas são os peptídeos semelhantes ao glucagon (GLP-1) e 2 (GLP-2) e o insulínico dependente (GIP), sendo que o GLP-1 é o predominante, representando cerca de 80% do efeito intestinal das incretinas (KAZAKOS, 2011).

O peptídeo semelhante ao glucagon-1 humano GLP-1, (*glucagon like peptide 1*), é pertencente a classe dos hormônios incretina que circula no organismo em duas formas ativas, o GLP-1 (7–37) e GLP-1 (7–36) amida. Onde a primeira é secretada nas células L encontradas no íleo e no cólon e no íleo intestinal, e a segunda é secretada no tecido pancreático, e representa 80% de todo o GLP-1 circulante (GUPTA, 2013).

O GLP-1 exerce influência sobre múltiplas funções fisiológicas, incluindo um rápido efeito de redução da glicose no sangue em resposta à absorção enteral de nutrientes (JACOBSEN et al., 2009). Dentre suas funções está aumento da secreção de insulina, inibição da secreção pós-prandial de glucagon, inibição da apoptose de células β , proliferação das ilhotas pancreáticas, diminuição do esvaziamento gástrico após as refeições, redução do apetite e do peso corporal dentre outros. (Figura 1) (CROOM; MCCORMACK, 2009; LEE; LEE, 2017).

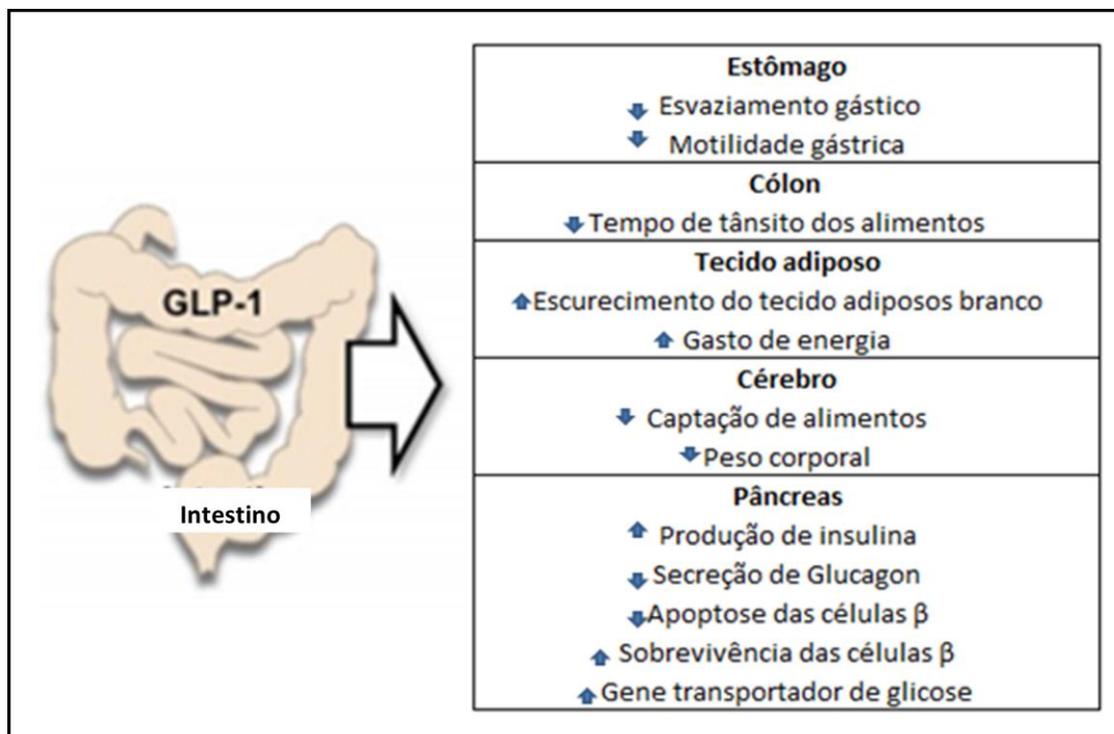


Figura 1: Efeitos do GLP-1 (LEE; LEE, 2017).

Esses efeitos tornam o GLP-1 um potente agente redutor de glicose no sangue, capaz de modular a progressão do diabetes tipo 2. No entanto, o GLP-1 nativo é rapidamente metabolizado pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) (Figura 2), encontrada em vários tecidos e tipos de células, bem como na circulação (JACOBSEN et al., 2009).

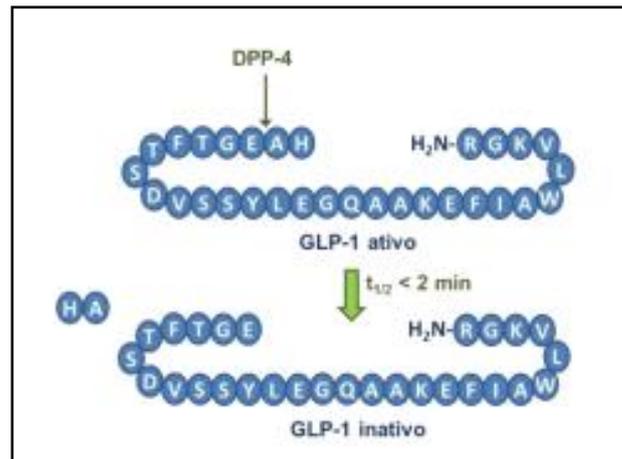


Figura 2: Estrutura Química do GLP-1 humano ativo e inativo (DA CONCEIÇÃO; DA SILVA; BARBOSA, 2017).(FIX, 1996) .

A ação da enzima DPP-4 forma fragmentos sem efeito insulínico que são susceptíveis a uma rápida depuração renal, tendo o tempo de meia vida de cerca de 2 minutos após administração. Entretanto, não é uma opção prática para terapia exógena sendo necessário o desenvolvimento de formulações baseadas em agonistas sintéticos do receptor GLP-1 com propriedades farmacocinéticas mais adequadas, com maior tempo de meia vida. (JACOBSEN et al., 2009; VILSBOLL, 2007).

Existem 6 agonistas do receptor do GLP-1 disponível no mercado atualmente. São eles: Exenatida, Liraglutida e Lixesenatida de ação curta, com tempos de meia-vida de 2,4, 2,3 e 4 horas respectivamente e Albiglutida, Semaglutida e Dulaglutida de ação longa, de meia vida em torno de 4 a 5 dias . Estes agonistas estão distribuídos em uma variedade de 8 tipos de formulações demonstradas na Tabela 3 e Figura 3:

Nome comercial	Nome genérico	Fabricante	Aprovação	Tempo meia vida	Mecanismo de ação biológica prolongada
Byetta	Exenatide	Amylin	2005	2.4 h	GLP-1 resistente a DPP-4
Victoza®	Liraglutide	Novo Nordisk	2010	13 h	GLP-1 resistente a DPP-4
Bydureon	Exenatide	Astra Zeneca	2012	7 d	Microesferas resistentes a DPP-4 (*)
Adlyxin	Lixisenatide	Sanofi	2013	4 h	GLP-1 resistente a DPP-4
Tanzeum	Albiglutide	Glaxo Smith Kline	2014	5 d	GLP-1 recombinante ligado a albumina e resistente a DPP-4
Trulicity	Dulaglutide	Ely Lilly	2014	4,5 d	GLP-1 resistente a DPP-4 ligado a IgG4
Saxenda	Liraglutide	Novo Nordisk	2017	13h	GLP-1 resistente a DPP-4
Ozempic	Semaglutide	Novo Nordisk	2017	5 d	GLP-1 resistente a DPP-4

Tabela

3: Formulações comercializadas pela FDA contendo agonistas do receptor do GLP-1 (ICART LUIS, 2019).

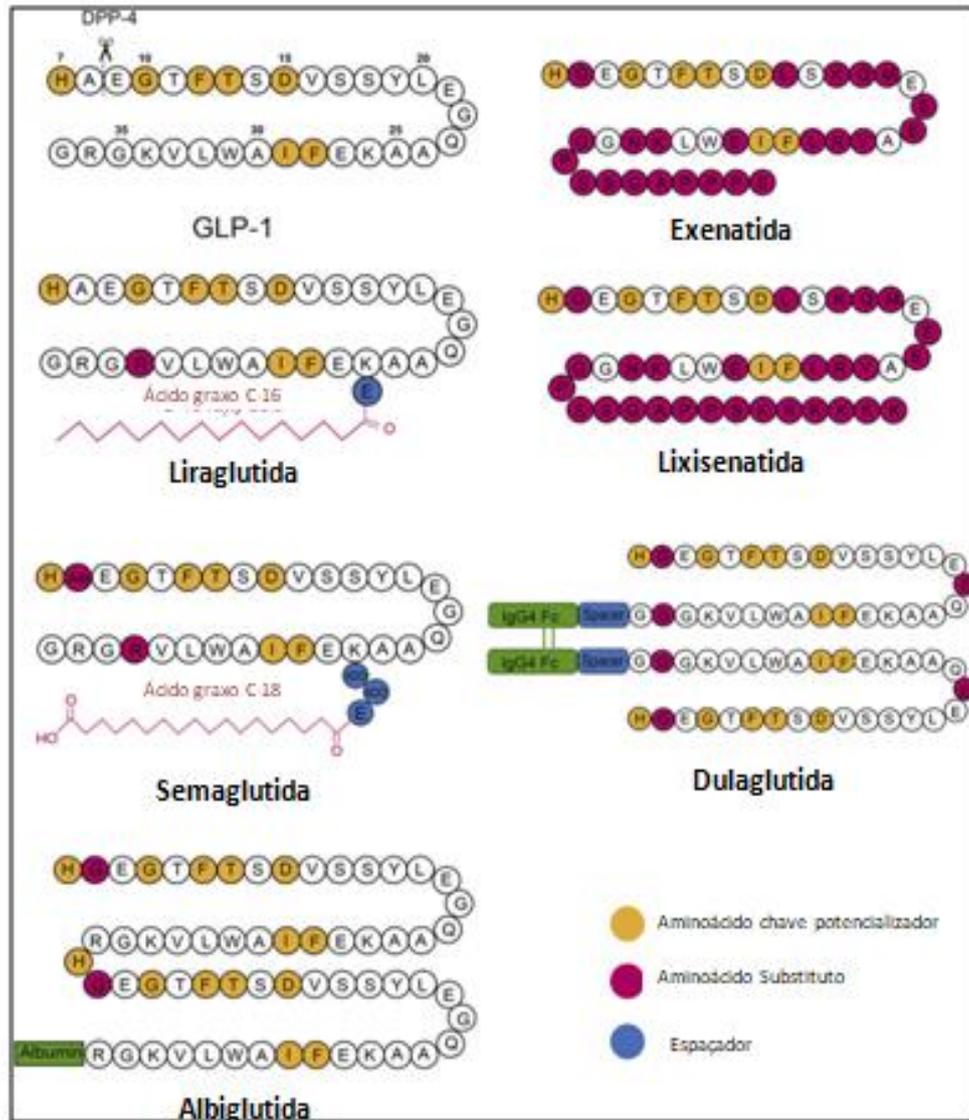


Figura 3: Estrutura química dos análogos do GLP-1 humano e a ação da enzima DPP-4 (YU et al., 2018).

O Exenatida foi o primeiro análogo de GLP-1 comercializado, aprovado pelo FDA em 2005, é uma versão sintética do exendin-4, que foi isolada da saliva do lagarto monstro de Gila. É resistente a enzima DPP-4 pela troca de glicina⁸ no lugar de alanina⁸, resíduo no qual a enzima DPP-4 atua. Devido sua semelhança com o GLP-1 (homologia de 53%) produz o mesmo efeito antidiabético por este peptídeo e possui um tempo de meia vida relativamente curto devido a depuração renal deste peptídeo (cerca de 2 a 4 horas), sendo necessário a administração subcutânea duas vezes ao dia. (BARRINGTON et al., 2011; LEE; LEE, 2017).

O Albiglutida foi aprovado pelo FDA em 2014, possui 97% de homologia com o GLP-1 humano e diferencia-se pela substituição de dois aminoácidos alanina por glicina ligada a uma molécula de albumina o que torna o tempo de meia vida mais prolongado (cerca de 5 a 7 dias), permitindo administração subcutânea uma vez por semana (BUSH et al., 2009; TUAN GIAM CHUANG; KRAGH-HANSEN; OTAGIRI, 2002).

O Dulaglutida, também foi aprovado pelo FDA em 2014, com 90% de homologia o GLP-1 humano. A molécula é formada pela fusão de um dímero resistente a enzima DPP-4 e ligado covalentemente a um fragmento Fc de imunoglobulina humana classe 4 (IgG4) tornando a molécula mais solúvel e imunogênica. Além disso, certifica um tempo de meia vida em torno de 5 dias sendo apropriado para administração 1 vez na semana (BARRINGTON et al., 2011; GLAESNER et al., 2010).

O Semaglutida é o mais novo agonista sintético do receptor de GLP-1, aprovado pelo FDP em 2017, possui 94% de homologia com o GLP-1 humano, constituído por 3 substituições: na posição 8 alanina por alfa-aminoisobutírico, na posição 34 lisina em arginina e na posição 34 acilação do peptídeo com um espaçador e cadeia de ácidos graxos C-18 a lisina. Essas modificações tornam a molécula menos susceptível a ação da enzima DPP-4 e permitem uma forte ligação com a albumina reduzindo a depuração renal e conferindo um maior tempo de meia vida sendo administrada apenas 1 vez por semana. (KAPITZA et al., 2015; LAU et al., 2015).

Já o Lixesenatida foi aprovado pelo FDA em 2016, possui alta afinidade pelo GLP-1 humano (cerca de 4 vezes comparado ao GLP-1 nativo). As modificações constituem na deleção de um resíduo de prolina e adição de seis resíduos de lisina C-terminal tornando a molécula mais resistente a ação da DPP-4 e sendo administrada 2 vezes ao dia devido seu tempo de meia vida curto (cerca de 2 a 4 horas) (CHRISTENSEN et al., 2011; LEE; LEE, 2017).

E por fim, o Liraglutida que possui 97% de homologia com o GLP-1 humano, diferindo apenas na substituição arginina₃₄ por lisina e uma adição de ácido glutâmico e ácido graxo livre de 16 carbonos a lisina 19 (Figura 4). Sua meia-vida em humanos é de aproximadamente 13 horas após a subcutânea injeção, permitindo administração uma vez ao dia (JACOBSEN et al., 2009; ROLIN et al., 2002).

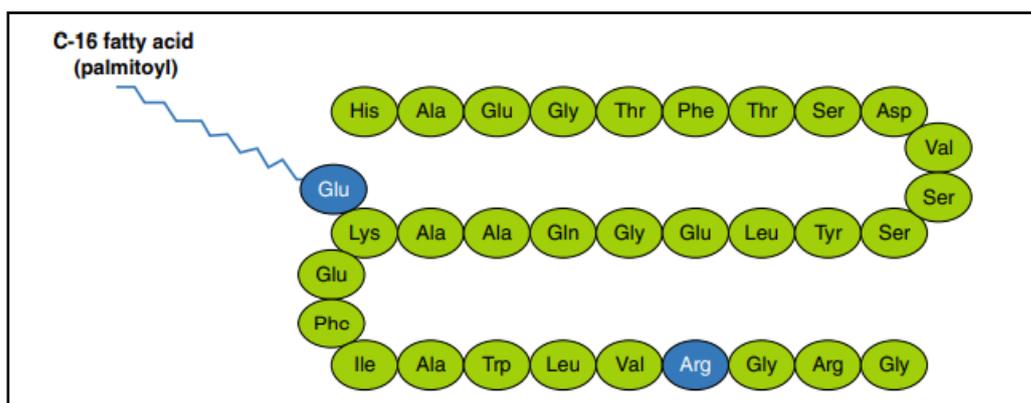


Figura 4: Esturuta Química Liraglutida.

Estudos com receptores *in vitro* demonstraram que o Liraglutida é um agonista potente e seletivo no receptor GLP-1 humano, e estudos *in vivo* demonstraram que este peptídeo promove reduções clinicamente significativas na hemoglobina glicada (HbA1c) de 0,8-1,5%,

seja administrado em monoterapia ou em combinação com metformina, glimepirida, rosiglitazona ou insulina. O Liraglutida também tem vários outros benefícios clínicos, incluindo reduções no peso corporal e pressão arterial sistólica e baixas taxas de hipoglicemia (JACOBSEN et al., 2016).

O Liraglutida é encontrado no mercado atualmente em duas formulações: Victoza® e Saxenda®, ambos do mesmo fabricante, Novo Nordisk sendo aprovados pelo FDA em 2005 e 2017 respectivamente. As duas formulações são compostas com 6mg/mL em uma caneta com administração subcutânea 1 vez ao dia.

O Victoza® é indicado para tratar DMII quando dieta e exercício sozinhos já não conseguem controlar seu nível de açúcar no sangue. O tratamento é iniciado com 0,6 mg por dia, durante 1 semana. Esta dose inicial destina-se a reduzir os sintomas gastrointestinais. Após 1 semana, a dose é aumentada para 1,2 mg e pode ser aumentada para 1,8 mg com base no controle glicêmico individual (DA CONCEIÇÃO; DA SILVA; BARBOSA, 2017; JACOBSEN et al., 2016).

O Saxenda® é indicado em associação a uma dieta hipocalórica e aumento do exercício físico para controle crônico de peso em adultos com Índice de Massa Corporal (IMC) de 30 kg/m² ou mais (obeso/muito acima do peso) e IMC de 27kg/m² correspondente a pessoas com sobrepeso e problemas de saúde relacionados ao peso. O tratamento é iniciado com uma dose menor (0,6mg), que será aumentada gradualmente ao longo das primeiras semanas até atingir a dose de 3,0 mg, que será mantida da quinta semana em diante (MCEVOY, 2016).

Apesar das formulações dos agonistas do receptor GLP-1 serem mais caras do que outros medicamentos disponíveis no mercado, seu uso oferece vantagens com relação à redução da hemoglobina glicada (HbA1c), pressão arterial, perda de peso, proteção cardiovascular e menor risco de hipoglicemia.

2.6 Vias de Administração

2.6.1 Via subcutânea

A escolha da via de administração de um medicamento é realizada de acordo com os seguintes fatores: tipo de ação desejada (local ou geral), rapidez da ação desejada e a natureza (composição química) que depende da volatilidade, resistência ao suco gástrico e solubilidade dos fármacos (PIZZOLATO; DE, 2013).

A via subcutânea é indicada como via de segunda opção para a administração de fármacos quando a via oral não é uma opção prática, no entanto há controvérsias e pouca aderência ao seu uso (GÓMEZ; RESTREPO; BRUERA, 2005).

A administração de GLP-1 e análogos por via subcutânea é eficaz em termos de biodisponibilidade, mas é invasivo, causando desconfortos (dor), infecção local, reações cutâneas, como lipoatrofia e lipohipertrofia, o alto custo, necessitam de preparações estéreis e podem apresentar dificuldade para autoadministração ocasionando a diminuição da adesão do paciente ao tratamento (ASTRUP et al., 2009; LOPES et al., 2012). Além disso, a administração sistêmica de proteínas requer injeções repetidas, que podem promover uma menor eficácia terapêutica devido à obtenção de níveis sanguíneos irregulares do fármaco e baixa adesão do paciente à terapia (Carrascosa et al., 2004).

2.6.2 Via Oral

A via oral (VO) é a administração do fármaco através da cavidade bucal, sua principal finalidade é conduzir o medicamento ao estômago e intestino para serem absorvidos e levado por via sanguínea aos tecidos susceptíveis. A VO é a via mais utilizada (representa mais da metade do mercado de medicamentos), por apresentar características como segurança, economia, facilidade de administração, indolor e é facilmente armazenada (não exige refrigeração na maioria dos produtos).

Apesar dessas vantagens, a via oral não é favorável à administração da maioria das proteínas e medicamentos polipeptídicos disponíveis atualmente, pois enfrenta dois desafios. O primeiro é a proteção contra a barreira metabólica no trato gastrointestinal (TGI). Todo o TGI e o fígado tendem a metabolizar proteínas e peptídeos em fragmentos menores de 2 a 10 aminoácidos com a ajuda de uma variedade de enzimas proteolíticas (proteases), que são representadas por quatro tipos principais: protease aspártica (pepsina e renina), cestinil proteases (papaína, endopeptidase), metaloproteases (carboxipeptidase-A, ECA) e serinil proteases (trombina e tripsina). O segundo problema é a ausência de um sistema transportador para absorção de peptídeos com mais de três aminoácidos, como consequência a má absorção e capacidade limitada de transporte através da barreira epitelial intestinal (LIU et al., 2003; SINHA; KUMRIA, 2001).

Dessa forma, nas últimas décadas novas estratégias para administração de proteínas têm sido investigadas para superar os obstáculos encontrados neste tipo de formulação (FIX, 1996). O desafio no design de veículos para administração oral de peptídeos necessita atender alguns critérios como permanecer intactos no trato gastro intestinal a fim de proteger o fármaco da degradação química e enzimática, além disso precisam ser absorvidos a uma taxa eficiente para ser terapeuticamente eficaz (SEMALTY1 et al., 2007; VANDAMME et al., 2002).

2.7 Formulações de Peptídeos Oral

A rota mais conveniente para a entrega sistêmica de produtos farmacêuticos é a via oral. No entanto, tentativas de fornecer peptídeos por via oral não tem sido amplamente bem sucedido. A biodisponibilidade por esta via é baixa devido a suscetibilidade dos peptídeos a hidrólise e pela presença de enzimas proteolíticas no TGI que levam a degradação de peptídeos. Uma maneira de superar barreiras enzimáticas é modificando a estrutura peptídica aumentando sua resistência a degradação enzimática sem diminuir sua potência. Existem alguns exemplos de drogas peptídicas modificadas com atividade oral melhorada.

Em 2007, dois medicamentos biotecnológicos (interferon alfa e hormônio do crescimento humano) que podem ser administrados por via oral são conhecidos por estarem em desenvolvimento clínico nos Estados Unidos (SEMALTY1 et al., 2007).

A BioSante Pharmaceuticals desenvolveu um sistema baseado em fosfato de cálcio para administrar insulina por via oral chamado fosfato de cálcio-PEG-insulina-caseína (CAPIC). Partículas de fosfato de cálcio contendo insulina foram sintetizadas na presença de PEG-3350 e modificadas pela agregação de partículas de caseínas para obter o sistema de distribuição de insulina oral, CAPIC. Estudos em ratos diabéticos mostraram que a administração oral de insulina através do novo sistema era eficaz na redução e na manutenção

dos níveis de glicose no sangue. A formulação mostrou resultados positivos em testes pré-clínicos e provavelmente será uma alternativa às injeções de insulina (MORÇÖL et al., 2004).

Em 1995 foi aprovado o DDAVP (desmopressina), para o tratamento de pacientes com diabetes insípido craniano. O DDAVP difere estruturalmente do peptídeo de ocorrência natural, vasopressina, em duas posições. DDAVP possui ácido mercaptopropoínico em vez de hemicistina na posição 1 e D-arginina no lugar de L-arginina na posição 8. Essas modificações levam a maior estabilidade contra a degradação proteolítica e aumento da permeação na membrana. No entanto, a dose de peptídeo necessária para comprimido ainda é muito maior do que o necessário pela administração parenteral (NIU; CHIU, 1998).

Um grupo de pesquisadores desenvolveu sistemas de administração por via oral de insulina mucoadesivos utilizando hidrogéis de lectina. Desenvolveram uma classe de hidrogéis de complexação compostos de ácido metacrílico enxertados com cadeia de etileno glicol (P(MAA-G-EG)) funcionalizados com glutamina de germen de trigo (WGA) com o objetivo de realizar a administração oral de insulina com eficácia. Os transportadores do fármaco foram utilizados para minimizar os efeitos do ambiente do trato gastrointestinal e para carrear a insulina até o intestino delgado superior, explorando a mudança do pH entre essas regiões. O aprisionamento da insulina na rede polimérica não foi afetado pela funcionalização WGA e a eficiência de encapsulação foi de 75% tanto nas micropartículas funcionalizadas quanto nas não funcionalizadas. Em janeiro de 2006 o FDA aprovou o lançamento de insulina humana para inalação em pó. O produto foi introduzido no mercado dos Estados Unidos em Dezembro de 2006 (PEPPAS, 2004; SEMALTY1 et al., 2007).

A Savaysa (Edoxaban), é um medicamento anticoagulante oral, inibidores do fator Xa. Foi desenvolvido e aprovado em julho de 2011 no Japão, para prevenção de tromboembolismos venosos após cirurgia ortopédica de membros inferiores, e aprovado no Estados Unidos pela FDA em janeiro de 2015 para a prevenção de acidente vascular cerebral e embolia sistêmica do sistema nervoso não central (CHAN; PISANO, 2015).

Em 2012 foi lançado o Linzess, contidos em cápsulas para administração oral. Linaclotida é um peptídeo agonista de guanilato ciclase usado para tratar síndrome do intestino curto e constipação idiopática crônica. Funciona aumentando o líquido do intestino e ajudando a acelerar o movimento dos alimentos através do intestino (KINTZING; COCHRAN, 2016).

O Entresto, aprovado em 2015, são comprimidos revestidos compostos por Sacubitril e Valsartana para o tratamento de insuficiência cardíaca crônica. Este medicamento funciona bloqueando os efeitos da neprilisina através do sacubitril, e do receptor angiotensina II através da valsartana. Por ação multimodal, o sacubitril mais o valsartan aumentam a resposta benéfica do sistema neuro-hormonal do coração, inibindo os efeitos prejudiciais do sistema renina-angiotensina-aldosterona (FALA, 2015).

No período de 2014 a 2016 foram aprovados cinco medicamentos peptídicos de administração oral (comprimidos revestidos) para o tratamento da hepatite crônica, são eles: Daklinza (Daclatasvir), indicado para o tratamento de infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) em pacientes adultos com infecção por HCV de genótipos 1 e 3 (MONTGOMERY et al., 2016). O Technivie composto por ombitasvir, inibidor da NS5A do vírus HCV, paritaprevir, um inibidor de protease NS3/4 A e ritonavir, um inibidor da CYP3A, é indicado para o tratamento de pacientes com hepatite C crônica do genótipo 4 sem cirrose ou com cirrose compensada (ZAJAC et al., 2019). O Zepatier é um medicamento combinado com Elbasvir, um inibidor da NS5A e Grasoprevir, um inibidor de protease NS3/4A, indicado para

o tratamento da Hepatite C em pacientes com genótipos 1 e 4 (RATRA; LOFTUS, 2017). Harvoni composto por Ledipasvir, um inibidor da proteína NS5A essencial para replicação e montagem dos vírus e Sofosbuvir, inibidor da RNA polimerase (SOFIA; LINK, 2017). Viekira Pak composto por ombitasvir, veruprevir e ritonavir que atuam respectivamente como inibidor de NS5A, inibidor de protease NS3/4A e um inibidor da polimerase NS5B não-nucleotídeo que atuam em três diferentes estágios do ciclo de vida da doença, inibindo a reprodução do vírus (RAEDLER, 2015).

Além desses, também estão no mercado 3 medicamentos peptídicos oral para o tratamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV) demonstrado na Tabela 4. São eles: Evotaz composto por atazanavir, azapeptídeo inibidor de protease do HIV e cobicistate, inibidor seletivo baseado no mecanismo de ação da inibição do citocromo P450 e da subfamília CYP3A (DIONNE, 2019). O Genvoya composto por elvitegravir, inibidor da integrase, cobicisato, retarda a degradação do elvitegravir aumentando o efeito antiviral, tenofovir alafenamida que é um pró-droga do tenofovir, e o emtricitanina que é inibidor da transcriptase reversa assim como o tenofovir (MEDICSUPPLY, 2017). E o Prezcoibix composto por danuravir, que impede a multiplicação do vírus e cobicistate já descrito anteriormente (DIONNE, 2019).

Nome Comercial	Nome Genérico	Aprovação	Financiador	Indicação
Entresto	Sacubitril Valsartan	2015	Novartis	Insuficiência cardíaca crônica
Daklinza	Baclastavir	2015	Bristol-Myers Squibb	Hepatite C Crônica
Technivie	Ombitasvir Paritaprevir Ritonavir	2015	Abbvie	Hepatite C Crônica
Zepatier	Elbasvir Grazoprevir	2016	Merck	Hepatite C Crônica
Evotaz	Atazanavir e Cobicistat	2015	Bristol-Myers Squibb	HIV
Genvoya	Emtricitabine Tenofobir Alafenamide	2015	Gilead Sciences	HIV
Prezcobix	Darunavir Cobicistat	2015	Janssen	HIV
Linzess	Linaclotide	2012	Ironwood Pharmaceuticals e Forest Laboratories	Síndrome do intestino curto e constipação idiopática
Harvoni	Ledipasvir Sofosbuvir	2014	Gilead Sciences	Hepatite C Crônica
Viekira Pak	Ombitasvir Veruprevir Ritonavir	2014	Abbvie	Hepatite C Crônica

Tabela 4: Medicamentos contendo peptídeo administrado por via oral aprovados em 2012-2015.

2.8 Estratégias de formulação

As abordagens para contornar a ação proteolítica devem se basear na visão principal da degradação do medicamento peptídico. As abordagens incluem: pró droga, coadministração de inibidores de protease, uso de intensificadores de permeação e surfactantes, uso de sistema transportador e /ou abordagens de formulação (SEMALTY1 et al., 2007).

2.8.1 Pró fármacos

A estratégia de pró-fármacos é considerada uma das mais antigas para proteção de proteínas e peptídeos. Os pró-fármacos consistem da modificação química das proteínas tornando-as mais estáveis com meia-vida plasmática aumentada (Tabela 5). As estratégias para formação de pró-fármacos incluem substituição de d-aminoácidos, substituição de olefênica, substituição de desidro-aminoácidos, redução de carboxil, fixação de polietilenoglicol (PEG) ao grupo amino, modificação de retro inversão e modificação de tio-metileno (BREWSTER; WALTHAM, 1981; WYVRATT; PATCHETT, 1985).

Proteína/Peptídeo	Pró-droga
Hormônio liberador de S-gonadotrofina	S-Gn-RH-A
Hormônio de crescimento	Nonopeptide com D-Arg-6-GHRP-6
Hormônio Luteinizante	Buserelin, luprorelina, gosereline
Vasopressina	Desmopressin
Somatostatina	Sandostatin

Tabela 5: Lista de pró fármacos de proteínas e peptídeos (SEMALTY1 et al., 2007).

2.8.2 Inibidores das proteases

Os inibidores das proteases podem ser coadministrados com proteínas e peptídeos com o objetivo de alterar o ambiente para máxima estabilidade enzimática. Esses inibidores são avaliados em relação à sua capacidade proteolítica e demonstraram resultados positivos na absorção oral de tetragastrina, insulina, arginina, inibidores de renina e vasopressina como demonstrado na Tabela 6 (JENNEWEIN; WALDECK; KONZ, 1974; SAFFRAN et al., 1988).

Droga	Inibidor de protease	Resultados
Insulina	Aprotinina, bactracina, bestatina, camostatmesilate, inibidor de quimotripsina FK- 488, glicolato de sódio, inibidor de tripsina de soja	Redução significativa na digestão de insulina e melhora no perfil de absorção intestinal
Insulina	Camostatmesilato	Os níveis plasmáticos de glicose diminuíram de maneira dependente da dose
Vasopressina e análogos	Aprotinina	Melhora no perfil de atividade da droga
Calcitonina	Camostatmesilato	Melhora significativa na entrega da calcitonina

Tabela 6: Estudos de medicamentos protéicos com inibidores de protease (SEMALTY1 et al., 2007).

2.8.3 Intensificadores de permeação

Outra técnica para proteção de peptídeos por via oral é a utilização de intensificadores de permeação. São compostos que, quando adicionados a um soluto, aumentam sua absorção através das membranas biológicas. Os intensificadores de permeação auxiliam as proteínas (moléculas grandes) a atingirem níveis terapêuticamente significativos de absorção luminal (ARUNACHALAM et al., 2011).

Os surfactantes são uma classe dos intensificadores de permeação que podem estabilizar uma proteína contra a desnaturação durante várias etapas desde a incorporação até a liberação no local de entrega. O uso de surfactantes aumenta a permeação e a estabilidade das formulações de proteínas e peptídeos. Como exemplo o glicolato de sódio além de aumentar a permeação, inibe a amino leucina peptidase e protege a insulina da proteólise (ARUNACHALAM et al., 2011).

2.8.4 Sistemas transportadores

Também são utilizados tipos especiais de transportadores para proteínas e peptídeos pouco absorvidos, que são instáveis no lúmen gastrointestinal por serem direcionados a um tecido ou órgão específico. Um sistema transportador bem projetado protege a droga das proteases intestinais e localiza a droga na membrana celular ou próximo a ela, para maximizar sua força motriz para a permeação passiva. Foram estudados vários novos sistemas transportadores como vesículas lipídicas, sistemas de partículas, emulsões e sistemas bioadesivos (CHEN; LANGER, 1998).

No entanto, pode-se concluir que uma variedade de abordagens é adotada na formulação de peptídeos orais de acordo com a natureza dos medicamentos e a matriz de administração. A tabela 7 mostra as principais estratégias já desenvolvidas para certas formulações de peptídeos e proteínas. Como exemplo, um polímero azo que é estável no TGI e se decompõe na junção íleocecal, foi usado para carrear a insulina por via oral e demonstrou-se promissor. Além disso, os conjugados de inibidores de quitosana-EDTA protease têm sido utilizados para a administração de muitos peptídeos (BERNKOP-SCHNÜRCH; SCERBE-SAIKO, 1998; SAFFRAN et al., 1986). Várias formulações testadas

para administração oral de proteínas incluem emulsões, lipossomas, nanopartículas e cápsulas revestidas com gelatina (SEMALTY1 et al., 2007).

Natureza das proteínas	Abordagem de Formulação
Instável em solução	Liofilização usando crioprotetores e incorporando a droga em uma matriz de entrega como um pó sólido
Adsorção para matriz de entrega	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incorporação de surfactante hidrofílicos (Polissorbato 20/80, Pluronic F.68) 2. Adição de outra proteína concorrente da superfície de adsorção
Alta concentração de proteína necessária no sistema de entrega propenso a agregação	<ol style="list-style-type: none"> 1. Adição de surfactante para diminuir a auto-associação 2. Uso de pró-fármaco menos solúvel, ex: complexação com metal (zinco-insulina)
Baixa estabilidade em pH baixo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Liofilização 2. Formulação em tampão com pH alto 3. Adição de sal básico solúvel na matriz de distribuição para neutralizar a degradação ácida 4. Formulação da matriz de entrega de microporos ao invés de dispositivo monolítico
Sensibilidade ao calor	Utilizar o processo de encapsulamento de homonização a baixa temperatura

Tabela 7: Principais estratégias desenvolvidas para formulações de peptídeos e proteínas.

2.9 Abordagens de Formulação

Os métodos para a produção de formulações de proteínas são a emulsão, coacervação, extrusão, secagem por pulverização e polimerização que serão descritos posteriormente. É necessário ressaltar que em todos esses métodos, agentes de alta tensão, alta temperatura, calor e reticulação devem ser evitados ou minimizados, para garantir a estabilidade durante a formulação (LEWIS, 1990).

Sabendo que as proteínas são mais estáveis no estado sólido do que no líquido, outras estratégias de formulação vêm sendo amplamente empregadas como a secagem por spray e a liofilização. Em um estudo, o hormônio de crescimento humano (hGH) foi liofilizado para obter uma forma mais estável. Após a remoção da água, diminuiu o potencial de degradação durante a liberação devido a diminuição da mobilidade das moléculas e assim, garantiu a estabilidade e melhorou a biodisponibilidade da administração oral do hormônio peptídico.

Os sistemas de liberação poliméricos são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica para o preparo de formulações com peptídeos e proteínas. Os principais sistemas poliméricos em estudo atualmente incluem as micropartículas, nanopartículas e os hidrogéis. Estes sistemas podem melhorar a terapêutica com peptídeos e proteínas oferecendo uma liberação prolongada e ou/ específica, redução dos efeitos adversos como degradação das proteínas no organismo resultando no aumento da biodisponibilidade do fármaco (MELO; SILVA-CUNHA; FIALHO, 2013).

2.10 Microencapsulação

A microencapsulação é uma alternativa válida para administração oral de peptídeos e proteínas visto que neste método, é possível aplicar diferentes estratégias adaptadas, de forma a proteger os fármacos da degradação enzimática e aumentar a permeabilidade através do epitélio intestinal (SILVA et al., 2003).

As micropartículas (MPs) são definidas como pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanhos que podem variar entre 1 a 1000µm. Subdividem-se em microesferas que são caracterizadas como sistemas matriciais, nos quais o fármaco está homogeneamente disperso no material polimérico e microcápsulas que consistem sistemas reservatórios, nos quais é possível identificar microdomínios diferenciados do fármaco, que pode ser sólido ou líquido (Figura 5) (MENDES, 2011).

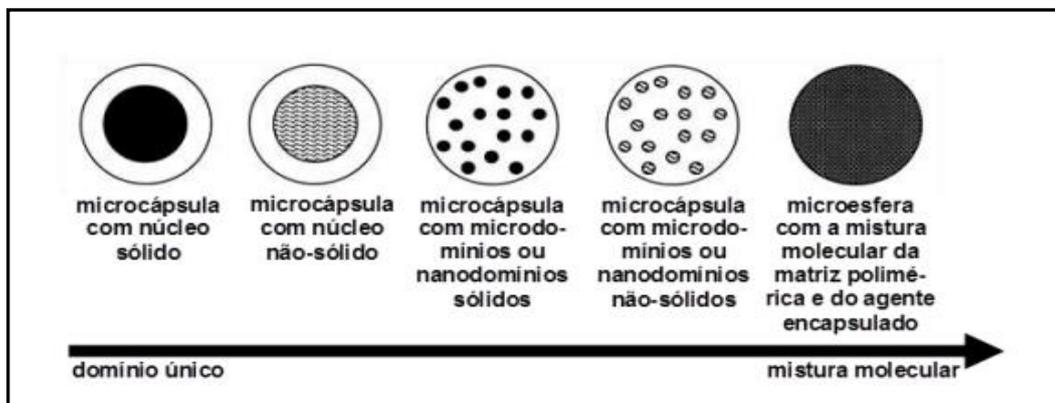


Figura 5: Esquema representativo microcápsulas e microesferas (BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2004).

A tecnologia de microencapsulação é utilizada na indústria farmacêutica para mascaramento de sabores ou odores, conversão de líquidos em sólidos, proteção em relação aos agentes atmosféricos (umidade, luz, calor, oxidação), redução ou eliminação da irritação gástrica, administração de fármacos incompatíveis, melhoramento das características de escoamento de pós, facilitação do manuseio de substâncias tóxicas, auxílio à dispersão de substâncias insolúveis em água em meio aquoso e produção de formas farmacêuticas de liberação controlada, sustentada e vetorizada (BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2004; DAS et al., 2011).

Dentre as vantagens desses métodos, as mais específicas são:

- i) Liberação precisa de baixas doses de fármacos potentes;
- ii) Redução da concentração do fármaco em outros locais que não seja os órgãos ou tecidos alvo e proteção dos compostos lábeis, antes e depois da administração até que exerçam sua ação farmacológica;
- iii) Diminuição da frequência de administração;
- iv) Eliminação de flutuações nos níveis séricos do fármaco;
- v) Potencial redução de efeitos adversos;

As micropartículas poliméricas têm sido muito estudadas como sistemas de liberação de peptídeos e proteínas terapêuticos por promoverem liberação prolongada e proteção contra degradação do fármaco incorporado no organismo, resultando em uma maior eficácia terapêutica.

As micro e nanopartículas são utilizadas para diferentes fins, como a administração de proteínas e peptídeo oral, em aplicações oftálmicas, como adjuvantes de vacinas e como formas de liberação de administração parenteral de citostáticos (BLANCO-PRIETO et al., 1998; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

O processo de microencapsulação foi representado pela primeira vez em 1931 com a preparação de microcápsulas de gelatina. Este processo foi utilizado pela indústria agrícola para fertilizantes e pesticidas, construções navais com o intuito de proteger da corrosão e mais tardiamente na indústria farmacêutica para mascarar sabor e odor de certas substâncias. Um dos primeiros exemplos descrito na indústria farmacêutica com este processo foi a microencapsulação do ácido acetilsalicílico com o objetivo de reprimir a irritação gástrica. (JYOTHI et al., 2010; SILVA et al., 2003).

Estudos comprovam que as micro/nanopartículas podem aumentar a biodisponibilidade oral de peptídeos e proteínas. A escolha do método para preparar nanopartículas depende essencialmente do polímero e das características de solubilidade do composto ativo a ser associado a nanopartículas. Entre os métodos gerais de microencapsulação encontra-se a coacervação, polimerização, spray drying, e emulsão/evaporação do solvente (DES RIEUX et al., 2006; SOPPIMATH et al., 2001).

2.10.1 Coacervação

A técnica de coacervação também conhecida como separação de fases consiste na obtenção, a partir de uma solução contendo uma macromolécula dispersa, de duas fases líquidas imiscíveis, uma fase de coacervado, em que a macromolécula está presente em elevada concentração e uma fase de equilíbrio, em que a mesma está em baixa concentração. Quando o sistema apresenta apenas uma macromolécula este processo é designado por coacervação simples e quando estão presentes duas ou mais moléculas de carga oposta é referido como coacervação complexa (DAS et al., 2011).

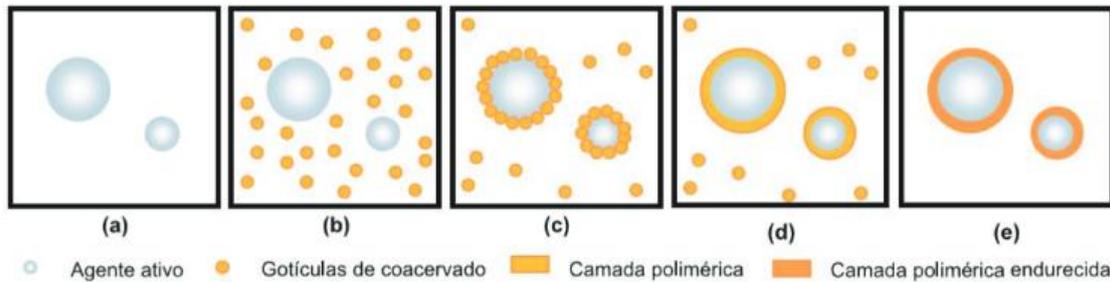


Figura 6. Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação. (a) Dispersão do agente ativo a ser encapsulado em uma solução de polímero. (b) Indução da coacervação, formando gotículas de coacervado. (c) Deposição de gotículas de coacervado em torno dos núcleos contendo o princípio ativo. (d) Coalescência das gotículas de coacervado para formar uma camada polimérica; (e) Endurecimento da camada polimérica por meio da difusão do solvente. Fonte: SILVA et al, 2015.

2.10.2 Polimerização

O processo de polimerização é classificado pela polimerização *in situ* e a polimerização interfacial (Figura7).

A polimerização *in situ* envolve um processo monomérico no interior das gotículas de uma emulsão em que o monômero de partida e o iniciador estão na mesma fase. Já a polimerização interfacial envolve uma rápida polimerização de monômeros na interface de uma emulsão onde o monômero de partida é dissolvido na fase aquosa juntamente com o fármaco e o iniciador na fase oleosa. (PERIGNON et al., 2015).

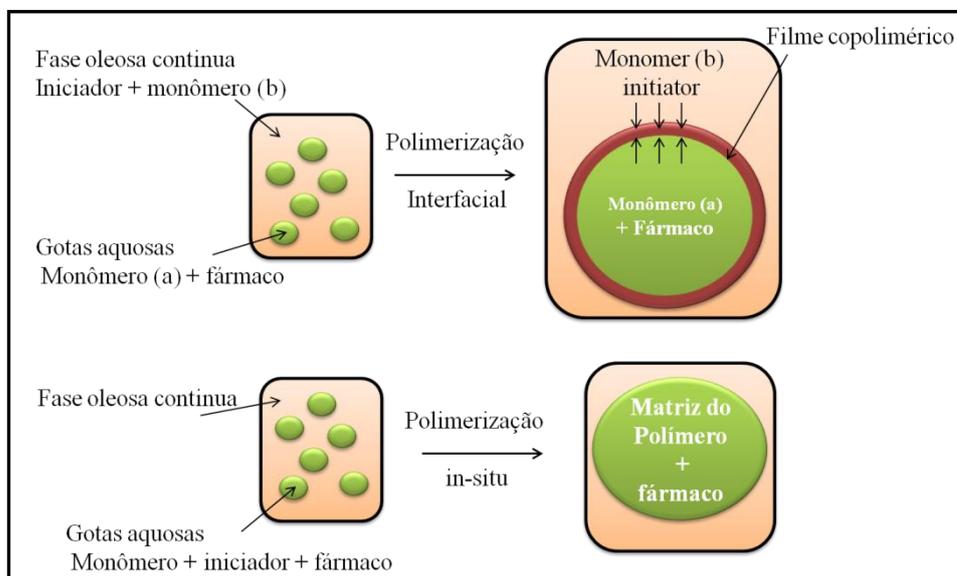


Figura 7: Esquema representativo no método de polimerização *in situ* e interfacial (ICART, 2019).

2.10.3 Spray drying

A técnica spray drying representada na Figura 8, também conhecida como nebulização, consiste na dispersão do fármaco numa solução orgânica ou aquosa do polímero e o sistema é nebulizado numa corrente de ar quente. Após a evaporação do solvente, as micropartículas secas são recuperadas. É uma técnica simples e rápida, porém tem como desvantagem o uso de calor que é capaz de afetar as propriedades de polímeros e fármacos termo-sensíveis (SILVA et al., 2003).

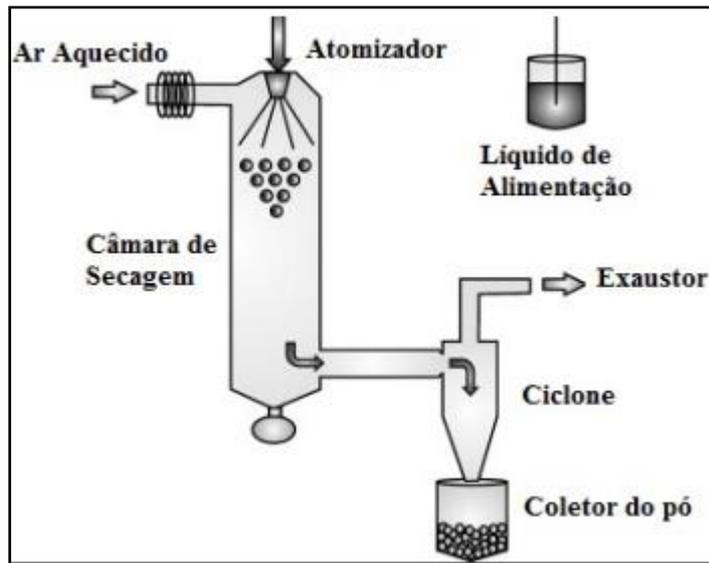


Figura 8: Esquema representativo da técnica de spray drying (SOSNIK; SEREMETA, 2015).

2.10.4 Emulsificação/Extração do solvente

No método de emulsificação/evaporação de solvente (Figura 9), envolve a preparação de uma solução orgânica do polímero contendo o fármaco dissolvido e a sua dispersão sob a forma de microgotas em um meio de suspensão (um líquido em que o polímero seja insolúvel). Em seguida, ocorre a eliminação do solvente por evaporação. O não-solvente deverá ter um ponto de ebulição superior ao do solvente orgânico e deverá ser imiscível com este. Podem ser utilizados diferentes tipos de emulsões, óleo/água - O/A, A/O, A/O/A ou O/A/O. As emulsões O/A são vantajosas porque utilizam a água como não-solvente, ou seja, o processo é econômico e não necessita de reciclagem, as partículas são fáceis de lavar e raramente aglomeram. A grande limitação é a sua utilização exclusiva para fármacos lipossolúveis. Como alternativa, a utilização de sistemas anidros do tipo O/O e as emulsões múltiplas A/O/A, A/O/O ou A/O/O/O que permitem obter rendimentos de encapsulação de substâncias ativas hidrossolúveis mais elevados (NOVIENDRI, 2014; SILVA et al., 2003).

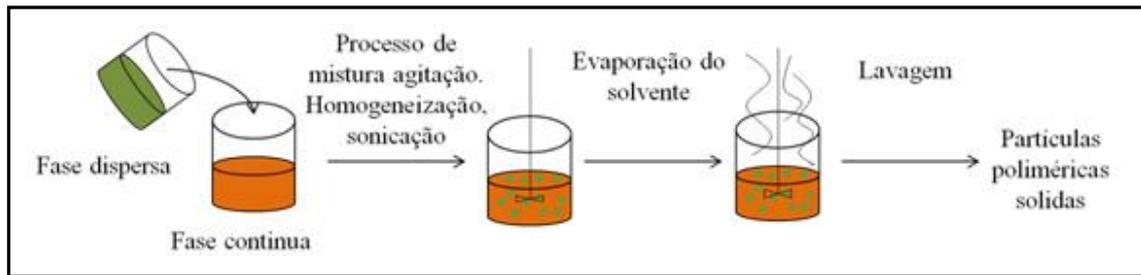


Figura 9: Esquema representativo do método de emulsão dupla com extração do solvente (TEWES et al., 2007).

Embora todas estas técnicas descritas anteriormente possam ser utilizadas para produção de micro e nanopartículas, algumas apresentam desvantagens para microencapsular peptídeos e proteínas. A técnica de spray drying apresenta condições elevadas de temperatura durante o processo dificultando a aplicação para substâncias termolábeis como proteínas e peptídeos. Durante o procedimento de coacervação é necessário garantir a total remoção do agente coacervante devido a toxicidade que pode ser gerada. Já no procedimento de polimerização é difícil a remoção dos monômeros no produto. Essas desvantagens que ocorrem durante o procedimento dificultam a escolha dessas técnicas para a micro e nanoencapsulação de proteínas e peptídeos (PERIGNON et al., 2015; SILVA et al., 2003).

O método de emulsão seguido de extração do solvente é o mais comumente descrito na literatura para encapsular proteínas e peptídeos. É o procedimento mais utilizado tanto em escala industrial quanto laboratorial para microencapsular moléculas hidrossolúveis devido ao menor custo e simplicidade do equipamento exigido. Embora seja o método mais utilizado, alguns cuidados tem que ser tomados, como a evaporação total do solvente orgânico e o controle da agitação (IQBAL et al., 2015; JELVEHGARI; MONTAZAM, 2012).

Realizando uma pesquisa no site do periódico CAPES em outubro de 2020, utilizando como palavras-chaves “peptide microencapsulation” encontram-se 1997 resultados e expandindo a busca é demonstrado 2577 trabalhos relacionados a este assunto. Se adicionarmos o termo emulsão, “emulsion peptide microencapsulation” é destacado 723 itens e expandindo os resultados são encontrados 950 trabalhos, o que representa 39% do resultado da busca total comprovando uma notável utilização desta técnica para o método de microencapsulação.

2.11 Materiais Utilizados para Revestimento

Após décadas de investigação, existem polímeros e copolímeros de diferentes naturezas para desenvolver sistemas de administração oral baseados em micro e nanopartículas. Os principais critérios para a escolha do polímero para administração de fármacos tem sido a compatibilidade, produção direta e degradação que proporcionam uma liberação sustentada dos fármacos encapsulados.

Os polímeros são classificados como sintéticos e naturais. Os polímeros naturais são obtidos a partir de fontes como carboidratos e proteínas. Os polímeros sintéticos são subdivididos em não biodegradáveis e biodegradáveis, que são comumente utilizados na indústria farmacêutica. A natureza dos polímeros e suas propriedades físico-químicas influenciam diretamente no tamanho das partículas e no perfil de liberação. Os polímeros

naturais oferecem uma liberação mais rápida do fármaco, enquanto os polímeros sintéticos permitem uma liberação prolongada podendo variar de dias a semanas (DES RIEUX et al., 2006).

Os polímeros sintéticos comumente utilizados para produção de partículas incluem o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poli (alquilcianoacrilatos), poli (etileno glicol) (PEG) e Eudragit. Os polímeros naturais incluem albumina, gelatina, colágeno e quitosana (DES RIEUX et al., 2006).

A modificação das propriedades da superfície das partículas pode ser realizada revestindo a superfície com polímeros hidrofílicos, com surfactantes estabilizadores, bioadesivos ou incorporando copolímeros biodegradáveis contendo porção hidrofílica na formulação. Essas modificações alteram a hidrofobicidade, potencial zeta, propriedades de mucoadesão das partículas, adsorção de proteínas na superfície e principalmente, melhoram a absorção oral das microartículas (SILVA et al., 2003).

O poli (etileno glicol) (PEG) tem sido empregado como revestimento de partículas para administração de fármacos. As cadeias de PEG formam uma barreira na superfície das micropartículas que estabiliza o complexo e evita a opsonização ou interações com macrófagos (YONCHEVA; LIZARRAGA; IRACHE, 2005).

O policaprolactona (PCL) é adequado para administração controlada de medicamentos devido à alta permeabilidade e excelente biocompatibilidade. No entanto, este polímero se degrada a uma taxa mais lenta que os outros biopolímeros tornando-o adequado para microencapsulação de formulações de liberação lenta. O PCL também pode ser utilizado junto com outros polímeros, tendo como vantagem cinética de degradação sob medida e facilidade de moldar e fabricar partículas com tamanho de poros apropriados a liberação controlada de fármacos contidos dentro da matriz polimérica. O PCL já foi amplamente utilizado em dispositivos médicos como suturas, curativos e na odontologia (LEJA; LEWANDOWICZ, MOHAMED; YUSOH, 2016).

O poli(ácido lático-co-ácido glicólico), PLGA é um polímero biodegradável e biocompatível. Na presença de hidrólise, produz os monômeros de ácido lático e glicólico pelo ciclo de Krebs. No entanto, as mesmas características que tornam o PLGA passível de liberação controlada, podem levar peptídeos e proteínas a instabilidade. A acumulação de ácido carboxílico formados por hidrólise torna a matriz mais ácida, iniciando a degradação peptídica catalisada por ácido (HOUCHIN; TOPP, 2008).

2.12 Eudragit®

Até a década de 1950, todos os medicamentos orais tinham uma grande desvantagem, não era possível controlar o tempo e o local de liberação das substâncias ativas. Com a criação do Eudragit pela empresa Röhm & Haas GmbH em Darmstadt, tornou possível a realização de revestimento dos fármacos, solucionando este problema. Os produtos Eudragit são polímeros com graus variados de solubilidade. Os primeiros revestimentos de fármacos desenvolvidos em 1953 eram solúveis em alcalinos, e portanto, resistentes a ácidos estomacais. As substâncias ativas não foram liberadas no estômago, mas no intestino, onde deveriam ser ativadas. Até os dias de hoje são utilizadas variantes desse tipo de polímero para o revestimento de fármacos sólidos administrados por via oral, como comprimidos, cápsulas e grânulos (NIKAM et al., 2011).

2.13 Propriedades do Eudragit®

Copolímeros do ácido metacrílico: copolímeros de metacrilato de metila (MMA) e acrilato de etila (EA) como componentes éster com ácido metacrílico (MA) são utilizados para revestimentos entéricos. Seu efeito entérico é atribuído à presença de grupos de ácidos carboxílicos que são transformados em carboxilatos a faixa de pH entre 5 e 7 por formação de sal com alcalis ou aminas. Em água pura e ácidos diluídos formam um filme insolúvel que é resistente ao suco gástrico. O pH de dissolução do copolímero depende principalmente do conteúdo dos grupos carboxílicos, por exemplo: pol (MA-MMA) 1:1 (Eudragit L) e poli (Ma-MMA) 1:2 (Eudragit S) (THAKRAL; THAKRAL; MAJUMDAR, 2013).

Através da difração em pó dos tipos de Eudragit (L100, S100, RL e RS) é possível afirmar que este polímero apresenta uma natureza amorfa. O espectro de infravermelho, mostra que este polímero possui vibrações carbonílicas do grupo éster na faixa de 173-1728 cm^{-1} . Um dos fatores na descrição das propriedades físicas dos filmes poliméricos é a temperatura de transição vítrea (T_g), que é uma função da mobilidade molecular dos segmentos de cadeia polimérica. A temperatura de transição vítrea para os tipos de Eudragit são: 9°C para Eudragit NE, 48°C para Eudragit E e maior que 150°C para Eudragit L e S (THAKRAL; THAKRAL; MAJUMDAR, 2013).

O Eudragit é o polímero pH dependente mais utilizado na indústria farmacêutica. É um copolímero derivado do ácido metacrílico e metilmetacrilato, e etilmetacrilato, dependendo de sua composição, começam a dissolver em valores de pH entre 5, e 7,0. Existe uma variedade de polimetacrilatos com diferentes tipos e características de solubilidade. Dentre os quais destacam-se o Eudragit E, L, S, NE, RL e RS (Figura 10) (CHOURASIA; JAIN, 2003).

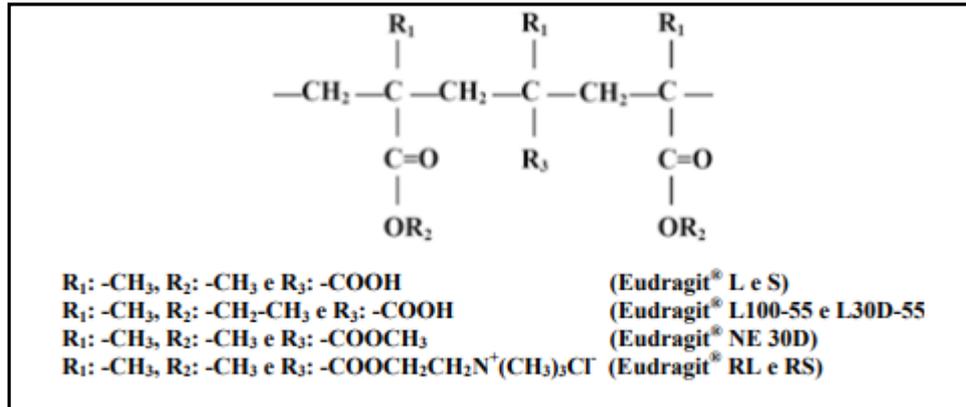


Figura 10: Representação esquemática dos principais tipos de Eudragit (VANDAMME et al., 2002).

De acordo com a estrutura química de cada tipo de Eudragit, diferente é a dissolução e também a aplicação na indústria farmacêutica. Desta maneira, o Eudragit E é solúvel em pH até 5,0 e é utilizado para mascaramento de sabor e na formação de revestimentos para proteção contra umidade. O eudragit L se dissolve em pH entre 5,5 e 6,0 e é empregado na formulação de revestimentos entéricos. O Eudragit RS é insolúvel e pouco permeável à água, já o RL também é insolúvel mas é altamente permeável a água. Tanto o Eudragit RS quanto o RL são utilizados na formulação de produtos de liberação sustentada (CHOURASIA; JAIN, 2003; VANDAMME et al., 2002). A Figura 11 demonstra o pH e o local de solubilidade dos diferentes tipos de Eudragit:

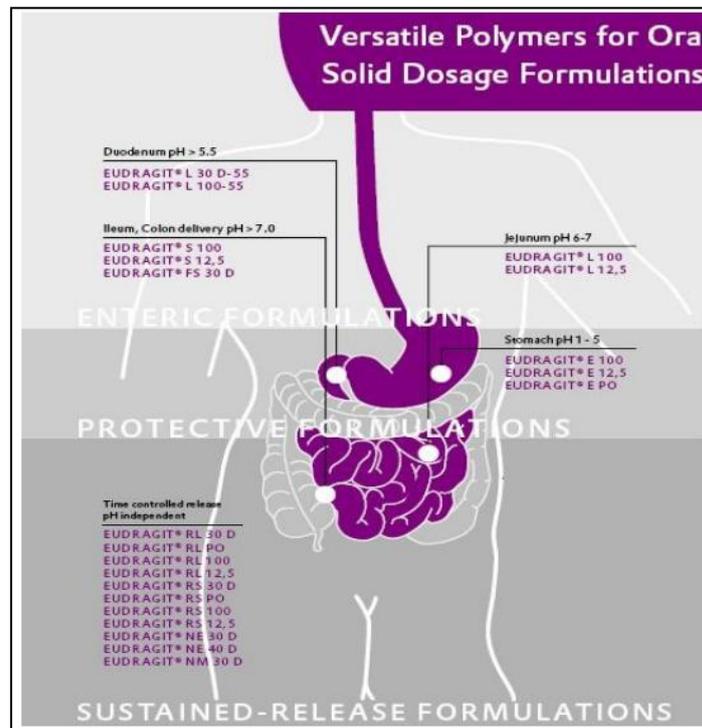


Figura 11: pH e local da solubilidade dos tipos de Eudragit (NIKAM et al., 2011).

Os tipos de Eudragit mais utilizados pela indústria farmacêutica são o E, L e S:

O Eudragit® E100 forma um filme com finalidade protetora, apresenta um sistema de liberação convencional, onde o filme apenas protegerá o comprimido sem alterar a liberação que ocorrerá nos fluidos gástricos. Este polímero se apresenta em forma de grânulos, sendo solúvel em solvente orgânico e nos fluidos gástricos em pH 5,0. Com isso é utilizado em soluções de revestimento com finalidade protetora, a fim de aumentar a estabilidade e as propriedades mecânicas. Ele dispensa a utilização de plastificante, por ser suficientemente elástico. Sua temperatura de transição vítrea é relativamente baixa, em torno de ~ 48°C (MOUSTAFINE; KEMENOVA; VAN DEN MOOTER, 2005; MOUSTAFINE; ZAHAROV; KEMENOVA, 2006).

O Eudragit® L100, tem como função a liberação retardada de fármacos, permite resistência do fármaco nos sucos gástricos, e libera o princípio ativo nos fluidos intestinais, caracterizando uma liberação entérica. Se apresenta sobre a forma de pó, sendo solúvel em solventes orgânicos). É capaz de formar revestimentos com capacidade entérica, sendo liberado em pH 6,0. Neste tipo de polímero é necessário adicionar um plastificante, pois sua temperatura de transição vítrea é alta, maior que 150°C. (FELTON et al., 1995; MOUSTAFINE; ZAHAROV; KEMENOVA, 2006).

O Eudragit® S-100 (ES100) é um polímero que apresenta características gastroresistentes, se dissolve em soluções aquosas com pH maior que 7,0. Então, é muito utilizado na indústria farmacêutica na formulação de sistemas de liberação colônica. O ES 100 designa-se como um pó branco, com 95% ou mais de polímero seco. É um produto aniônico da polimerização do ácido metacrílico e do metilmetacrilato, sendo a proporção entre grupos carboxila livres e grupos ésteres de aproximadamente 1:2 (Figura 12) (MENDES, 2011):

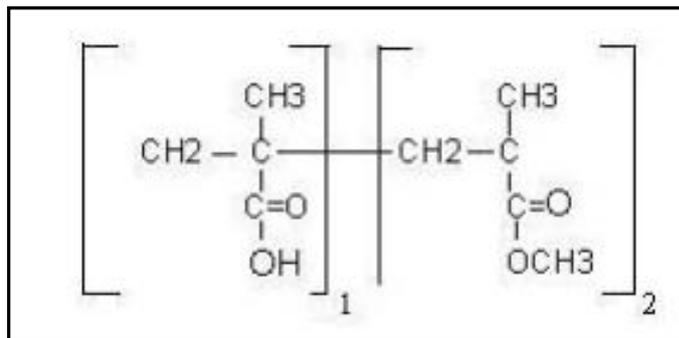


Figura 12: Estrutura Química do Eudragit S-100.

Aplicações dos polímeros Eudragit na liberação de fármacos (GARG; GUPTA, 2008; MULLIGAN, 1993; NIKAM et al., 2011; RAHMAN; ALI, 2008):

- Oftálmicos;
- Bucal e sublingual;
- Gastrointestinal
- Intestinal
- Cólon;
- Transdérmica;
- Vaginal;
- Vacinas;

A necessidade de formas de dosagem gastroresistentes proporcionou o desenvolvimento de tais sistemas de administração de medicamentos. As pesquisas resultaram em formas de dosagens gastroresistentes com base em diferentes abordagens que podem ser alcançadas utilizando diferentes graus de Eudragit (GARG; GUPTA, 2008):

- Forma de dosagem de baixa densidade que causa fluutuabilidade no líquido gástrico;
- Forma de dosagem de alta densidade que é retida no fundo do estômago;
- Bioadesão para mucosa estomacal;
- Motilidade reduzida do trato gastrointestinal por concomitante administração de medicamentos ou excipientes farmacêutico;
- Expansão por inchaço ou desdobramento a um tamanho grande que limita o esvaziamento da forma de dosagem através do esfíncter pilórico.

Além da proteção gastroresistente também é de interesse deste trabalho a administração intestinal de medicamentos. A administração sustentada de fármacos revestidos com o polímero Eudragit, contornam o estômago e liberam o fármaco no intestino. O Eudragit L e S são duas formas de resinas acrílicas entéricas disponível atualmente no mercado. Ambos produzem filmes resistentes ao líquido gástrico e são solúveis nos líquidos intestinal a pH 6 e 7, respectivamente. O Eudragit L está disponível como solução orgânica (isopropanol), dispersão sólida ou aquosa. O Eudragit S está disponível apenas como solução (isopropanol) e sólido (RAHMAN; ALI, 2008).

No entanto, conclui-se que novas estratégias para redução de custos e aumento da estabilidade química e metabólica de peptídeos e proteínas, associada a vias alternativas de administração e liberação de fármacos, estão sendo estudado nas últimas décadas, o que possibilitou inúmeros fármacos baseados em peptídeos alcançarem o mercado. Atualmente, cerca de 110 fármacos peptídicos estão disponíveis para aplicação terapêutica, sendo alguns considerados “block-busters” em vendas, como o etanercept/Enbrel® (artrite reumatóide/\$8 bilhões em 2011), rituximab/Rituxan® (linfoma não-Hodgkin de células/ \$7 bilhões em 2011), glargine/lantus® (diabetes tipo I e II/ \$4,8 bilhões em 2001), pegfrilgrastim/Neulasta® (mielossupressão/ \$3,5 bilhões em 2001). Ainda se estima que a cada ano que passa, a taxa de aprovação de fármacos peptídicos no mercado cresce disparadamente. Em 2015 a taxa de aprovação de fármacos biológicos (enzimas, peptídeos e anticorpos) foi de um terço do total de fármacos aprovados neste ano, um aumento significativo comparado com o ano anterior que foi de um quarto aprovado (SANTOS, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de um medicamento é um processo complexo que demanda a integração de diversas áreas. Assim, a presente proposta tem caráter transversal tanto técnica quanto social, pela inclusão multidisciplinar em um mesmo projeto, de conhecimentos das áreas de engenharia química, engenharia de materiais e tecnologia farmacêutica, além da possibilidade de geração de tecnologia genuinamente nacional e, ainda, transposição entre conhecimento acadêmico e aplicação comercial. Assim, a construção do conhecimento na área de medicamentos é vital tanto para a saúde e bem estar dos pacientes, quanto para o setor farmoquímico brasileiro.

A administração de peptídeos pela via subcutânea é eficaz em termos de biodisponibilidade, mas apresenta dificuldade para auto-administração e pode ocasionar desconfortos (dor), infecção local, reações cutâneas como lipoatrofia e lipohipertrofia, além de apresentar o custo mais elevado se comparado com as formulações administradas pela via oral. Esse conjunto de fatores diminui a adesão do paciente ao tratamento.

A microencapsulação é uma alternativa válida para administração oral de peptídeos e proteínas visto que neste método, é possível aplicar diferentes estratégias adaptadas, de forma a proteger os fármacos da degradação enzimática e aumentar a permeabilidade através do epitélio intestinal.

No entanto, a presente proposta visa o desenvolvimento de formulações de Liraglutida em sistemas micro estruturados para uso oral. Esta via além de ser a mais utilizada, é indolor o que contribui de forma significativa para melhor adesão dos pacientes diabéticos ao tratamento.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Desenvolver composições farmacêuticas poliméricas contendo Liraglutida para auxiliar no tratamento de diabetes tipo II e obesidade com o intuito de ampliar as vias de administração do peptídeo e consequentemente melhorar a adesão dos pacientes ao tratamento.

4.2. Objetivos Específicos

- i. Desenvolver micropartículas de Eudragit S100 carregadas com Liraglutida através da técnica de dupla emulsão com evaporação do solvente.
- ii. Avaliar o rendimento e eficiência de encapsulação das formulações;
- iii. Avaliar a morfologia e granulometria das partículas.
- iv. Avaliar as características físicas químicas das partículas através da termogravimetria;
- v. Quantificar o peptídeo na respectiva matriz polimérica;
- vi. Analisar o perfil de liberação *in vitro* das formulações.

5 MATERIAIS

5.1 Materiais e Reagentes

- Alcól Etílico - VETEC
- Alcól Isopropílico - VETEC
- Água destilada e Milli-q
- Diclorometano - VETEC
- DMSO – Amresco
- Fluorescamina – Sigma-Aldrich
- Fosfato de sódio dibásico - Fabricante VETEC (código de catálogo 225)
- Eudragit ® tipo S100 – Degussa
- Poliacetato de Vinila (PVA), Sigma-Aldrich, (31000-50000)
- Filtro 100KDa – MerckMillipore
- Victoza® (Liraglutida) 6mg/mL

5.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador Mecânico RW 20 digital – IKA
- Amicon – MerckMillipore
- Centrífuga: Fabricante Eppendorf, modelo 5804R, rotor F45-30-11
- Centrífuga: Fabricante DLS DynaPro NanoStar - Wyatt Technology
- Balança analítica: Fabricante Shimadzu, modelo AY220
- Dispersor Ultraturrax: Fabricante IKA, modelo Dispersing system T10 basic
- Dispersor Ultraturrax: Fabricante IKA, modelo T 25 digital
- Estufa: Fabricante Splabor, modelo SP – 200
- Filtro 100KDa - MerckMillipore
- Leitor de placas Sinergy H1- BioTek
- Liofilizador L101 – Lotop
- Mastersize 2000 – Malvern
- Microscópio eletrônico de varredura FEI-Quanta 259
- Phmetro: Fabricante Hanna Instruments, modelo HI 2221
- Placa eletromagnética – IKA
- SigmaPlot 12.5 - Systat Software, Inc., CA, USA

6- MÉTODOS

6.1- Preparo de Micropartículas

Inicialmente, foi realizada a produção de composições farmacêuticas poliméricas contendo Liraglutida. As partículas poliméricas foram produzidas a partir do polímero Eudragit S100 e da formulação comercial do medicamento de Liraglutida, Victoza®. O método de produção das partículas utilizado foi de emulsão dupla e extração do solvente (IWATA; MCGINITY, 1991) caracterizado através das seguintes etapas:

- i. Para a preparação da fase orgânica (FO), o Eudragit foi solubilizado em 5 mL de uma mistura de solventes contendo Álcool Etílico, Álcool Isopropílico e Dicolometano na proporção de 6:4:5 respectivamente, com concentração final de 6% p/v.
- ii. Em seguida, 200 µL de Victoza® (6mg/mL) (fase aquosa interna) foi adicionada à fase orgânica com agitação em Turrax T10 durante 10 minutos a 20.000 rpm para a formação da primeira emulsão do tipo água em óleo (A/O).
- iii. A primeira emulsão formada foi gotejada em 20 mL de uma solução aquosa de PVA a 2% (fase aquosa externa) com agitação em Turrax T10 a 20.000 rpm durante 10 minutos para formar a segunda emulsão do tipo água em óleo em água (A/O/A).
- iv. Para a evaporação da mistura de solventes o material ficou sob agitação mecânica durante 2 horas a temperatura ambiente.
- v. Foi realizada a retirada dos ativos não aprisionados por 3 ciclos de centrifugação e lavagem com água ultrapura, durante 10 min a 5000 rpm (após a centrifugação o sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior quantificação do peptídeo).
- vi. As micropartículas obtidas foram resfriadas em nitrogênio líquido por 5 minutos e liofilização (152 uHg de pressão; 50°C de temperatura) por 4 dias.

As micropartículas foram desenvolvidas através do método de dupla emulsão seguida por extração do solvente. Para a obtenção dessas formulações foram utilizados o peptídeo Liraglutida (1,2mg) e o polímero Eudragit S100 (300mg). Elas foram obtidas na forma de pós liofilizados com o intuito de realizar a administração oral, permitindo a liberação controlada do peptídeo para minimizar os problemas gastrointestinais apresentados por esta via.

As micropartículas de Eudragit sem o peptídeo também foram produzidas, centrifugadas, lavadas, liofilizadas e caracterizadas pelas mesmas técnicas para comparação com as MPs contendo o ativo.

6.2- Caracterização das Micropartículas

6.2.1 Rendimento e Eficiência de Encapsulação

O rendimento (RE) do processo foi calculado com base no percentual entre a massa recuperada após a liofilização (MPt) em relação a massa total empregada na produção da formulação (peptídeo (PEPo) + polímero (POLo)) representada pela Equação 1:

$$RE(\%) = \frac{MPt}{(PEPo + POLo)} \times 100$$

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada pela quantificação do peptídeo existente na lavagem do sobrenadante (PEPs) que foi conservado a -20°C através método de derivatização química por fluorescamina. Esse valor é subtraído da quantidade de peptídeo utilizado na produção da formulação (PEPo) e o cálculo é representado pela Equação 2:

$$EE(\%) = \frac{(PEPo - PEPs)}{PEPo} \times 100$$

6.2.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise morfológica pequenas porções das partículas liofilizadas foram fixadas em suporte de microscopia chamado stubs com fita dupla-face de carbono e cobertas com uma fina camada de ouro como material condutor. O processo para deposição do metal utilizado foi o sistema de evaporação conhecido como “sputtering”. Neste sistema, um eletrodo recoberto de ouro é ligado ao potencial negativo de uma fonte de tensão da ordem de 1 a 2 KV que é bombardeado com íons positivos. Os íons positivos são produzidos pela ionização do argônio, injetado na câmara de descarga, e o ouro se deposita sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. As imagens foram obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando voltagem de 12,5KV.

A avaliação morfológica de sistemas nano e microestruturados é realizada a partir da observação da forma, tamanho e superfície das partículas por meio das técnicas de microscopia.

6.2.3 Distribuição de Tamanho de Partículas (DLS)

Para a realização desta análise, foram preparados lotes (n=3) de micropartículas vazias (sem conter o peptídeo). As partículas foram caracterizadas em aparelho Malvern Mastersizer 2000 laser diffraction particle size analyzer (Laboratório Engepol (PEQ/COPPE/UFRJ)).

As micopartículas foram pesadas e transferidas para um Becker contendo tampão fosfato de sódio 50mM (pH 4,5 e 8) sob agitação moderada, para cada mL de tampão foram adicionados 5mg da formulação. As alíquotas foram retiradas em tempos determinados de acordo com cada pH. Em pH 4,5, as leituras foram realizadas no tempo zero e duas horas, no pH 8 as leituras ocorreram nos tempos zero, 10, 20, 30, 40 e 60 min. Com a variação da leitura é possível afirmar se há mudança de distribuição de tamanho das partículas em função do tempo e da faixa de pH utilizada.

6.3 Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas das amostras foram realizadas usando o aparelho TGA-50 Shimadzu, sob atmosfera de nitrogênio. Uma pequena quantidade das micropartículas foi inserida no porta amostras do equipamento e submetida a um fluxo de aquecimento de 20°/min variando de temperatura ambiente (cerca de 24°C) até 600°C. Nessa análise foram utilizadas as micropartículas com o peptídeo, as micropartículas vazias (sem o peptídeo) e o polímero Eudragit S100 puro.

6.4 Liberação *in vitro*

Após a liofilização, 50mg da formulação foi pesada e misturada com 20 mL do meio de liberação (tampão fosfato de sódio pH 8,0) transferidos para o Erlenmeyer mantidos sob agitação a 30rpm em estufa a 37°C. Depois de 1 hora e meia, o material foi transferido para o Amicon com membrana de 100 KDa também mantidos sob agitação suave e estufa a 37°C. Sob pressão de nitrogênio, alíquotas de 4mL do material foram filtradas e coletadas de hora em hora realizando a reposição do meio. As amostras coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas por 4 dias e mantidas congeladas para posterior análise.

A coleta da amostra a partir do amicon teve como objetivo separar o peptídeo do polímero, pois a presença do polímero leva a formação de um hidrogel que prejudica a quantificação do peptídeo. A quantificação do peptídeo liberado no meio foi realizada pelo método de derivatização por fluorescamina.

A determinação da cinética de liberação foi feita através da análise de regressão linear do gráfico de dispersão, aplicando três modelos:

- ORDEM ZERO: quantidade liberada por concentração $\mu\text{g/mL}$ versus tempo (dias);
- HIGUCH: quantidade liberada por concentração $\mu\text{g/mL}$ versus raiz quadrada do tempo (dias);
- PRIMEIRA ORDEM: log da quantidade liberada por concentração $\mu\text{g/mL}$ versus tempo (dias).

A partir da análise do coeficiente linear (r) obtido para cada um dos modelos, determinou-se a cinética de liberação. O modelo que apresentou maior valor de R foi o escolhido. O valor do fluxo de liberação (J) corresponde a inclinação (a) da porção linear da curva de liberação para cada formulação.

6.5 Quantificação do Peptídeo por Fluorescamina

As análises quantitativas do peptídeo no sobrenadante e na liberação *in vitro* foram realizadas pelo método de derivatização química por fluorescamina, que é um composto que se liga às aminas primárias do peptídeo gerando um produto fluorescente (UNDENFRIEND et al., 1972). A curva de calibração, assim como as análises dessas amostras foram obtidas no leitor de placas através da fluorescência com emissão em 390 nm e excitação em 480 nm. A curva de calibração foi realizada com diluição seriadas do peptídeo em tampão fosfato pH 8,0 nas seguintes concentrações: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 ug/mL.

7- RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Caracterização das Partículas

7.1.1. Rendimento

As formulações produzidas neste trabalho demonstraram rendimento variando de 42 a 68% (Tabela 8). Inicialmente a massa total do sistema (polímero + Victoza®) correspondia a 301,2 µg, mas nos ensaios de microescalas aqui utilizados realizaram-se 3 etapas de transferência de massa, assim a perda de poucos microgramas em cada etapa pode reduzir o rendimento.

MPs Eudragit S100	
Formulação	Rendimento (%)
F1	42.7
F2	50.3
F3	54.5
F4	48.5
F5	60.4
F6	57
F7	64.5
F8	47.9
F9	68.2
F10	57.8
Média	55.18
Desvio Padrão	7.968

Tabela 8: Rendimento das micropartículas de Eudragit S100 carregadas com Liraglutida

Além da perda de massa durante as etapas do processo, é comum a formação de filmes que pode ocorrer durante o gotejamento (formação da emulsão). Sendo assim, é possível afirmar que o valor do rendimento é devido a um artefato de técnica. Para as análises subsequentes a massa recuperada de cada formulação foi suficiente, além disso, esse problema é facilmente corrigido aumentando a escala da formulação.

O rendimento pode ser prejudicado devido as perdas atribuídas nas diversas etapas do procedimento de formação de micropartículas. (AGARWAL; REDDY; KHAN, 2001).

O baixo rendimento em alguns casos pode estar correlato às perdas, como colagem da solução polimérica no recipiente de vidro, perda de microesferas durante a etapa de lavagem etc. A perda por aderência pode ser minimizada usando um aparelho de plástico ou polietileno (JAIN; PANDA; MAJUMDAR, 2005). No entanto, com o aumento da escala, o rendimento será melhor como já mencionado anteriormente.

Em um trabalho de micropartículas à base de polimetacrilato de insulina, o autor alcançou um rendimento de 80%. (AGARWAL; REDDY; KHAN, 2001). Já no estudo de microesferas de insulina aprisionadas pelo Eudragit S100 para administração oral, apresentou um rendimento variando de 36 a 82% (JAIN; PANDA; MAJUMDAR, 2005).

Os resultados obtidos para o rendimento estão abaixo comparados aos dados da literatura. Entretanto, pode-se afirmar que a massa perdida de formulação não estava no sobrenadante, uma vez que a eficiência de encapsulação está alta e os sobrenadantes apresentavam aspecto límpido.

7.1.2 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação de cada formulação foi obtida através da quantificação do peptídeo (liraglutida) no sobrenadante pelo método de derivatização química por fluorescamina com uma curva de calibração linear nas seguintes concentrações: 0,05/ 0,025/ 0,0125/ 0,006/ 0,003/ 0,00015 $\mu\text{g/mL}$ com coeficiente de regressão linear $r^2 = 0,999$ (Figura 13).

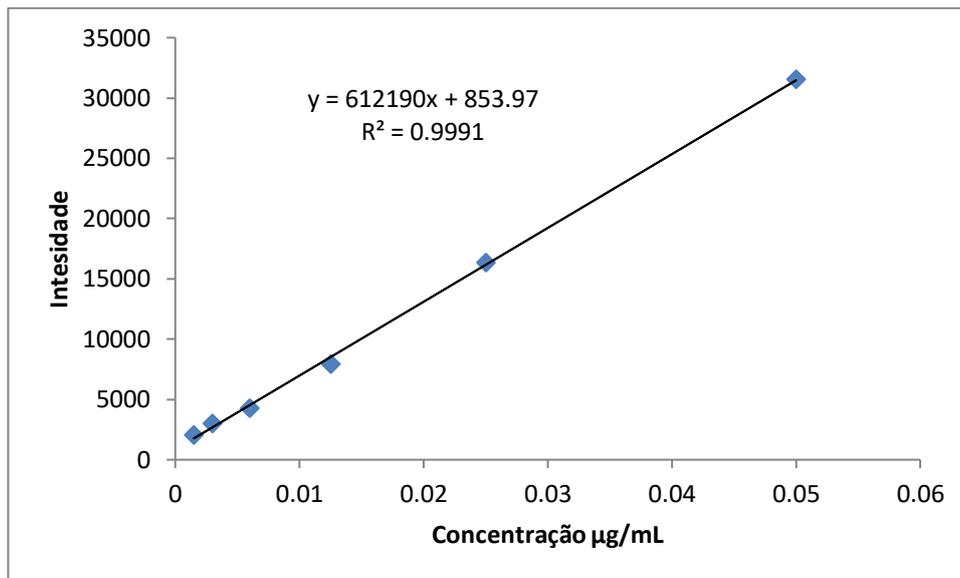


Figura 13: Curva de Calibração do Liraglutida e coeficiente e correlação linear.

A avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) tem por finalidade determinar a porcentagem de fármaco incorporada ao sistema de liberação desenvolvido. A eficiência de encapsulação foi realizada através do sobrenadante, ou seja, através do fármaco que não foi incorporado na formulação. É a análise que determina a quantidade de fármaco real presente na amostra.

Esta análise apresentou resultados elevados para todas as formulações, com valores variando de 85 a 95% de eficiência. O valor de sua alta eficiência pode ser explicado através do seu tamanho: partículas micrométricas possuem valores elevados de área/volume e permitem que moléculas sejam encapsuladas com facilidade em seu interior.

MPs Eudragit S100	
Formulação	Eficiência (%)
F1	87.22
F2	85.95
F3	88.41
F4	94.11
F5	89.5
F6	86.94
F7	96.65
F8	95.13
F9	95.99
F10	94.85
Média	91.475
Desvio Padrão	4.234

Tabela 9: Eficiência de Encapsulação das respectivas micropartículas de Eudragit S100 carregadas com Liraglutida

Segundo Gomes e colaboradores 2006, a eficiência de encapsulação se refere à quantidade de fármaco incorporada ou adsorvida na matriz polimérica. Alguns fatores podem influenciar na capacidade de encapsulamento, como as interações entre o fármaco e o polímero e a solubilidade do fármaco na matriz polimérica.

Em um estudo sobre formação de micropartículas e o mecanismo da emulsão simples e dupla com extração do solvente, o autor afirma que para um encapsulamento bem sucedido, é necessário que as condições da formulação produzam as microgotas com diâmetro muito menor que o da emulsão secundária (ROSCA; WATARI; UO, 2004).

Também se deve atentar para a concentração de polímero utilizada. Segundo Cózar-Bernal e colaboradores 2011, em um trabalho com micropartículas de insulina, a eficiência de encapsulação deste peptídeo foi diminuída à medida que a quantidade de polímero na fase orgânica foi aumentada. (CÓZAR-BERNAL et al., 2011). Tendo em vista essas informações, pode-se afirmar que tanto a proporção do fármaco e polímero quanto à solubilidade do polímero apresentou resultados positivos considerando eficiência de encapsulação superior a 85%.

Em um trabalho sobre nanopartículas de Eudragit L carregadas com insulina, pesos moleculares poliméricos mais altos, resultam em maior eficiência de encapsulação do peptídeo (JELVEHGARI et al., 2010).

Para alcançar elevada eficiência de encapsulação, é necessário analisar desde o tamanho da cadeia do polímero escolhido e sua solubilização até cada uma das etapas contidas no processo de microencapsulação e principalmente o tempo e a rotação utilizada para a formação das micropartículas.

Microesfera de Eudragit contendo diclofenaco de sódio apresentaram eficiência de encapsulação em torno de 41 a 65% e afirma que a eficiência das microesferas aumenta com o aumento na porcentagem de PVA utilizada enquanto a eficiência diminui com o aumento da quantidade de polímero na fase orgânica. Isto pode ser explicado devido ao maior tempo necessário para a precipitação do polímero quando encontrado em maior quantidade (DESHMUKH; NAIK, 2013).

7.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

As micropartículas de Eudragit S100 carregadas com Liraglutida apresentaram aspecto de pó esbranquiçado e disperso, e a partir desse material foi realizado o ensaio de microscopia eletrônica de varredura. Analisando as imagens da Figura 14 pode-se observar a presença de micropartículas esféricas, com superfície lisa e sem presença de poros.

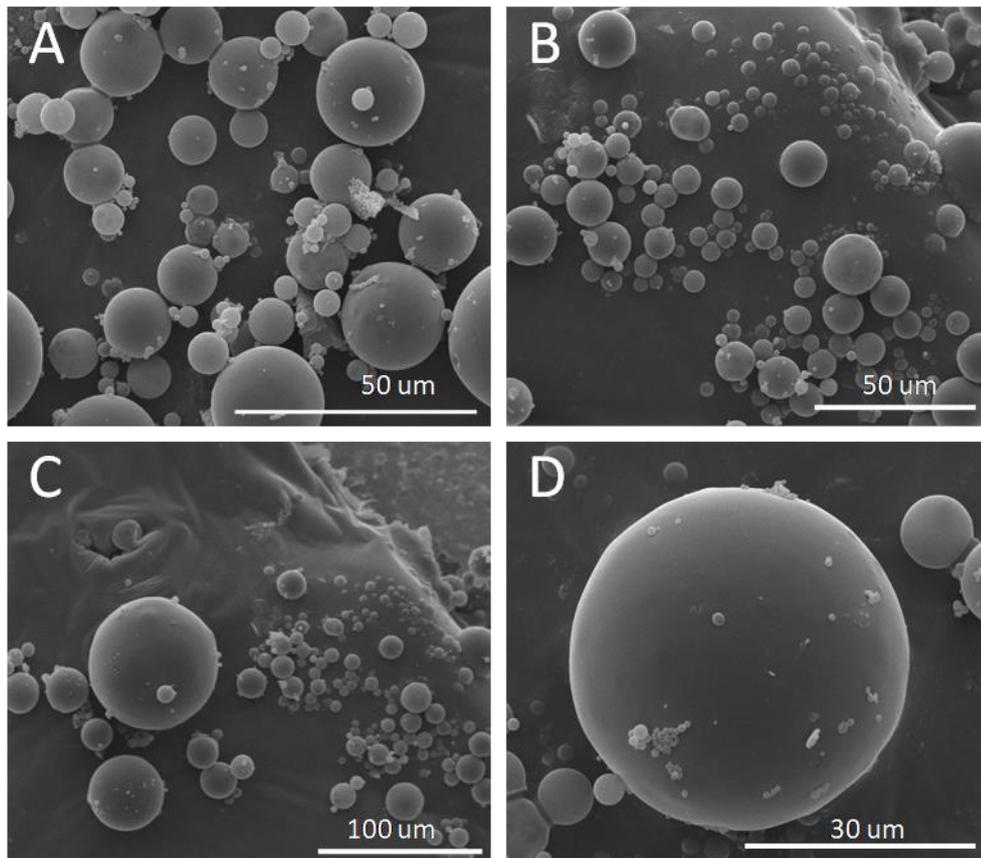


Figura 14: Microscopia Eletrônica de Varredura de partículas poliméricas contendo Liraglutida. Em A, imagem com aumento de x3000, em B x2000, em C x1000 e em D x5000. Todas as imagens obtidas com 15kV, barras em micrometros indicadas nas figuras.

O peso molecular do polímero afeta o tamanho das partículas, ou seja, quanto maior o peso molecular, maior o tamanho da partícula (JELVEHGARI et al., 2010).

Segundo Iosif Daniel e colaboradores 2004, em um trabalho utilizando a mesma técnica de microencapsulação (emulsão dupla seguido por extração de solvente) evidenciaram na triagem da microscopia eletrônica de varredura que as micropartículas são esféricas e tem superfície lisa.

Com alta ampliação na imagem, observa-se uma fina camada de nanopartículas cobrindo a superfície das micropartículas, o que costuma ser comum nesta técnica de microencapsulação e também é possível identificar neste trabalho na Figura 14 D. Se essas nanopartículas estivessem livres na superfície, elas seriam eliminadas no processo de centrifugação (lavagem das partículas), mas a microscopia revela que provavelmente essas nanopartículas estão aderidas na superfície das micropartículas. A camada nanoparticulada é uma consequência direta do mecanismo de formação de partículas (ROSCA; WATARI; UO, 2004).

7.1.4. Distribuição de Tamanho de Partículas

A determinação do diâmetro hidrodinâmico foi realizada mediante ao método de distribuição de tamanho de partículas (DLS), de intensidade de espalhamento da luz pelas micropartículas. Portanto, devido à relação entre a dispersão da luz e o diâmetro das partículas, pode-se afirmar que as partículas com diâmetros maiores proporcionam maior dispersão de luz que as partículas com diâmetros menores (BARROS, 2014).

A análise com a porcentagem de volume apresentou resultados variados de acordo com pH e o tempo de dissolução em tampão, demonstrados na Figura 15.

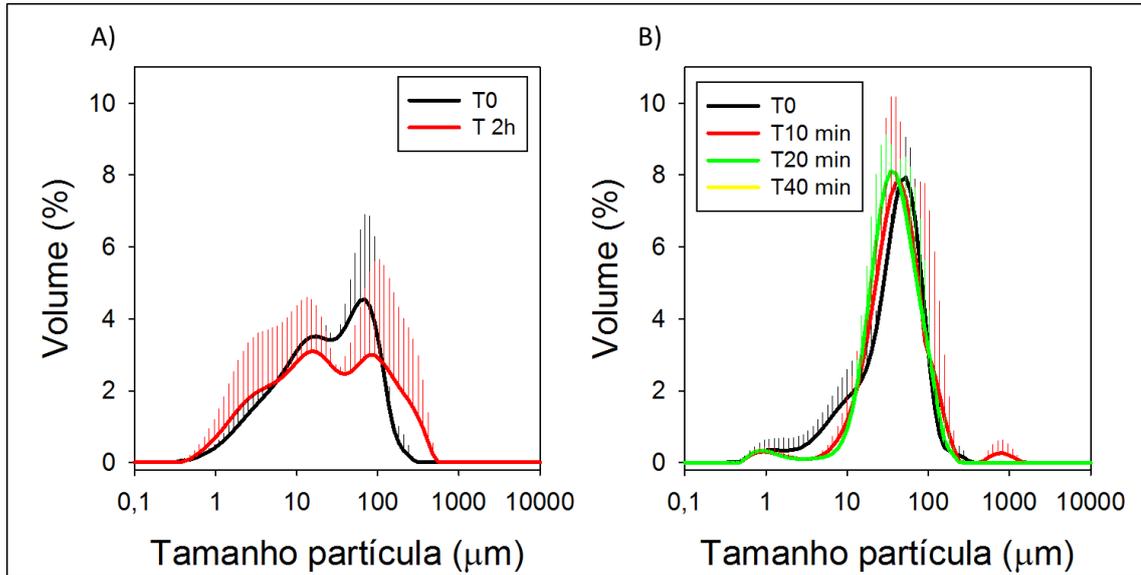


Figura 15: Distribuição de tamanho de micropartículas de Eudragit S100, % volume. Em A micropartículas em tampão fosfato de sódio pH 4,5 nos tempos 0 e 2 horas. Em B micropartículas em tampão fosfato de sódio pH 8,0 nos tempos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos. As barras representam os desvios do padrão em triplicatas n=3.

As micropartículas em pH 4,5, apresentaram no tempo 0 um caráter bimodal, com duas populações: uma primeira em torno de 15 µm e uma segunda em torno de 70 µm (Figura 15A). Após 2 horas na mesma faixa de pH essas partículas continuam apresentando o mesmo perfil (Figura 15 B) representado no tempo 0, mas com segunda população em torno de 100 µm. Esse aumento do tamanho pode ser explicado pela formação de aglomerados na alíquota retirada no momento da leitura. Com base neste resultado, afirma-se que as micropartículas de Eudragit não são solubilizadas em tampão ácido como demonstrado na Figura 15 A.

As micropartículas em pH 8,0, apresentam um caráter unimodal para todos os tempos analisados, com tamanho em torno de 50 µm. A partir de 60 min não é possível realizar a distribuição de tamanho dessas partículas, pois elas se apresentam solubilizadas no meio e não atingem o nível de obscuridade necessário para leitura do aparelho, confirmando assim a característica pH dependente do polímero.

As Figura 16 e 17, mostram os mesmos resultados da análise de distribuição de tamanho, porém com diferente representação, os dados estão inseridos em um gráfico de tamanho versus porcentagem cumulativa.

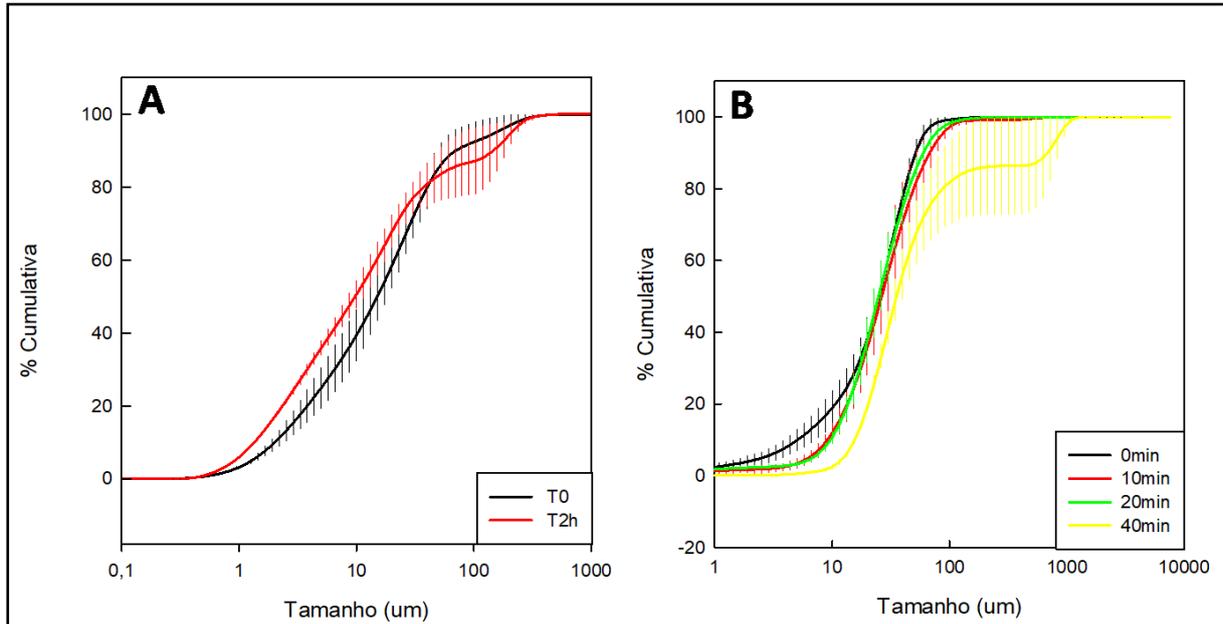


Figura 16: Distribuição de tamanho de micropartículas de Eudragit S100 em % cumulativa. Em A micropartículas em tampão fosfato de sódio pH 4,5 nos tempos 0 e 2 horas. Em B micropartículas em tampão fosfato de sódio pH 8,0 nos tempos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos. As barras representam os desvios padrão em triplicatas $n=3$.

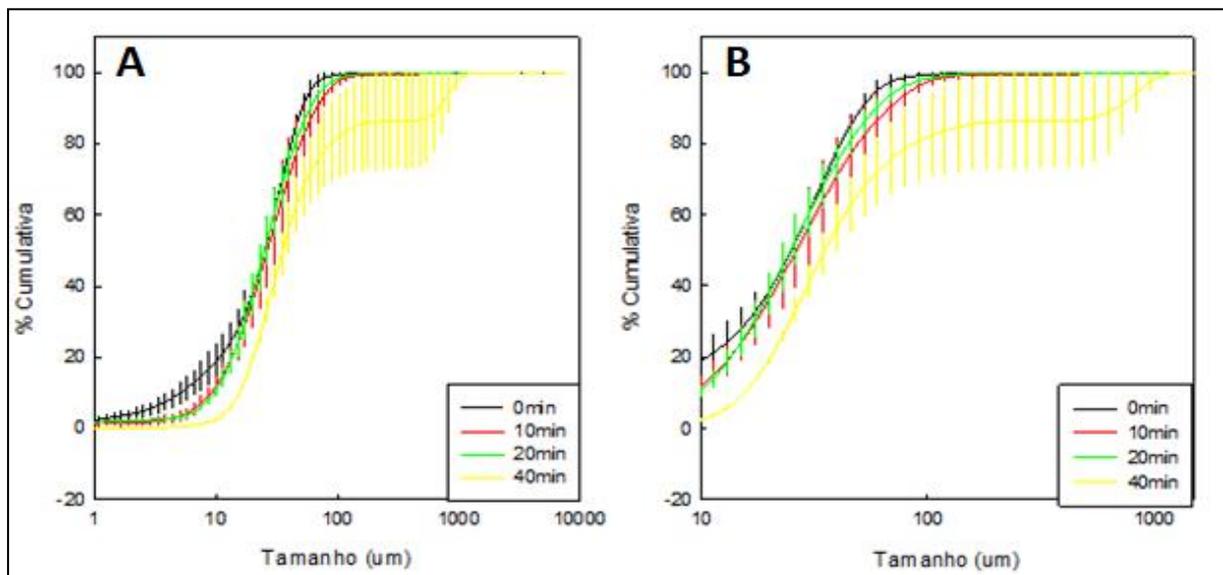


Figura 17: Distribuição de tamanho de micropartículas de Eudragit S100 em % cumulativa ampliada. Ambos representam micropartículas em tampão fosfato de sódio pH 8,0 nos tempos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos. Em A o tamanho (eixo x) varia de 1 μm a 10000 μm . Em B o tamanho varia de 10 μm a 1000 μm . As barras representam os desvios da padrão em triplicatas $n=3$.

Em tampão fosfato pH 8,0, no tempo zero, 100% das partículas apresentam tamanho de aproximadamente 80 μ m e quando atinge aos 40 minutos no tampão, 100% das partículas possuem tamanho de aproximadamente 1000 μ m. Uma hipótese para explicar este resultado é o efeito de intumescimento, as partículas no processo de solubilização vão se aglomerando. Como já dito anteriormente, em 60 minutos as partículas já estão completamente solubilizadas no tampão e não obtém obscuridade (concentração) para leitura, comprovando assim que as partículas nestas condições são solubilizadas, diferentemente quando estão na faixa ácida (pH 4,5).

Para a confirmação desta hipótese, a figura abaixo demonstra as partículas sendo solubilizadas no meio com tampão pH 8,0 (Figura 18). Com o decorrer do tempo, o líquido que contém as partículas e que inicialmente demonstra uma turbidez, vai se tornando translúcido, o que comprova a solubilização completa das partículas nesta faixa de pH.

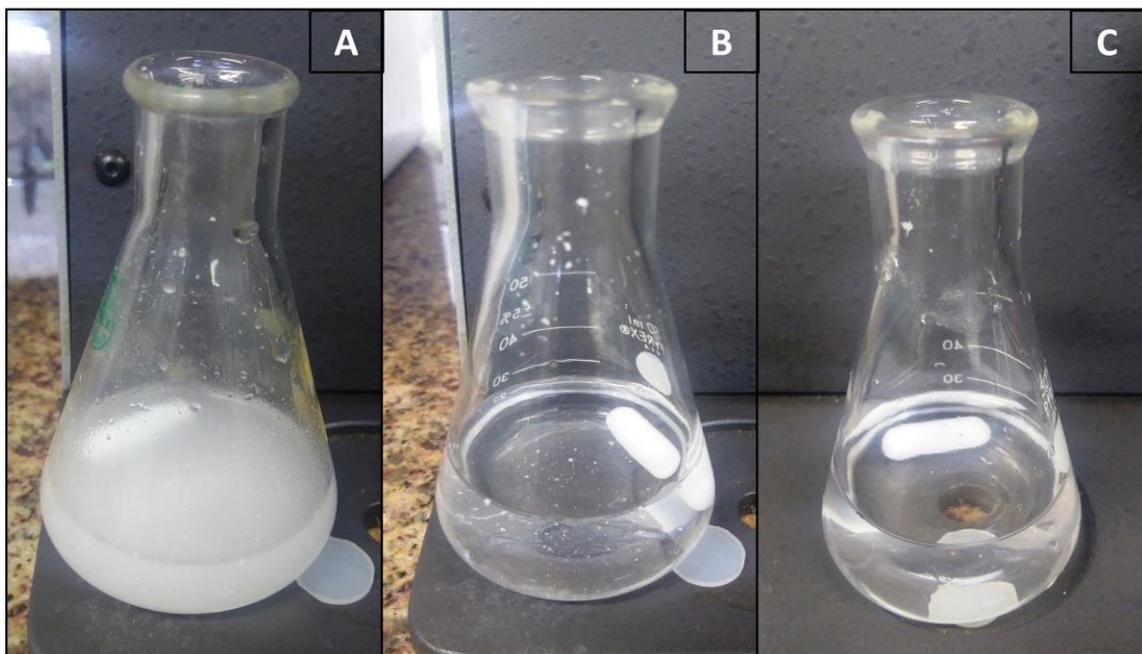


Figura 18: Micropartículas de Eudragit em tampão fosfato de sódio pH 8,0. Em A representa o tempo 0, em B após 60min e em C após 120min.

O diâmetro da partícula é o parâmetro global que abrange todos os parâmetros de formulação: energias de emulsificação, concentração de polímero, concentração de agente ativo de superfície, volumes de fase, viscosidades, etc (ROSCA; WATARI; UO, 2004).

No estudo de Iosif Daniel e colaboradores 2004, a emulsão primária foi preparada sempre nas mesmas condições: 500 μ l de água dispersa em 5mL de solução de polímero a 20.000rpm, condições bem semelhantes às utilizadas neste trabalho. Estes parâmetros têm como finalidade manter sua distribuição de tamanho constante. Já o diâmetro médio da segunda emulsão pode variar alterando a taxa de agitação e a concentração do polímero empregada.

Micropartículas desenvolvidas por emulsão e extração de solvente utilizando Eudragit RL para encapsular o fármaco Tamoxifeno, apresentaram diâmetro médio de 2 μ m (BARROS, 2014). Micropartículas obtidas utilizando o mesmo método e o polímero (Eudragit RL) contendo o fármaco Nitrendipino (agente anti-hipertensivo) mostraram resultados de diâmetro médio de 14 μ m (BASU; ADHIYAMAN, 2008). Ambos os resultados são inferiores do que o diâmetro das micropartículas deste trabalho.

A diferença entre estes resultados pode ser explicada de acordo com o tamanho do fármaco a ser encapsulado, que pode interferir diretamente no tamanho da partícula, o que sugere que a encapsulação de peptídeos leva a formação de micropartículas com diâmetros maiores. Outro fator que pode influenciar diretamente no diâmetro são as adaptações realizadas no método de formação das partículas, como número de lavagens, concentração do polímero e rotação utilizada.

7.2 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica é uma técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa da amostra, em função da temperatura.

No presente trabalho foram utilizadas micropartículas com o peptídeo, micropartículas vazias (sem o peptídeo) e o polímero Eudragit S100 puro. Com o objetivo de comparar os resultados para verificar se existe influência do peptídeo e do processo de formação das partículas na análise termo analítica do polímero.

Conforme demonstrado na Figura 19 e Figura 20, são apresentadas as curvas de variação de massa em função do tempo obtidas a partir do polímero de partida e das micropartículas. A análise de TGA do polímero Eudragit S100 mostrou apenas um evento de perda de massa, iniciando em torno de 450°C. As curvas de TGA para as micropartículas também apresentaram um único evento de perda de massa, por volta de 475°C tanto para as MPs cheias quanto para as MPs vazias. Comparando o termograma do polímero puro com os termogramas das micropartículas observa-se um pequeno aumento das temperaturas máximas de decomposição, sugerindo que o processo de formação das micropartículas não tem grande influência nas temperaturas máximas de decomposição do Eudragit S100.

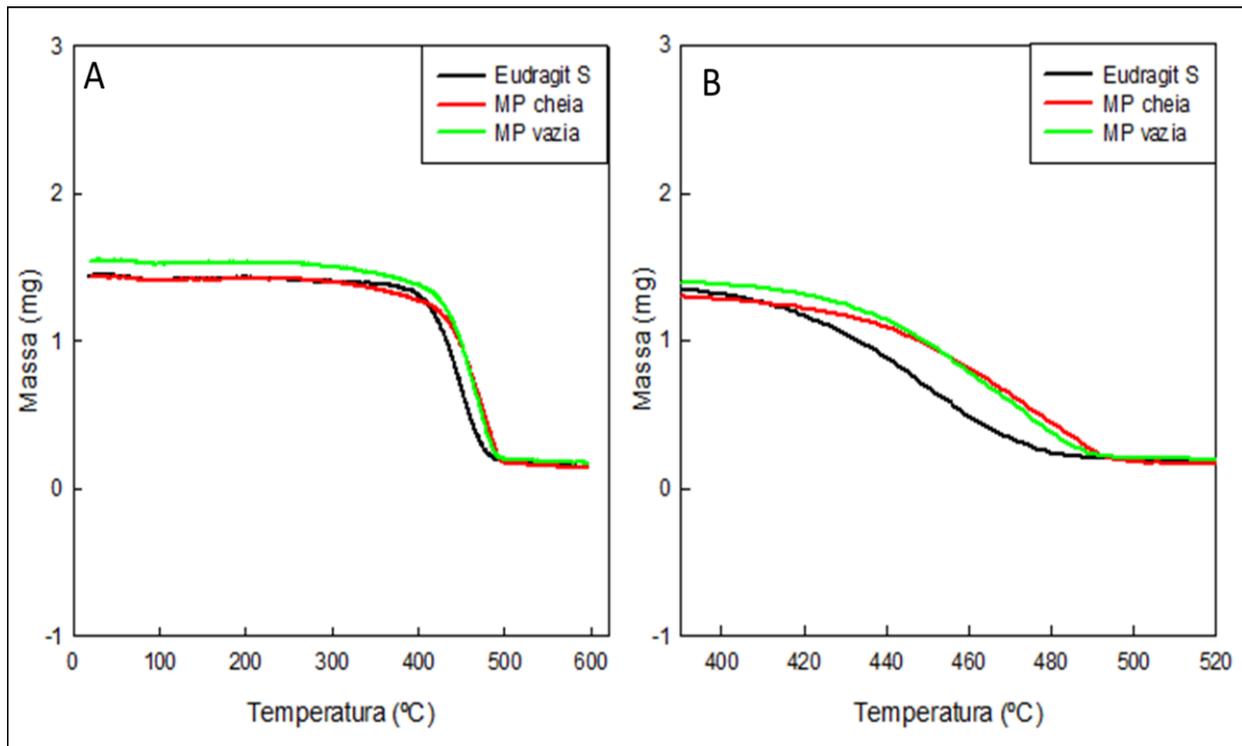


Figura 19: Análise termogravimétrica do polímero Eudragit S100 em vermelho, da micropartícula contendo o peptídeo em preto e da micropartícula sem o peptídeo em verde. Em A, indica o gráfico com a temperatura (eixo x) variando de 0°C a 600°C e em B o gráfico variando a temperatura de 380°C a 520°C.

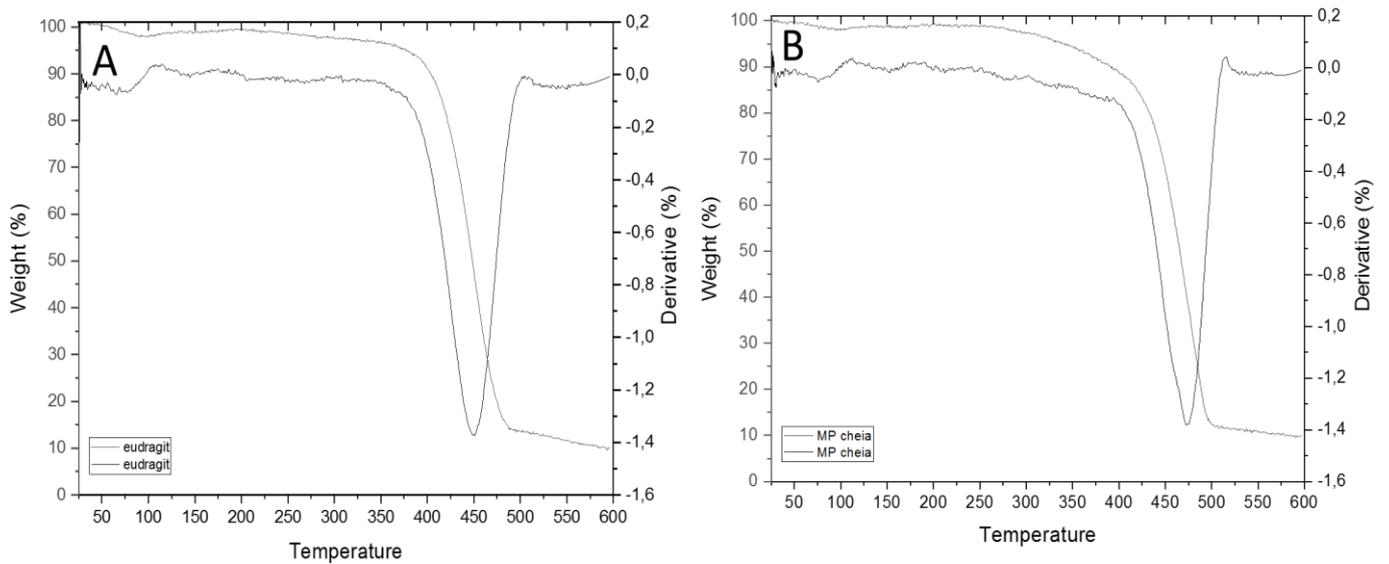


Figura 20: Análise Termogravimétrica, derivada do polímero Eudragit S100 em A e da micropartícula cheia em B.

A aplicação da análise térmica permite observar as alterações físicas e químicas que ocorrem nas substâncias em função da temperatura. Além disso, as técnicas de TGA e DSC podem fornecer dados sobre parâmetros como pureza e compatibilidade entre os componentes de uma formulação para a caracterização de compostos (KLEEMANN et al., 2017).

Micropartículas de Eudragit RS carregadas de chalconas para uso oral, apresentaram na análise termogravimétrica um evento de perda de massa ocorrendo na faixa de temperatura de 320 a 450°C (KLEEMANN et al., 2017). Considerando que a degradação térmica desta formulação começa em uma temperatura mais baixa em comparação com as micropartículas produzidas neste trabalho, pode-se concluir que as micropartículas de Eudragit do tipo S possuem maior estabilidade térmica.

No estudo de micropartículas de Eudragit S100 carregadas com xilano, demonstra que na análise termogravimétrica das partículas há uma pequena perda de peso (2,73%) entre 60 e 104°C devido à desidratação e um segundo evento endotérmico entre 360 e 430°C com perda de peso de aproximadamente 90% correspondente à decomposição do polímero (SILVA et al., 2013).

7.3 Liberação *in vitro*

A determinação do perfil de liberação visa avaliar a cinética de liberação do fármaco da matriz polimérica em função do tempo.

De acordo com os dados da Tabela 10, a cinética é caracterizada como pseudo-primeira ordem (Higuch). Esse modelo apresentou o maior valor de correlação linear ($r = 0,9803$). E o fluxo apresentado nesta cinética foi de 33.97 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{dia}$).

Cinética	Correlação Linear	Fluxo($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{dia}$)
Ordem Zero	0.9615	9.96
Pseudo Primeira Ordem	0.9803	33.97
Primeira Ordem	0.9438	0.07

Tabela 10: Caracterização da cinética de liberação.

Para realizar a quantificação do peptídeo liberado na formulação, foi preparada uma curva de calibração com Liraglutida nas seguintes concentrações: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A curva apresentou coeficiente de regressão linear $r^2 = 0,994$.

No primeiro teste de liberação da micropartícula, foi utilizado tampão fosfato de sódio na concentração de 50mM pH 8,0 que resultou uma liberação de baixa porcentagem do peptídeo. Essa baixa taxa de liberação é resultante do processo de dissolução de polímeros carboxílicos, onde ocorre a ionização dos grupos carboxila desenvolvendo íons hidrogênio na interface polimérica. O acúmulo de hidrogênio dificulta a ionização da cadeia polimérica levando a diminuição da solubilização dessas cadeias. Então, para solucionar tal problema, é necessário a remoção dos íons hidrogênio na interface para aumentar a taxa de dissolução da cadeia. Deste modo, é necessário adicionar no meio de liberação os carreadores de prótons que atuam como promotores de difusão, aumentando a taxa de remoção dos íons hidrogênio na interface do polímero. (NGUYEN; FOGLER, 2005).

Sabendo que o fosfato é um carreador de prótons, à medida que sua concentração é aumentada na solução, mais transportadores estarão disponíveis para se difundir na interface polimérica, captando os íons hidrogênio presentes nessa interface. Sendo assim, foi necessário aumentar a concentração do tampão fosfato de 50mM, para 200mM alcançando como resultado uma liberação de 75% do peptídeo em 4,h (Figura 20).

O valor do pH também influencia na solubilização do polímero. O Eudragit tipo S é solubilizado por reações de ionização dos grupos carboxila como já mencionado anteriormente. A solubilidade do polímero é muito baixa em valores de pH inferiores aos pKa. O Eudragit tipo S apresenta pKa em torno de 6, sendo assim, se o pH for acima de 7 a solubilidade aumenta rapidamente (cerca de 17 vezes) (NGUYEN; FOGLER, 2005).

As micropartículas contendo Liraglutida apresentaram uma cinética de liberação *in vitro* bifásica. Onde o primeiro estágio representa uma rápida liberação do fármaco (cerca de 45% de liberação em 1,5h) e o segundo estágio consiste em um aumento lento e gradual de liberação, alcançando 75% em 4,5h (Figura 20). Existem dois fenômenos que podem ser caracterizados na Figura 20: a desorção, também conhecida como efeito burst e a difusão do ativo.

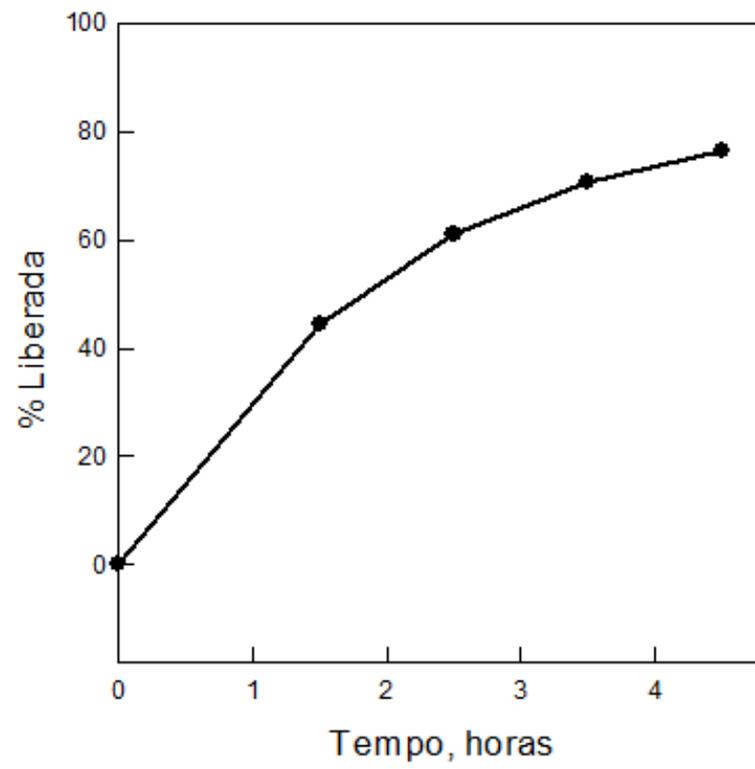


Figura 21: Perfil de liberação cumulativa *in vitro* de micropartículas de Eudragit S100 contendo Liraglutida em função do tempo.

i. Efeito Burst ou Dessorção

Em muitas formulações de liberação controlada, imediatamente após a colocação da matriz polimérica em contato com o meio de liberação, uma grande quantidade do composto ativo incorporado é liberada antes que a velocidade de liberação alcance um perfil estável. Este fenômeno é comumente referido como efeito burst ou dessorção. Resultando em elevada liberação inicial do composto ativo, além da redução do tempo de vida efetivo do sistema (MEDEIROS, 2013).

O efeito burst no início da liberação (primeira etapa) pode ser referente ao fato do polímero utilizado ser permeável em solução aquosa, auxiliando o intumescimento da matriz polimérica e a difusão do fármaco encapsulado próximo à superfície das micropartículas para o meio.

A dessorção do peptídeo pode ser corrigida aumentando o número de lavagens durante a formulação ou utilizando tensoativo para retirar o peptídeo que não foi encapsulado nas partículas. Tendo em vista que a formulação será para uso oral, o fenômeno de dessorção não é considerado uma adversidade, argumentando que o polímero Eudragit do tipo S só iniciará sua solubilização em pH acima de 7, 0, ou seja, quando atingir a porção do intestino/íleo.

ii. Difusão do Ativo

Medeiros 2013, afirma que um composto ativo em matriz polimérica pode ser liberado por difusão, após a sua dissolução nos canais da micropartícula preenchidos por água ou através da degradação polimérica. Conforme acontece o fenômeno de hidrólise, ocorre entrada do meio na partícula, fazendo com que o ativo se difunda e seja liberado.

Este fenômeno caracteriza a segunda etapa da liberação de micropartículas de Liraglutida demonstrado na Figura 20. Esta segunda etapa é definida por uma liberação mais lenta do peptídeo ao longo do tempo, correspondente a dissolução da matriz polimérica.

Diversos estudos utilizando Eudragit como sistema carreador como Tamoxifeno (BARROS, 2014), Zidovudina (SAHOO et al., 2005), Estavudina (NATH, NATH e KUMAR, 2011), e Nitrendipino (BASU; ADHIYAMAN, 2008) apresentaram perfil de liberação semelhante ao perfil apresentado neste trabalho, evidenciando uma cinética bimodal definida por uma liberação mais rápida inicialmente seguida de uma liberação mais lenta, sustentada remetendo-se à dissolução da matriz polimérica ao longo do tempo.

O caráter bifásico na liberação de fármacos encapsulados pode ser descrito por dois mecanismos (já mencionados anteriormente): a capacidade de intumescimento em meio aquoso tendo como resultado a formação de poros e canais na matriz polimérica e a liberação dos respectivos fármacos por meio de reações de hidrólise das cadeias poliméricas devido a degradação das micropartículas (FENÁNDEZ et al., 2012).

8- CONCLUSÃO

O método utilizado para o desenvolvimento das micropartículas apresentou eficiência e reprodutibilidade para o desenvolvimento da formulação oral de Liraglutida, fármaco utilizado no tratamento de DM tipo 2 e obesidade. Sendo assim, foi possível estabelecer a metodologia e condições experimentais tanto para o encapsulamento do peptídeo quanto para o teste de liberação *in vitro*.

As micropartículas apresentaram rendimento variado, elevada eficiência de encapsulação e morfologia esférica. Na análise de distribuição de tamanho, as micropartículas inseridas em meio básico (pH 8,0) apresentaram concentração suficiente para a realização da leitura no aparelho até o tempo de 40min, a partir de 60min não atingia concentração necessária, comprovando a solubilização das mesmas nesta faixa de pH.

O uso do polímero promoveu proteção do peptídeo em meio ácido simulado. As micropartículas foram solubilizadas em meio básico simulado apresentando uma cinética com 75% de liberação do peptídeo em 4,5 horas. Os resultados sustentam a continuidade do estudo para o desenvolvimento da formulação de Liraglutida para uso oral.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, V.; REDDY, I. K.; KHAN, M. A. Polymethacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: Preparation and in vitro dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1, p. 31–39, 28 ago. 2001.
- ALBERS, A. P. F. et al. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48, n. 305, p. 34–37, mar. 2002.
- ARUNACHALAM, A. et al. Floating drug delivery systems: A review. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 76–83, 20 jan. 2011.
- ASSOCIATION, A. D. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. Supplement 1, p. S1–S2, 1 jan. 2018.
- ASTRUP, A. et al. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **The Lancet**, v. 374, n. 9701, p. 1606–1616, 7 nov. 2009.
- BARRINGTON, P. et al. A 5-week study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of LY2189265, a novel, long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, in patients with type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 426–433, 2011.
- BARROS, S. S. Desenvolvimento de micropartículas de eudragit rl 100 contendo tamoxifeno como agente antitumoral. 2014.
- BASU, S. K.; ADHIYAMAN, R. Preparation and Characterization of Nitrendipine-loaded Eudragit RL 100 Microspheres Prepared by an Emulsion-Solvent Evaporation Method. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1033–1041, 11 set. 2008.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; SCERBE-SAIKO, A. Synthesis and In Vitro Evaluation of Chitosan-EDTA-Protease-Inhibitor Conjugates Which Might Be Useful in Oral Delivery of Peptides and Proteins. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 2, p. 263–269, 1 fev. 1998.
- BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. Microparticle Drug Delivery Systems. In: BROWN, D. M. (Ed.). **Drug Delivery Systems in Cancer Therapy**. Cancer Drug Discovery and Development. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. p. 117–135.
- BLANCO-PRIETO, M.-J. et al. Nouvelles approches pour l'encapsulation de peptides au sein de microsphères de PLG. **Nouvelles approches pour l'encapsulation de peptides au sein de microsphères de PLG**, v. 56, n. 6, p. 256–263, 1998.
- BREWSTER, D.; WALTHAM, K. TRH degradation rates vary widely between different animal species. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, n. 6, p. 619–622, 15 mar. 1981.
- BUSE, J. B. et al. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). **The Lancet**, v. 374, n. 9683, p. 39–47, 4 jul. 2009.

BUSH, M. A. et al. Safety, tolerability, pharmacodynamics and pharmacokinetics of albiglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 mimetic, in healthy subjects. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 11, n. 5, p. 498–505, 2009.

CHAMBERLAIN, J. J. et al. Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes: Synopsis of the 2017 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes. **Annals of Internal Medicine**, v. 166, n. 8, p. 572, 18 abr. 2017.

CHAN, L.; PISANO, M. Edoxaban (Savaysa): A Factor Xa Inhibitor. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 10, p. 651–695, out. 2015.

CHEN, H.; LANGER, R. Oral particulate delivery: status and future trends. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Oral Particulates. v. 34, n. 2, p. 339–350, 1 dez. 1998.

CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271–281, 1 abr. 2018.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. p. 34, 2003.

CHRISTENSEN, M. et al. Lixisenatide for type 2 diabetes mellitus. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 20, n. 4, p. 549–557, 1 abr. 2011.

CÓZAR-BERNAL, M. J. et al. Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 5, p. 430–441, 1 ago. 2011.

CROOM, K. F.; MCCORMACK, P. L. Liraglutide. **Drugs**, v. 69, n. 14, p. 1985–2004, 1 out. 2009.

DA CONCEIÇÃO, R. A.; DA SILVA, P. N.; BARBOSA, M. L. C. Drugs for the Treatment of Type II Diabetes: A Visit to the Past and a Look to the Future. **Revista Virtual de Química**, p. 514–534, 2017.

DAS, S. K. et al. MICROENCAPSULATION TECHNIQUES AND ITS PRACTICE. v. 6, p. 24, 2011.

DES RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1–27, 10 nov. 2006.

DESHMUKH, R. K.; NAIK, J. B. Diclofenac Sodium-Loaded Eudragit® Microspheres: Optimization Using Statistical Experimental Design. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 8, n. 4, p. 276–287, 1 dez. 2013.

DIONNE, B. Key Principles of Antiretroviral Pharmacology. **Infectious Disease Clinics of North America**, HIV. v. 33, n. 3, p. 787–805, 1 set. 2019.

DRUCKER, D. J. et al. Exenatide once weekly versus twice daily for the treatment of type 2 diabetes: a randomised, open-label, non-inferiority study. **The Lancet**, v. 372, n. 9645, p. 1240–1250, 4 out. 2008.

FALA, L. Entresto (Sacubitril/Valsartan): First-in-Class Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor FDA Approved for Patients with Heart Failure. **American Health & Drug Benefits**, v. 8, n. 6, p. 330–334, set. 2015.

FELTON, L. A. et al. Physical and enteric properties of soft gelatin capsules coated with eudragit® L 30 D-55. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 17–24, 2 jan. 1995.

FENÁNDEZ, A. et al. Tamoxifen-loaded microspheres based on mixtures of poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(D,L-lactide) polymers: Effect of polymeric composition on drug release and in vitro antitumoral activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 4, p. 2987–2998, 2012.

FIGUEIREDO, D. M.; RABELO, F. L. A. Diabetes insipidus: principais aspectos e análise comparativa com diabetes mellitus. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, n. 2, p. 155–162, 15 dez. 2009.

FIX, J. A. Oral Controlled Release Technology for Peptides: Status and Future Prospects. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 12, p. 1760–1764, 1 dez. 1996.

GARG, R.; GUPTA, G. D. Progress in Controlled Gastroretentive Delivery Systems. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1055-1066–1066, 1 jan. 2008.

GLAESNER, W. et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 26, n. 4, p. 287–296, 2010.

GÓMEZ, C. C. T.; RESTREPO, M. M.; BRUERA, E. Vías alternativas a la vía oral para administración sistémica de opioides en Cuidados Paliativos. Revisión de la literatura. **Medicina Paliativa**, v. 12, n. 2, p. 108–122, 1 abr. 2005.

GUPTA, V. Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 3, p. 413, 2013.

HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, S.; AGUILAR-SALINAS, C. A.; GÓMEZ-PÉREZ, F. J. Tiazolidinedionas. Beneficios y riesgos reales. **Revista de Endocrinología y Nutrición**, v. 10, n. 2, p. 69–76, 2002.

HOUCHIN, M. L.; TOPP, E. M. Chemical Degradation of Peptides and Proteins in PLGA: A Review of Reactions and Mechanisms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2395–2404, 1 jul. 2008.

INZUCCHI, S. E. et al. Efficacy and Metabolic Effects of Metformin and Troglitazone in Type II Diabetes Mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 867–873, 26 mar. 1998.

IQBAL, M. et al. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 173–190, 30 dez. 2015.

IWATA, M.; MCGINITY, J. W. Preparation of multi-phase microspheres of poly(D,L-lactic acid) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) containing a W/O emulsion by a multiple

emulsion solvent evaporation technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 9, n. 2, p. 201–214, 1 jan. 1991.

JACOBSEN, L. V. et al. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of the GLP-1 analogue liraglutide. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 898–905, 2009.

JACOBSEN, L. V. et al. Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 55, n. 6, p. 657–672, 1 jun. 2016.

JAIN, D.; PANDA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Eudragit S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 1, p. E100–E107, 1 mar. 2005.

JELVEHGARI, M. et al. Development of pH-sensitive Insulin Nanoparticles using Eudragit L100-55 and Chitosan with Different Molecular Weights. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1237–1242, 1 set. 2010.

JELVEHGARI, M.; MONTAZAM, S. H. Comparison of Microencapsulation by Emulsion-Solvent Extraction/Evaporation Technique Using Derivatives Cellulose and Acrylate-Methacrylate Copolymer as Carriers. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 7, n. 4, p. 144–152, 2012.

JENNEWEIN, H. M.; WALDECK, F.; KONZ, W. The absorption of tetragastrin from different sites in rats and dogs. **Arzneimittel-Forschung**, v. 24, n. 8, p. 1225–1228, ago. 1974.

JYOTHI, N. V. N. et al. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 1 maio 2010.

KAPITZA, C. et al. Semaglutide, a once-weekly human GLP-1 analog, does not reduce the bioavailability of the combined oral contraceptive, ethinylestradiol/levonorgestrel. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 5, p. 497–504, 2015.

KAZAKOS, K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Insulin: from its discovery to its role in state-of-the-art management of diabetes mellitus. v. 93, p. S32–S36, 1 ago. 2011.

KINTZING, J. R.; COCHRAN, J. R. Engineered knottin peptides as diagnostics, therapeutics, and drug delivery vehicles. **Current Opinion in Chemical Biology**, Synthetic Biology * Synthetic Biomolecules. v. 34, p. 143–150, 1 out. 2016.

KLEEMANN, C. R. et al. Development and Characterization of Synthetic Chalcones-Loaded Eudragit RS 100 Microparticles for Oral Delivery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1074–1080, jun. 2017.

Kollicoat MAE grades | Tablet (Pharmacy) | Solubility. Disponível em: <<https://www.scribd.com/document/5682786/Kollicoat-MAE-grades>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

LAU, J. et al. Discovery of the Once-Weekly Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analogue Semaglutide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 18, p. 7370–7380, 24 set. 2015.

LEE, S.; LEE, D. Y. Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes. **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 15–26, mar. 2017.

LEWIS, D. H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. **Biodegradable polymers as drug delivery systems.**, p. 1–41, 1990.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1–2, p. 26–39, 3 nov. 2008.

LIU, L. et al. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3333–3343, 1 ago. 2003.

LOPES, V. P. et al. FARMACOLOGIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2: ANTIDIABÉTICOS ORAIS, INSULINA E INOVAÇÕES TERAPÊUTICAS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 4, p. 22–22, 30 dez. 2012.

MCEVOY, B. W. Missing data in clinical trials for weight management. **Journal of Biopharmaceutical Statistics**, v. 26, n. 1, p. 30–36, 2 jan. 2016.

MEDICSUPPLY. **Síndrome da imunodeficiência adquirida – Genvoya**. Disponível em: <<http://medicsupply.net/sindrome-da-imunodeficiencia-adquirida/>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

MELO, C. S.; SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 469-477–477, 26 fev. 2013.

MENDES, J. B. E. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO RESVERATROL. 17 set. 2011.

MONTGOMERY, M. et al. Daclatasvir (Daklinza). **Pharmacy and Therapeutics**, v. 41, n. 12, p. 751–755, dez. 2016.

MORÇÖL, T. et al. Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, Selected Papers from The 11th International Pharmaceutical Technology Symposium. v. 277, n. 1, p. 91–97, 11 jun. 2004.

MOREIRA, G. F. et al. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para Determinação da Pureza de Fármacos. **Produto & Produção**, v. 11, n. 1, 19 jan. 2010.

MOUSTAFINE, R. I.; KEMENOVA, V. A.; VAN DEN MOOTER, G. Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E 100 with sodium alginate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, n. 1, p. 113–120, 27 abr. 2005.

MOUSTAFINE, R. I.; ZAHAROV, I. M.; KEMENOVA, V. A. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit® E PO/Eudragit® L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 1, p. 26–36, 1 maio 2006.

MULLIGAN, R. C. The basic science of gene therapy. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 926–932, 14 maio 1993.

NGUYEN, D. A.; FOGLER, H. S. Facilitated diffusion in the dissolution of carboxylic polymers. **AIChE Journal**, v. 51, n. 2, p. 415–425, 1 fev. 2005.

NIKAM, V. K. et al. EUDRAGIT A VERSATILE POLYMER : A REVIEW. p. 13, 2011.

NIU, C.-H.; CHIU, Y.-Y. FDA perspective on peptide formulation and stability issues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 11, p. 1331–1334, 1998.

PEPPAS, N. A. Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Selected Papers from The 11th International Pharmaceutical Technology Symposium. v. 277, n. 1, p. 11–17, 11 jun. 2004.

PERIGNON, C. et al. Microencapsulation by interfacial polymerisation: membrane formation and structure. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 1, p. 1–15, 2015.

PRASAD-REDDY, L.; ISAACS, D. A clinical review of GLP-1 receptor agonists: efficacy and safety in diabetes and beyond. **Drugs in Context**, v. 4, 9 jul. 2015.

RAEDLER, L. A. Viekira Pak (Ombitasvir, Paritaprevir, and Ritonavir Tablets; Dasabuvir Tablets): All-Oral Fixed Combination Approved for Genotype 1 Chronic Hepatitis C Infection. **American Health & Drug Benefits**, v. 8, n. Spec Feature, p. 142–147, mar. 2015.

RAHMAN, MD. A.; ALI, J. Development and in vitro Evaluation of Enteric Coated Multiparticulate System for Resistant Tuberculosis. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 4, p. 477–481, 2008.

RATRA, A.; LOFTUS, R. Stevens-Johnson Syndrome in a Chronic Hepatitis C Patient Treated With Zepatier (Elbasvir/Grazoprevir): 2311. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, p. S1264, out. 2017.

ROLIN, B. et al. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases β -cell mass in diabetic mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 4, p. E745–E752, 1 out. 2002.

ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 2, p. 271–280, 30 set. 2004.

SAFFRAN, M. et al. A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. **Science**, v. 233, n. 4768, p. 1081–1084, 5 set. 1986.

SAFFRAN, M. et al. Vasopressin: A model for the study of effects of additives on the oral and rectal administration of peptide drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 1, p. 33–38, 1 jan. 1988.

SANTOS, G. B. DOS. **Estudos de síntese total de peptídeos cíclicos naturais**. Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 18 jan. 2018.

SCHWARTZ, S. S. et al. The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the β -Cell-Centric Classification Schema. **Diabetes Care**, v. 39, n. 2, p. 179–186, 1 fev. 2016.

SEINO, Y. et al. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 1, n. 5, p. 212–228, 2010.

SEMALTY1, A. et al. Properties and formulation of oral drug delivery systems of protein and peptides. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 6, p. 741, 2007.

SHOUKRI, R. A.; AHMED, I. S.; SHAMMA, R. N. In vitro and in vivo evaluation of nimesulide lyophilized orally disintegrating tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 162–171, 1 set. 2009.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1–20, mar. 2003.

SILVEIRO, S. P.; SATLER, F. **Rotinas em Endocrinologia**. [s.l.] Artmed Editora, 2015.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1, p. 19–38, 14 ago. 2001.

SOFIA, M. J.; LINK, J. O. 8.23 - Harvoni: A Combination Therapy for Curing HCV. In: CHACKALAMANNIL, S.; ROTELLA, D.; WARD, S. E. (Eds.). . **Comprehensive Medicinal Chemistry III**. Oxford: Elsevier, 2017. p. 558–582.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1, p. 1–20, 29 jan. 2001.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p. 40–54, 1 set. 2015.

TEWES, F. et al. Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 488–492, 1 jun. 2007.

THAKRAL, S.; THAKRAL, N. K.; MAJUMDAR, D. K. Eudragit®: a technology evaluation. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 1, p. 131–149, 1 jan. 2013.

TUAN GIAM CHUANG, V.; KRAGH-HANSEN, U.; OTAGIRI, M. Pharmaceutical Strategies Utilizing Recombinant Human Serum Albumin. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 5, p. 569–577, 1 maio 2002.

VANDAMME, TH. F. et al. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 3, p. 219–231, 15 maio 2002.

VILSBØLL, T. Liraglutide: a once-daily GLP-1 analogue for the treatment of Type 2 diabetes mellitus. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 2, p. 231–237, 1 fev. 2007.

WYVRATT, M. J.; PATCHETT, A. A. Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 5, n. 4, p. 483–531, 1985.

YONCHEVA, K.; LIZARRAGA, E.; IRACHE, J. M. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 5, p. 411–419, 1 abr. 2005.

YU, M. et al. Battle of GLP-1 delivery technologies. **Advanced drug delivery reviews**, v. 130, 12 jul. 2018.

ZAJĄC, M. et al. Hepatitis C – New drugs and treatment prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 165, p. 225–249, 1 mar. 2019.