

À minha avó
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Doutora Paula Correia da Silva, pela sua orientação e disponibilidade. Pelas suas opiniões, críticas, e pela colaboração em solucionar todas as questões que me foram surgindo ao longo da realização da monografia.

Ao meu namorado, Hugo Pinto Carmo, pela força e por todo o incentivo. Por ser incansável, pela paciência e por ter sempre prontas palavras doces, meigas e de conforto. Acima de tudo, por me fazer sorrir, mesmo quando tudo à nossa volta é triste, vazio e amargo.

Ao meu querido amigo, e irmão afectivo, Paulo José, pela amizade de longa data e por estar ao meu lado, tanto nos bons como nos maus momentos. Por me levar a idealizar e a concretizar os nossos projectos e não deixar morrer a minha paixão artística.

Às colegas do Hospital Garcia de Orta, EPE, Técnica Vera Santos e Assistente Operacional Maria José Brito, pela amizade e carinho. Pelas recepções calorosas, em todas as minhas visitas.

Ao colega da Farmácia Pragal, Auxiliar técnico Tiago Barata, pelos bons momentos, pela paciência e pela partilha de conhecimentos.

Aos colegas que me acompanharam ao longo destes cinco anos, em especial à colega Sara Garrido, pelo seu companheirismo e amizade.

À minha família, pelo apoio e motivação ao longo de todo o meu percurso escolar, sobretudo nesta fase final.

A todos, um agradecimento sincero, por nunca terem deixado de acreditar em mim.

RESUMO

As Nanopartículas poliméricas (NPP's), são um campo de estudo em constante crescimento, e têm vindo cada vez mais a despertar o interesse dos cientistas nas últimas décadas. Segundo a literatura possuem dimensões compreendidas entre 1-100 (um-cem) nanómetros (nm), e desde o seu aparecimento, têm vindo a demonstrar-se cada vez mais como alternativas promissoras para a aplicação na saúde.

A utilização de polímeros naturais, como é o caso dos açúcares, têm sido amplamente estudado devido às suas capacidades de segurança *in vivo*. Para além de muitas outras características, que os tornam tão desejáveis, são biodegradáveis, biocompatíveis, estáveis e não tóxicos.

Os sistemas nanopartícula-fármaco consideram-se superiores à medicina tradicional no que diz respeito à veiculação, libertação controlada de fármacos e impacto terapêutico. É necessário, contudo, ter em atenção problemas relacionados com a nanotoxicidade.

Futuramente, espera-se que as nanopartículas (NP's) mudem o actual panorama Farmacêutico, dando oportunidade de existirem novos métodos de administração de fármacos, que não poderiam ser administrados até agora, por serem pouco solúveis em água.

Palavras chave: Açúcares, Design de nanopartículas, Nanopartículas, Veiculação de fármacos.

ABSTRACT

Polimeric nanoparticles (NPP's), are a field of study in constant growth, and have been increasingly attracting the attention of scientists in recent decades. According to the literature NPP's have dimensions between 1-100 (one-one hundred) nm, and since its emergence, it has been shown to be increasingly seen as promising alternatives for application in health.

The use of natural polymers, such as sugars, has been widely studied due to their in vivo safety abilities. In addition to many other features, that make them so desirable, NPP's are biodegradable, biocompatible, stable and non-toxic.

Nanoparticle-drug systems are considered superior to traditional medicine regarding in placement, drug delivery and therapeutic impact. It must, however, be cautious in issues related to nanotoxicity.

In the future, it is expected that the nanoparticles (NP's) will change the current Pharmaceutical scenario, giving opportunity for new drug administration methods, that could not be used so far, as in the case of drugs poorly water soluble drugs.

Keywords: Sugars, Nanoparticles design, Nanoparticles, Drug delivery.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
I. INTRODUÇÃO.....	12
II. NANOPARTÍCULAS.....	13
II.1. Classificação.....	13
II.2. Design de NP's.....	14
II.2.1. Tamanho e Morfologia das partículas.....	15
II.2.2. Potencial Zeta (ζ).....	15
II.2.3. Estabilidade química.....	16
II.2.4. Estabilidade física.....	17
III. FARMACOCINÉTICA E TOXICOLOGIA ASSOCIADAS AO USO DE NANOPARTÍCULAS.....	22
III.1. Farmacocinética dos fármacos veiculados através de Nanopartículas.....	22
III.2. Nanotoxicologia.....	24
IV. AÇÚCARES.....	26
IV.1. Açúcares utilizados em Nanopartículas.....	26
V. NANOPARTÍCULAS A PARTIR DE AÇÚCARES.....	31
V.1. Mecanismos de preparação de NP's a partir de açúcares.....	31
V.2. Gliconanopartículas.....	36
VI. UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES PARA REVESTIMENTO DE NANOPARTÍCULAS.....	42
VII. UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM ONCOLOGIA.....	46
VII.1. Cancro da mama.....	47
VII.2. Terapêutica disponível.....	47
VII.3. NP's disponíveis no mercado.....	49
VII.4. NP's em estudo.....	49
VIII. UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NO HIV.....	52
VIII.1. O vírus do HIV.....	52
VIII.2. Transmissão.....	52
VIII.3. Terapêutica disponível.....	53
VIII.4. NP's em estudo.....	54
IX. UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NA DIABETES MELLITUS.....	56
IX.1. Tipos e etiologia da diabetes.....	56
IX.2. Terapêutica disponível.....	57
IX.3. NP's em estudo para veiculação de insulina.....	58

IX.5. NP's em estudo para a veíulação de ADO.....	63
X. CONCLUSÃO.....	65
XI. BIBLIOGRAFIA.....	67

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Classificação das NP's biodegradáveis: Nanoesferas e nanocápsulas.....	13
Figura 2: Representação esquemática do potencial ζ	15
Figura 3: Esquema das possíveis vias para veiculação de fármacos.....	17
Figura 4: Veiculação passiva de fármacos às células tumorais.....	18
Figura 5: Libertação de fármaco das NP's em pH tumoral (pH ácido).....	18
Figura 6: Veiculação activa de fármacos a células tumorais.....	19
Figura 7: Representação esquemática do sistema de um pró-fármaco tumoral.....	20
Figura 8: Transporte de NP's pelo tracto respiratório.....	22
Figura 9: Estrutura química do ácido hialurónico.....	26
Figura 10: Estrutura química das α , β e γ -ciclodextrinas.....	26
Figura 11: Estrutura química do dextrano.....	27
Figura 12: Estrutura química do manitol.....	27
Figura 13: Estrutura química da pectina.....	28
Figura 14: Estrutura química do pululano.....	28
Figura 15: Estrutura química do quitosano.....	29
Figura 16: Estrutura química da sacarose.....	29
Figura 17: Ligação cruzada covalente.....	30
Figura 18: Estrutura química do gluteraldeído.....	31
Figura 19: Estrutura química da genipina.....	31
Figura 20: Ligação cruzada iónica.....	32
Figura 21: Estrutura química do tripolifosfato.....	32
Figura 22: Esquema de NP's polissacarídeas por PCP.....	33
Figura 23: Esquema de auto-montagem de polissacarídeos.....	33
Figura 24: NP's revestidas com ácido hialurónico.....	41
Figura 25: Estrutura química da NPP Sac-PEG-Col.....	43
Figura 26: Estrutura química do polímero biodegradável em forma de estrela M-PLGA-TPGS.....	49
Figura 27: Esquematização do método de preparação das NP's M-PLGA-TPGS.....	50
Figura 28: Exemplos de estruturas de açúcares sintéticos para o design da vacina do HIV....	54
Figura 29: Estrutura química da insulina.....	57
Figura 30: Possíveis obstáculos à absorção oral da insulina.....	59
Figura 31: Diagrama dos possíveis mecanismos que as NP's de QS podem promover a absorção de insulina.....	60

Figura 32: Complexo de CP β CD's-insulina.....	61
--	----

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1: Algumas diferenças entre NP's e partículas ditas normais.....	13
Tabela 2: Barreiras existentes na entrega das NP's.....	15
Tabela 3: Exemplos de NP's produzidas experimentalmente para veiculação de fármacos, e respectivos fármaco veiculados.....	36
Tabela 4: Exemplos de aplicações às CD's e derivados em diferentes áreas de veiculação de fármacos.....	39
Tabela 5: Fármacos mais utilizados em quimioterapia no cancro da mama.....	48
Tabela 6: Categorias de ARV disponíveis.....	54
Tabela 7: Tipos de insulinas existentes e as suas características após administração.....	57
Tabela 8: Exemplos de fármacos utilizados no tratamento da DMNID.....	58
Tabela 9: Exemplos de estudos feitos com NP's de açúcares para a veiculação de insulina <i>per os</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ADTP	Ácido dietilenetriamina penta acético
Ag	Antigénio
AH	Ácido hialurónico
AP	Acetato de pululano
APL	Ácido poli-l-láctico
ARV	Antiretrovirais
CD's	Ciclodextrinas
CMQ	Carboximetilquitina
CP β CD's	Polímeros de β CD's catiónicos
CPT	Capotensina
DEX	Dextrano
DM	Diabetes Mellitus
DM- β -CD's	Dimetil β CD's
DMID	Diabetes Mellitus Insulina Dependente
DMNID	Diabetes Mellitus Não Insulina Dependente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
Esp	Espermina
FDA	<i>Food and Drug Association</i>
Gli	Gliclazida
GRAS	Geralmente reconhecida como segura
HEMA	Hidroxietilmetacrilato
HP- β -CD's	Hidroxipropil β CD's
IV	Intravenosa
mm	Milímetros
MM	Massa molecular
MPS	Sistema mononuclear fagocítico
nm	Nanómetros
NNRTI	Inibidores não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa
NP's	Nanopartículas
NPP's	Nanopartículas poliméricas
NsRTI	Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

NtRTI	Inibidores Nucleotídeos da Transcriptase Reversa
Oli	Oligonucleótidos
PCP	Nanopartículas polissacarídeas por complexação de polielectrolitos
PCT	Paclitaxel
PEG	Polietilenoglicol
PI	Inibidores da Protease
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PMMA	Poli(metil metacrilato)
Potencial ζ	Potencial Zeta
QGHM's	Quitosano glicol hidrofobicamente modificados
QS	Quitosano
QTM	Quitosano trimetilado
RPG	Repaglinida
SC	Subcutânea
SIDA/AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
siRNA	RNA de interferência de cadeia simples
SRE	Sistema retículo endotelial
TARVAA	Terapêutica Antiretroviral altamente activa
Ti	Trietilenotetramina
TPT	Topotecano
TPF	Tripolifosfato
VB12	Vitamina B12
VIH/HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
VIS	Vírus da imunodeficiência símia

I. INTRODUÇÃO

O termo “nano” é actualmente bastante utilizado em diversos campos da ciência e no quotidiano, de tal forma que pode assumir-se que nos encontramos a viver na geração “nano” (Cannon & Ranade, 2011).

A Nanotecnologia aplicada na área biomédica tem sido alvo de grande interesse nas últimas décadas, devido à possibilidade de revolucionar o tratamento de doenças graves como é o caso do cancro, doenças cardiovasculares e neurológicas. Os sistemas nano têm assim como objectivo ser direccionados para os tecidos alvo, promovendo as interações específicas fármaco-receptor para cada doença a tratar. Como vantagens da utilização destes sistemas, consegue-se uma maior eficácia terapêutica e diminuição da toxicidade associados ao fármaco isoladamente e uma diminuição dos efeitos secundários inespecíficos (Brambilla, Couvreur, Mackiewicz, Mura, & Nicolas, 2013).

É necessário um amplo conhecimento acerca das características físico-químicas e terapêuticas dos fármacos a utilizar, para que se determine a formulação mais adequada e o melhor sistema de veiculação (Siahaan, Soltero, & Wang, 2005).

De acordo com a literatura, as NPP's caracterizam-se por serem sistemas coloidais sólidos, em que os fármacos ficam dispersos, dissolvidos ou quimicamente ligados por cadeias poliméricas, com dimensões compreendidas entre 1-100 (um-cem) nm (Liu, Jiao, Wang, Zhou, & Zhang, 2008).

Encontram-se disponíveis, em ensaios clínicos, NP's para o tratamento de doenças como Cancro, HIV, Diabetes Mellitus (DM), Malária, Doença de priões e Tuberculose. Algumas delas já se encontram a ser comercializadas (Kumari, Yadav, & Yadav, 2010).

Os sistemas NP-fármaco consideram-se superiores à medicina tradicional no que diz respeito à veiculação, libertação controlada de fármacos e impacto terapêutico. Estas características estão dependentes de factores como o tamanho, carga e modificações de superfície e hidrofobicidade (Kumari et al., 2010).

De modo a fazer uma abordagem mais específica quanto à utilização de açúcares em NP's foram escolhidas 3 (três) doenças que afectam bastante a população mundialmente, e em que urge a necessidade de melhorias a nível da terapêutica até agora instituída. São elas o Cancro da Mama, o HIV e a DM.

II. NANOPARTÍCULAS

As NPP's desde o seu aparecimento, têm vindo a revelar-se cada vez mais uma alternativa promissora para o tratamento de várias doenças, nomeadamente devido à possível flexibilidade na modificação das suas estruturas. Este processo de veiculação de fármacos tem-se demonstrado promissor. Acrescenta-se ainda um grande avanço na permeação cutânea, uma vez que a pele é o maior órgão do corpo humano, e é a barreira física que possibilita a entrada de fármacos no organismo (Candeias, Gomes, Pinto, & Reis, 2012).

Tabela 1: Algumas diferenças entre NP's e partículas ditas normais.

Adaptado de Oberdörster, G. (2010).

	Nanopartículas (<100nm)	Partículas >500 nm
Deposição no TR	Difusão	Sedimentação, Impacto e Intercepção
Translocação para outros órgãos		
Clearance	Sim	Geralmente não
Mucociliaridade	Provavelmente sim	Eficiente
Macrófagos alveolares	Pobre	Eficiente
Circulação linfática	Sim	Em sobrecarga
Circulação sanguínea	Sim	Em sobrecarga
Neurónios sensoriais	Sim	Não
Entrada celular/ uptake		
Mitocôndria	Sim	Não
Núcleo	Sim (<40 nm)	Não
Efeitos directos		
Outros órgãos alvo	Sim	Não
No local administração	Sim	Sim
Inflamação	Sim	Sim
Stress Oxidativo	Sim	Sim
Genotoxicidade primária	Alguma	Não
Carcinogenicidade	Sim	Sim

II.1. Classificação

De acordo com a literatura, as NPP's caracterizam-se por serem sistemas coloidais sólidos em que os fármacos ficam dispersos, dissolvidos ou quimicamente ligados por cadeias poliméricas. São também definidos pelas dimensões compreendidas de 1 a 100 (um-cem) nm e por se poderem obter Nanoesferas ou Nanocápsulas, para o transporte de fármacos e/ou biomoléculas, consoante o mecanismo de preparação seleccionado (Liu et al., 2008).

As Nanoesferas são sistemas do tipo matricial, em que o fármaco fica disperso numa matriz polimérica. As Nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório constituídos por um núcleo líquido (hidrofílico ou lipofílico) rodeado por uma membrana polimérica simples (Brambilla et al., 2013).

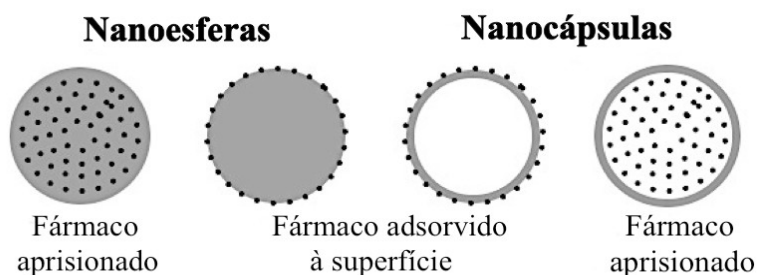


Figura 1: Classificação das NP's biodegradáveis: Nanoesferas e nanocápsulas.

Adaptado de Kumari, A., Yadav, S., & Yadav, S. (2010).

As grandes vantagens da utilização destes sistemas nano para o transporte de fármacos prendem-se com a capacidade de incorporar fármacos hidrofóbicos a concentrações mais elevadas do que a sua solubilidade em água, capacidade de passar através dos vasos capilares de menores dimensões devido ao seu pequeno volume (evitando a detecção pelo sistema mononuclear fagocítico, o que vai permitir a sua presença no fluxo sanguíneo por um período mais alargado e que deste modo reduz a quantidade de fármaco necessária para se observar efeito terapêutico), capacidade de penetrar nas células e tecidos para chegar aos órgãos alvo (como o fígado, baço, pulmões, medula espinhal e linfa), possibilidade de libertação controlada, e melhor capacidade de distribuição dos fármacos reduzindo-se assim a toxicidade associada à sua utilização (Liu et al., 2008; Brambilla et al., 2013).

II.2. Design de NP's

O desenvolvimento do *design* das NP's tem de ter em consideração alguns factores, tais como a sua via de administração, a aplicação terapêutica e o local onde se pretende exercer a acção (órgão, tecido, célula ou organelos celulares) (Elsabahy & Wooley, 2012).

Relativamente à via de administração, a via IV é considerada a mais usual para a distribuição destes sistemas. Contudo, podem também ser distribuídos através das vias dérmica/transdérmica, oral, bucal, ocular, vaginal, pulmonar, nasal e rectal. O processo de selecção da via a utilizar é tão importante como o *design* da NP em si, e deve ser bastante minucioso, na medida em que para cada uma das vias enumeradas existem barreiras biológicas para atravessar (Elsabahy & Wooley, 2012).

Essas barreiras vão trazer mais desafios ao nível do *design* das NP's a serem utilizadas para os mais diversos fins (Elsabahy & Wooley, 2012).

Tabela 2: Barreiras existentes na entrega das NP's.

Adaptado de Elsabahy, M., & Wooley, K. (2012).

Barreiras Externas	En-route barriers	Barreiras Celulares
• Pele 10-20µm Difusão passiva (<1kDa) • Muco 100-1000 nm	• Sangue Diâmetro dos capilares (~5-40µm); Tamanho poro vasculatura tumoral (<200nm) • Clearance renal • Clearance hepática e esplénica (<500nm) • Barreira Hematoencefálica Tamanho poro (~12nm glioma maligno) • Matriz extracelular	• Uptake celulares Difusão passiva (<1kDa) • Endocitose Vesículas internas (60-120nm ou maior) • Citoplasma Degradação • Translocação para organelos subcelulares Complexos dos poros nucleares (~10 nm) • Exocitose Clearance celular das NP's

II.2.1. Tamanho e Morfologia das partículas

O tamanho escolhido para uma NP vai ter influência no seu comportamento no interior do organismo, como tempo de circulação, *clearance*, distribuição selectiva aos tecidos e destino intracelular (Elsabahy & Wooley, 2012).

As NP's de grandes dimensões (>1µm) são vistas pelo organismo como agentes estranhos, e portanto, são como consequência opsonizadas e acumulam-se no fígado e baço. Por outro lado, as NP's de pequenas dimensões (<5nm) são eliminadas do organismo rapidamente através da *clearance* renal, podendo este factor ser considerado um benefício quando se pretende usar agentes de contraste ou até mesmo atravessar a barreira hematoencefálica (apesar de nesta última situação não haver tempo suficiente para se dar a acumulação desejada para obter o efeito terapêutico) (Elsabahy & Wooley, 2012).

As NP's de tamanho intermédio (20-100nm) são, deste modo, as que apresentam um maior potencial para exercer o efeito terapêutico desejado na medida em que, quando bem construídas, permanecem um longo período de tempo no organismo. O seu tamanho é suficientemente grande para evitar uma rápida *clearance* renal e suficientemente pequeno para não sofrerem opsonização (Elsabahy & Wooley, 2012).

A morfologia mais usual para as nanopartículas é a esférica. Contudo, podem ser desenvolvidas outras morfologias a partir desta, como a cilíndrica ou vesicular, e que vão apresentar características diferentes no que respeita à capacidade de solubilização, tempo de permanência em circulação e *uptake* celular (Elsabahy & Wooley, 2012).

II.2.2. Potencial Zeta (ζ)

Sabe-se que, quando se coloca um qualquer tipo de material, como é o caso das NP's, em

contacto com a água, independentemente das suas dimensões, este vai de imediato adquirir uma carga eléctrica à sua superfície. Contudo, a sua carga efectiva vai ser mascarada, pois vão estar a ser atraídos iões da vizinhança, que por sua vez vão atrair contra-iões. Este fenómeno, existente entre a interface da partícula e de um líquido, é denominado por dupla camada eléctrica (Cardoso, 2009).

Esta teoria defende que na carga instalada à volta das NP's estão compreendidas duas regiões distintas: Uma primeira camada, constituída por iões intimamente ligados à superfície, também designada por camada de Stern e uma segunda, mais externa, constituída por iões que se distribuem de modo a equilibrar as forças electrostáticas e os movimentos térmicos, também denominada por camada difusa ou camada de Gouy-Chapman. Nesta última camada, o potencial vai diminuindo à medida que se aumenta a distância à superfície das NP's (Cardoso, 2009).

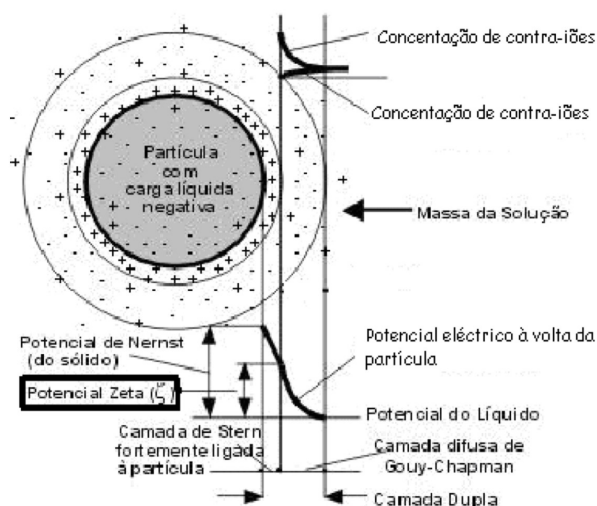


Figura 2: Representação esquemática do potencial ζ .

Retirado de Cardoso, M. (2009).

O potencial ζ é o parâmetro que caracteriza a carga global da superfície de uma partícula em suspensão, e está relacionado com a sua estabilidade e morfologia superficial. Dada a sua importância, é um parâmetro bastante utilizado em laboratório para estudos de estabilidade e de absorção de superfície, que envolve quer o tamanho das partículas quer o ambiente em que estão inseridas, como o pH, força iónica, o tipo de iões em suspensão, entre outros (Xu, 2008).

II.2.3. Estabilidade química

As NP's após desenvolvidas podem ainda ser revestidas com grupos químicos para alterar a sua hidrofobicidade, carga de superfície, imunogenicidade, tempo de circulação *in*

vivo, biodistribuição e biodisponibilidade intracelular, de modo a que se possam obter melhores resultados terapêuticos aquando da sua interacção com o organismo (Elsabahy & Wooley, 2012).

A sua estabilidade química pode ser comprometida por factores ambientais como a exposição à luz, oxigénio, e altas temperaturas. Também a presença de água, metais ou enzimas possibilita a ocorrência de degradações por hidrólise. Para contornar esta última situação, sempre que possível, deve proceder-se à liofilização das NP's de modo a garantir uma estabilidade química mais duradoura (Kayser, Müller, & Wissing, 2004).

Em formulações de NP's que tenham lípidos na sua constituição devem ser utilizados antioxidantes, de maneira a evitar a sua oxidação ou peroxidação (Burgess, Costa, Khan, & Xu, 2012).

II.2.4. Estabilidade física

A garantia da estabilidade física das NP's é bastante importante na medida em que é esta que vai ditar se o sistema perderá fármaco quando estiver armazenado, e se o seu perfil de libertação será ou não diferente do esperado. Estes sistemas podem sofrer envelhecimento de Ostwald, perda de carga e de estabilidade electrostática, ruptura das membranas, desnaturação, agregação ou dissociação (Burgess et al., 2012).

Esta estabilidade pode ser comprometida devido a variações bruscas de temperatura, por processos de produção inadequados, exposição à luz, por interacção da preparação com superfícies que desencadeiem processos de agregação das partículas, e por contaminação das preparações com outras estruturas coloidais, metais e eletrólitos. As variações bruscas de temperatura têm um maior impacto quando as NP's são constituídas por lípidos e ocorrem alterações do seu estado físico (Mäder & Mehnert, 2001; Kayser et al., 2004).

Por outro lado, a exposição à luz vai provocar um aumento da energia cinética ao sistema, e deste modo a sua instabilidade física. Para este caso concreto os sistemas devem ficar protegidos de fontes luminosas (Kayser et al., 2004).

II.3. Veiculação de fármacos

A veiculação de fármacos pode ser feita de forma passiva ou activa. Contudo, a forma activa não pode ser considerada independente da passiva, uma vez que só ocorre após se ter dado acumulação passiva de NP's no tumor (Danhier, Feron, & Pr  at, 2010).

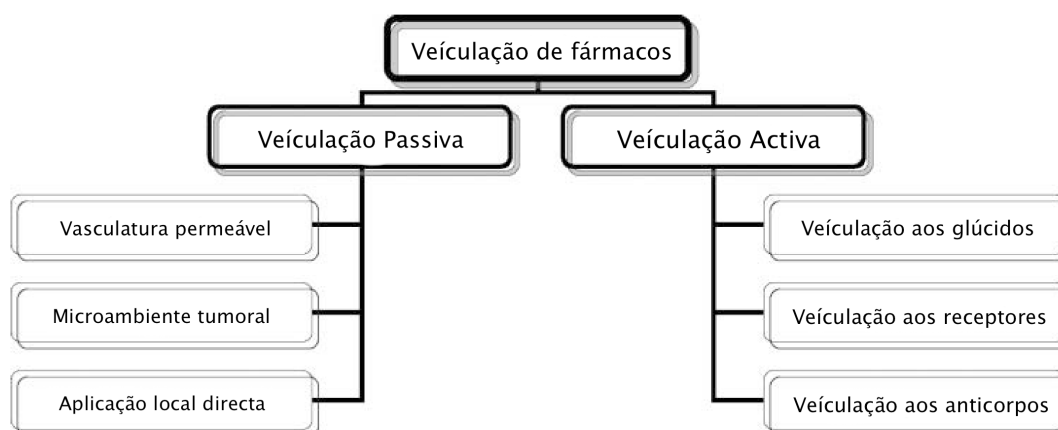


Figura 3: Esquema das possíveis vias para veiculação de fármacos.

Adaptado de Kim, G., Nie, S., Shin, D., & Sinha, R. (2006).

II.3.1. Veiculação Passiva

A veiculação passiva tem sido uma área bastante explorada no que diz respeito a aplicações oncológicas, uma vez que os tumores têm a particularidade de acumular facilmente NP's através dos mecanismos de aumento de permeabilidade e retenção, também designado de efeito EPR. Adicionalmente, o microambiente dos tecidos alvos é também um factor que pode ser levado em consideração na veiculação passiva de fármacos (Farokhzad, Kamaly, Radovic-Moreno, Valencia, & Xiao, 2012).

As NP's que satisfaçam as características de tamanho e características necessárias para escapar ao sistema mononuclear fagocítico (MPS) têm a capacidade de permanecer durante mais tempo na corrente sanguínea e como consequência, uma maior probabilidade de alcançar os tecidos alvo (Chen, Cho, Nie, Shin & Wang, 2008).

As células tumorais, por serem de crescimento rápido exigem o recrutamento de novos vasos sanguíneos, ou que seja feita uma reorganização dos vasos existentes ao redor da massa tumoral, de modo a que tenham sempre disponíveis os nutrientes e o oxigénio necessário para continuarem a prosperar. Deste processo, designado por angiogénese, vai resultar um desequilíbrio organizacional nos vasos, e consequentemente estes vão ficar mais permeáveis à introdução de macromoléculas que os tecidos normais. Este aumento de permeabilidade vai permitir a ocorrência de extravasamento de NP's para o interstício tumoral. Adicionalmente, a ausência de drenagem linfática no tumor, vai conduzir a uma maior acumulação das NP's e retenção das mesmas (Kim, Nie, Shin & Sinha, 2006; Chen et al., 2008).

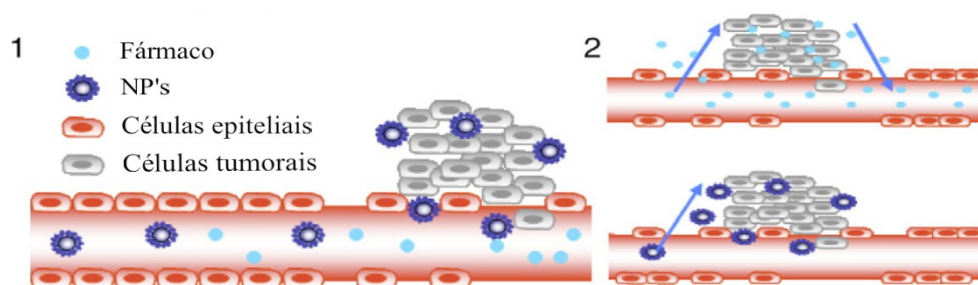


Figura 4: Veiculação passiva de fármacos às células tumorais.

(1)- As NP's atingem o tumor, através da vasculatura selectivamente permeável; (2)- Em cima: O fármaco sozinho difunde livremente para dentro e fora dos vasos sanguíneos em redor da massa tumoral, devido ao seu tamanho reduzido, e como consequência, resulta numa rápida diminuição da concentração eficaz. Em baixo: O fármaco inserido nas NP's não pode difundir para trás devido ao seu tamanho, resultando assim na sua acumulação na massa tumoral – efeito EPR.

Adaptado de Danhier, F., Feron, O., & Préat, V. (2010).

Relativamente ao microambiente, as células tumorais, por possuírem elevadas necessidades de consumo energético que não conseguem ser satisfeitas unicamente pelos vasos sanguíneos, realizam glicólise o que resulta numa redução local do pH. Deste modo, a construção de NP's passa por ter estabilidade em pH fisiológico e proceder à libertação de fármaco quando o pH diminui (Kim et al., 2006).

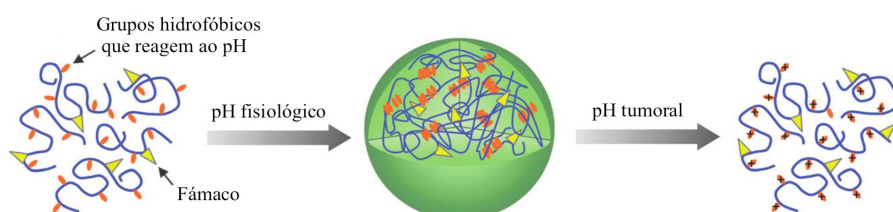


Figura 5: Libertação de fármaco das NP's em pH tumoral (pH ácido).

Adaptado de Mizrahy, S., & Peer, D. (2012).

Um exemplo de uma NP's em fase experimental utilizando açúcares para veiculação passiva de fármacos é o TI-101 (NP's de capotensina-ciclodextrinas). Este complexo demonstrou exibir um tempo prolongado na circulação sanguínea e uma cinética de libertação lenta, *in vivo*, quer nos ensaios pré-clínicos como clínicos (Farokhzad et al., 2012).

II.3.2. Veiculação Activa

A veiculação activa consiste na conjugação das NP's com ligandos que possuam afinidade específica para o tecido-alvo, aumentando assim a selectividade e eficácia, quando comparada com a veiculação passiva. Esses ligandos são seleccionados para interagirem com

os receptores das células tumorais que são superexpressados, e que não são expressados pelas células normais (Danhier et al., 2010).

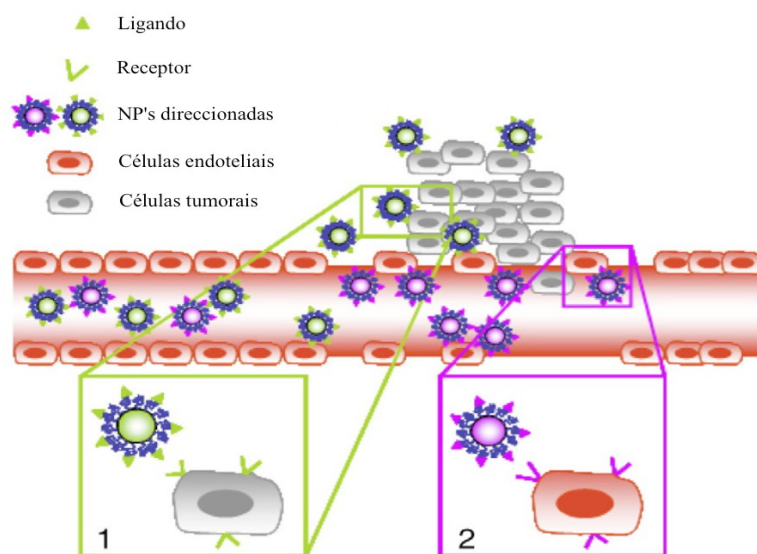


Figura 6: Veiculação activa de fármacos a células tumorais.

Introdução de ligandos na superfície das NP's e que se vão ligar aos receptores específicos, expressos por (1)- células cancerígenas; (2)- células endoteliais angiogénicas.

Adaptado de Danhier, F., Feron, O., & Pr  at, V. (2010).

O direccionamento dos f  armacos ao endotélio tumoral tem como vantagens:

- Não existir necessidade de extravasamento das NP's para alcançarem o local de acção;
- A liga  o aos receptores assim que se proceda    injecc  o IV;
- Diminui  o do risco de ocorrência de resistências devido    estabilidade do endotélio das células normais quando comparadas com as tumorais;
- A maior parte dos marcadores são expressos independentemente do tipo de tumor o que permite um amplo espectro de acção (Danhier et al., 2010).

Nesta abordagem utilizam-se NP's com veicula  o para hidratos de carbono, antigénios (Ag) e receptores (Kim et al., 2006).

Relativamente aos a   ares, a jun  o entre lecitina-a   ar    um dos exemplos de veicula  o utilizada em oncologia. Esta interac  o pode ser conseguida através do desenvolvimento de NP's contendo invólucro de a   ares, e que vão ser direccionadas a determinadas lecitinas (vectoriza  o direccionado para as lecitinas), ou ainda introduzir lecitinas em NP's que vão ser direccionadas para a superfície celular tumoral, rica em a   ar (vectoriza  o reversa das lecitina). Os sistemas de administra  o desenvolvidos, até agora, partindo desta interac  o, têm a capacidade de atingir todos os   rg  os. Posto isto, podem

resultar deste facto problemas para os tecidos normais. Ainda assim, têm vindo a ser continuados estudos com as lecitinas por apresentarem grande afinidade para a camada de açúcar existente na superfície tumoral (Kim et al., 2006).

No que diz respeito à veiculação por Ag e receptores as NP's são absorvidas através de endocitose mediada por um receptor. Uma vez no interior celular, a dissociação do fármaco das NP's para o citoplasma celular pode dar-se no espaço extracelular, na superfície celular ou em lisossomas por enzimas lisossomais. Esta forma de veiculação de fármacos inclui 3 (três) moléculas essenciais: polímeros para a veiculação dos fármacos, ligandos ou Ac para se acoplarem às NP's que têm elevada afinidade para as células da superfície tumoral e receptores ou Ag, presentes na superfície tumoral (Kim et al., 2006).

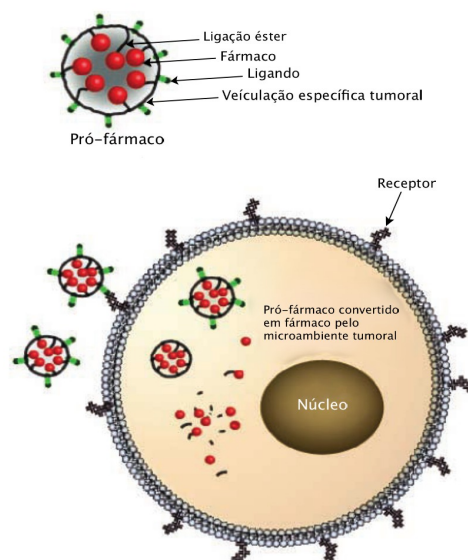


Figura 7: Representação esquemática do sistema de um pró-fármaco tumoral.

O fármaco é conjugado com um polímero biocompatível por uma ligação éster. A ligação é posteriormente hidrolizada por enzimas específicas, ou pela diferença de pH sentida nas proximidades do tumor. Neste momento a NP procede à libertação do fármaco.

Adaptado de Kim, G., Nie, S., Shin, D., & Sinha, R. (2006).

III. FARMACOCINÉTICA E TOXICOLOGIA ASSOCIADAS AO USO DE NANOPARTÍCULAS

III.1. Farmacocinética dos fármacos veiculados através de Nanopartículas

III.1.1 Via Oral

A administração de fármacos pela via oral, também designada *per os*, pode ser feita através de suspensões de NP's ou pelos convencionais comprimidos, com NP's incorporadas (Mäder & Mehnert, 2001).

Como o ambiente estomacal possui um pH baixo e elevadas quantidades de iões, estão reunidas as condições que promovem uma rápida degradação das NP's que têm no seu interior o fármaco encapsulado. Deste modo, as NP's que se destinem à veiculação de fármacos no tracto gastrointestinal devem possuir características especiais como proteger o fármaco da degradação, resistir a valores baixos de pH e permitir uma boa absorção através do epitélio intestinal (Lopes & Souto, 2011).

As NP's formadas a partir de misturas de ciclodextrinas (CD's) são bastante utilizadas nesta via por potenciarem a absorção epitelial. Além disso, a adesividade das NP's ao epitélio intestinal é também um factor que afecta positivamente a sua absorção e biodisponibilidade (Al-Hilal, Alam, & Byun, 2013).

III.1.2. Via Ocular

Na área da oftalmologia têm vindo a obter-se resultados promissores com a utilização de NP's. Muito embora a utilização das NP's provoque uma limitada obstrução da visão, elas vão proteger os fármacos da degradação química e enzimática e como consequência melhorar significativamente o tempo de semi-vida no humor vítreo, por libertação prolongada de fármaco na córnea (Lopes & Souto, 2011).

Contudo, para que o fármaco contido nas NP's desenvolva uma capacidade farmacológica eficiente devem ter-se em consideração quer a natureza do polímero a utilizar quer as características do próprio fármaco. Isto porque o fármaco não deve apresentar uma afinidade muito elevada para o polímero a que se encontra acoplado (Lopes & Souto, 2011).

A acrescentar ainda que, ao serem administradas NP's a locais com processo inflamatório activo, estas vão apresentar uma bioadesividade 4 (quatro) vezes superior comparativamente aos tecidos normais (Lopes & Souto, 2011).

O fármaco a ser utilizado deve ser estéril, e ter reacção próxima da neutralidade (Alves, Lobo, Prista, & Morgado, 2011).

III.1.3. Via Inalatória e Pulmonar

Os pulmões são o órgão responsável pela realização das trocas gasosas de oxigénio e de dióxido de carbono com o meio ambiente. Qualquer partícula estranha que se deposite nos pulmões é maioritariamente eliminada pelo mecanismo mucociliar. Contudo, partículas de tamanho inferior a 2,5 milímetros (mm), como é o caso das NP's, chegam directamente aos alvéolos pulmonares que não possuem depuração mucociliar. Assim as NP's vão ser primeiramente fagocitadas pelos macrófagos, e que posteriormente vão ser transportadas para as regiões brônquicas para serem removidos (Krug & Wick, 2011).

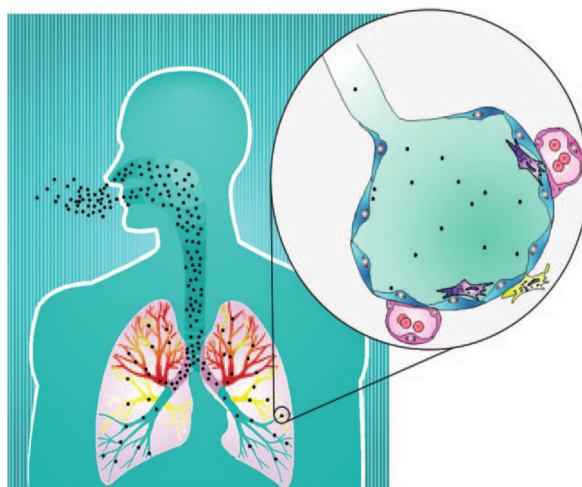


Figura 8: Transporte de NP's pelo tracto respiratório.

Uma vez nos alvéolos as NP's podem ser fagocitadas pelos macrófagos (roxo), ou por células dendríticas (amarelos). Podem ainda ser recolhidas pelas células epiteliais (azul).

Retirado de Krug, H. F., & Wick, P. (2011).

A administração de fármacos por esta via não é invasiva, é fácil e acima de tudo não diminui a sua biodisponibilidade pelo metabolismo de primeira passagem. A barreira epitelial é fina, bastante irrigada e com actividade metabólica reduzida quando comparada com outras vias. Assim, as NP's utilizadas para estas administrações devem possuir um diâmetro adequadamente reduzido, para que não sejam eliminadas por expiração e que cubram toda a superfície do tracto respiratório. Devem ainda ter uma mucosidade apropriada, sendo esta influenciada pela carga das partículas, composição, tamanho e porosidade (Betbeder & Dombu, 2013).

Além das características relacionadas com as NP's, devem também ter-se em consideração as características físico-químicas do fármaco a encapsular, o local de deposição do aerossol e o design do aparelho de inalação. Exemplos de fármacos administrados pela via

nasal são a insulina, o ácido desoxirribonucleico (DNA) e a toxina tetânica (Betbeder & Dombu, 2013).

III.1.4. Via Cutânea e Transdérmica

A pele é constituída por camadas principais: Epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a camada mais superficial e subdivide-se ainda em 4 (quatro) camadas sendo que a que contacta directamente com os produtos cosméticos é o extracto córneo (Krug & Wick, 2011).

As NP's podem difundir os fármacos a partir do estrato córneo da barreira epidérmica, poros, folículos pilosos, e espaços intercelulares. Para potenciar esta difusão pode ser adicionado calor sob a forma de massagem no local de aplicação. Contudo se a pele se encontrar de algum modo lesionada ou debilitada, a absorção a nível do extracto córneo será mais intensa (Krug & Wick, 2011).

Exemplos de fármacos administrados pela via dérmica e transdérmica são o interferão gama, utilizado no tratamento de *Herpes cutaneous*, e o minoxidil usado para o tratamento da alopecia (Chang et al., 2004).

III.1.5. Via Parentérica

Também designada por via injectável, pode dividir-se em várias vias de administração: Intradérmica, subcutânea (SC), intramuscular, intravenosa (IV), intraraquidica, intraperitoneal e intrapleural, sendo a IV a via de administração mais rápida e com efeito mais intenso uma vez que não é necessária absorção do fármaco (Alves et al., 2011).

A administração de fármacos por esta via exige que estes sejam estéreis, e é desejável que apresentem pH neutro, isotonicidade e ainda isenção de pirogénios (Alves et al., 2011).

A administração parentérica de nanopartículas requer que estas apresentem alguma proteção contra a opsonização e rápida eliminação pelo sistema retículo endotelial (SRE) (Kayser et al., 2004).

III.2. Nanotoxicologia

A Nanotoxicologia, que ganha cada vez mais importância com o crescimento das aplicações tecnológicas, pode ser descrita como “o estudo dos efeitos adversos da engenharia dos nanomateriais nos organismos vivos e nos ecossistemas, incluindo a prevenção e a melhoria dos mesmos” (Oberdörster, 2010).

A maioria das NP's, produzidas até ao momento, são bastante estáveis e podem ser veiculadas através de qualquer via de administração. Não obstante, devem ser tidas em consideração possíveis interações entre as NP's e o organismo, uma vez que podem ser desencadeados mecanismos de toxicidade, como resposta inflamatória e imunológica (Buzea,

Pacheco, & Robbie, 2007).

As dimensões das NP's podem estar intimamente relacionadas com a sua toxicidade. As de pequena dimensão vão induzir uma resposta inflamatória mais extensa que as de grandes dimensões, por possuírem uma elevada área de contacto e produzindo consequentemente uma maior reactividade (Buzea et al., 2007).

A toxicidade das NP's depende também da biocompatibilidade, quantidade, método de preparação e metabolismo dos materiais utilizados na sua formação. Os excipientes a utilizar devem de apresentar uma designação própria da *Food and Drug Administration* (FDA), “Geralmente reconhecida como segura” (GRAS), que prova que as substâncias químicas utilizadas são seguras, e portanto, garante a sua eliminação do organismo (Gadhav et al., 2012).

Por outro lado, os surfactantes utilizados na produção de NP's, são outro factor relevante no que diz respeito à nanotoxicidade. Sabe-se que, se forem utilizadas grandes quantidades de surfactante, existe uma grande possibilidade de provocar citotoxicidade pela interacção destes agentes tensioactivos com as membranas celulares fosfolipídicas (Hommos, Müller, & Pardeike, 2009).

A utilização de solventes orgânicos para a produção de NP's, pode ser também sinónimo de toxicidade, pois revelam-se difíceis de remover quando se estão a produzir as NP's (Mäder & Mehnert, 2001).

IV. AÇÚCARES

Os açúcares ou glúcidos são aldeídos poli-hidroxilados ou, cetonas poli-hidroxiladas ou outros compostos que se podem transformar nestes ao sofrerem hidrólise. Subdividem-se em monossacáridos, dissacáridos e polissacáridos, sendo que os primeiros são a unidade mais simples e não são passíveis de sofrer hidrólise. São exemplos de monossacáridos a glucose e a frutose (Boyd & Morrison, 1996).

Os dissacáridos são açúcares constituídos por 2 (duas) unidades de monossacáridos unidas por ligações glicosídicas que se quebram por hidrólise e originam os monossacáridos. A maltose, a lactose e a sacarose são alguns exemplos (Boyd & Morrison, 1996).

Os polissacáridos são compostos moleculares de grandes dimensões constituídos por várias unidades de monossacáridos, e tal como os dissacáridos, unidas por ligações glicosídicas. Os polissacáridos mais importantes na natureza são a celulose (polissacarídeo estrutural) e o amido (polissacarídeo de reserva). Outros exemplos são o ácido hialurónico (AH), CD's, dextrano (DEX) e o quitosano (QS) (Boyd & Morrison, 1996).

IV.1. Açúcares utilizados em Nanopartículas

IV.1.1. Ácido hialurónico

É um biopolímero aniónico composto pela junção alternada dos dissacarídeos D-ácido glucorónico e N-acetil-D-glucosamina interligados entre si por ligações β -(1,4). Está presente em alguns tecidos e fluídos do organismo humano, como pele, pulmões, intestino, líquido sinovial e umbilical e sangue do cordão umbilical, sendo este último a maior fonte de AH, segundo estudos recentes. No que diz respeito ao nível comercial, o AH é produzido a partir de cristas de galo e da fermentação microbiana (Hahn et al., 2010).

Possui características únicas que o colocam na linha da frente quando se trata do desenvolvimento de fármacos e sistemas genéticos de entrega de fármacos direccionados para diferentes vias de administração. Essas características são endogenicidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, capacidade de elevar o tempo de circulação *in vivo* e a capacidade de alterar a dissolução e absorção dos fármacos (Al-Qadi, Grenha, & Remuñán-López, 2011).

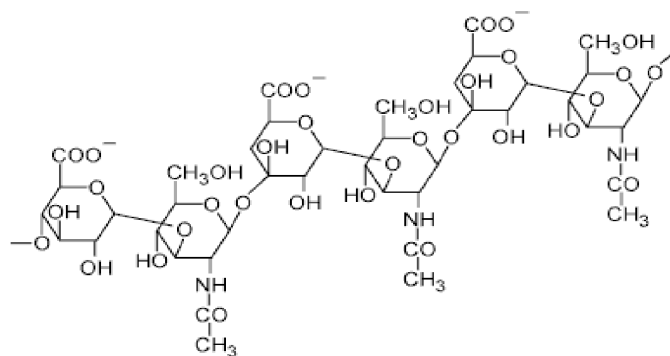


Figura 9: Estrutura química do ácido hialurônico.

Adaptado de Karthikeyan, D., & Kumar, C. (2013).

IV.1.2. Ciclodextrinas

Também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses ou dextrinas de Schardinger, são oligossacarídeos cíclicos formados a partir de unidades de glucose interligadas entre si por ligações do tipo α -(1,4). O número unidade de glucose constituintes de um anel de CD's pode variar de 6-13, sendo as CD's mais comuns constituídas por 6,7 e 8 unidades de D-glucose (α -CD, β -CD e γ -CD respectivamente) (Saltão & Veiga, 2001; Fathi, Heydari & Namazi, 2011).

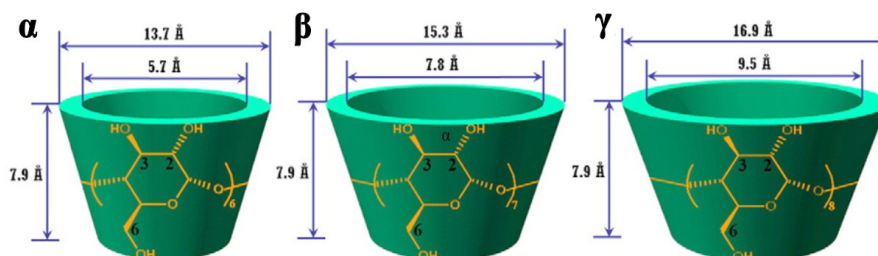


Figura 10: Estrutura química das α , β e γ -ciclodextrinas.

Adaptado de Ma, P., & Zhang, J. (2013).

As CD's apresentam-se assim como tendo um exterior hidrofílico e uma cavidade interior hidrofóbica. Esta cavidade serve para armazenar fármacos hidrofóbicos ou biodegradáveis, e a sua introdução nestes sistemas forma deste modo complexos de inclusão, que permitem aumentar a sua biodisponibilidade. São também sistemas biocompatíveis com o organismo, não impulsionam a acção do sistema imunológico e têm baixo poder tóxico tanto em animais como humanos (Mizrahy & Peer, 2012).

São sistemas bastante utilizados na inclusão de fármacos em Tecnologia Farmacêutica para aumentar a solubilidade, estabilidade e absorção dos fármacos, mascarar odores e sabores, diminuir a toxicidade local e sistémica, controlar o perfil de libertação dos fármacos e melhorar a sua permeabilidade para atravessar as barreiras biológicas (Ma & Zhang, 2013).

IV.1.3. Dextrano

Polímero ramificado constituído por várias unidades de glucose unidas entre si por ligações glicosídicas α -(1,6) e podem apresentar diversos comprimentos. As ramificações fazem-se através da ligação α -(1,3) da cadeia principal (Karthikeyan & Kumar, 2013).

O DEX é obtido através da fermentação da sacarose pelas bactérias ácido-láticas *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 (Kumria & Sinha).

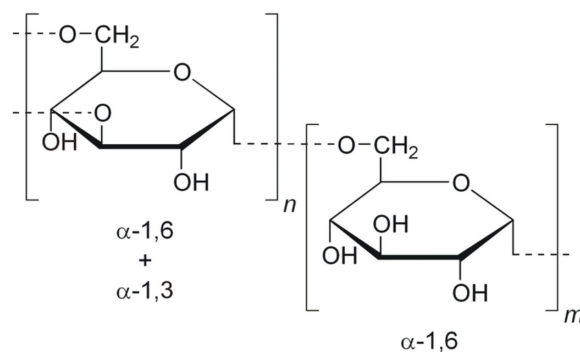


Figura 11: Estrutura química do dextrano.

Adaptado de Karthikeyan, D., & Kumar, C. (2013).

IV.1.4. Manitol

O manitol, ou (D-)manitol, é um açúcar álcool resistente de 6 (seis) carbonos ou um poliol, utilizado com alguma frequência pela Indústria Farmacêutica por ter a capacidade de aumentar a solubilidade de certos fármacos (Gao et al., 2014).

É considerado o poliol mais abundante na natureza, e encontra-se disponível microorganismos como bactérias, leveduras, fungos, algas, líquenes e em diversas plantas (Eggink, Grobбен, Hugenholtz, Weusthuis, & Wisselink, 2002).

Quando introduzido em produtos alimentares, melhora o seu valor nutricional, e posto isto, tem efeitos benéficos na promoção da saúde (Eggink et al., 2002).

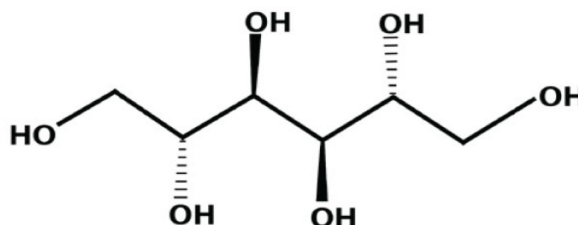


Figura 12: Estrutura química do manitol.

Adaptado de Galliker, B., & Steinbach, A., (n.d.).

IV.1.5. Pectina

Polissacarídeo estrutural, obtido através da parede celular das plantas. Possui uma estrutura química heterogênea, baseada em grandes quantidades de poli (D-ácido galacturónico) interligados por ligações glicosídicas do tipo α -(1,4) (Karthikeyan & Kumar, 2013).

Em quantidades abundantes está presente na parede primária de dicotiledóneas e monocotiledóneas não gramíneas, e é enriquecida em frutas como a maçã e os citrinos (Atmodjo, Hao, & Mohnen, 2013).

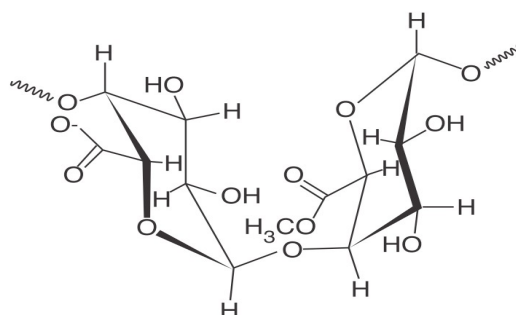


Figura 13: Estrutura química da pectina.

Adaptado de Sharma, C., & Sonia, T. (2012).

IV.1.6. Pululano

Homo-polissacarídeo linear bacteriano produzido a partir do amido pelos fungos *Aureobasidium pullulans*. A sua estrutura química é composta por ligações glicosídicas entre α -(1,6) D glucopirranose e α -(1,4) D-glucopirranose numa proporção de 1:2 (Karthikeyan & Kumar, 2013).

É um açúcar que possui como vantagens ser biodegradável, ter elevada adesividade, ser flexível e ter uma boa solubilidade. É ainda hemocompatível, não imunogénico, não carcinogénico e portanto, a FDA aprovou a sua utilização para diversas aplicações (Karthikeyan & Kumar, 2013).

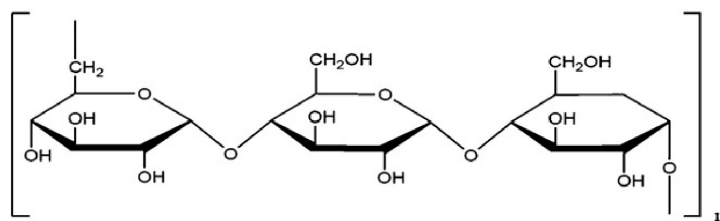


Figura 14: Estrutura química do pululano.

Adaptado de Jani, G., Khanda, S., & Prajapati, V. (2013).

IV.1.7. Quitosano

Polissacarídeo linear composto por β -(1,4) e D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, natural, biodegradável, formado através da desacetilação da quitina (segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, e constituinte do esqueleto de crustáceos e parede celular de alguns fungos como o *Aspergillus* e *Mucor*).

A sua eliminação por parte do organismo é bastante fácil por se degradar em N-acetil glucosamina, através das lisozimas, acabando por abandonar o organismo na forma de dióxido de carbono (Gan & Wang, 2007; Luca, Popa, Racoviță & Vasiliu, 2009; Hu, Sun, & Wu, 2013).

Por ser um açúcar com propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade, reduzida toxicidade, hemostático, bacteriostático, fungicida, anticancerígeno e antiolesterolémico, tem sido bastante utilizado a nível do sector Farmacêutico (Gan & Wang, 2007).

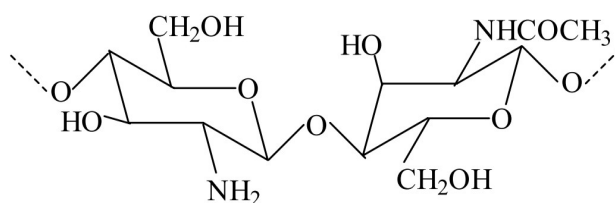


Figura 15: Estrutura química do quitosano.

Retirado de Luca, C., Popa, M., Racoviță, S., Vasiliu, M. (2009).

IV.1.8. Sacarose

Também designada por 1-O-(β -D-Fructofuranosil)- α -D-glicopirranose, é um dissacárido composto por um resíduo de frutose e outro de glucose, unidas por uma ligação glicosídica pelos carbonos anoméricos de cada um dos resíduos (Boscolo, 2003; Silva, 2012).

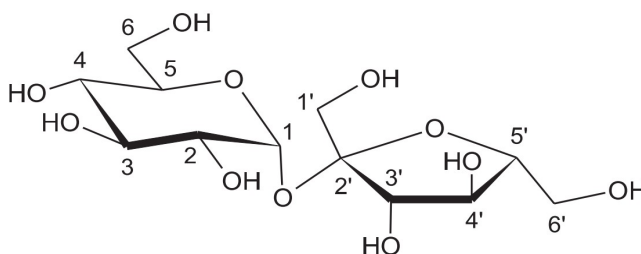


Figura 16: Estrutura química da sacarose.

Retirado de Boscolo, M. (2003).

É uma molécula de ocorrência natural, não-tóxica, biocompatível e biodegradável (Silva, 2012).

V. NANOPARTÍCULAS A PARTIR DE AÇÚCARES

V.1. Mecanismos de preparação de NP's a partir de açúcares

V.1.1. Ligação cruzada covalente

A preparação de NP's iniciou-se a partir de ligações cruzadas covalentes, e de entre vários polissacarídeos que são possíveis de utilizar na sua produção, o QS foi o primeiro a ser utilizado (Liu et al., 2008).

Nas ligações cruzadas covalentes, as interações existentes entre as cadeias poliméricas e os agentes de reticulação são irreversíveis, formando-se uma malha rígida, desde que não sejam utilizados agentes de reticulação biodegradáveis. Esta estrutura formada tem como característica permitir a absorção de água e compostos activos sem que ocorra a dissolução das NP's (Mizrahy & Peer, 2012).

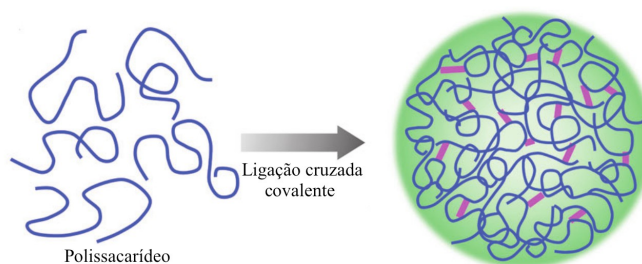


Figura 17: Ligação cruzada covalente.

Adaptado de Mizrahy, S., & Peer, D. (2012).

A malha rígida obtida é designada de hidrogel, e é considerada uma estrutura porosa. Esta estrutura pode libertar água livre que esteja no seu interior, e com base neste pressuposto é possível produzir-se um sistema de libertação de fármacos por difusão. De salientar ainda que este sistema vai depender do tamanho da malha do hidrogel, que por sua vez depende do rácio inchaço/aumento do QS (Berger et al., 2004).

Os agentes de reticulação mais utilizados juntamente com os polissacarídeos são o glutaraldeído e o glioxal, 2 (dois) dialdeídos. O glutaraldeído e o glioxal são conhecidos por serem agentes neurotóxico e mutagénico, respectivamente, não sendo alternativas viáveis na veiculação de fármacos. Ainda que se coloque a possibilidade de purificação dos hidrogéis formados, para posterior administração, deve ser considerada a existência de dialdeídos livres e que irão induzir toxicidade no organismo (Berger et al., 2004).

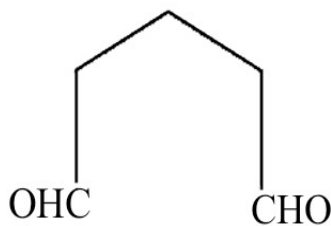


Figura 18: Estrutura química do gluteraldeído.

Adaptado de Dartiguenave, C., & Migneault, I. (2004).

Deste modo têm vindo a ser testadas outras alternativas viáveis, como os ácidos di- e tricarboxílicos naturais (ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico e ácido cítrico) e a genipina (Liu et al., 2008).

A genipina é um composto orgânico proveniente dos frutos de *Gardenia jasminoides* Ellis, muito utilizado em medicina tradicional. Um estudo realizado por Choi et al, 2011 demonstra que a genipina possui características que se assemelham às do glutaraldeído. Adicionalmente, a genipina tem a vantagem de apresentar uma toxicidade bastante reduzida *in vitro* e ser biocompatível com o organismo (S. Choi, Kim, Kim, & Yoo, 2011).

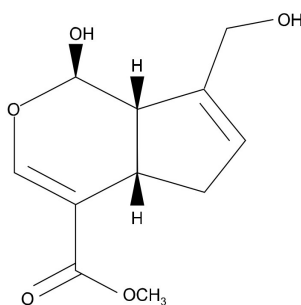


Figura 19: Estrutura química da genipina.

Adaptado de Choi, S., Kim, Y., Kim, S., & Yoo, J. (2011).

Da junção do QS com agentes de reticulação ácidos di e tricarboxílicos naturais formam-se NP's de QS biodegradáveis que podem ser policatiões, polianiões e NP's anfotéricas (Liu et al., 2008).

V.1.2. Ligação cruzada Iónica

As ligações cruzadas iónicas funcionam como alternativas às ligações cruzadas covalentes quando se pretende utilizar polissacarídeos com carga. Adicionalmente, tem como vantagens condições de preparação reduzidas e procedimento relativamente simples (Liu et al., 2008).

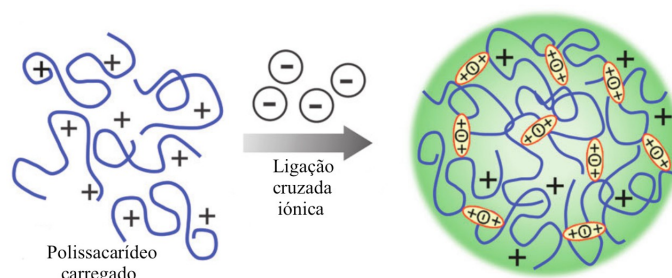


Figura 20: Ligação cruzada iónica.

Adaptado de Mizrahy, S., & Peer, D. (2012).

A formação de NP's com base nesta metodologia pressupõem interacções electrostáticas entre os polissacarídeos carregados e agentes de reticulação de carga oposta. O polianião mais usado até hoje como agente de reticulação em ligações cruzadas iónicas é o tripolifosfato (TPF). Este não é tóxico, tem aniões multivalentes e a interacção TPF-QS tem sido bastante utilizada para proceder à entrega de vários fármacos e macromoléculas no organismo (Liu et al., 2008).

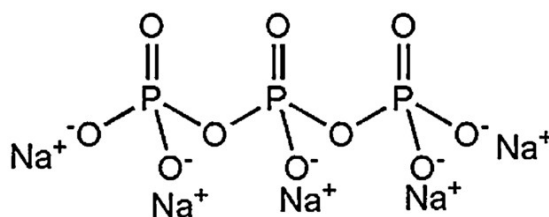


Figura 21: Estrutura química do tripolifosfato.

Adaptado de Costa, A., Grenha, A., & Rodrigues, S. (2012).

O tamanho e a carga global do agente de reticulação e do polissacárido a utilizar são factores influentes nas reacções de ligação cruzada iónica. Ao contrário das NP's formadas a partir de ligações covalentes, estas NP's são sensíveis ao pH, o que é uma vantagem quando se pretende distribuição de fármacos. Por outro lado, esta sensibilidade ao pH pode provocar alguma instabilidade na rede iónica formada entre o polissacárido e o agente de reticulação (Mizrahy & Peer, 2012).

V.1.3. Nanopartículas polissacarídeas por complexação de polielectrolitos (PCP)

Os complexos PCP, são formados por interacções electrostáticas directas entre polielectrólitos de cargas diferentes. Assemelham-se à ligação cruzada iónica desde que não se formem ligações permanentes. Contudo, enquanto que na ligação cruzada iónica os iões ou

moléculas interagem com os polieletrólitos, nos complexos PCP a interacção é feita entre os polieletrólitos e as moléculas de maiores massa molecular (MM) (Mizrahy & Peer, 2012).

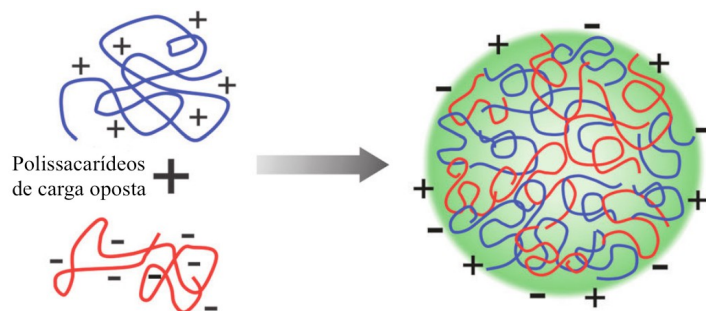


Figura 22: Esquema de NP's polissacarídeas por PCP.

Adaptado de Mizrahy, S., & Peer, D. (2012).

Em teoria pode utilizar-se um qualquer polieletrólito para interagir com um polissacárido e assim formar NP-PCP. No entanto, a prática demonstra que os polieletrólitos a utilizar devem ser solúveis em água e biocompatíveis de modo a garantir segurança na sua utilização. Com estas características, o QS é o único polissacarídeo policatiónico natural disponível (Liu et al., 2008).

Regra geral, as NP's formadas por PCP podem ser divididas em polissacarídeos negativos, péptidos negativos, família ácido poliacrílico e outras (Liu et al., 2008).

V.1.4. Auto-montagem de polissacarídeos hidrofóbicamente modificados

Ao serem introduzidas porções hidrofóbicas num polissacarídeo hidrófilo, forma-se um copolímero anfifílico. Este copolímero quando em meio aquoso vai-se reorganizar numa NP de modo a que o meio interno vai conter os excertos hidrófobos e a parte hidrofílica. Esta auto-reorganização é feita de modo a minimizar a energia livre interfacial (Mizrahy & Peer, 2012).

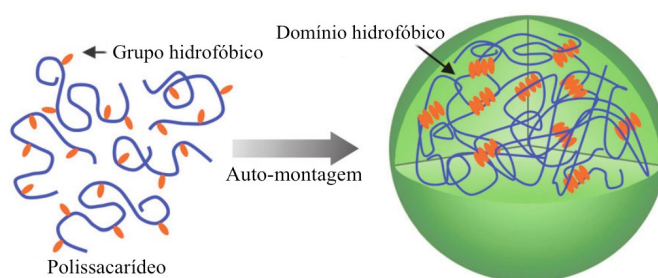


Figura 23: Esquema de auto-montagem de polissacarídeos.

Adaptado de Mizrahy, S., & Peer, D. (2012).

Estas micelas poliméricas podem ser transportadores de fármacos promissores uma vez

que o seu interior hidrofóbico rodeado por um revestimento exterior hidrófilo, pode servir como um reservatório para vários fármacos hidrofóbicos (Burt & Letchford, 2007).

Alguns exemplos de moléculas utilizados neste sistema são o polietilenoglicol (PEG), colesterol, ácido linoleico, ácido palmitico, ácido esteárico, doxorrubicina (DOX) e vitamina H (Liu et al., 2008).

Regra geral, os polissacarídeos hidrofobicamente modificados podem ser divididos em moléculas lineares hidrofóbicas, moléculas cíclicas hidrofóbicas e moléculas da família poliacrilato (Liu et al., 2008).

Tabela 3: Exemplos de NP's produzidas experimentalmente para veiculação de fármacos, e respectivos fármaco veiculados.

Adaptado de Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008).

Constituição NP's	Fármaco	Método
Cloreto de N-(2-hidroxi) propil-3-trimetil amônio quitosano	Albumina do soro bovino	1
N-trimetil quitosano	Ovalbumina	1
Carboximetil quitosano – iões cálcio	Doxorrubicina	1
Alginato – cálcio	Genes Pirazinamida Rifampicina	1
Quitosano	Retinol	1
CMQ-quitosano	Plasmídeos DNA	2
Quitosano-Sulfato de dextrano-sulfato de zinco	Anfotericina B	2
Sulfato de dextrano-quitosano	Insulina	2
Alginato-quitosano	Insulina	2
Alginato/ Cloreto de cálcio seguido de complexação com Alginato e Quitosano	Insulina	2
Carboximetil glucomanano de konjac - quitosano	Insulina Albumina soro bovino	2
Heparina-quitosano	Insulina Albumina soro bovino	2
Queratinizadas de alginato-quitosano	Proteínas	2
Ácido poli- γ -glutâmico - quitosano	Genes	3
Ácido polimetacrílico-quitosano-PEG	Insulina Albumina soro bovino	4
Sal de sódio do ácido poliaspártico-quitosano	5-Fluoracilo	5
Metoxi-PEG enxertado com quitosano	Ácido retinóico	6
Metoxi-PEG enxertado com conjugados de quitosano	Metotrexato	6
N-ftaloil quitosano enxertado com PEG-metil etér	Capotensina	6
Quitosano - colesterol modificado	Epirrubicina	7
Colesterol-pululano	Insulina	7
Quitosano-ácido desoxicólico	Adriamicina Genes	7
Glicol quitosano modificado	Doxorrubicina	7
PIBCA-quitosano	Nimodipina	8

Legenda: 1- Ligação cruzada Iônica; 2-PCP:Polissacarídeos Negativos; 3-PCP:Péptidos negativos; 4-PCP:Família ácido poliacrílico; 5-PCP:Outras; 6- Moléculas lineares hidrofóbicas; 7-Moléculas cíclicas hidrofóbicas; 8-Moléculas da família poliacrilato.

V.2. Gliconanopartículas

Os polímeros naturais, como é o caso dos polissacarídeos, têm sido motivo de amplos estudos em todo o mundo, devido às suas capacidades de segurança *in vivo*. Para além de serem hidrófilos e biodegradáveis, possuem ainda uma boa biocompatibilidade e degradação enzimática.

Os polissacarídeos exibem ainda a vantagem de poderem ser modificados com facilidade, quer quimicamente quer bioquimicamente, serem bastante estáveis, seguros, não tóxicos e poderem ser administrados pela via paratérica e não parentérica. Esta última característica permite que as nanopartículas formadas a partir de polissacáridos tenham o

potencial para manter a estabilidade de proteínas, como é o caso da insulina, e aumentar assim o seu efeito terapêutico (Sharma & Sonia, 2012).

V.2.1. Ácido hialurónico

As NP's formadas a partir do AH modificado quimicamente têm sido bastante utilizadas na entrega de proteínas, péptidos e nucleótidos. Estas modificações têm a vantagem de, até certo ponto, aumentar o tempo de semi-vida das NP's. Uma vez ultrapassando esse ponto crítico, as NP's de AH deixam de ter a capacidade de interagirem com os receptores (Hahn et al., 2010).

Em comparação com NP's formadas através de outros açúcares, estas têm a capacidade de funcionar tanto como veiculação passiva (efeito EPR em tumores) como activa (receptores para o AH super expressado pela maioria dos tumores) (Mizrahy & Peer, 2012).

Um dos fármacos utilizado em NP's é o paclitaxel (PCT). No entanto, investigadores demonstraram que a conjugação AH-PCT exhibe um aumento da captação e citotoxicidade do fármaco *in vitro* quando comparado com a administração do fármaco individualizado (Jr & Platt, 2008).

Num outro estudo foi demonstrado que os conjugados com AH foram utilizados para a entrega e aumento da estabilidade no soro da exendina 4 (exenatida). A exendina 4 é um aminoácido peptídico mimético das incretinas que apresenta actividade reguladora da glucose. Por apresentar um tempo de semi-vida curta, as suas aplicações clínicas ficam limitadas. Contudo, ao ser conjugada com AH modificado pela vinilsufona verificou-se que a sua estabilidade no soro aumentou 20 (vinte) vezes, sem perda de bioactividade. Adicionalmente, este conjugado provocou a diminuição dos níveis de glicémia na diabetes tipo 2 em ratinhos, e esse efeito hipoglicemiante durou até 3 (três) dias após a injeção (Mizrahy & Peer, 2012).

Por último, num outro estudo foi demonstrada actividade antineoplásico para NP's de AH poli (g-benzílico de L-glutamato) contendo DOX. Ficou demonstrado suprimento tumoral superior pelo conjugado AH-DOX quando comparado com a DOX individualizada. Ficou também demonstrada uma redução na cardiotoxicidade da DOX quando combinada com o AH (Mizrahy & Peer, 2012).

V.2.2. Ciclodextrinas

As NP's de CD's têm sido utilizadas para a veiculação de proteínas, péptidos, genes e oligonucleótidos (Oli) (Ahuja, Ali, Challa, & Khar, 2005).

Relativamente à veiculação de péptidos e proteínas sabe-se que a sua utilização

terapêutica é comprometida pela sua instabilidade química e enzimática, fraca absorção através das membranas biológicas, rápida *clearance*, entre outros. As CD's, são assim, introduzidas como meio de resolução destes problemas devido à sua elevada bioadaptabilidade para fins farmacêuticos e capacidade de interagir com as membranas celulares. Exemplos de fármacos inseridos em CD's para ultrapassar estas dificuldades são, a calcitonina, o glucagon, a insulina e o factor de estimulação de colónias de granulócitos recombinante humano (Ahuja et al., 2005).

Quanto à veiculação de genes, as CD's tem vindo a ser testadas na veiculação de ácidos nucleicos terapêuticos. Contudo, devem ter-se em consideração o tipo de CD's a ser utilizada, no que toca a questões de toxicidade (Ahuja et al., 2005).

Por último, os Oli são estruturas que apresentam bastantes problemas ao serem veiculadas *in vivo*. Alguns dos problemas estão relacionados com dificuldades em atravessar as membranas celulares e susceptibilidades à degradação pelas endonucleases, com consequente risco de toxicidade com os produtos de degradação dos Oli. Deste modo, as CD's utilizam-se neste caso para facilitar a passagem dos Oli através das membranas e impedir uma degradação enzimática acelerada (Ahuja et al., 2005).

Tabela 4: Exemplos de aplicações às CD's e derivados em diferentes áreas de veiculação de fármacos.

Adaptado de Ahuja, A., Ali, J., Challa, R., & Khar, R. (2005).

CD's	Fármaco	Observações
β -CD's	DNA	Aumento da permeabilidade, devido a interacções entre CD's com os componentes das membranas, como o colesterol;
β -CD's-Ps ^{*1}	DNA	Aumento na eficácia de transfecção e estabilidade contra a degradação enzimática, com reduzida toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ;
	Calcitonina	Aumento em 5% de absorção intranasal em ratos e coelhos;
	Glucagon	Aumento biodisponibilidade (>80%), em coelhos, em administração de uma formulação líquida quando comparada com administração SC;
DM- β -CD's ^{*2}	Insulina	Aumento biodisponibilidade para ~100% em administração nasal;
	ACTH	Aumento biodisponibilidade para ~70-100% em absorção nasal, em ratos; A mesma concentração de CD-Insulina em coelhos e seres humanos é ineficaz;
	DNA	Aumento da permeabilidade, devido a interacções entre CD's com os componentes das membranas, como o colesterol;
HP- β -CD's ^{*3}	DNA	Aumento da permeabilidade, devido a interacções entre CD's com os componentes das membranas, como o colesterol;

Legenda: ^{*1} Poliplexos (polímeros policatiónicos de estruturas compósitas de DNA) de β -CD's lineares catiónicas; ^{*2} Dimetil β -CD's; ^{*3} Hidroxipropil β -CD's.

V.2.3. Dextrano

As NP's de DEX conjugado com hidroxietilmetacrilato (HEMA) foram construídas para a veiculação de RNA de interferência de cadeia simples (siRNA), baseado em interacções electrostáticas.

Complexos de sulfato de DEX e polietilenamina estabilizados com Zn^{2+} foram utilizados na entrega de proteínas, DNA e anfotericina B, um antifúngico pouco solúvel em meio aquoso. A administração do antifúngico em NP's não apresenta toxicidade quando comparado com o fármaco individualizado, e ambas as formulações apresentam a mesma eficácia na morte da *Candida albicans* (Middaugh, Tiyaboonchai, & Woiszwillo, 2001).

V.2.4. Manitol

Recentemente, foram produzidas NP's de manitol acopladas ao fármaco antineoplásico

capotensina (CPT) para veiculação tumoral. Esta junção NP's-CPT foi feita de modo a melhorar a solubilização do fármaco e ficou demonstrado que a capacidade de encapsulação do fármaco é relativamente boa. Adicionalmente foram também testados os efeitos com topotecano (TPT) e com CPT isoladamente, nas mesmas doses, na inibição do crescimento de células tumorais H22, *in vivo*, em ratinhos. Concluíram que o complexo NP's-CPT possui um maior efeito antineoplásico, menos efeitos tóxicos e uma maior capacidade de acumulação no interior do tumor (Gao et al., 2014).

V.2.5. Quitosano

Por ser de origem natural, único polissacarídeo carregado positivamente e fácil de sofrer modificações químicas, o QS é amplamente utilizado na preparação de NP's para a veiculação de fármacos (Alonso, Calvo, & Janes, 2001).

Um dos métodos mais utilizados para a preparação de NP's de QS é o PCP. Da junção do QS com poli (γ -ácido glutâmico), um polímero carregado negativamente natural, não-tóxico e biodegradável, Chen et al. (2009) prepararam NP's para administração oral de insulina. Ficou demonstrado que as NP's aderiam à superfície das mucosas e induziram acção hipoglicemiante significativa durante pelo menos 10h, quando administradas oralmente, em ratinhos diabéticos.

Os mesmos autores também demonstraram que NP's de QS-poli (γ -ácido glutâmico) apresentam boa penetração cutânea e maior expressão génica, quando comparadas com as partículas apenas compostas por QS-DNA. Isto pode ser atribuído a uma maior densidade das NP's possuindo poli (γ -ácido glutâmico), o que contribuiu para um impulso maior penetração na barreira da pele (Chen et al., 2009).

As NP's de QS também tem sido muito utilizadas na veiculação de fármacos antineoplásicos insolúveis, e que após administração IV, demonstraram possuir especificidade para o tumor com uma duração superior a 24h (Chen et al., 2009).

V.2.6. Pululano

Este açúcar, devido às características já referidas, têm vindo a ser explorado na veiculação de fármacos antineoplásicos e genes (Jani, Khanda, & Prajapati, 2013).

Relativamente à veiculação de fármacos antineoplásicos, cientistas desenvolveram bioconjugados pululano-DOX, que apresentaram um perfil de libertação de fármaco a pH 5,5 de 100% em ~40h. Efectuaram-se também estudos farmacocinéticos, em ratinhos Balb/c, de modo a comparar a administração IV de DOX e pululano-DOX. Verificaram que 4h após a administração, 40% da pululano-DOX estava na corrente sanguínea e que 80% da DOX, ao

fim de 30 minutos, já tinha sido depurada. Nesta perspectiva o bioconjugado pululano-DOX mostra-se bastante promissor para a veiculação passiva de fármacos (Jani et al., 2013).

Na veiculação de genes, produziram-se vários derivados do pululano através da introdução química de trietilenotetramina (Ti), ácido dietilenetriamina penta acético (ADTP) e espermina (Esp) juntamente com DNA plasmídico conjugado com Zn^{2+} . Este tipo de veiculação é mais orientado para o fígado, devido à afinidade do pululano (Jani et al., 2013).

Administraram estes derivados IV, observaram que o nível de expressão génica aumentou significativamente nos hepatócitos, quando comparado com a administração do DNA plasmídico livre. Observaram ainda que o derivado pululano-ADTP-DNA plasmídico conjugado possuía uma afinidade aumentada para o fígado, tendo a expressão génica deste conjugado durado 12 (doze) dias após injeção. Concluíram assim, que conjugados de pululano são uma aposta promissora na veiculação de genes, bem como no prolongamento da duração da expressão génica (Jani et al., 2013).

VI. UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES PARA REVESTIMENTO DE NANOPARTÍCULAS

A utilização de açúcares para a modificação da superfície química das NP's, é um factor crucial a ter em consideração quanto à sua biodisponibilidade, uma vez que o organismo as reconhece como corpos estranhos. Deste modo, para impedir que ocorra uma rápida *clearance* pelo sistema MPS, tem-se vindo a apostar em revestimentos para os sistemas de veiculação de fármacos (Crucho & Barros, 2014).

Alguns açúcares descritos utilizados para revestimento são o AH, DEX, heparina, QS, pectina e pululano (Mizrahy & Peer, 2012).

VI.1. Ácido hialurónico

Ao ser observado que a cápsula constituída por AH, dos *streptococcus* do grupo A, lhes permite não serem visualizados pelo sistema imunitário, e ainda permanecerem durante um maior período de tempo na circulação, Margalit e Peer (2004), aproveitaram essa características e desenvolveram lipossomas revestidos por HA para a entrega de Mitomicina, um fármaco antineoplásico.

Recentemente, Hammond, Lee, Morton e Poon (2011) testaram o efeito estabilizante de NP's montadas em camadas para aplicação em oncologia. Demonstraram que a estabilidade *in vivo* aumentou com o aumento do número de camadas e que, a camada exterior de AH provocou um aumento do tempo de circulação e baixa acumulação das NP's no fígado.

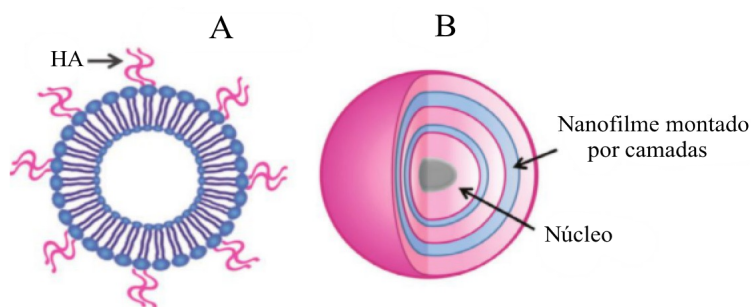


Figura 24: NP's revestidas com ácido hialurónico.

A- Lipossoma revestido com AH ;B-NP's montadas por camadas e com revestimento externo de AH.

Adaptado de Hammond, P., Lee, J., Morton, S., & Poon, Z. (2011)

VI.2. Dextrano e heparina

Revestir as NP's com heparina tem como vantagem aumentar o seu tempo em circulação. O polímero poli(metil metacrilato) (PMMA), modificado a partir da heparina, quando utilizado no revestimento de NP's, permitiu-lhes permanecer em circulação por mais

de 48 h. Por outro lado, as NP's não revestidas com PMMA demonstraram ficar apenas 3 minutos em circulação (Mizrahy & Peer, 2012).

Adicionalmente, estudos realizados *in vitro* demonstraram que revestir NP's com DEX ou heparina atrasa a absorção pelos macrófagos, quando em comparação com NP's sem revestimento (Mizrahy & Peer, 2012).

VI.3. Quitosano

O QS é um açúcar bastante apelativo na veiculação de fármacos às mucosas, devido à sua natureza catiónica, que lhe proporciona aderência, e devido à sua capacidade de abrir *tight junctions* entre as células epiteliais (Alonso et al., 2001).

Quando utilizado para revestir lipossomas, com administração *per os*, Alonso et al. (2001) verificaram que a insulina e a calcitonina possuíam a capacidade de diminuir consideravelmente a glucose e o cálcio, respectivamente, quando comparados com a administração dos lipossomas sem revestimento.

Relativamente aos benefícios estruturais do revestimento com QS, estes tornam-se mais estáveis em fluído gástrico, do que sem revestimento (Alonso et al., 2001).

VI.4. Pectina

A utilização deste açúcar para o revestimento de NP's, deve ser feita com alguma precaução, principalmente na administração *per os*. Isto deve-se à pectina ser bastante solúvel em água, e ao passar pelo estômago e intestino, deixa de revestir com eficácia os fármacos contidos nas NP's (Karthikeyan & Kumar, 2013).

Deste modo, vários grupos de pesquisa têm vindo a procurar por derivados da pectina menos solúveis na água. Foram testados por Karthikeyan e Kumar (2013) 2 (dois) derivados da pectina: o pectinato de cálcio e a pectina amidada reticulada com cálcio, 2 (dois) sais de cálcio ligado não covalentemente com as cadeias glúcídicas da pectina. Verificaram que, para o primeiro, existe uma diminuição na solubilidade e estabilidade a pH baixos, o que demonstra ser um forte candidato para a administração de fármacos *per os*. Relativamente ao segundo, verificaram que retarda a libertação dos fármacos devido à sua biodegradabilidade, maior tolerância a variações de pH e flutuações nos níveis de cálcio.

Num estudo realizado recentemente, ainda os mesmos autores, utilizaram a pectina amidada para o revestimento de insulina, a ser administrada *per os*, em ratinhos diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Puderam verificar que a libertação de insulina ocorreu de forma controlada e que a concentração de glucose no sangue dos ratinhos diminuiu significativamente (Karthikeyan & Kumar, 2013).

VI.5. Pululano

Em 2010, um grupo de investigadores desenvolveu um método de revestimento de NP's magnéticas, com acetato de pululano (AP), um polímero anfipático do pululano. Estas NP's foram desenvolvidas a pensar na terapêutica antineoplásica, aproveitando o conceito de hipertermia, uma vez que as células tumorais são mais sensíveis ao calor do que as células normais. Deste modo, a sua utilização, associada ou não a quimio ou radioterapia, é reconhecida como útil no tratamento dos tumores malignos (Cai et al., 2010).

Estas NP's, demonstraram ter um elevado teor de magnetismo e boa biocompatibilidade com os tecidos tumorais. Adicionalmente, apresentam um grande sucesso na eficácia terapêutica em células KB, a partir da hipertermia induzida por um campo magnético (Cai et al., 2010).

VI.6. Sacarose

No presente ano, cientistas Portugueses, desenvolveram um novo polímero anfifílico constituído por um núcleo hidrofóbico de ácido cólico e um revestimento hidrofílico de uma modificação química de PEG e sacarose (Sac-PEG-Col) (Crucho & Barros, 2014).

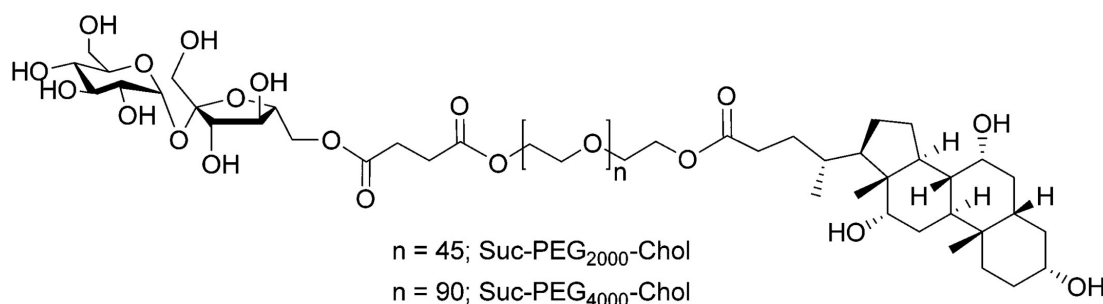


Figura 25: Estrutura química da NPP Sac-PEG-Col.

Adaptado de Crucho, C., & Barros, M. (2014).

A utilização de ácido cólico, um ácido biliar e molécula anfifílica biocompatível e biodegradável, tem como principal objectivo possuir uma estrutura química apropriada para transportar fármacos. A utilização do PEG, polímero hidrofílico, não iónico e biocompatível aprovado pela FDA, tem como principal objectivo aumentar o seu tempo de permanência na corrente sanguínea, pela diminuição da probabilidade de serem opsonizadas. Já a utilização da sacarose tem como objectivo veicular e reduzir os efeitos secundários associados aos fármacos, devido à maior afinidade para as lectinas da superfície celular (Crucho & Barros, 2014).

Observaram assim, que as NP's Sac-PEG-Col são boas candidatas para as aplicações

biomédicas, contudo ainda são necessários estudos *in vivo* (Crucho & Barros, 2014).

VII. UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM ONCOLOGIA

Para que a terapêutica oncológica produza o efeito desejado é necessário ter um conhecimento abrangente acerca da fisiopatologia do cancro, descobrir novos fármacos antineoplásicos e novas tecnologias biomédicas (Danhier et al., 2010).

Actualmente a terapêutica existente contra o cancro é bastante invasiva, incluindo administração inicial de quimioterapia, remoção cirúrgica do tumor (quando possível) seguida por mais quimioterapia e radioterapia. A aplicação tanto da quimioterapia e radioterapia tem como objectivo matar as células tumorais, que são mais susceptíveis a estes tratamentos, por terem um ritmo de crescimento bastante acelerado quando comparadas com as restantes células do organismo (Blanchette & Brannon-Peppas, 2012).

A Nanotecnologia em oncologia interliga várias disciplinas como a biologia, química, engenharia e medicina com o propósito de conduzir a avanços no diagnóstico e tratamento do cancro aumentando o tempo de sobrevivência e a qualidade de vida dos doentes (Wang & Thanou, 2010; Blanchette & Brannon-Peppas, 2012).

A utilização de NP's é bastante promissora para o transporte de fármacos antineoplásicos, pretendendo-se uma distribuição mais selectiva dos fármacos, altamente tóxicos, reduzindo assim os efeitos secundários. Ao serem utilizadas NP's na veiculação de fármacos espera-se que ocorra a acumulação do fármaco no tecido alvo (Wang & Thanou, 2010).

Os tumores são caracterizados por possuírem uma drenagem linfática disfuncional que ajuda as NP's a ficarem retidas por tempo suficiente para que ocorra a sua desintegração e libertem o fármaco nas proximidades das células tumorais (Wang & Thanou, 2010).

O hexapéptido de arginina é um exemplo de um péptido que foi encapsulado em NP's derivadas do QS-DEX, para se conseguir uma libertação controlada, prolongando a sua actividade biológica. O poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), um co-polímero, é bastante utilizado no encapsulamento de fármacos antineoplásicos como é o caso do paclitaxel (PCT), a 9-nitrocamptotecina, a cisplatina, entre outros.

Futuramente esperam-se fazer terapias individualizadas. Para tal, inicialmente procede-se à identificação dos marcadores tumorais de cada paciente. Posteriormente formulam-se as NP's usando os mesmos biomarcadores encontrados, e que vão transportar o fármaco específico para promover a destruição da proteína do tumor em causa (Wang & Thanou, 2010).

VII.1. Cancro da mama

O cancro da mama é a forma de cancro com maior predomínio entre as mulheres contando com 458.000 (quatrocentos e cinquenta e oito mil) mortes em todo o mundo. Este tipo de cancro é constituído por um agregado complexo de tecido com vasos sanguíneos, células do estroma, infiltrações de células imunocompetentes e uma matriz extracelular diferencial, que interagem umas com as outras formando um microambiente ideal ao crescimento tumoral (Shalviri, 2012).

Esta massa heterogénea vai assim desenvolver-se e atingir um tamanho de aproximadamente 2 (dois) mm³ até que não exista um aporte de nutrientes e oxigénio suficiente para alimentar o tumor. Tumores com tamanho superior a 2 (dois) mm³ estão dependentes do processo angiogénico (Shalviri, 2012).

A quimioterapia não está restrita somente às células cancerígenas e o seu uso vai promover efeitos tóxicos também nas células normais. Alguns dos efeitos secundários provocados pela utilização de fármacos citotóxicos são náuseas, vômitos, alopecia e mielossupressão (Shalviri, 2012).

Elevadas doses de quimioterapia estão geralmente associadas a uma maior eficácia terapêutica, contudo estão também associados a elevados níveis de toxicidade aguda e crónica. Para contornar esta problemática deve-se impedir a exposição dos fármacos às células saudáveis e ao mesmo tempo aumentar a sua concentração nas células tumorais. Esta racionalização está na base para o uso de NP's na veiculação de fármacos antineoplásicos directamente ao tumor, poupando os tecidos saudáveis ("Benefits, n.d.").

Comparativamente à quimioterapia convencional, a utilização de NP's tem como vantagens:

- Proteger os fármacos de serem degradados antes de chegarem ao local de acção;
- Aumentar a absorção dos fármacos nas células tumorais;
- Melhorar o tempo de distribuição dos fármacos nos tecidos;
- Impedir interações entre fármacos e células saudáveis, evitando assim efeitos secundários excessivos ("Benefits, n.d.").

VII.2. Terapêutica disponível

A utilização de quimioterapia pode ocorrer em 3 (três) situações distintas: Antes de se proceder à cirurgia, após cirurgia ou em situações avançadas de cancro da mama ("Chemotherapy", 2014).

A administração antes da remoção cirúrgica, também denominada de quimioterapia

neoadjuvante, tem como principal objectivo diminuir significativamente tumores de maiores dimensões de modo a que se possa recorrer à sua remoção, e quando se proceder à mesma, a cirurgia seja menos extensa. Uma outra vantagem a ter em consideração é a resposta tumoral à quimioterapia neoadjuvante. Se o tumor não responder aos fármacos usados nesta fase inicial, tem de se modificar a terapêutica (“Chemotherapy”, 2014).

A administração após cirurgia, também denominada de terapia adjuvante, tem como principal objectivo destruir as células tumorais que não foram possíveis de eliminar durante a extração tumoral. A terapêutica adjuvante reduz o risco de uma nova recidiva, e permite eliminar células tumorais da mama que possam ter ido depositar-se noutros órgãos, através da corrente sanguínea (“Chemotherapy”, 2014).

Por último, a quimioterapia pode também ser administrada no cancro da mama avançado, quando o cancro se espalhou para fora da mama e axilas, quer quando é diagnosticada quer após os tratamentos iniciais (“Chemotherapy”, 2014).

A tabela 5 apresenta os fármacos mais utilizados em quimioterapia no cancro da mama, contudo, destes, os mais utilizados são a DOX, epirrubicina, PCT e docetaxel (“Chemotherapy medicines”, 2014).

Tabela 5: Fármacos mais utilizados em quimioterapia no cancro da mama.

Adaptado de “Chemotherapy medicines”, 2014.

<i>Agentes Alquilantes</i>	<i>Agentes antimetabolitos</i>	<i>Inibidores da Topoisomerase I e II</i>	<i>Citotóxicos que interferem com a tubulina</i>	<i>Citotóxicos que se intercalam no DNA</i>	<i>Hormonas e anti-hormonas</i>
Ciclofosfamida Carboplatina	Metotrexato 5-Fluoracilo Gemcitabina Capecitabina	-	Alcalóides da vinca: Vincristina Paclitaxel Docetaxel	Daunorrubicina Doxorrubicina Epirrubicina Mitoxantrona Mitomicina	-

Algumas das combinações mais utilizadas em quimioterapia no cancro mama inicial são:

- Ciclofosfamida + doxorrubicina + 5-fluoracilo;
- Docetaxel + doxorrubicina + ciclofosfamida;
- Doxorrubicina + ciclofosfamida + paclitaxel/docetaxel;
- 5-Fluoracilo + epirrubicina + ciclofosfamida seguido de docetaxel + paclitaxel
- Docetaxel + ciclofosfamida

(“Chemotherapy medicines”, 2014)

VII.3. NP's disponíveis no mercado

No início do ano 2005 foi comercializada primeira formulação Farmacêutica contendo NP's, o Abraxane[®]. É uma forma de veiculação passiva que consiste em NP's de albumina sérica humana contendo PCT e é utilizado no cancro da mama metastizado (Kreuter, 2007).

O Nanoxel[®] é uma forma de veiculação passiva do PCT, utilizado no cancro da mama avançado, e encontra-se em fase I dos ensaios clínicos (Danhier et al., 2010).

VII.4. NP's em estudo

Dev et al. (2010) realizou estudos *in vitro*, com NP's de carboximetilquitina (CMQ) e introduziu no seu interior o fármaco 5-fluoracilo. Observaram que estas NP's possuíam libertação prolongada do fármaco quando expostas a um pH de 6,8. Relativamente à toxicidade do fármaco, observaram um direccionamento acentuado para as células KB, e que com o aumento do nível inicial de fármaco introduzido nas NP's, aumentava a também a toxicidade. Concluíram assim que este sistema de NP's é bastante promissor na veiculação de fármacos antineoplásicos.

Os autores Choi et al. (2010) numa primeira instância desenvolveram quitosano glicóis hidrofobicamente modificados (QGHM's) que formassem NP's quando em contacto com o meio aquoso. Estas estruturas apresentam-se como promissoras para a veiculação de fármacos por serem biocompatíveis *in vivo* e por terem a capacidade de se acumularem no tecido tumoral, passivamente, devido ao efeito EPR. Posteriormente introduziram no seu interior o fármaco PCT e concluíram que a sua libertação ocorre lentamente, a toxicidade PCT-QGHM é baixa e possui um efeito antineoplásico de eficácia razoável.

Ainda relativamente ao PCT, Bilensoy, Doğan, Gürkaynak, e Hincal (2008) introduziram-no em NP's formadas a partir de β -CD's anfífilas com o objectivo de testar a sua segurança e eficácia. Estas estruturas são derivados químicos das α -, β - e γ -CD's naturais como resultado de substituições nas cadeias alifáticas das diferentes estruturas. No final do estudo os autores concluíram que as NP's são um sistema capaz de solubilizar o PCT, pouco solúvel em água, e tornando possível a sua administração via IV. A sua administração nestas condições diminui bastante a citotoxicidade e a hemólise e promove ainda uma maior estabilidade física do fármaco.

Bochot et al. (2005), utilizaram também estruturas β -CD's anfífilas para a veiculação de citrato de tamoxifeno, com o objectivo de demonstrar se é um sistema eficaz no combate às linhas de células MCF-7 do cancro da mama. Preferiram a utilização de citrato de tamoxifeno ao próprio tamoxifeno devido à sua maior eficácia. Com este estudo concluíram que o citrato de tamoxifeno no interior destas NP's possui um perfil de libertação de

aproximadamente 6h e uma citotoxicidade significativa contra as células MCF-7. Pode assim considerar-se uma boa alternativa na veiculação de fármacos antineoplásicos.

Recentemente, Huang et al. (2013) desenvolveram um polímero biodegradável em forma de estrela com o intuito de produzir uma nova nanoformulação para a veiculação de quimioterapia ao cancro da mama. Esta NP's denominada por M-PLGA-TPGS possui no seu cerne o açúcar manitol.

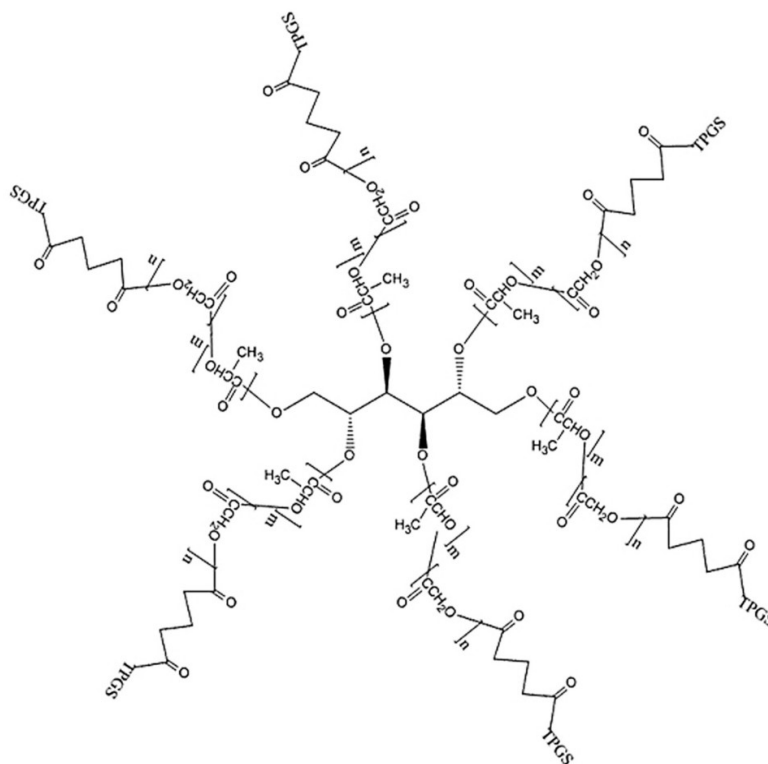


Figura 26: Estrutura química do polímero biodegradável em forma de estrela M-PLGA-TPGS.

Adaptado de Huang, L., Liu, T., Mei, L., Ouyang, C., Tao, W., Wang, Z., ... Zeng, X. (2013).

Este novo polímero em forma de estrela tem várias ramificações que se estendem desde o seu centro, fornecendo a estas NP's uma maior capacidade de carregamento de fármaco e uma melhor eficiência na encapsulação deste (Huang et al., 2013).

Posteriormente à produção do polímero, produziram NP's através de uma modificação ao método de nanoprecipitação, carregadas com o fármaco docetaxel, bastante utilizado no tratamento de tumores sólidos, especialmente cancro da mama e cancro do ovário (Huang et al., 2013).

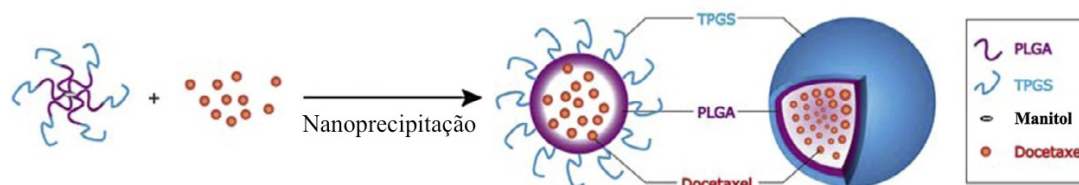


Figura 27: Esquematização do método de preparação das NP's M-PLGA-TPGS.

Adaptado de Huang, L., Liu, T., Mei, L., Ouyang, C., Tao, W., Wang, Z., ... Zeng, X. (2013).

Os autores demonstraram, *in vitro*, que estas NP's conseguem atingir o interior das células MCF-7 e ter um efeito antineoplásico bastante eficiente. Concluíram assim que este polímero M-PLGA-TPGS possui potencial para a veiculação de fármacos, e que pode ser aplicado no desenvolvimento de novas nanoformulações para a terapêutica do cancro da mama (Huang et al., 2013).

VIII. UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NO HIV

Desde que foi identificado o agente causador do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, também designado por AIDS/SIDA, em 1983, têm-se adquirido novos conhecimentos extremamente valiosos para o desenvolvimento de estratégias preventivas e das terapêuticas actualmente existentes. Para que se continuem a desenvolver novos fármacos e novas medidas preventivas é necessário, acima de tudo, ter-se um vasto conhecimento do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV/VIH) bem como dos seus processos de transmissão (Amiji, Bahia, Neves, & Sarmiento, 2010).

VIII.1. O vírus do HIV

O vírus do HIV, é classificado como pertencendo à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae* e género *Lentivirus*. O seu genoma é constituído por uma cadeia simples de RNA de 9,7 kb (Hoy, Lewin, & Street, 2009).

Se decorrer muito tempo desde o doente ter sido infectado e o início do tratamento adequado, o vírus vai danificar o seu sistema imunitário. Como consequência da falta de terapêutica antiretroviral (ARV), os linfócitos CD4⁺ atingem um nível muito baixo, resultando na denominada AIDS/SIDA. Deste modo, se a pessoa infectada for afectada por microorganismos inofensivos (vírus, bactérias ou fungos), vai apresentar manifestações clínicas exacerbadas, que seriam irrelevantes caso o sistema imunitário possuísse um normal funcionamento (Dimmock, Easton, & Leppard, 2007).

Segundo dados recolhidos pela OMS (2012), existem no mundo aproximadamente 35.3 milhões de pessoas com HIV/AIDS, e 1.6 milhões de pessoas morreram com esta doença no mesmo ano. Ainda em 2012, Portugal conta com 6.6 mil pessoas a morrer de HIV/AIDS (“HIV/AIDS”, 2014).

Existem 2 (dois) tipos de HIV, que foram descobertos: O HIV-1 e o HIV-2. Os 2 (dois) estão intimamente ligados e diferem, essencialmente, na sua origem geográfica e em alguns genes. O HIV-1 foi transmitido aos seres humanos a partir do chimpanzé *Pan troglodytes*, portador do vírus da imunodeficiência símia (VIS). Por outro lado, o HIV-2 é apenas idêntico geneticamente 40% com o HIV-1, está mais relacionado com o VIS e é menos virulento que o HIV-1 (Gupta & Jain, 2010).

VIII.2. Transmissão

O HIV pode propagar-se através de transmissão horizontal, vertical e por sangue infectado (Dimmock et al., 2007).

A transmissão horizontal ocorre através de contacto sexual desprotegido com um parceiro infectado. Pode ocorrer propagação através de actividade heterossexual ou homossexual (Dimmock et al., 2007).

A transmissão vertical ocorre através da passagem do vírus de mães HIV-positivas para os filhos durante o período de gravidez, parto e amamentação (Dimmock et al., 2007).

Por último, a transmissão por sangue infectado ocorre através da partilha de seringas contaminadas durante o uso de drogas injectáveis, picadas acidentais praticadas pelos profissionais de saúde, transfusões sanguíneas e injeções médicas com equipamento não esterilizado (Dimmock et al., 2007).

VIII.3. Terapêutica disponível

Desde a introdução da zidovudina em 1987, a terapêutica ARV evolui consideravelmente, e conta-se de momento com pelo menos 20 (vinte) fármacos para utilizar em regimes de combinação (Hoy et al., 2009).

Estão disponíveis até ao momento 7 (sete) classes de fármacos: Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (NsRTI), Inibidores Nucleotídeos da Transcriptase Reversa (NtRTI), Inibidores não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (NNRTI), Inibidores da protease (IP), Inibidores de entrada, Inibidores de fusão e Inibidores da integrase (Anand, Krishnan, Ramana, & Sethuraman, 2014).

A terapêutica ARV não é eficaz no controlo da infecção e da progressão da doença, devido ao desenvolvimento de estirpes resistentes do vírus. Deste modo, utilizam-se cocktails com no mínimo 3 (três) fármacos, conhecido como Terapêutica Antiretroviral altamente activa (TARVAA) (Mallipeddi & Rohan, 2010).

Todavia, a TARVAA não é uma solução definitiva para a doença do HIV. A gestão da doença é bastante complexa e inclui questões como o desenvolvimento de estirpes resistentes do vírus, locais onde a veiculação de fármacos é inacessível pelos métodos existentes, redução da adesão dos doentes pelo aumento de efeitos secundário e toxicidade, elevados custos, entre outros (Mallipeddi & Rohan, 2010).

Tabela 6: Categorias de ARV disponíveis.

Adaptado de Anand, A., Krishnan, U., Ramana, L., & Sethuraman, S. (2014).

<i>NsRTI</i>	<i>NtRTI</i>	<i>NNRTI</i>	<i>IP</i>	<i>Inib. Entrada</i>	<i>Inib. Fusão</i>	<i>Inib. Integrase</i>
Zidovudina	Tenofovir	Nevirapina	Saquinavir	Maraviroc	Efuvirtide	Raltegravir
Didanosina		Efavirenz	Indinavir			Dolutegravir
Estavudina		Etravirina	Ritonavir			
Lamivudina		Rilpivirina	Nelfinavir			
Emtricitabina			Atazanavir			
Abacavir			Tipranavir			
			Darunavir			

VIII.4. NP's em estudo

A utilização de NP's na veiculação da terapêutica ARV vai ter como vantagem permitir que os fármacos alcancem locais em que a distribuição é normalmente reduzida, quando não direccionados. Deste modo, vão ocorrer alterações na farmacocinética dos fármacos ARV que vão possibilitar o aumento de eficácia e redução da toxicidade tanto na prevenção como no tratamento da infecção (Mallipeddi & Rohan, 2010).

A utilização de vários tipos de CD's para aumentar a solubilidade de ARV hidrofóbicos como o efavirenz, tem vindo a ser estudada. Num desses estudos, a junção entre a hidroxipropil- β -CD e o efavirenz demonstrou que o perfil de dissolução do fármaco, *in vitro*, era superior quando comparada com o fármaco isolado (Mallipeddi & Rohan, 2010).

Num outro estudo, foi testada a biodisponibilidade do saquinavir utilizando hidroxibutenil- β -CD. Este estudo foi realizado em ratos Wistar-Hannover, e verificou-se que os complexos formados apresentavam uma solubilidade e biodisponibilidade oral, *in vivo*, 9 (nove) vezes superior quando comparada com o mesilato de saquinavir (Mallipeddi & Rohan, 2010).

Os autores Dev et al., 2010 citado por Jayakumar et al., 2010 realizaram preparações de NP's de ácido poli-l-láctico/QS (APL/QS) e posteriormente introduziram no seu interior o ARV lamivudina. Observaram que a taxa de libertação do fármaco era mais baixa em pH ácido quando em comparação com o pH alcalino. Pensa-se que tal acontece devido às repulsões que ocorrem entre os iões H^+ presentes no TGI e os grupos catiónicos das NP's. Concluíram assim que este complexo é bastante promissor na entrega controlada de fármacos, tanto a nível ARV como oncológico (Jayakumar, Menon, Manzoor, Nair, & Tamura, 2010).

O facto de o envelope do HIV ser um forte mecanismo de defesa para que o vírus invada o sistema imunológico do hospedeiro, tem-se apresentado como uma barreira ao

desenvolvimento de uma vacina eficaz. Contudo, a identificação de anticorpos (Ac) glicano dependentes como 2G12, PG9, PG16, PGT121–123, PGT125–128 e PGT13 têm sido utilizados no *design* imunológico e podem considerar-se bons alvos a ter em consideração na produção de vacinas (Wang, 2013).

Deste modo, Wang (2013) descreveu os recentes avanços na síntese de glúcidos antigénicos no *design* de uma vacina eficaz para o HIV. Conseguiram-se fazer avanços significativos na síntese de açúcares com uma estrutura base de modo a mimetizar o epitopo 2G12. Contudo, apesar de todos os esforços ainda não se conseguiram obter Ac neutralizantes do HIV. Este facto leva os cientistas a, futuramente, focarem a sua atenção numa melhor caracterização dos epitopos neutralizantes do HIV, em abordagens inovadoras para *design* imunogénico e na exploração de novos protocolos de imunização para testar vacinas candidatas (Wang, 2013).

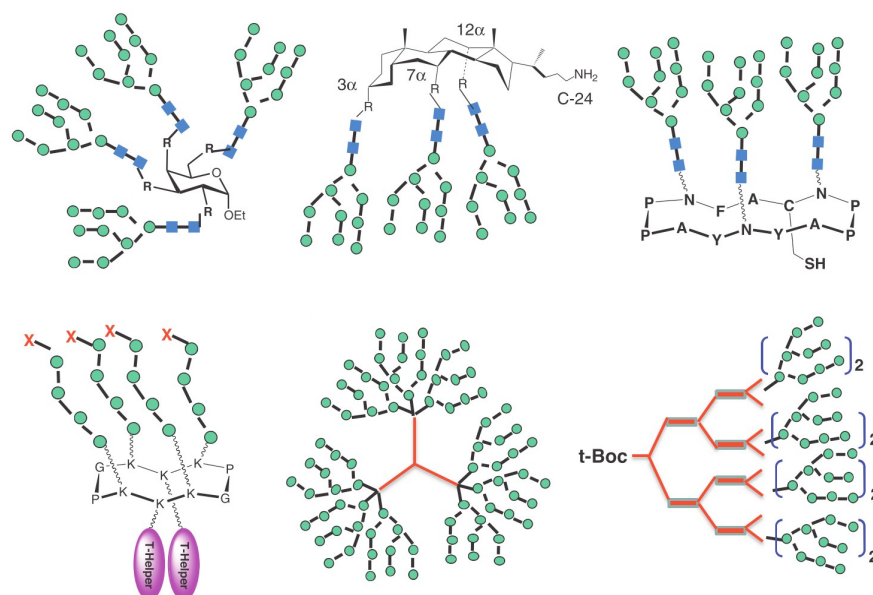


Figura 28: Exemplos de estruturas de açúcares sintéticos para o design da vacina do HIV.

Adaptado de Wang, L.-X. (2013).

IX. UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NA DIABETES MELLITUS

A DM foi considerada uma pandemia mundial no ano 2000, contando com cerca de 160 (cento e sessenta) milhões de pessoas a sofrer com a doença, e prevê-se que no ano 2030 o número de pessoas aumente para 370 (trezentos e setenta) milhões (Karthikeyan & Kumar, 2013).

Relativamente a Portugal, segundo dados da OMS, no ano 2000 existiam 662 (seiscentos e sessenta e duas) mil pessoas com a doença, com perspectivas de que no ano 2030 ocorra um aumento para as 882 (oitocentas e oitenta e duas) mil pessoas (“Country and regional”, 2014).

IX.1. Tipos e etiologia da diabetes

A DM caracteriza-se pela incapacidade do organismo em regular os níveis de glucose no sangue com a insulina produzida, devido à diminuição da secreção da hormona por parte dos ilhéus pancreáticos de Langerhans. Como consequência, a glucose no sangue estará aumentada, podendo também designar-se por hiperglicémia (Hosseinkhani, Pathak, & Subramani, 2012).

Existem 3 (três) tipos de DM: O tipo 1 ou diabetes mellitus insulina dependente (DMID), o tipo 2 ou diabetes mellitus não insulina dependente (DMNID) e a diabetes gestacional.

A DMID, é a forma de diabetes que mais comumente aparece na infância tardia, por volta dos 8-12 (oito-doze) anos, não excluindo a hipótese de aparecer em qualquer outra idade. Caracteriza-se pela ausência total de insulina no organismo, devido à perda de células β do pâncreas, provocada por reacções auto-imunes contra a insulina (Karthikeyan & Kumar, 2013).

A DMNID, é a forma de diabetes mais prevalente em indivíduos adultos, e quem a apresenta é normalmente obeso. Caracteriza-se pela resistência à insulina nos tecidos periféricos, ou seja, a insulina é normalmente produzida, mas não é passível de exercer o seu efeito por questões relacionadas com os receptores da insulina nas membranas celulares (Hosseinkhani et al., 2012; Karthikeyan & Kumar, 2013).

A diabetes gestacional aparece durante o período de gestação em mulheres sem diabetes diagnosticado anteriormente. Acredita-se que as hormonas produzidas durante a gravidez reduzem a sensibilidade à insulina, levando assim a elevados níveis de glucose no sangue (Hosseinkhani et al., 2012).

IX.2. Terapêutica disponível

IX.2.1. Insulinas

A insulina é uma hormona polipeptídica, naturalmente secretada pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Tem a capacidade de diminuir a concentração de glucose no sangue, e ainda regular a capacidade metabólica das gorduras e dos aminoácidos. É utilizada em todos os doentes com DMID, e em alguns dos doentes com DMNID. Geralmente administra-se pela via SC e em casos de urgências diabéticas utiliza-se a via IV (Ferro, Lewis, Mant, & Ritter, 2008).

Existem 4 (quatro) tipos de insulina: Insulina de acção rápida, regular ou de curta duração, acção intermédia e de acção lenta (“Insulin basics”, 2014).

Tabela 7: Tipos de insulinas existentes e as suas características após administração.

Adaptado de World Health Organization. (2014b).

	<i>Acção rápida</i>	<i>Regular</i>	<i>Acção intermédia</i>	<i>Acção lenta</i>
<i>Início acção</i>	15 min	30 min	2-4h	
<i>Pico</i>	1h	2-3h	4-12h	
<i>Duração acção</i>	2-4h	3-6h	12-18h	24h
<i>Exemplos</i>	Glulisina (Apidra) Lispro (Humalog) Aspártico (NovoLog)	Humulin R Novolin R	Isofânica/NPH (Humulin N, Novolin N)	Detemir (Levemir) Glargina (Lantus)

IX.2.2. Antidiabéticos orais

Esta classe de fármacos é apenas utilizada no tratamento da DMNID do adulto, caso não se verifique a presença de cetoacidose. Neste tipo de doentes o importante é controlar os níveis de glicémia no sangue. A grande maioria de diabéticos nesta condição e que são obesos, podem ser tratados através de uma dieta equilibrada juntamente com a prática de exercício físico e/ou administração de antidiabéticos orais (ADO). Por outro lado, os diabéticos que não sejam obesos, a dieta é o suficiente para controlar a diabetes (INFARMED, 2012).

Dos fármacos para a DMNID disponíveis, a sua selecção é sempre feita tendo em conta o tipo de situação clínica de cada doente (INFARMED, 2012).

Tabela 8: Exemplos de fármacos utilizados no tratamento da DMNID.

Adaptado de INFARMED. (2012).

Secretagogos	Inibidores da absorção	Sensibilizadores	Gliptinas
Sulfonilureias	Inibidores da α-glucosidase	Biguanidas	Sitagliptina
Glipizida (Minidiab);	Acarbose (Glucobay)	Metformina	(Januvia);
Glimepirida		(Glucophage, Risidon).	Vildagliptina
(Amaryl);			(Galvus);
Glibenclamida		Glitazonas	Saxagliptina
(Daonil);		Pioglitazona (Actos).	(Onglyza).
Gliclazida			
(Diamicon).			
Meglitinidas			
Nateglinida (Starlix).			

IX.3. NP's em estudo para veiculação de insulina

Apesar da administração de insulina, diariamente, pela via SC ser amplamente aceite por grande parte dos doentes diabéticos, para outros é uma prática que tem graves problemas de adesão. Estes problemas prendem-se a questões relacionadas com fobia a agulhas, dor após injeção, reações alérgicas, ganho de peso, entre outras (Kundu, Mukhopadhyay, Mishra, & Rana, 2012).

Existe, portanto, a necessidade de encontrar alternativas para a veiculação de insulina à corrente sanguínea através de métodos não invasivos. Este é um processo, à partida inalcançável uma vez que, por se tratar de um fármaco proteico, tem de atravessar múltiplas barreiras físicas (má absorção) e químicas (inativação pelo pH e degradação enzimática tanto a nível gástrico como intestinal) e, eventualmente, acabaria por não exercer o efeito terapêutico pretendido (Kundu et al., 2012).

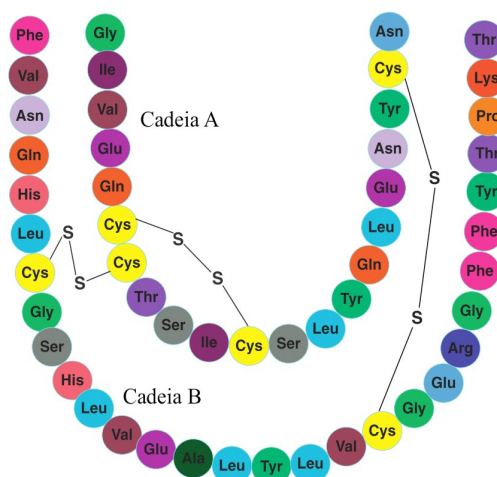


Figura 29: Estrutura química da insulina.

Adaptado de Sharma, C., & Sonia, T. (2012).

A comunidade científica testou outras vias para a administração da insulina, como a ocular, vaginal, nasal, entre outras, no sentido de se tentar ultrapassar esta grande problemática. Relativamente à via ocular deram grande enfoque à toxicidade. Para a via vaginal e rectal, observaram que as taxas de absorção e biodisponibilidade são bastante reduzidas, devido à espessura das camadas da mucosa. A administração nasal foi também estudada por ser associada a uma boa absorção, bem vascularizada e de fácil acesso. Contudo, devido à elevada actividade mucociliar, reduz grandemente a actividade da insulina, levando a resultados de baixa biodisponibilidade (Kundu et al., 2012).

Tomando todos estes factores em consideração, numa situação ideal, por ser o método mais prático e viável, apresentar maior aderência, e ainda mimetizar o destino fisiológico da insulina no organismo, esta deveria ser administrada *per os* (Chalasani, Diwan, Jain, Jain, & Russell-Jones, 2007; Kundu et al., 2012).

Segundo Sharma e Sonia (2011) os sistemas de veiculação da insulina, idealmente, devem apresentar como características:

- Serem resistentes contra as enzimas do TGI e às diferenças de pH;
- Proporcionarem um ambiente seguro, que mantenha a insulina biologicamente activa após encapsulação nos açúcares, e que preservem a sua actividade biológica e fisiológica durante o processo de veiculação e de libertação;
- Aumentem a permeabilidade da insulina na membrana intestinal;
- Ao ser absorvida pela camada de células epiteliais, a insulina libertada deve interagir com os receptores da superfície celular ou seguir outros possíveis caminhos desde que o fármaco permaneça intacto e o seu tamanho continue abaixo de um certo limite;
- Prolonguem a sua permanência do intestino de modo a aumentar a absorção da insulina;
- Entreguem a insulina de forma suficientemente rápida, de modo a controlar os níveis de glucose no sangue. Este método deve processar-se sempre com a mesma eficiência e rapidez de cada vez que a insulina for veiculada;
- Serem seguros após cada administração.

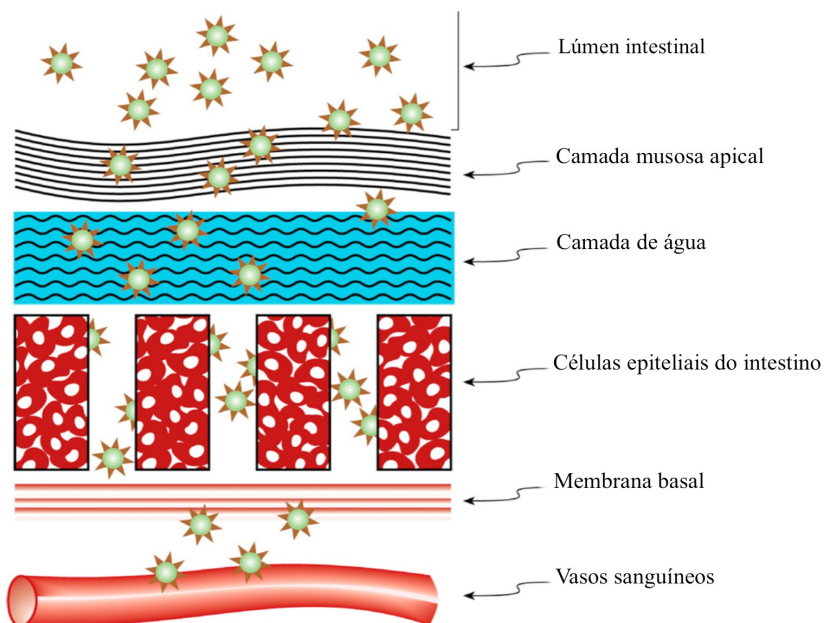


Figura 30: Possíveis obstáculos à absorção oral da insulina.

Adaptado de Kundu, P., Mukhopadhyay, P., Mishra, R., & Rana, D. (2012).

Ao longo das últimas décadas têm vindo a reunir-se esforços a nível da investigação, no sentido de desenvolver formulações orais utilizando várias abordagens de libertação de fármacos. Contudo, até agora, as melhorias observadas não foram suficientemente boas para se proceder ao desenvolvimento de um produto viável para comercialização (Chalasani et al., 2007).

A utilização de açúcares como o QS, o sulfato de DEX e as CD's têm sido amplamente estudadas na veiculação de insulina pela via oral. Também já foi utilizado o QS na veiculação de insulina pela via inalatória (Hosseinkhani et al., 2012).

IX.3.1. NP's de dextrano

Surgiu, em 2007, a possibilidade de aproveitar processos naturais de absorção intestinal, como é o caso do transporte da vitamina B12 (VB12), para a veiculação oral de péptidos e proteínas, quando devidamente acoplados por sistemas apropriados de NP's (Chalasani et al., 2007).

Chalasani et al. (2007) com base nessa possibilidade, testaram laboratorialmente o sistema NP-VB12-insulina, recorrendo ao açúcar DEX, com o objectivo de testar a eficácia deste tipo de sistema na administração de insulina *per os*.

Observaram a existência de efeito antidiabético, com redução da glucose no sangue de 70-75% e um prolongamento da acção por 54h, em ratinhos diabéticos STZ. Comparativamente à insulina administrada pela via SC, este sistema demonstrou ter uma

capacidade antidiabética de apenas 29,4% (Chalasani et al., 2007).

Concluíram, deste modo, que o sistema NP-VB12-insulina é um possível sistema de veiculação para o tratamento da DMNID (Chalasani et al., 2007).

IX.4.2. NP's de quitosano e seus derivados

Sendo o epitélio intestinal um obstáculo à absorção de macromoléculas hidrofóbicas, como já referido, o transporte paracelular tem sido estudado como alternativa. Contudo, este tipo de transporte é bastante restrito devido à presença de *tight junctions*, sendo necessário as NP's apresentarem um revestimento de modo a tornar a superfície carregada positivamente ou simplesmente utilizar-se NP's de QS. Esta característica permite abrir as *tight junctions* entre as células Caco-2 e aumentar a permeabilidade paracelular (Chang et al., 2007).

Posto isto, Chang et al. (2007) desenvolveram NP's compostas por QS e poli(γ -ácido glutâmico) para veiculação de insulina *per os*, e testaram-nas em ratinhos diabéticos. Do seu estudo concluíram que estas NP's conseguem reduzir os níveis de glucose no sangue e que esta redução se encontra dependente da dose de insulina inserida nas NP's.

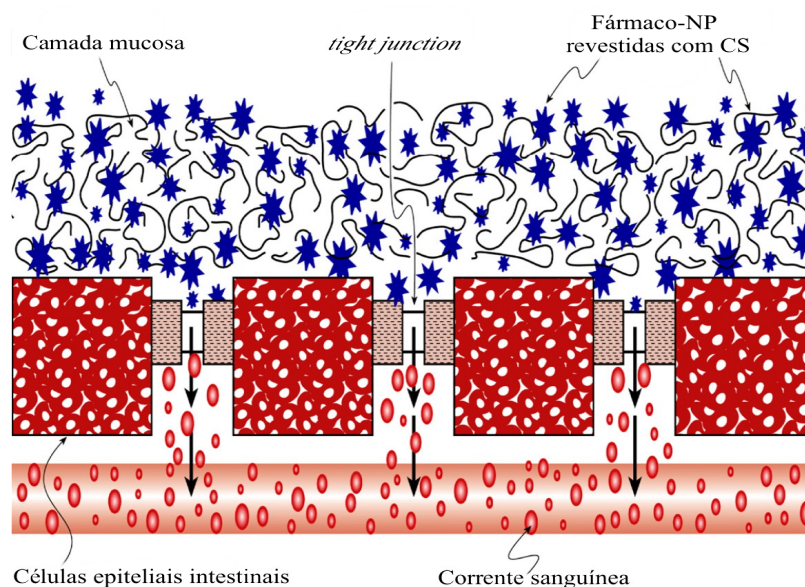


Figura 31: Diagrama dos possíveis mecanismos que as NP's de QS podem promover a absorção de insulina.

Adaptado de Kundu, P., Mukhopadhyay, P., Mishra, R., & Rana, D. (2012).

Para além do QS, foram também sintetizados e avaliados seus derivados como o quitosano trimetilado (QTM) e QS conjugado com β -CD's, quanto ao seu potencial para veiculação da insulina *per os*, tendo estes demonstrado possuírem uma eficácia superior à do QS não modificado (Bernkop-Schnürch, Takeuchi, & Werle, 2009).

IX.4.4. NP's de CD's e seus derivados

As CD's e os seus derivados têm também sido alvos de grande interesse para a administração de insulina *per os*. O complexo CD's-insulina possui várias vantagens como estabilidade da insulina contra a agregação, desnaturação e degradação térmica, aumento da absorção da insulina através das barreiras biológicas, entre outros. Contudo, a utilização destas CD's sem modificações, limita bastante as suas aplicações farmacêuticas, no sentido de exibir citotoxicidade e baixa solubilidade na água (Sharma & Sonia, 2012).

Guo, Huang, Li e Xin (2009) prepararam um complexo de polímeros de β -CD's catiónicos-insulina (CP β CD's-insulina), que depois encapsularam em NP's de alginato-QS. Demonstraram com que este sistema tem a capacidade de proteger a insulina contra as condições gástricas e ter uma boa capacidade de libertação da insulina quando chegam ao intestino

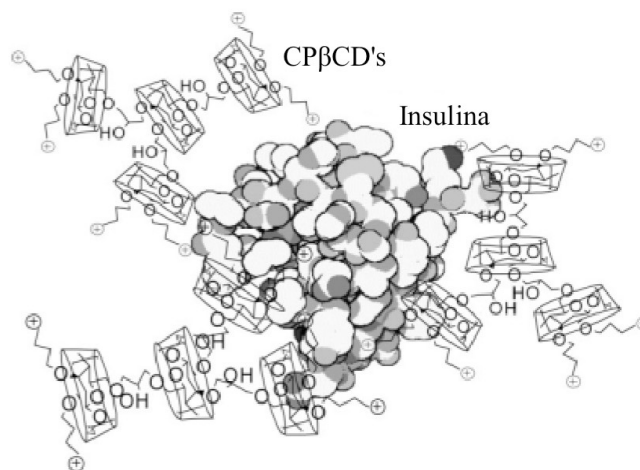


Figura 32: Complexo de CP β CD's-insulina.

Adaptado de Guo, Y., Huang, L., Li, J., & Xin, J. (2009).

Num outro estudo, Zhang et al., 2010, citado por Chen, Chen, Sonaje e Sung, 2011, produziram NP's de β CD's conjugadas com QS para proteger a insulina da degradação gástrica. Observaram que este sistema tem a capacidade de proteger o fármaco quando simulado o ambiente gástrico laboratorialmente, não tendo testado esta possibilidade em modelos animais

Para além dos exemplos descritos, a tabela 9 apresenta mais alguns exemplos de outros estudos efectuados para a veiculação de insulina *per os*.

Tabela 9: Exemplos de estudos feitos com NP's de açúcares para a veiculação de insulina *per os*.

Adaptado de Sharma, C., & Sonia, T. (2012).

Polímero	Modelo animal	Observações
Alginato reticulado com sulfato de dextrano polaxamero revestido com Albumina	Ratos Wistar Diabéticos (machos)	Efeito hipoglicemiante por 24h
Núcleo de Alginato-Sulfato de DEX revestido por QS-PEG	Ratos Wistar Diabéticos (machos)	Resposta dose-dependente com duração de 24h. Efeito máximo às 16h após administração
Alginato-DEX-QS	Ratos Wistar Diabéticos (machos)	Efeito hipoglicemiante por 18h
Sulfato DEX-QS	Ratos Wistar Diabéticos (fêmeas)	Efeito hipoglicemiante por mais de 24h
QS	Ratos Wistar Diabéticos (machos)	Efeito hipoglicemiante por 15h
QS trimetiltilolado	Ratos Sprague-Dawley não diabéticos	Efeito hipoglicemiante considerável por 8h
QS-ácido poliglutâmico	Ratos Wistar Diabéticos (machos)	Efeito hipoglicemiante dependente da composição do copolímero 2-10h após administração
QS-polimetilmetacrilato	Ratos Sprague-Dawley não diabéticos	
Laurilsucilquitosano	Ratos Wistar Diabéticos (machos)	Redução dos níveis de glucose por 6h após administração

IX.5. NP's em estudo para a veiculação de ADO

Almurshedi e Barakat (2011) produziram micropartículas de QS contendo Gliclazida (Gli), um antidiabético oral da classe das sulfonilureias, através de ligações cruzadas iônicas com TPF. Posteriormente testaram estas micropartículas *in vitro* e *in vivo*. Observaram a existência de actividade antidiabética em modelos de coelhos diabéticos, que durou ~18h, em comparação com o efeito dos comprimidos de Gli comerciais que apresentam apenas um efeito hipoglicemiante máximo após 4h da toma.

Concluíram, deste modo, que as micropartículas de QS-Gli são promissoras na libertação controlada de Gli (Almurshedi & Barakat, 2011).

Ainda relacionado com o fármaco Gli, e fora do âmbito da utilização de açúcares em NP's, Devarajan e Sonavane (2007) produziram NP's utilizando Eudragit (L100 e RS), polímeros bastante utilizados em revestimento entérico e na preparação de formas farmacêuticas de libertação controlada *per os*. Observaram, *in vitro*, que ambos os polímeros produziram libertação satisfatória da Gli e se mantiveram estáveis por 6 (seis) meses. Quanto a estudos *in vivo*, efectuados em ratinhos diabéticos, observaram actividade antidiabética superior quando comparada com a Gli individualizada, para além de aumento de

biodisponibilidade.

Concluíram assim que, a utilização destes polímeros pode reduzir a toma regular de doses pelos doentes diabéticos, diminuir os efeitos secundários e melhorar a adesão à terapêutica (Devarajan & Sonavane, 2007).

Ainda fora do âmbito da utilização de açúcares em NP's, foram estudadas NP's de polimetilmetacrilato (PMMA), PLGA e poli (ácido láctico-co-glicólico) peguilado (mPEG-PLGA) para a veiculação de repaglinida (RPG), um antidiabético oral análogo das meglitinidas, que possui um tempo de semi-vida curto (2-6h). Posto isto, os cientistas acharam pertinente desenvolver sistemas que aumentassem a eficácia e que controlem a longo prazo a DMNID, utilizando a título de exemplo a RPG. Posteriormente testaram as NP's, *in vitro* e *in vivo*. Observaram que as NP's de PLGA e mPEG-PLGA eram capazes de controlar a DMNID por 24h e uma semana, respectivamente. Relativamente às NP's de PMMA, obtiveram resultados de toxicológicos e de libertação do fármaco satisfatórios (Jain & Saraf, 2009; Dhana Lekshmi, Poovi, Kishore, & Reddy, 2010).

Concluíram, deste modo, que estes sistemas de NP's, futuramente, seriam vantajosos na medida em que permitiriam uma libertação prolongada de fármacos, e assim reduzir a frequência das doses administradas e melhorar a adesão por parte dos doentes (Jain & Saraf, 2009; Dhana Lekshmi et al., 2010).

X. CONCLUSÃO

No âmbito da veiculação de fármacos, as NP's, mais concretamente as NPP's, têm vindo cada vez mais a despertar o interesse dos cientistas nas últimas décadas (Crucho & Barros, 2014).

Todo o conhecimento que a comunidade científica detém até hoje, acerca destes sistemas, deve-se sobretudo aos trabalhos de pesquisa feitos laboratorialmente. Ainda assim, não se percebeu plenamente como o corpo humano responde quando em contacto com estas NP's, sabendo que, se existir uma acumulação excessiva no organismo pode provocar toxicidade (Hosseinkhani et al., 2012).

Ainda assim, a utilização de NP's, permite uma veiculação prolongada e controlada dos fármacos e, trazem inúmeras vantagens como aumento da biodisponibilidade e estabilidade, diminuição de efeitos secundários, toxicidade e da frequência de administração dos fármacos, melhorando assim a adesão à terapêutica por parte dos doentes. Contudo, se não forem tomadas as devidas precauções quanto ao *design* das NP's, rapidamente eliminadas da corrente sanguínea através do sistema MPS. Uma metodologia bastante comum para proteger as NP's do sistema MPS passa pelo seu revestimento com PEG, processo denominado por PEGuilação (Danhier et al., 2010).

Deste modo fármacos muito dispendiosos, podem ser administrados em pequenas quantidades, e ainda assim, possuírem o efeito terapêutico pretendido eficientemente (Crucho & Barros, 2014).

Relativamente à veiculação de fármacos em Oncologia, o *National Cancer Institute*, tem vindo a utilizar os sucessos da nanotecnologia para modificar radicalmente a forma como o cancro é prevenido, diagnosticado e tratado. Espera-se de futuro, que a nanotecnologia abra novas portas quanto à veiculação de fármacos antineoplásicos (Danhier et al., 2010).

No caso do HIV, existe uma contínua necessidade de superar o aparecimento das resistências aos fármacos, os efeitos secundários que surgem após a utilização a longo prazo e a necessidade de administração frequente, consequência de tempos de semi-vida curtos. Os sistemas de NP's surgem assim como abordagens possíveis para ultrapassar estes problemas, reduzindo eficazmente a carga viral e possivelmente erradicação do vírus do organismo (Anand et al., 2014).

Quanto à veiculação de insulina *per os*, têm sido desenvolvidos vários sistemas de NP's nos últimos anos, alguns deles bastante promissores. Contudo, deve testar-se a eficácia deste sistema de entrega em animais maiores e em seres humanos e, futuramente poderá ser possível aplicar estes sistemas de NP's no tratamento da DM. Os desafios actuais prendem-se em introduzir uma dose de insulina nas NP's que seja suficiente para produzir redução da

glucose no sangue e manter a sua estabilidade físico-química e biológica ao longo do TGI (Chen et al., 2011).

Por outro lado, a veiculação de ADO em NP's, ainda não está a ser muito abordada.

Futuramente, espera-se que estes sistemas de veiculação de fármacos mudem o actual panorama Farmacêutico, dando oportunidade de existirem novos métodos de administração de fármacos que não poderiam ser feitas até agora, como é o caso dos fármacos pouco solúveis em água (Danhier et al., 2010).

XI. BIBLIOGRAFIA

- Ahuja, A., Ali, J., Challa, R., & Khar, R. (2005). Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6(2), E329–57. doi:10.1208/pt060243
- Al-Hilal, T., Alam, F., & Byun, Y. (2013). Oral drug delivery systems using chemical conjugates or physical complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(6), 845–64. doi:10.1016/j.addr.2012.11.002
- Al-Qadi, S., Grenha, A., & Remuñán-López, C. (2011). Microspheres loaded with polysaccharide nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 25–34. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.022
- Almurshedi, A., & Barakat, N. (2011). Design and development of gliclazide-loaded chitosan microparticles for oral sustained drug delivery: in-vitro/in-vivo evaluation. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(2), 169–78. doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01214.x
- Alonso, M., Calvo, P., & Janes, K. (2001). Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 83–97. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251247>
- Alves, A., Lobo, J., Prista, L., & Morgado, R. (2011). *Tecnologia Farmacêutica*. (Fundação Calouste Gulbenkian, Ed.) (8th ed.).
- American Cancer Society. (2014). Consultado a 20 de Agosto de 2014. Disponível em <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-chemotherapy>
- American Diabetes Association. (2014). Consultado a 25 de Setembro de 2014. Disponível em <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/medication/insulin/insulin-basics.html>
- Amiji, M., Bahia, M., Neves, J., & Sarmiento, B. (2010). Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(4-5), 458–77. doi:10.1016/j.addr.2009.11.017
- Anand, A., Krishnan, U., Ramana, L., & Sethuraman, S. (2014). Targeting strategies for delivery of anti-HIV drugs. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 192C, 271–283. doi:10.1016/j.jconrel.2014.08.003

- Atmodjo, M., Hao, Z., & Mohnen, D. (2013). Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 747–79. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105534
- Berger, J., Felt, O., Gurny, R., Mayer, J., Peppas, N., & Reist, M. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19–34. doi:10.1016/S0939-6411(03)00161-9
- Bernkop-Schnürch, A., Takeuchi, H., & Werle, M. (2009). Modified chitosans for oral drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(5), 1643–56. doi:10.1002/jps.21550
- Betbeder, D., & Dombu, C. Y. (2013). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, 34(2), 516–25. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.070
- Bilensoy, E., Doğan, a L., Gürkaynak, O., & Hincal, a A. (2008). Safety and efficacy of amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1-2), 163–70. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.06.051
- Blanchette, J., & Brannon-Peppas, L. (2012). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 206–212. doi:10.1016/j.addr.2012.09.033
- Bochot, A., Duchene, D., Hincal, a A., Memisoglu-Bilensoy, E., Renoir, J. M., & Vural, I. (2005). Tamoxifen citrate loaded amphiphilic Beta-cyclodextrin nanoparticles: in vitro characterization and cytotoxicity. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 104(3), 489–96. doi:10.1016/j.jconrel.2005.03.006
- Boscolo, M. (2003). Sucroquímica: síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose. *Química Nova*, 26(6), 906–912. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/qn/v26n6/a21v26n6.pdf>
- Boyd, R., & Morrison, R. (1996). *Química Orgânica*. (Fundação Caloute Gulbenkian, Ed.) (13th ed.).
- Brambilla, D., Couvreur, P., Mackiewicz, N., Mura, S., & Nicolas, J. (2013). Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 42(3), 1147–235. doi:10.1039/c2cs35265f
- Breast Cancer Organization. (2014). Consultado a 25 de Agosto de 2014. Disponível em

<http://www.breastcancer.org/treatment/chemotherapy/medicines>

- Burgess, D., Costa, A., Khan, M., & Xu, X. (2012). Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1-2), 349–59. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.002
- Burt, H., & Letchford, K. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 65(3), 259–69. doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.009
- Buzea, C., Pacheco, I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17. doi:10.1116/1.2815690
- Cai, Y., Gao, F., Ouyang, W., Tang, J., Wang, X., Wang, X., ... Zhou, J. (2010). Pullulan acetate coated magnetite nanoparticles for hyper-thermia: Preparation, characterization and in vitro experiments. *Nano Research*, 3(1), 23–31. doi:10.1007/s12274-010-1004-6
- Candeias, S., Gomes, A., Pinto, P. C., & Reis, C. P. (2012). Nanotechnology applied to drug delivery – formulation , development and characterization studies. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, (9), 103–109.
- Cannon, J., & Ranade, V. (2011). *Drug delivery systems* (3^a Ed.).
- Cardoso, M. (2009). *Nanopartículas de lecitina revestidas de polissacarídeos para o aumento da biodisponibilidade oral de antineoplásicos*. (Tese de Doutorado). Universidade Fernando Pessoa, Portugal.
- Chalasani, K., Diwan, P., Jain, A., Jain, S., & Russell-Jones, G. (2007). Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 122(2), 141–50. doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.019
- Chang, I.-S., Han, S.-H, Kim, J., Park, W.-S, Seok Kang, H., & Shim, J. (2004). Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 97(3), 477–84. doi:10.1016/j.jconrel.2004.03.028

- Chang, W.-C., Chen, C.-T., Liang, H.-F., Lin, Y.-H., Mi, F.-L., Peng, S.-F., & Sung, H.-W. (2007). Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules*, 8(1), 146–52. doi:10.1021/bm0607776
- Chen, C.-T., Juang, J.-H., Lin, Y.-H., Sonaje, K., Sung, H.-W., & Wey, S.-P. (2009). In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 30(12), 2329–39. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.066
- Chen, K., Chen, M.-C., Sonaje, K., & Sung, H.-W. (2011). A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*, 32(36), 9826–38. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.087
- Chen, Z., Cho, K., Nie, S., Shin, D., & Wang, X. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), 1310–6. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1441
- Choi, K., Chung, H., Kim, I.-S., Kim, J.-H., Kim, Y.-S., Kim, K., ... Park, R.-W. (2006). Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 111(1-2), 228–34. doi:10.1016/j.jconrel.2005.12.013
- Choi, S., Kim, S., Kim, Y., & Yoo, J. (2011). Study on genipin: a new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 44(3), 197–207. doi:10.5090/kjtcs.2011.44.3.197
- Costa, A., Grenha, A., & Rodrigues, S. (2012). Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 282–289. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.010
- Crucho, C., & Barros, M. (2014). Surfactant-free polymeric nanoparticles composed of PEG, cholic acid and a sucrose moiety. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(25), 3946. doi:10.1039/c3tb21632b
- Danhier, F., Feron, O., & Pr  at, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 148(2), 135–46. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.027

- Dartiguenave, C., & Migneault, I. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5). Disponível em [http://www.chem.science.cmu.ac.th/userfiles/chm009/file/739-glutaraldehyde crosslinking.pdf](http://www.chem.science.cmu.ac.th/userfiles/chm009/file/739-glutaraldehyde%20crosslinking.pdf)
- Dev, A., Hussain, F., Jayakumar, R., Mohan, J., Nair, S., Patzke, G., ... Weyeneth, S. (2010). Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 1073–1079. doi:10.1016/j.carbpol.2009.10.038
- Devarajan, P., & Sonavane, G. (2007). Preparation and in vitro/in vivo evaluation of gliclazide loaded Eudragit nanoparticles as a sustained release carriers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 33(2), 101–111. doi:10.1080/03639040601096695
- Dhana Lekshmi, U., Kishore, N., Poovi, G., & Reddy, P. (2010). In vitro characterization and invivo toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 396(1-2), 194–203. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.06.023
- Dimmock, N., Easton, A., & Leppard, K. (2007). *Introduition to Modern Virology* (6^a Ed.). Blackwell.
- Eggink, G., Grobбен, G., Hugenholtz, J., Weusthuis, R., & Wisselink, H. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 151–161. doi:10.1016/S0958-6946(01)00153-4
- Elsabahy, M., & Wooley, K. (2012). Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2545–2561.
- Farokhzad, O., Kamaly, N., Radovic-Moreno, A., Valencia, P. M., & Xiao, Z. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971–3010. doi:10.1039/c2cs15344k
- Fathi, F., Heydari, A., & Namazi, H. (2011). Nanoparticles Based on Modified Polysaccharides. In *The Delivery of Nanoparticles*. Disponível em http://cdn.intechopen.com/pdfs/36882/InTech-Nanoparticles_based_on_modified_polysaccharides.pdf

- Ferro, A., Lewis, L., Mant, T., & Ritter, J. (2008). *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics* (5^a Ed.).
- Gadhav, M., Gaikwad, D., Grampurohit, N., Jadhav, S., Shelke, P., & Shinde, S. (2012). Toxicity induced by nanoparticles. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(4), 331–334. doi:10.1016/S2222-1808(12)60072-3
- Galliker, B., & Steinbach, A. (n.d.). Ion Chromatography with Pulsed Amperometric Detection for Determining Intestinal Permeability to Lactulose and Mannitol. *Separation Science*. Disponível em <http://www.sepscience.com/Techniques/IC/Articles/1315-/Ion-Chromatography-with-Pulsed-Amperometric-Detection-for-Determining-Intestinal-Permeability-to-Lactulose-and-Mannitol?pageNo=1>
- Gan, Q., & Wang, T. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 59(1), 24–34. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.04.009
- Gao, W., Hua, C., Li, Q., Sun, B., Wang, Z., Zhao, X., & Zhu, Q. (2014). Preparation, formula optimization and antitumor actions of mannitol coupling camptothecin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 465(1-2), 360–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.02.019
- Guo, Y., Huang, L., Li, J., & Xin, J. (2009). A Novel Insulin Oral Delivery System Assisted by Cationic β -Cyclodextrin Polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 115(May), 1371–1379. doi:10.1002/app
- Gupta, U., & Jain, N. K. (2010). Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(4-5), 478–90. doi:10.1016/j.addr.2009.11.018
- Hahn, S., Hoffman, A., Kim, J., Kim, K., Kong, J.-H., Lee, M., ... Yang, J.-A. (2010). Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 141(1), 2–12. doi:10.1016/j.jconrel.2009.09.010
- Hammond, P., Lee, J., Morton, S., & Poon, Z. (2011). Controlling in vivo stability and biodistribution in electrostatically assembled nanoparticles for systemic delivery. *Nano*

- Letters*, 11(5), 2096–2103. doi:10.1021/nl200636r.Controlling
- Hommos, A., Müller, R., & Pardeike, J. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1-2), 170–84. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.10.003
- Hosseinkhani, H., Pathak, S., & Subramani, K. (2012). Recent trends in diabetes treatment using nanotechnology. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(1), 85–95. Disponível em http://www.researchgate.net/publication/233390667_RECENT_TRENDS_IN_DIABETES_TREATMENT_USING_NANOTECHNOLOGY/file/79e4150a1a20aa5446.pdf
- Hoy, E., Lewin, S., & Street, A. (2009). *HIV Management in Australasia: a guide for clinical care*.
- Hu, L., Sun, Y., & Wu, Y. (2013). Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. *Nanoscale*, 5(8), 3103–11. doi:10.1039/c3nr00338h
- Huang, L., Liu, T., Mei, L., Ouyang, C., Tao, W., Wang, Z., ... Zeng, X. (2013). Docetaxel-loaded nanoparticles based on star-shaped mannitol-core PLGA-TPGS diblock copolymer for breast cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 9(11), 8910–20. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.034
- INFARMED. (2012). *Prontuário Terapêutico*. (INFARMED, Ed.) (11th ed.).
- Jain, S., & Saraf, S. (2009). Repaglinide-loaded long-circulating biodegradable nanoparticles: rational approach for the management of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes*, 1(1), 29–35. doi:10.1111/j.1753-0407.2008.00001.x
- Jani, G., Khanda, S., & Prajapati, V. (2013). Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 540–9. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.082
- Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S. V., & Tamura, H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 227–232. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.074
- Jr, F. & Platt, V. (2008). Anticancer Therapeutics: Targeting Macromolecules and Nanocarriers to Hyaluronan or CD44, a Hyaluronan Receptor Virginia. *Mol Pharm*, 5(4), 474–486. doi:10.1021/mp800024g

- Karthikeyan, D., & Kumar, C. (2013). A review: Polyelectrolyte polysaccharides nanoparticles on diabetic mellitus. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3(1).
- Kayser, O., Müller, R. H., & Wissing, S. A. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257–72. doi:10.1016/j.addr.2003.12.002
- Kim, G. J., Nie, S., Shin, D. M., & Sinha, R. (2006). Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1909–17. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0141
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles--a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(1), 1–10. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.021
- Krug, H., & Wick, P. (2011). Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(6), 1260–78. doi:10.1002/anie.201001037
- Kumari, A., Yadav, S. C., & Yadav, S. K. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), 1–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- Kumria, R. & Sinha, V. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1-2), 19–38. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472812>
- Kundu, P., Mukhopadhyay, P., Mishra, R., & Rana, D. (2012). Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, 37(11), 1457–1475. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.04.004
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1650–62. doi:10.1016/j.addr.2008.09.001
- Lopes, C. M., & Souto, E. B. (2011). *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos* (Edições Un., pp. 237–264). Porto.
- Luca, C., Popa, M., Racoviță, S., Vasiliu, M. (2009). Polysaccharides based on micro-and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems.

- Revue Roumaine de Chimie*, 54(9), 709–718. Disponível em http://revroum.getion.ro/wp-content/uploads/2009/RRCh_9_2009/Art 01.pdf
- Ma, P. X., & Zhang, J. (2013). Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1215–33. doi:10.1016/j.addr.2013.05.001
- Mäder, K., & Mehnert, W. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), 165–96. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311991>
- Mallipeddi, R., & Rohan, L. C. (2010). Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 533–47. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2950411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Margalit, R., & Peer, D. (2004). Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 6(4), 343–53. doi:10.1593/neo.03460
- Middaugh, C., Tiyaboonchai, W., & Woiszwillo, J. (2001). Formulation and characterization of amphotericin B-polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(7), 902–14. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458338>
- Mizrahy, S., & Peer, D. (2012). Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2623–40. doi:10.1039/c1cs15239d
- National Cancer Institute. (n.d.). Consultado a 23 de Setembro de 2014. Disponível em <http://nano.cancer.gov/learn/impact/treatment.asp>
- Oberdörster, G. (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*, 267(1), 89–105. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x
- Saltão, R., & Veiga, F. (2001). Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 1–17. Disponível em <http://www.rbcf.usp.br/Edicoes/Volumes/V37N1/PDF/v37n1p1-17.pdf>

- Shalviri, A. (2012). *Novel Polysaccharide Based Polymers and Nanoparticles for Controlled Drug Delivery and Biomedical Imaging*. (Tese de Doutorado). Universidade de Toronto, Canadá.
- Sharma, C., & Sonia, T. (2012). An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discovery Today*, 17(13-14), 784–92. doi:10.1016/j.drudis.2012.03.019
- Siahaan, T., Soltero, R., & Wang, B. (2005). *Drug delivery: Principles and applications*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Silva, P. (2012). *Funcionalização e regiosselectiva da sacarose e sua aplicação na síntese de novos materiais*. (Tese de Doutorado). FCT/UNL, Portugal.
- Wang, L.-X. (2013). Synthetic carbohydrate antigens for HIV vaccine design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(6), 997–1005. doi:10.1016/j.cbpa.2013.10.001
- Wang, M., & Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 62(2), 90–9. doi:10.1016/j.phrs.2010.03.005
- World Health Organization. (2014a). Consultado a 2 de Setembro de 2014. Disponível em <http://www.who.int/gho/hiv/en/>
- World Health Organization. (2014b). Consultado a 8 de Setembro de 2014. Disponível em http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index4.html
- Xu, R. (2008). Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*, 6(2), 112–115. doi:10.1016/j.partic.2007.12.002