

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

LUCAS EMER FAURI

**PROPOSTA DE UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A LIBERAÇÃO DE
INSULINA UTILIZANDO NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO (LNCs).**

PORTO ALEGRE, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

LUCAS EMER FAURI

**PROPOSTA DE UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A LIBERAÇÃO DE
INSULINA UTILIZANDO NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO (LNCs).**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico – QUI” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para obtenção do grau de Químico Industrial.

Prof^a. Dr^a. Adriana Raffin Pohlmann
Orientadora

PORTO ALEGRE, 2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha orientadora, Professora Adriana Pohlmann, pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa e por todo o conhecimento adquirido ao longo destes quase três anos. Assim como a todo o grupo de pesquisa do laboratório K204, por toda a experiência adquirida, pela paciência ao longo destes anos e pela amizade gerada, que certamente não será esquecida.

Agradeço imensamente a minha namorada Anne, que esteve comigo ao longo destes quatro anos de curso, me apoiando e incentivando de todas as formas possíveis, além do fato de ter conseguido me aguentar durante os meus piores momentos, principalmente àqueles gerados por desenho técnico. Sem o teu apoio eu certamente não chegaria onde estou agora, muito obrigado, eu te amo muito.

Aos meus pais, pelo apoio durante a graduação, pelo grande incentivo ao estudo e apoio durante às grandes mudanças que ocorreram desde a minha saída de Garibaldi.

Aos meus dindos, por terem me recebido em sua casa durante os dois primeiros anos da faculdade e me tratado como um filho, nunca me esquecerei da farofa ao chegar cansado e faminto da faculdade.

RESUMO

A funcionalização de nanocápsulas de núcleo lipídico com o complexo quitosana – zinco – insulina é uma proposta interessante visando uma estratégia alternativa para o carreamento da enzima, devido a possibilidade da complexação pela presença de heteroátomos na molécula de insulina. Neste trabalho foram desenvolvidas formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico dispersas em água, seguido pelo revestimento das mesmas com quitosana e funcionalização, utilizando uma solução de acetato de zinco e uma solução aquosa de insulina. Foram realizadas caracterizações para determinar a quantidade otimizada de quitosana necessária para revestir a superfície, além da determinação da quantidade máxima de insulina suportada, realizando a funcionalização a partir de diferentes soluções com concentrações variadas e analisando o perfil de diâmetros da população nanométrica. Após a determinação da concentração máxima suportada, a eficiência de ligação da insulina ao complexo metálico foi determinada, empregando a técnica de detecção de proteínas pela redução do íon Cu^{+2} e a formação de complexo corado a partir do íon reduzido com o ácido bicinconínico. Foram determinadas concentrações de quitosana de 1,5% (m/v) em solução para revestimento da superfície aniônica da nanocápsula e a concentração de saturação de insulina em 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com eficiências de ligação de 87,40% e 90,05%.

PALAVRAS-CHAVE: nanocápsulas de núcleo lipídico, insulina, quitosana.

ABSTRACT

The functionalization of the lipid core nanocapsules with a chitosan-zinc-insulin complex is a promising proposal aiming to have an alternative strategy for carrying the enzyme through the possibility of complexation by the presence of heteroatoms on the insulin molecule. In the present study, lipid-core nanocapsules dispersed in water were formulated, following chitosan-coating and insulin-functionalization using zinc acetate. To determine the optimal concentration of chitosan needed to coat the surface, characterizations were performed including the determination of the maximum insulin concentration to form a monolayer. The interfacial reaction of functionalization was assayed varying the concentration of materials, and the diameter distribution curve to characterize the nanometric population was determined for each batch of formulation. After defining the optimal concentration of materials, the efficiency of the insulin binding was determined by employing the protein detection by Cu^{+2} reduction and the formation of the stained complex of the reduced ion with bicinchoninic acid. Chitosan concentration of 1.5% (m/v) was selected. For the insulin solution, the saturation concentration used was 200 $\mu\text{g/mL}$ with a binding efficiency of 87.40% and 90.05%.

KEY-WORDS: lipidic-core nanocapsules, insulin, chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico expressando o número de publicações relacionadas a nanotecnologia por ano.....	11
Figura 2. Esquema da biossíntese da insulina. ¹⁶	14
Figura 3. Representação da insulina humana. ¹⁵	15
Figura 4. Estrutura de uma MCMN, adaptado. ²⁰	20
Figura 5. Mecanismo de degradação da PCL. ¹⁷	20
Figura 6. Gráfico do Potencial Zeta em função da % de quitosana.....	27
Figura 7. Perfis de distribuição de tamanho para todas concentrações de insulina utilizadas, gerado a partir de análise de DLS.	29
Figura 8. Perfis de distribuição de tamanho para todas as concentrações de insulina. Gerado a partir de análise de Difração de Laser.....	29
Figura 9. Relação do diâmetro hidrodinâmico com a concentração de insulina nas In-MCMN.	30
Figura 10. Resultados de DLS para insulina + zinco em solução aquosa.....	31
Figura 11. Resultados de DLS para insulina em solução aquosa	32
Figura 12. Curva analítica para a albumina.....	33
Figura 13. Curva analítica para a insulina.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Etapas de hiperglicemia associada a concentração de glicose no sangue.	12
Tabela 2. Relação do tipo de insulina com o seu tempo de ação. ⁶	18
Tabela 3. Relação entre a percentagem de quitosana em solução e potencial zeta.	27
Tabela 4. Propriedades físico-químicas da In-MCMN ₂₀₀	30
Tabela 5. Valores de absorvância medidos para a albumina.	32
Tabela 6. Valores de absorvância medidos para a insulina.	32
Tabela 7. Dados da concentração de insulina complexada à MCMN	34
Tabela 8. Custo dos insumos para formulação da In-MCMN ₂₀₀	36

LISTA DE SIGLAS

WHO	Organização Mundial da Saúde
LNC	Nanocápsula de Núcleo Lipídico
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
U ou UI	Unidade Internacional
LNC+	Nanocápsula de núcleo lipídico revestida com quitosana
MCMN	Nanocápsulas multi paredes complexadas com metal
In-MCMN	Nanocápsulas multi paredes complexadas com metal e insulina
LD	Difração de Laser
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
BCA	Ácido bicinconínico
PDI	Índice de polidispersão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAIS TEÓRICOS	12
2.1. DIABETES	12
2.2. INSULINA.....	13
2.2.1. BIODÍNTÉSE E FUNÇÃO	13
2.2.2. ESTRUTURA.....	15
2.2.3. INSULINA INJETÁVEL	16
2.2.4. TIPOS DE INSULINA.....	17
2.3. NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO.....	18
2.3.1. ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR	19
3. OBJETIVOS	21
4. PROPÓSTA TECNOLÓGICA	22
5. METODOLOGIA	23
5.1. SÍNTESE DAS LNCs.....	23
5.2. REVESTIMENTO DA LNC	23
5.3. FUNCIONALIZAÇÃO	23
5.4. CARACTERIZAÇÃO	24
5.4.1. Difractometria de Laser (LD).....	24
5.4.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	24
5.4.3. Potencial Zeta	25
5.4.4. Eficiência de Ligação	25
5.4.5. Análise Estatística.....	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
7. ANÁLISE DE CUSTOS	35
8. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS:.....	38

1. INTRODUÇÃO

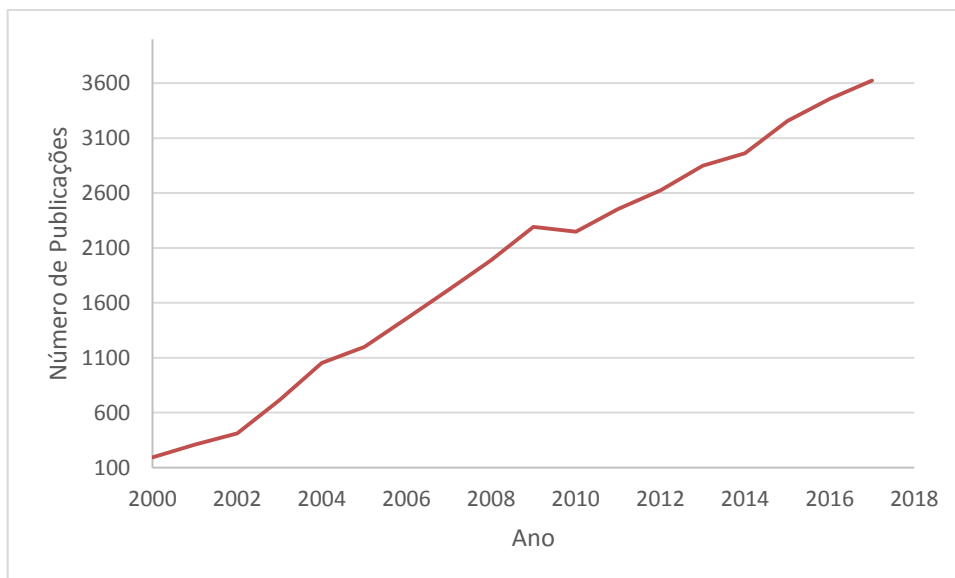
A diabetes é uma doença metabólica crônica, associada ao aumento do nível de glicose no sangue. É conhecido que há milhares de anos já havia pessoas afetadas pela diabetes, porém, devido ao crescente índice de obesidade a incidência da doença vem aumentando, de acordo com a World Health Organization o número de pessoas com diabetes em 1980 era de 108 milhões e em 2014 de 422 milhões, um aumento de aproximadamente quatro vezes¹. Ainda comunicado pelo mesmo órgão, 5% das mortes totais no mundo são decorrentes da diabetes e este número pode aumentar em 50% nos próximos 10 anos se medidas urgentes não forem tomadas.¹ No Brasil, em 2017, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, 13 milhões de pessoas foram diagnosticadas com diabetes, correspondendo a 6,9% da população². A doença causa complicações cardíacas e renais e a ela é associada o maior número de casos de cegueira, falhas renais, ataques cardíacos e amputação dos membros inferiores.

A insulina é um hormônio resultante de duas cadeias de aminoácidos, uma cadeia A composta por 21 resíduos de aminoácidos e uma cadeia B composta por 30 resíduos. O hormônio é responsável pela manutenção do nível de carboidratos no sangue, desempenhando a função de sinalizar se estes serão utilizados para gerar energia ou serão armazenados. Quando a quantidade de insulina produzida pelo corpo não é suficiente para manter o nível de glicose em uma faixa específica resulta o quadro de hiperglicemia, podendo desencadear a diabetes³.

Quando o corpo humano não é capaz de produzir quantidades suficientes do hormônio é necessário a administração de insulina por meios externos. A forma mais comum de administração é via subcutânea, utilizando um dispositivo contendo a insulina acoplado a uma agulha para a inserção do hormônio na hipoderme, na forma de solução.

O estudo de estruturas nanométricas está em crescente estudo, de acordo com a plataforma Web of Science, quando comparando os resultados para a pesquisa do termo *nanotechnology* nos anos de 2000 a 2017 é possível observar um grande aumento de artigos, conforme expresso na figura 1.

Figura 1. Gráfico expressando o número de publicações relacionadas a nanotecnologia por ano.



Devido a biocompatibilidade, estabilidade físico-química e capacidade de transpor barreiras biológicas, a utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) se mostra uma proposta atraente para o carregamento de fármacos. A parede polimérica protege o fármaco encapsulado, disperso no núcleo lipídico, evitando a degradação pelo pH de diferentes regiões do corpo humano e por enzimas, aumentando a biodisponibilidade do fármaco e, desta forma, diminuindo a quantidade necessária para que seja obtida a concentração terapêutica^{22,26,33}.

Outra possibilidade é a funcionalização da superfície das LNCs utilizando um complexo quitosana – metal complexado com alguma biomolécula de interesse que contenha heteroátomos para que ocorra a complexação com o metal. Em estudos anteriores com a funcionalização da superfície de LNCs utilizando bromelina²², laronidase²⁶, metotrexato³³ e doxorubicina³⁴ foi observado um aumento da atividade das moléculas, quando comparadas a sua respectiva solução. Além da vantagem de maior biodisponibilidade, a estratégia de síntese e funcionalização de nanocápsulas possui etapas de fácil realização, não sendo necessária a etapa de purificação e a maior biodisponibilidade do fármaco adicionado reflete em menor quantidade administrada, diminuindo os custos com o tratamento e ainda possuindo a vantagem de diminuir a quantidade de injeções aplicadas pelo paciente ao longo do dia, reduzindo as consequências devido a quantidade de injeções diárias.

2. REFERENCIAIS TEÓRICOS

2.1. DIABETES

Entre o nível normal de glicose no sangue e o desenvolvimento da diabetes existe um período de transição, a glicemia de jejum prejudicada (IFG), e a tolerância de glicose prejudicada (IGT). Estes são caracterizados como estados intermediários, também chamados de pré-diabetes.³

Tabela 1. Etapas de hiperglicemia associada a concentração de glicose no sangue.

Quadro	Concentração de glicose no sangue (mg/dl)
IFG	≥100 e <126
IGT*	≥140 e <200
Diabetes	≥126 ou ≥200*

* Nível de glicose medido duas horas após o teste de tolerância oral a glicose, pela ingestão de 75g de glicose.

Nesse quadro os níveis de glicose no sangue ainda não estão tão elevados para caracterizar a diabetes, porém estão acima dos normais, aumentando o risco de doenças cardiovasculares.

A absorção e a regulação dos níveis de açúcar no sangue são realizadas pela insulina, um hormônio produzido pelo pâncreas, quando o mesmo não é produzido, produzido em níveis inferiores ao necessário ou não possui a eficiência esperada ocorre a hiperglicemia, desencadeando a diabetes. A diabetes pode ser dividida em três classes:

Diabetes tipo 1: Ocorre quando o pâncreas não produz insulina ou quando a quantidade produzida é inferior ao necessário. Os pacientes que apresentam esta condição necessitam de acesso a tratamentos constantes com insulina para a sua sobrevivência e a causa da diabetes tipo 1 ainda não é conhecida.

Diabetes tipo 2: Ocorre quando o corpo não utiliza a insulina de forma apropriada, caracterizando a resistência à insulina. Este tipo de diabetes é mais comumente associado a adultos, pois inicialmente o pâncreas consegue produzir

insulina extra para compensar a ineficiência, porém, ao decorrer do tempo, essa superprodução não consegue ser mantida e ocorre a hiperglicemia devido a não absorção efetiva do açúcar no sangue. Não são todos os pacientes com diabetes tipo 2 que necessariamente necessitam de tratamento contínuo com insulina, pois alguns conseguem controlar a taxa de glicose no sangue através de dietas e exercícios além do uso de hipoglicemiantes orais, que estimulam a produção de insulina.

Diabetes Gestacional: Pode ocorrer durante a gestação, mais precisamente por volta da 24^a semana. Não se sabe exatamente a causa do distúrbio mas pode ter relação com os hormônios da placenta, que podem causar resistência à insulina, fazendo com que a quantidade de insulina produzida tenha que ser elevada, semelhante à Diabetes tipo 2. ³

2.2. INSULINA

2.2.1. BIOSÍNTESE E FUNÇÃO

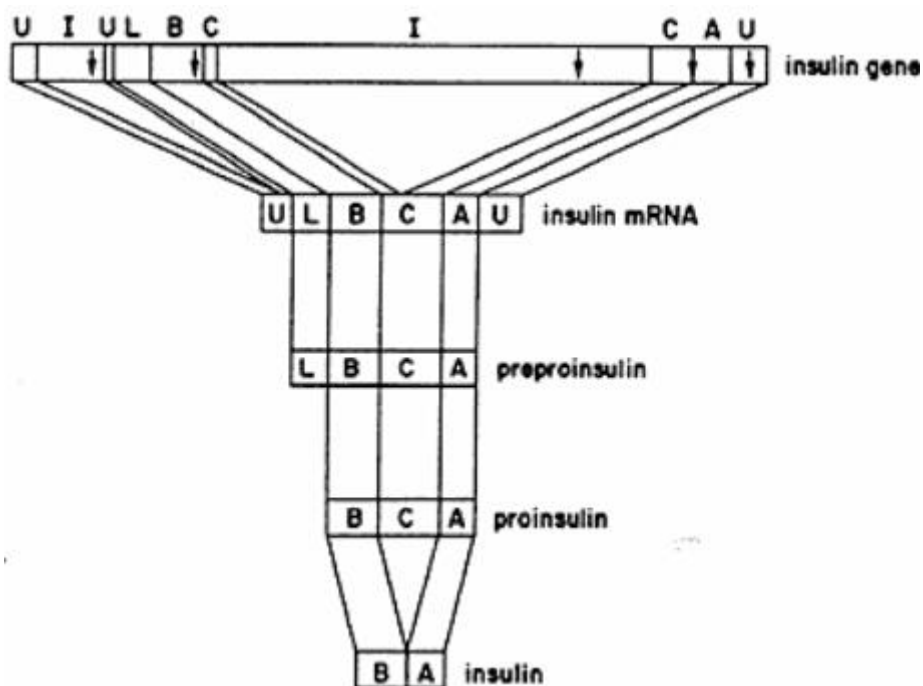
Desde a descoberta da insulina em 1921 por Banting e Best uma riqueza de conhecimento químicos, bioquímicos e estruturais sobre o hormônio e o seu precursor biosintético, a proinsulina, se tornaram disponíveis⁴.

O pâncreas é um órgão localizado no abdômen, dividido em três partes, a cabeça o corpo e a cauda. A cabeça é localizada na parte direita do abdômen e é nessa região, majoritariamente, que se localizam as ilhotas de Langerhans. As células das ilhotas produzem uma série de hormônios, como por exemplo a insulina, glucagon e somatostatina; que são liberados no sangue (as ilhotas não são conectadas aos dutos pancreáticos) e distribuídos para outras partes do corpo⁷.

A insulina possui duas formas precursoras, a preproinsulina e a proinsulina. As células β do pâncreas realizam a síntese da preproinsulina, uma molécula com 110 resíduos de aminoácidos. A preproinsulina sofre clivagem através de proteases gerando a proinsulina. A proinsulina é uma proteína com massa de 9 kDa e possui as duas cadeias do monômero de insulina, A e B, com adição de uma cadeia C. O peptídeo C é um segmento de peptídeo com comprimento variável, consistindo de 26 – 31 resíduos de aminoácidos, dependendo da espécie, que liga a carboxila terminal da cadeia B até o terminal amino da cadeia A via duas ligações de resíduos

dibásicos (Arg – Arg e Lis – Arg)¹⁶. A clivagem destas ligações origina o monômero da insulina e um peptídeo C livre.

Figura 2. Esquema da biossíntese da insulina.¹⁶



A insulina é um hormônio que desempenha uma série de funções no metabolismo do corpo, é responsável por regular a utilização de glicose e gordura, sinalizando quando estas devem ser armazenadas ou utilizadas como energia. A quantidade de insulina produzida pelo corpo é proporcional a quantidade de glicose no sangue devido a maior demanda de combustível para ser absorvido pelas células, para a produção de energia. Caso a quantidade de glicose seja mais elevada que a demanda de energia pelo corpo a insulina sinaliza para o fígado que a quantidade adicional pode ser armazenada, na forma de glicogênio. A alta porosidade das células β permite uma alta permeabilidade de sangue, tendo como consequência a rápida notificação da concentração de glicose no sangue e uma resposta quase imediata do pâncreas, elevando a produção de insulina. Uma ingestão oral de 75 g de glicose irá causar o aumento da concentração de insulina de 20 – 30 pmol/L para 250 – 300 pmol/L em um intervalo de 30 minutos.¹⁴

Quando a insulina não é produzida em quantidades suficientes para suprir a demanda do corpo a sinalização para a absorção de glicose pelas células não é totalmente eficiente, proporcionando um aumento do nível de glicose no sangue e

uma carência de energia. Para corrigir essa produção ineficaz é necessária a administração de insulina por vias externas.

2.2.2. ESTRUTURA

A insulina é um hormônio formado por duas cadeias de aminoácidos, por definição uma proteína. A quantidade e os resíduos de aminoácidos na molécula de insulina variam, na humana as duas cadeias são denominadas cadeia A, com 21 resíduos de aminoácidos e cadeia B, com 30 resíduos de aminoácidos, possuindo um peso molecular de aproximadamente 6000 Da. As duas cadeias que originam a insulina possuem resíduos de cisteína, aminoácido que possui grupo -SH em sua estrutura e, devido à presença desses resíduos, as moléculas de insulina apresentam três ligações de dissulfeto intramoleculares, duas entre as cadeias A e B e uma entre os resíduos da cadeia A.⁴

Independente da variação de sua estrutura primária, a conformação espacial da insulina é a mesma devido a resíduos de aminoácidos que se mantêm constantes, como por exemplo os resíduos de cisteína. A estrutura secundária possui a formação de α -hélices antiparalelas, entre os resíduos A1 – A8, A12 – A20 e B9 – B19. E as pontes de dissulfeto que ocorrem entre os resíduos A7 – B7 e A20 – B19.¹⁶

Figura 3. Representação da insulina humana.¹⁵



Em concentrações acima de 0,6 µg/mL, a insulina não se apresenta na forma de monômeros, mas em dímeros ou hexâmeros. As duas moléculas de insulina no dímero são mantidas juntas através de forças apolares e quatro ligações de hidrogênio (entre os resíduos)¹³. Essa interação ocorre entre a cadeia B do monômero, que se arranja de maneira antiparalela com estrutura de folha β na qual os grupos –COOH interagem entre si para a formação das ligações de hidrogênio e uma das superfícies apolar da insulina é direcionada para o interior do dímero, não entrando em contato com o solvente. Quando esses dímeros estão submetidos a certas condições de pH, entre 4 e 8, ou concentrações elevadas e na presença de íons Zn²⁺; ocorre a formação de hexâmeros, com três pares de dímeros. Esta formação ocorre devido a coordenação do zinco com os grupos imidazol dos resíduos de histidina, presentes nas cadeias B dos monômeros que formam os dímeros. Esta formação de hexâmeros pode resultar em diferentes organizações cristalinas: romboédrica, com dois ou quatro íons Zn²⁺ no interior do cristal, onde os íons metálicos possuem arranjo octaédrico e os dímeros estão mais afastados entre si, em comparação a distância dos monômeros para compor o dímero, possuindo uma menor interação; monoclinica, com dois íons Zn²⁺ e presença de moléculas de fenol, com ocorrência de formação de duas ligações de hidrogênio entre a hidroxila do fenol com o oxigênio da carbonila do resíduo A6 e o hidrogênio do grupo amida do resíduo A11. No plasma sanguíneo ocorre a prevalência da insulina em sua forma monomérica, devido a sua concentração, e é nesse formato que a molécula desempenha as suas atividades hormonais.^{12, 14, 16}

2.2.3. INSULINA INJETÁVEL

A administração de insulina por pacientes que possuem deficiência, ou inexistência, de sua síntese pelo pâncreas é majoritariamente realizada por injeções na camada subcutânea, que possui como característica uma extensa rede de capilares que possibilita a difusão para a corrente sanguínea. A administração via oral não é realizada devido a degradação da insulina pelo suco gástrico e pelas enzimas digestivas.⁵

A injeção através da seringa é o método mais conhecido de administração, as seringas possuem volumes variáveis e diferentes comprimentos e espessuras de

agulha. A popularidade da seringa pode ser atribuída ao custo e a facilidade de aquisição da mesma no Brasil, devido a lei 11.347 de 2006, que garante que todas as pessoas com diabetes e cadastro no Sistema Único de Saúde tenham acesso gratuitamente a estes dispositivos.⁸

Outro dispositivo para a administração de insulina é a caneta de injeção, com uma crescente popularidade devido a maior facilidade de manuseio e transporte. O dispositivo é muito parecido com uma caneta comum, porém, ao invés da tinta possui carga de insulina que podem ter uma dose fixa ou variável, dependendo do dispositivo. A aplicação se dá através de uma agulha que pode ser acoplada na extremidade da caneta e o volume de insulina é escolhido através de um marcador.^{5, 6, 8, 10}

A administração da insulina pela caneta e pela seringa ocorre apenas no momento da injeção, porém, existe a bomba de infusão de insulina, que fornece doses contínuas de insulina. O dispositivo é semelhante a um *pager* e é fixado no exterior do corpo, normalmente na região abdominal. Por meio de uma agulha com cateter e cânula e uma programação prévia, o dispositivo realiza a liberação de insulina para o corpo, aumentando as doses durante as refeições. Devido ao alto custo não são muito utilizados.^{5, 6, 8, 10}

2.2.4. TIPOS DE INSULINA

Embora a insulina esteja em uso há mais de 90 anos, nas últimas três décadas ocorreram os maiores avanços na sua produção e na forma como ela é utilizada na prática clínica. As diversas preparações de insulina diferem entre si com relação a quatro características: concentração, grau de purificação, origem de espécie e tempo de ação⁶.

A unidade de medida adotada para a insulina é dada por “U” ou “UI”. Esta unidade representa um número x de unidades de insulina em 1 mL de solução, em termos práticos, a insulina 100U possui 100 unidades de insulina por mL de solução. Existem outras concentrações de soluções disponíveis, tais como U-500, U-40 e U-10, sendo que as soluções mais concentradas possuem uma absorção mais rápida.⁸

Na década de 1970 o processo industrial de purificação dos preparados insulínicos foi implementado, reduzindo o nível dos contaminantes, mais comumente a pró-insulina, para uma taxa inferior a 10 ppm, uma concentração bem menor

quando comparada aos níveis de contaminantes antes da implementação do processo, na faixa de 10000 – 50000 ppm.⁶

A insulina pode ter origem animal ou humana, sendo que a primeira é extraída mais comumente de porcos ou bois e na segunda não ocorre realmente a extração do hormônio de seres humanos, a insulina é sintetizada em laboratório por meio de técnicas de DNA recombinante. Dentre estas duas possibilidades a insulina recombinante apresenta a maior compatibilidade com seres humanos.⁶

Existem no mercado insulinas com quatro tipos de velocidades de absorção, cada uma possui diferentes tempos de absorção, pico de ação e duração da atividade. É possível fazer misturas de insulinas com diferentes características para se alcançar uma proporção ideal para cada caso.

Tabela 2. Relação do tipo de insulina com o seu tempo de ação.⁶

Ação	Tipo de insulina	Início	Pico	Duração
Rápida	Regular ou cristalina	30-60 min	2-4 h	6-7 h
Ultra-rápida	LISPRO	1-5 min	1/2-2,5 h	3-4 h
Intermediária	NPH	1-3 h	8-12 h	20-24 h
	Lenta	1-3 h	8-12 h	20-24 h
Lenta	Ultra-lenta	4-6 h	12-16 h	24-36 h

2.3. NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO

O desenvolvimento de um grande espectro de tecnologias na escala nanométrica está começando a alterar o panorama científicos em termos de doenças, diagnósticos, tratamento e prevenção²³. Estes dispositivos incluem, mas não estão limitados em: nanotubos de carbonos funcionalizados, nanomáquinas (e.g., contruídas a partir de peças de DNA), nanofibras, nanoconstrutores auto montáveis poliméricos, nanomembranas e chips de silicones para liberação de medicamentos, proteínas, ácidos nucleicos ou peptídeos, além de biosensores e diagnósticos laboratoriais²².

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou

adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido¹⁸.

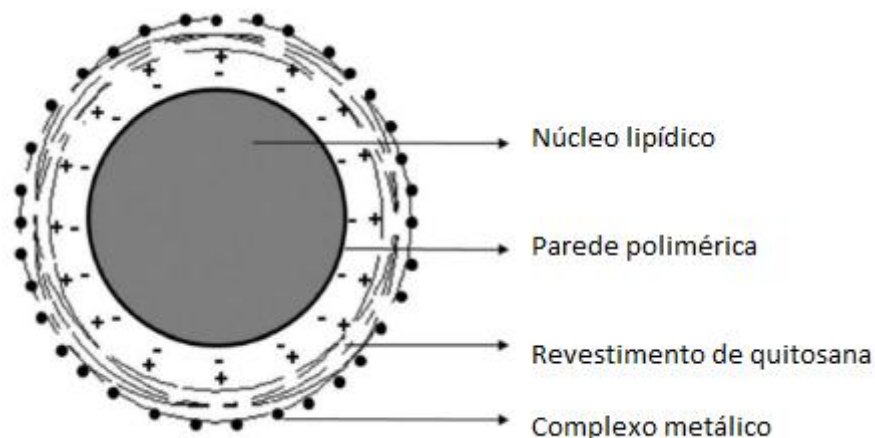
Devido a distribuição de tamanho e propriedades físico-químicas das LNC as mesmas possuem vantagens no carreamento de fármacos, possuindo uma distribuição mais seletiva devido a vetorização do fármaco em determinado tecido ou órgão, aumento do índice terapêutico, permeabilidade a barreiras biológicas e biocompatibilidade, além de possibilitar a incorporação de fármacos no núcleo, encapsuladas, ou por funcionalização da superfície.^{19, 21}

2.3.1. ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR

As LNCs, após a sua formulação, ficam dispostas em suspensão aquosa e consistem em um núcleo oleoso delimitado por uma parede polimérica contendo surfactante polissorbato 80 em sua superfície, para permitir uma maior dispersão em água, evitando aglomeração. Após a formulação as LNCs são revestidas com lecitina (surfactante aniônico) e quitosana, um polissacarídeo catiônico, garantindo uma carga positiva para as nanocápsulas.

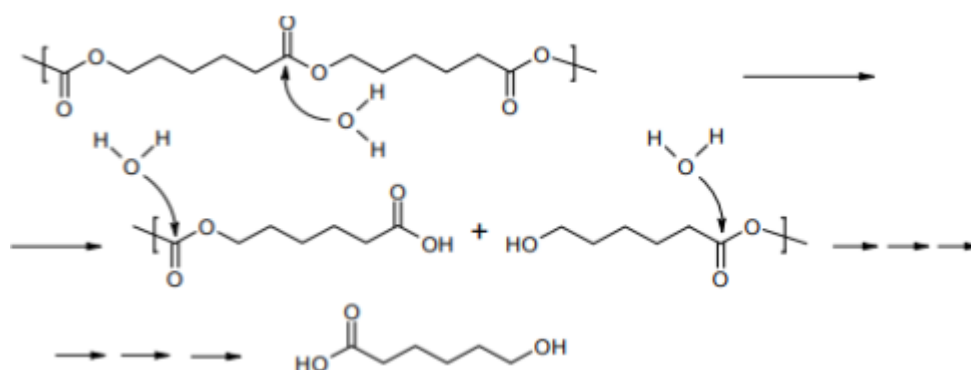
Após o revestimento das LNCs com quitosana, obtendo-se nanocápsulas de núcleo lipídico positivamente carregadas (LNC+) é possível realizar a complexação de metais ao polissacarídeo, devido a presença de heteroátomos, tais como oxigênio e nitrogênio, formando nanocápsulas multi-paredes complexadas com metal (MCMN). Os íons metálicos mais comumente utilizados são Fe^{+2} ou Zn^{+2} , que se complexam com heteroátomos presentes nas diversas funções orgânicas apresentadas por biomoléculas, tais como oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre.²⁰

Figura 4. Estrutura de uma MCMN, adaptado.²⁰



Para que as MCMNs possam ter aplicação *in vivo* os componentes não podem apresentar toxicidade ao ser humano, logo, o polímero utilizado para a formação da parede polimérica da nanocápsula deve ser biocompatível. Por este motivo LNCs empregando a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) são comumente descritas na literatura e utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa, uma vez que a PCL é um poliéster alifático com alta permeabilidade para fármacos, possibilitando a liberação de fármaco caso o mesmo esteja encapsulado, possui baixa toxicidade, altas taxas de degradação nas condições do corpo e o subproduto formado após degradação por hidrólise, o ácido 6 hidroxihexanoico, é excretado do corpo sem apresentar toxicidade.¹⁷

Figura 5. Mecanismo de degradação da PCL.¹⁷



3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico, revestir e funcionalizar a superfície com insulina, além de otimizar a quantidade de quitosana a ser utilizada na solução de revestimento das LNCs, com base no potencial zeta da suspensão aquosa de LNC+ e determinar a quantidade máxima de insulina suportada pela MCMN através da formulação de diferentes concentrações de insulina para a complexação à MCMN, assim como a caracterização da formulação MCMN – insulina (In-MCMN) com a concentração de saturação, de acordo com o seu diâmetro hidrodinâmico, diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de ligação.

4. PROPÓSTA TECNOLÓGICA

A diabetes mellitus é uma doença endócrina, associada ao aumento da taxa de glicose no sangue e segundo estimativas da WHO o número de pessoas afetadas pelo distúrbio será de 438 milhões no ano de 2030. O tratamento disponível é realizado com a administração de insulina por vias parenterais, mais precisamente no tecido subcutâneo. A quantidade diária de insulina necessária é dependente do tipo de diabetes e do estilo de vida levado, além do tipo de insulina utilizada. Além do desconforto causado ao paciente a numerosa quantidade de injeções de insulina pode acarretar a formação de nódulos endurecidos, lipo-hipertrofia, infecções entre outros efeitos colaterais, além do custo vinculado a constante compra de insulina.

A utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico se mostrou eficiente para o carreamento de fármacos, tanto encapsulados no núcleo oleoso quanto complexados em metais na superfície, aumentando a sua biodisponibilidade e permeabilidade em barreiras biológicas. Devido à presença de átomos de nitrogênio e oxigênio na molécula de insulina a mesma pode ser viável para complexação e funcionalização. Neste contexto, a funcionalização de nanocápsulas poliméricas com insulina poderia aumentar a biodisponibilidade da mesma, diminuindo as doses necessárias para manter o nível glicêmico estável e redução do custo com a compra do hormônio.

5. METODOLOGIA

5.1. SÍNTESE DAS LNCs

A formulação foi preparada utilizando o método da deposição do polímero pré-formado. Em um frasco âmbar foi preparada a “fase orgânica”, dissolvendo 0,038 g de monoesterato de sorbitano (Span® 60) em 27 mL de acetona grau HPLC e a solução foi deixada em banho ultrassônico por 60 minutos. Após este período foram adicionados 0,1 g de PCL (0,09 g de PCL com Mw ~ 80000 e 0,01 g de PCL com Mw ~ 14000), e 170 µL de triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico e a solução foi mantida em agitação magnética sob temperatura de 40 °C *over night*. Em um béquer foi preparada outra solução, a fase aquosa, contendo 0,08 g de polissorbato 80 (Tween® 80) em 53 mL de água ultrapura (Milli-Q®) e posteriormente submetida a agitação magnética. Uma terceira solução contendo 0,06 g de lecitina de soja (Lipoid® S95) em 4 mL de etanol foi preparada e, após a solubilização da lecitina a solução foi vertida no frasco contendo a fase orgânica. Terminado o período de agitação a fase orgânica é injetada na fase aquosa, utilizando um funil de boca pequena. Passados 10 minutos de agitação moderada a solução resultante é levada a evaporador rotatório a 40 °C para eliminação do solvente orgânico e redução do volume de água até o final de 10 mL.

5.2. REVESTIMENTO DA LNC

Após a finalização da formulação a mesma foi armazenada em refrigerador a 4 °C por 24 h. Posteriormente, as LNCs foram revestidas utilizando soluções contendo diferentes concentrações de quitosana, afim de otimizar a sua quantidade e 1,5 % (v/v) de ácido acético glacial. A solução de quitosana foi lentamente gotejada à formulação até completar 10% do volume total, mantendo agitação magnética durante o processo e ao longo de duas horas subsequentes.

5.3. FUNCIONALIZAÇÃO

Uma solução de acetato de zinco com concentração de 1 mg/mL de íons Zn²⁺ foi preparada, utilizando 14 mg de acetato de zinco em 5 mL de água ultrapura. Paralelamente foram preparadas soluções de insulina em variadas concentrações para determinação da concentração máxima suportada pela MCMN, as soluções de

insulina foram preparadas em solução aquosa contendo 1% de ácido acético glacial, para manutenção do pH em ~3,00.

A funcionalização das LNC+ foi realizada em um eppendorf contendo 950 μL da LNC+ seguida da adição de 25 μL da solução de zinco e dentro de um intervalo de tempo de 40 segundos a adição de 25 μL da solução de insulina, sob agitação constante. A concentração final dos íons zinco para todas as soluções foi mantida constante em 25 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a concentração final de insulina foi variada, sendo: 25, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente denominadas de In-MCMN₂₅, In-MCMN₅₀, In-MCMN₁₀₀, In-MCMN₂₀₀, In-MCMN₃₀₀, In-MCMN₄₀₀, In-MCMN₆₀₀, In-MCMN₈₀₀ e In-MCMN₁₀₀₀.

5.4. CARACTERIZAÇÃO

5.4.1. Difratometria de Laser (LD)

A técnica de difratometria de laser tem como princípio o espalhamento de luz proveniente de um laser após passar através de uma suspensão de partículas. A diferenciação do tamanho da partícula é evidenciado pelo ângulo de espalhamento e a partir da distribuição de luz obtida são formados os perfis de diâmetro das partículas. Para esta análise foi utilizado o equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern Instruments). O equipamento é acoplado com um dispenser, Hydro 2000SM, que promove a agitação (2000 rpm) para dispersar as partículas. Esse dispenser é preenchido com água deionizada e a amostra é adicionada ao meio. A quantidade de amostra adicionada foi o suficiente para promover uma opalescência de aproximadamente 3%, esta opalescência é necessária para que o sinal analítico tenha uma intensidade adequada. Por meio desta técnica foram determinados os diâmetros médios.

5.4.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico também é conhecida como espectroscopia de correlação de fótons e é constituída de um feixe de luz monocromática posicionado de forma que o feixe passe através de uma solução contendo as partículas em suspensão. As partículas em suspensão estão em constante movimento, conhecido como movimento Browniano, causado pela colisão das partículas do solvente com as partículas em suspensão. Considerando que a difusão é dependente do diâmetro e que partículas menores possuem maior

facilidade de difusão o perfil de diâmetros pode ser construído, dependendo da flutuação da intensidade da luz espalhada. A técnica é dependente da temperatura e da viscosidade do meio, logo, ambos devem ser conhecidos e considerados para a acurácia da medição. Para as análises de DLS as amostras foram diluídas 500 vezes em água ultrapura filtrada em filtro 0,45 μ m e por meio desta técnica foram verificados os diâmetros hidrodinâmicos das In-MCNCs assim como o índice de polidispersão.

5.4.3. *Potencial Zeta*

Quando uma partícula carregada é dispersa em água ocorre a formação de uma camada de íons de carga contrária em toda superfície externa. O potencial zeta é a diferença do potencial entre esta camada e o potencial do solvente, no caso a água. Para a estabilidade de sistemas coloidais um alto valor, em módulo, de potencial zeta é necessário, pois a aglomeração de partículas pode ocorrer por atrações eletrostáticas, sendo menos pronunciada entre duas cargas com grande magnitude, sejam positivas ou negativas. O potencial zeta é medido através da técnica de Dispersão de Luz Eletroforética (ELS), a técnica tem como princípio a aplicação de um campo elétrico e em decorrência deste campo aplicado ocorrerá a migração das partículas em direção aos eletrodos, com a sua velocidade variando de acordo com o seu potencial zeta. Tanto as medidas de DLS quanto as medidas de potencial zeta foram realizadas no equipamento Zetasizer®nano-ZS, Malvern Instruments. Para as análises de potencial zeta as amostras foram diluídas 500 vezes em solução de NaCl 10 mM filtrada em filtro 0,45 μ m. O valor do potencial zeta das nanocápsulas influencia na sua estabilidade e é afetado pela quantidade de quitosana adicionada. Foram realizadas medidas para diferentes concentrações de quitosana, afim de otimizar a quantidade da mesma para o revestimento das LNCs.

5.4.4. *Eficiência de Ligação*

Para determinar a Eficiência de Ligação da insulina complexada ao metal é utilizada a técnica de determinação de proteínas com ácido bicinconínico (BCA) utilizando o QuantiPro® BCA Assay Kit, Sigma-Aldrich®. O princípio da determinação é a capacidade de proteínas de reduzir o Cu^{2+} em pH alcalino e o íon a Cu^{1+} resultante forma um complexo corado com o BCA, sendo analisado por a UV. O método utilizado possui linearidade da concentração de proteínas determinadas

com a absorvância do complexo medido por UV desde a concentração de 0,5 até 30 $\mu\text{g/mL}$.

Precedendo a etapa de determinação da insulina 400 μL da suspensão da In-MCMN₂₀₀ foi adicionada a um eppendorf Ultrafree® (Merck Milipore, 30kda), ultrafiltrado e centrifugado a 1840 xg por cinco minutos, para que o solvente fosse extraído, sem a passagem das In-MCMN mas contendo a porção de insulina adicionada à formulação mas não complexada aos íons metálicos, conforme metodologia descrita por *Oliveira et al.* Foram preparadas soluções, em placa multipoço, utilizando concentrações de 3,0; 9,0; 15,0; 21,0 e 27,0 $\mu\text{g/mL}$ de insulina e de albumina de soro bovino para a construção da curva analítica, além da solução extraída por ultracentrifugação. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A adição dos reagentes segmento da reação de redução e complexação do íon cobre seguiu conforme descrito no boletim técnico do Kit e a temperatura de encubação para a ocorrência da reação foi de 37 °C por duas horas. As leituras de absorvância foram realizadas no equipamento Spectramax M2e, utilizando comprimento de onda de 562 nm, utilizando água ultrapura como branco analítico.

5.4.5. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados em forma de média das medidas com o seu respectivo desvio padrão, para as análises realizadas em triplicata. Cálculos estatísticos para avaliar a significância dos dados foram realizados utilizando o programa Microsoft Office Excel, utilizando teste T de Student com distribuição bicaudal com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

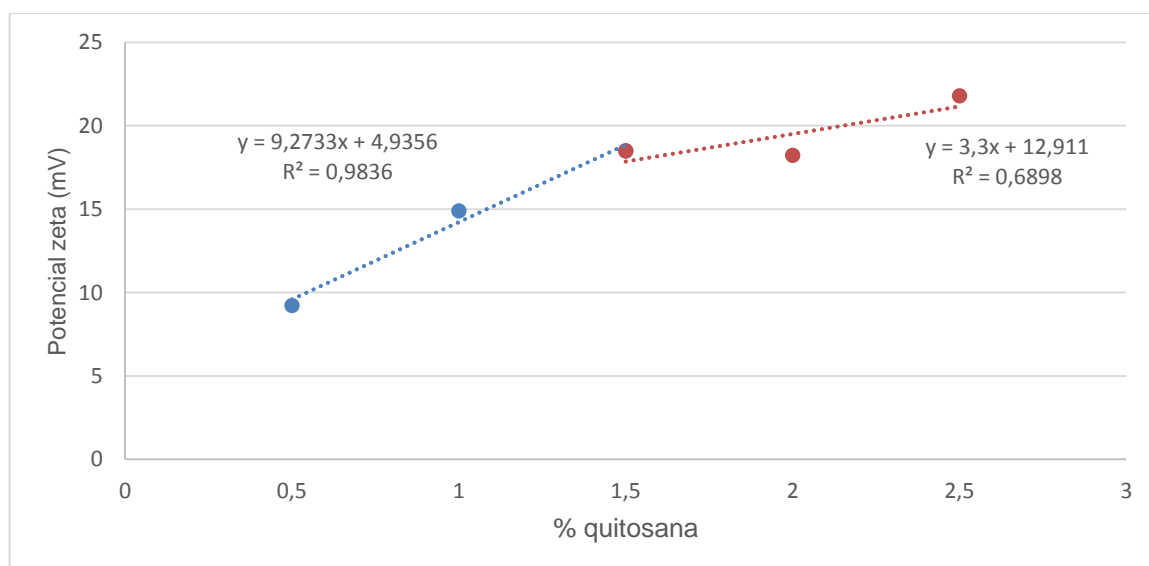
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro aspecto a ser avaliado durante este trabalho foi a quantidade de quitosana de baixo peso molecular e alto grau de desacetilação a ser adicionada à solução, visando uma otimização da concentração. Para esta avaliação foram adicionadas 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5% (m/v) de quitosana em solução contendo 1,5% de ácido acético glacial. Em cada um das concentrações o método de revestimento foi o mesmo, descrito no tópico 5.2. e para análise dos dados foram traçadas curvas de potencial (mV) em função da porcentagem de quitosana utilizada.

Tabela 3. Relação entre a porcentagem de quitosana em solução e potencial zeta.

Quitosana	Potencial Zeta (mV)
0,5 %	+9,23 ± 1,2
1,0 %	+14,90 ± 0,6
1,5 %	+18,50 ± 0,6
2,0 %	+18,23 ± 1,0
2,5 %	+21,80 ± 0,7

Figura 6. Gráfico do Potencial Zeta em função da % de quitosana.



No gráfico é possível observar a tendência de formação de duas retas, com o ponto de inflexão entre elas localizado na concentração de 1,5%. Até a concentração de 1,5% um mesmo aumento em porcentagem da concentração de quitosana causa um aumento superior no potencial zeta, quando comparado aos pontos acima de 1,5%, este aumento é traduzido pelos coeficientes angulares das duas retas de tendência plotadas a partir dos pontos. A diminuição do coeficiente angular da reta pode sugerir que em 1,5% de quitosana na formulação ocorre a formação de uma monocamada, ocupando todos os sítios da superfície aniônica de lecitina. O aumento em módulo do potencial das LNC+ é favorável devido às forças de repulsão resultantes, porém o excesso de quitosana pode refletir em quitosana livre no sistema, não sendo efetivamente empregado para o revestimento das LNCs, logo, a concentração ótima de quitosana foi determinada como 1,5%.

O parâmetro limitante para a determinação da máxima concentração de insulina suportada pelas MCMN é o diâmetro médio das partículas, assim como a sua distribuição de tamanho. Portanto, foram analisados o tamanho médio e a curva de distribuição de tamanhos por LD e o diâmetro hidrodinâmico a curva de distribuição de tamanhos e o índice de polidispersão por DLS.

As formulações In-MCMN₂₅, In-MCMN₅₀, In-MCMN₁₀₀, In-MCMN₂₀₀, In-MCMN₃₀₀, In-MCMN₄₀₀, In-MCMN₆₀₀, In-MCMN₈₀₀ e In-MCMN₁₀₀₀ foram utilizadas, afim de saturar a suspensão para determinar a maior concentração suportada pela MCMN, mantendo o perfil de diâmetro unimodal na faixa nanométrica, além de uma baixa polidispersão (< 0,3).

Sobrepondo as curvas de distribuição para todas as concentrações analisadas, pelas técnicas de LD e DLS é possível perceber que os perfis se dividem em dois grupos de distribuição, o primeiro compreende a In-MCMN₂₅ até a In-MCMN₂₀₀ e o segundo compreende a In-MCMN₃₀₀ até a In-MCMN₁₀₀₀. A divisão dos grupos de distribuição é mais clara quando analisada por LD, onde ocorre a sobreposição quase total das curvas.

Figura 7. Perfis de distribuição de tamanho para todas concentrações de insulina utilizadas, gerado a partir de análise de DLS.

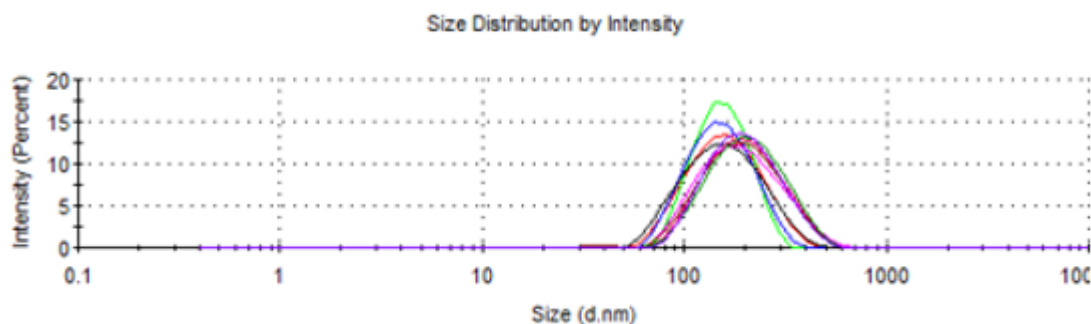
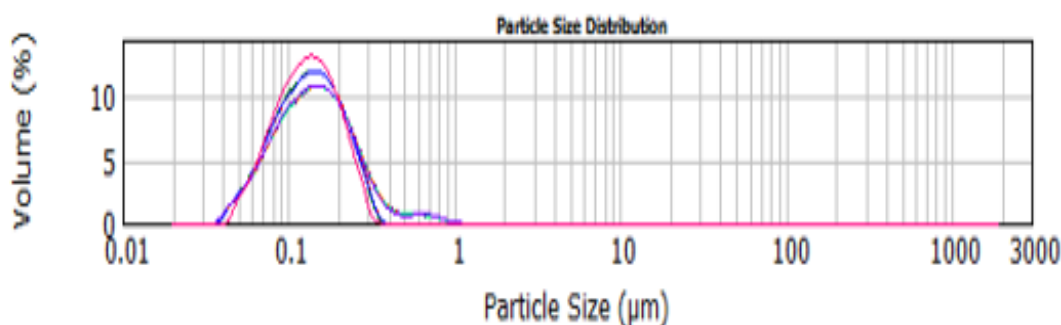


Figura 8. Perfis de distribuição de tamanho para todas as concentrações de insulina. Gerado a partir de análise de Difração de Laser.



Com base na análise de LD observa-se que concentrações acima de 200 $\mu\text{g/mL}$ apresentam um “ombro” no perfil de distribuição, apresentando partículas com tamanhos próximos a 1000 nm e não apresentando uma distribuição unimodal. Para a técnica de LD utiliza-se um equipamento responsável por promover a agitação da suspensão, ocasionando a detecção de toda a população de partículas da amostra, enquanto que no DLS a leitura é realizada em cubeta estática, além de ser necessário um período de aproximadamente dois minutos até a inserção da cubeta no equipamento e a incidência do feixe de luz. Estas diferenças podem ser responsáveis pela detecção da população de In-MCMNs com diâmetros próximos a 1 μm pela técnica de LD e o não aparecimento das mesmas pela técnica de DLS, uma vez que existe a possibilidade de sedimentação destas partículas com maior diâmetro, quando o meio está estático, ocasionando a não incidência do feixe de luz, enquanto que quando promovida a agitação estas partículas sedimentadas são suspensas novamente, estando na faixa de detecção.

Plotando os diâmetros hidrodinâmicos adquiridos pela técnica de DLS, calculado pelo método de Cumulantes, em função da concentração de insulina das In-MCMN verifica-se que nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ o diâmetro se

mantém praticamente inalterado, quando comparado a LNC+ não funcionalizada, enquanto que a In-MCMN₂₀₀ apresenta um pequeno aumento do diâmetro hidrodinâmico porém não apresenta partículas com diâmetro próximo a 1 μm e possui uma distribuição unimodal e monodispersa, traduzida pelo baixo índice de polidispersão ($< 0,3$). As concentrações acima de 200 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram um aumento de diâmetro hidrodinâmico mais acentuado, além de não possuírem distribuição unimodal em sua população particulada, evidenciado pela análise de LD. Logo, a partir dos resultados das análises de LD e DLS a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ foi determinada como concentração máxima de saturação da MCMN.

Figura 9. Relação do diâmetro hidrodinâmico com a concentração de insulina nas In-MCMN.

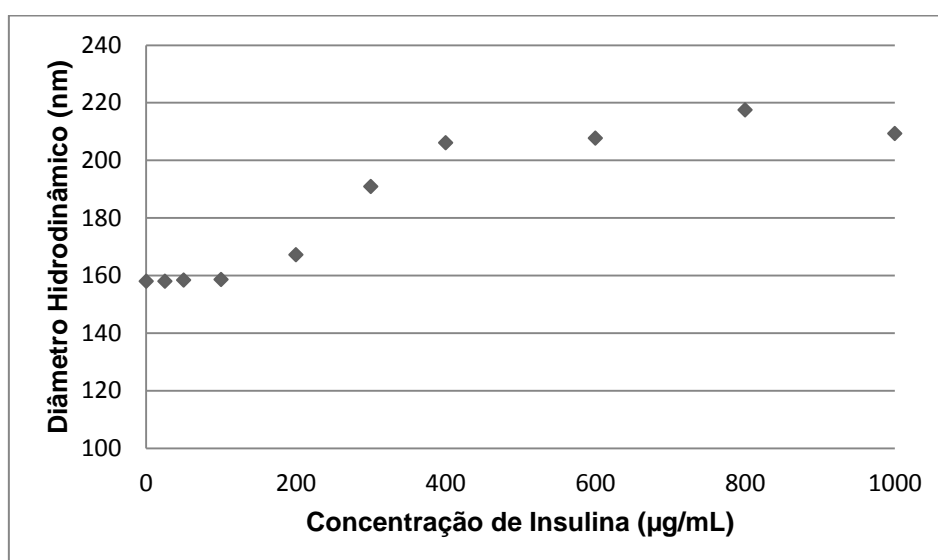


Tabela 4. Propriedades físico-químicas da In-MCMN₂₀₀.

Concentração	Diâmetro Hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
200 $\mu\text{g/mL}$	171 \pm 3	0,13 \pm 0,01	21,2 \pm 0,2

Foram realizadas análises de DLS para soluções aquosas de insulina e insulina+Zn²⁺, nas mesmas concentrações às utilizadas na funcionalização das nanocápsulas, para avaliar a sua distribuição de tamanho quando livres em solução, uma vez que há a possibilidade de ocorrer a formação de agregados da enzima em solução.

Nas soluções aquosas contendo apenas insulina e água ultrapura observa-se um perfil multimodal com a presença de população micrométrica sendo replicada nas três análises realizadas, enquanto que nas amostras as quais ocorrem a adição de íons zinco, duas análises apresentam perfil unimodal e apenas uma apresenta perfil multimodal. Essa disposição suporta o argumento de que existe a formação de diferentes agregados da enzima, quando livre em solução, enquanto que na presença de íons zinco ocorre a complexação da insulina, apresentando uma conformação preferencial, porém, de acordo com as análises, esse complexo não é replicável, uma vez que as três amostras apresentam picos em diferentes regiões de diâmetro.

Figura 10. Resultados de DLS para insulina + zinco em solução aquosa

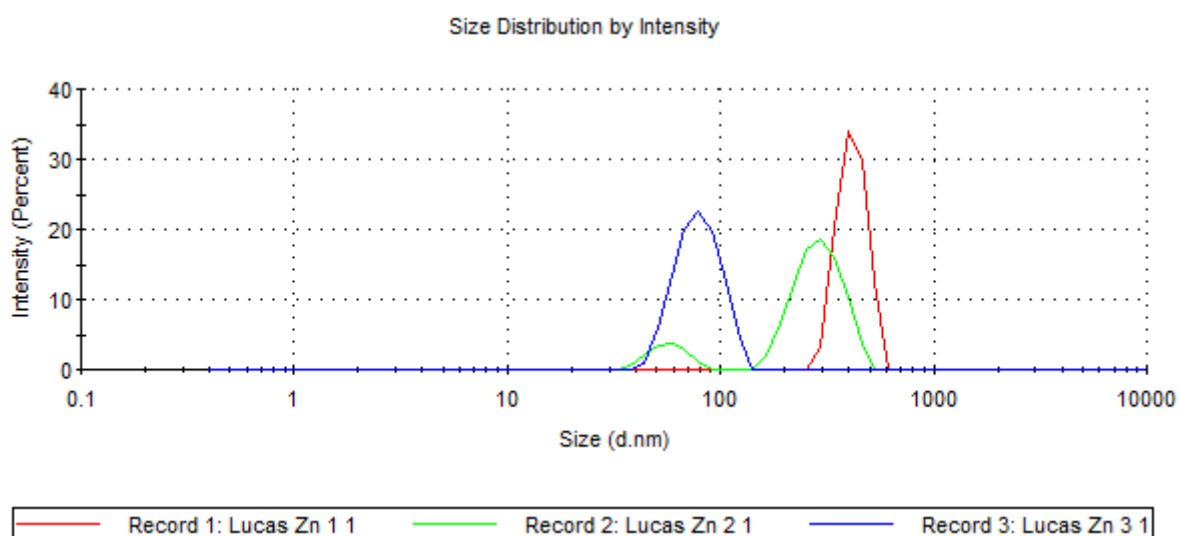
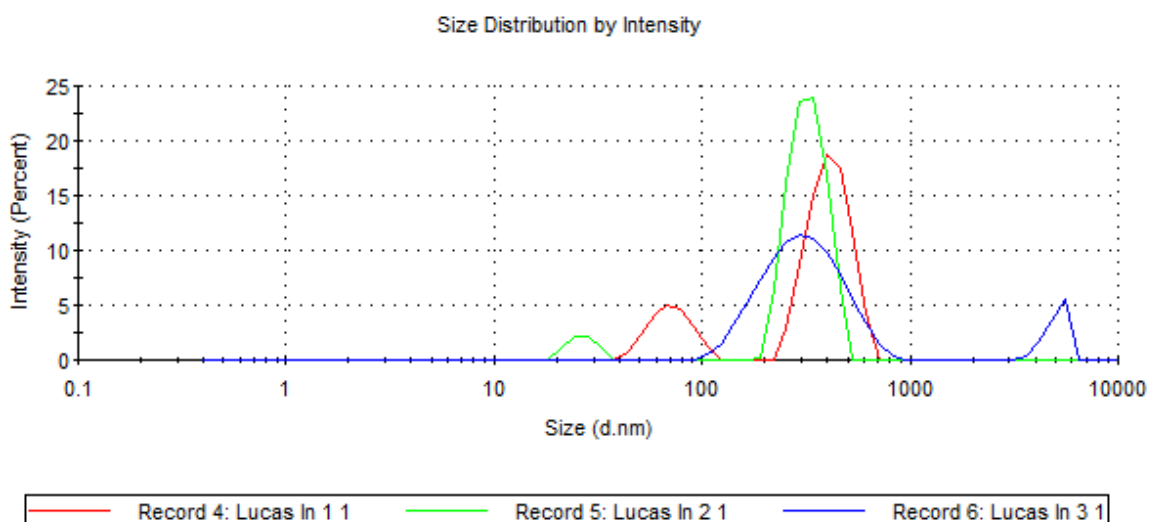


Figura 11. Resultados de DLS para insulina em solução aquosa



A eficiência de ligação foi determinada apenas para a In-MCMN₂₀₀, utilizando o QuantiPro[®] BCA Assay Kit, para a determinação da concentração de proteínas livres após a ultracentrifugação da suspensão de In-MCMN. Foram construídas duas curvas analíticas, uma para a albumina de soro bovino, proveniente do Kit e comumente utilizada como padrão, e outra para a insulina.

Tabela 5. Valores de absorvância medidos para a albumina.

Concentração (µg/mL)	Absorvância			Absorvância média
3	0,055	0,041	0,052	0,049
9	0,127	0,105	0,075	0,102
15	0,146	0,145	0,136	0,142
21	0,205	0,205	0,195	0,202
27	0,258	0,258	0,273	0,263

Tabela 6. Valores de absorvância medidos para a insulina.

Concentração (µg/mL)	Absorvância			Absorvância média
3	0,047	0,052	0,027	0,042
9	0,108	0,096	0,128	0,111
15	0,174	0,177	0,175	0,175
21	0,252	0,262	0,256	0,257
27	0,333	0,322	0,287	0,314

Figura 12. Curva analítica para a albumina.

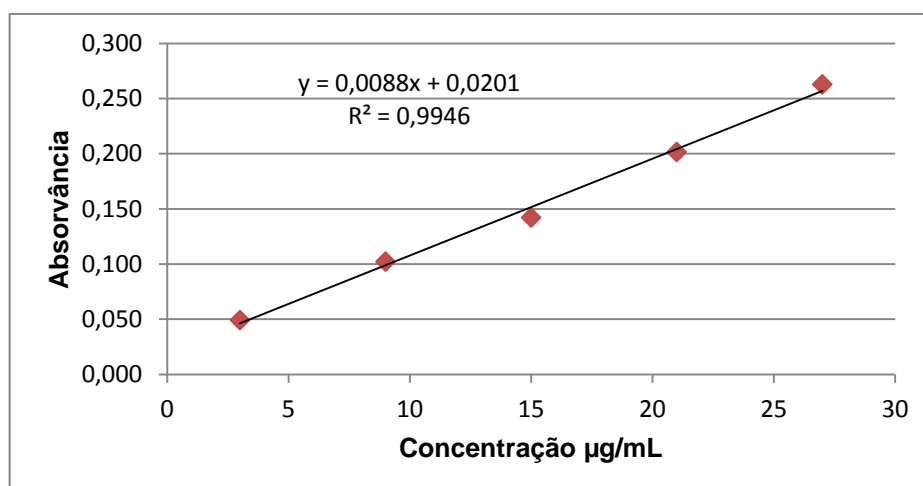
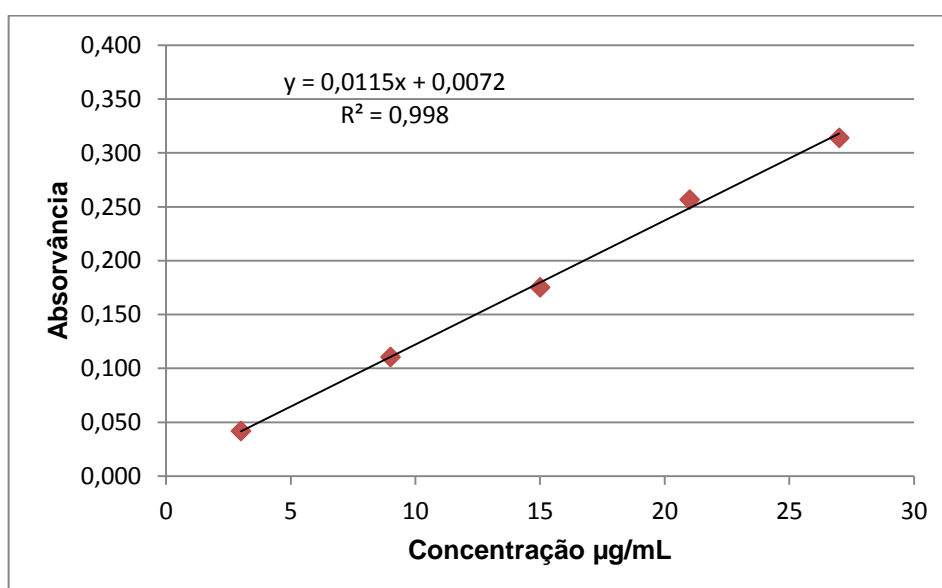


Figura 13. Curva analítica para a insulina.



A albumina de soro bovino é comumente utilizada como padrão para a curva analítica para a determinação de proteínas, devido ao seu baixo custo em comparação com algumas proteínas de trabalho além de sua boa adequabilidade e linearidade de resultados para curva analítica. Devido a disponibilidade de insulina para construção da curva analítica a mesma foi realizada com a enzima, para comparação de resultados frente a curva de albumina. Ambas apresentaram coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99, demonstrando linearidade no intervalo estudado e adequação ao método, porém a equação da reta se mostrou

diferente, comparando as duas curvas. Devido a possibilidade de utilizar a curva analítica com a proteína de estudo, por causa de sua linearidade e melhor adequabilidade aos resultados, a curva da insulina foi empregada como base para o cálculo das concentrações das amostras.

Foram coletados volumes conhecidos para a realização do teste de determinação de insulina e os mesmos foram adicionados na placa multipoços, juntamente com os reagentes de trabalho para a determinação.

Tabela 7. Dados da concentração de insulina complexada à MCMN

Eficiência de ligação	Absorvância	Concentração no filtrado ($\mu\text{g/mL}$)	Insulina complexada ao metal (%)
1	0,297	25,20	87,40
2	0,236	19,90	90,05

A concentração obtida a partir da absorvância, empregando a curva analítica da insulina, é referente a concentração da enzima no filtrado, quantificando o que não estava complexado a MCMN. Para calcular a concentração de insulina que efetivamente está complexada utilizou-se a Equação 1.

$$\%Lig = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde %Lig é a percentagem de insulina complexada à MCMN, C_i a concentração de insulina adicionada inicialmente à suspensão de nanocápsulas e C_f a concentração de insulina encontrada a partir da curva analítica. Na tabela 7 estão descritos os resultados encontrados para duas réplicas de análises, na primeira a concentração de insulina complexada ao metal ficou em 87,40%, enquanto que na segunda a concentração ficou em 90,05%.

7. ANÁLISE DE CUSTOS

A implementação do processo de funcionalização não requer equipamentos de elevado custo e grande especificidade, assim como não necessita de condições drásticas de ambiente para a sua realização, tais como altas temperaturas e pressões ou atmosfera inerte. Os equipamentos necessários para realização do processo são: banho ultrassônico, placas de agitação com aquecimento, balança analítica, evaporador rotatório e equipamento para obtenção de água ultrapurificada.

A viabilidade econômica das In-MCMN não pode ser realizada por comparação da formulação com a insulina disponível comercialmente, uma vez que de acordo com trabalhos previamente realizados foi verificado o aumento da atividade de fármacos complexados à MCMNs, porém, a razão de eficiência do fármaco complexado e livre em solução é variável. Esta comparação poderia ser realizada apenas após estudos posteriores, avaliando o comportamento das In-MCMN no organismo.

No entanto, os custos com a utilização da matéria-prima empregada para a formulação de 100 mL da formulação de In-MCMN₂₀₀ foram calculados e expressos na tabela 6.

Tabela 8. Custo dos insumos para formulação da In-MCMN₂₀₀

Insumo Utilizado	Quantidade	Valor (R\$)
PCL Mw ~ 14000	100 mg	0,33
PCL Mw ~ 80000	900 mg	2,83
Monoestearato de sorbitano	380 mg	0,60
Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico	1,7 mL	0,13
Acetona grau HPLC	270 mL	31,05
Etanol PA	40 mL	4,88
Lecitina de Soja	600 mg	12,07
Polissorbato 80	800 mg	0,31
Ácido acético glacial	300 µL	0,05
Quitosana de baixo peso molecular	300 µg	1,90
Acetato de zinco	28 mg	0,72
Insulina	20 mg	100,64
TOTAL para 100 mL	-	155,51

É salientado que o cálculo levou em consideração apenas o custo dos insumos empregados para a formulação, custos de eletricidade, manutenção de equipamentos, operador e análises posteriores não foram avaliados, devido à grande flutuação de valores dependendo da localização do laboratório, cuidados com equipamento e formação do operador. Os equipamentos necessários para a formulação são comumente encontrados em laboratórios, não sendo um empecilho para a implementação do método.

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram realizadas formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico e o seu revestimento com quitosana e íons zinco complexados à insulina. A otimização da quantidade de quitosana de baixo peso molecular e alto grau de desacetilação utilizada em solução para o total revestimento da LNC, contendo uma mistura de PCL $M_w \sim 14000$ e $M_w \sim 80000$, foi determinado por análises de potencial zeta, fixado em 1,5% (m/v) demonstrando que após este valor ocorre uma mudança de inclinação em função do aumento da concentração de quitosana, decorrente da formação completa da monocamada, saturando os sítios ativos.

A funcionalização da nanocápsula com insulina se mostrou possível através dos resultados de DLS e LD, demonstrando que após a adição da enzima até a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ não houve indícios de populações na escala micrométrica, caracterizando esta concentração como a concentração de saturação de insulina suportada pela MCMN.

As análises de DLS da insulina livre e na presença de íons zinco em solução, quando comparadas às análises de DLS da In-MCMN, apresentaram diferenças acentuadas de disposição modal dos perfis, assim como uma reprodutibilidade de organização da insulina quando complexada ao zinco na superfície da MCMN, não demonstrando a presença de aglomerados.

A possibilidade da funcionalização de nanocápsulas de núcleo lipídico com insulina, assim como a determinação de sua concentração de saturação e eficiência de ligação, abrem caminhos para estudos posteriores relacionados a nanocápsula funcionalizada e para melhor avaliar a sua viabilidade como método alternativo para a administração de insulina.

REFERÊNCIAS:

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>. Acesso em: 20 set. 2018.
2. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. O que é a diabetes. Disponível em: <[sociedade brasileira de diabetes. o que é a diabetes. disponível em: https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/oque-e-diabetes](https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/oque-e-diabetes)>. acesso em: 20 set. 2018.>. Acesso em: 20 set. 2018.
3. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/type-2/facts-about-type-2.html?loc=db-slabnav>>. Acesso em: 26 set. 2018.
4. DODSON, Guy; STEINER, Don. The role of assembly in insulin's biosynthesis . **Current opinion in structural biology**, v. 8, n. 2, p. 189-194, abr. 1998
5. DIABETES EDUCATOR. **Learning how to inject insulin**. Disponível em: <https://www.diabeteseducator.org/docs/default-source/legacy-docs/_resources/pdf/general/insulin_injection_how_to_aade.pdf>. Acesso em: 28 set. 2018.
6. SOUZA, Carla Regina De; ZANETTI, Maria Lúcia. Administração de insulina: uma abordagem fundamental na educação em diabetes.. **Revista da escola de enfermagem da USP** v. 34, n. 3, p. 264-270, 2010.
7. MEDICINENET. **Pancreatic cysts**. Disponível em: <https://www.medicinenet.com/pancreatic_cysts/article.htm>. Acesso em: 02 out. 2018.

8. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Aplicação da insulina: dispositivos e técnica de aplicação**. 2014-2015.
9. DIABETES TASMANIA. **Insulin**. Disponível em: <<https://www.diabetestas.org.au/insulin>>. Acesso em: 29 set. 2018.
10. T. KARAMITSOS, Dimitrios. The story of insulin discovery. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Thessaloniki, v. 93, n. 1, ago. 2011.
11. Blundell T, Dodson G, Hodgkin D, Mercola D 1972 Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Adv Protein Chem* 26:279-402
12. DIABETES.CO.UK. **The global diabetes community**. Disponível em: <<https://www.diabetes.co.uk/body/insulin.html>>. Acesso em: 26 set. 2018.
13. MEYTS, Pierre De. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* 26:1351–1362, 2004.
14. FU, Zhuo; GILBERT, Elizabeth R.; LIU, Dongmin. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 9, p. 25-53. 2013.
15. WANG, Y John; PEARLMAN, Rodney. **Stability and characterization of protein and peptide drugs: Case Histories**. 5 ed. New York: Plenum, 1993. 316-321 p.
16. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. [Updated 2014 Feb 1]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>
17. BYRNE, James D.; BETANCOURT, Tania; BRANNON-PEPPAS, Lisa. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1615-1626, 2008.

18. HÖGLUND, A. Controllable degradation product migration from biomedical polyester-ethers. KTH, **Chemical Science and Engineering**, v. 8, n. 6, p. 2025 – 2032, 2007.
19. SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.
20. BENDER, E. A. et al. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scfv anti-Idl(-) -functionalized nanocapsules. **Pharmaceutical research**, New york, p. 2975-2987, mai. 2014.
21. JORNADA, D. S. et al. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft matter**, v. 8, p. 6646-6655, 2012.
22. OLIVEIRA, C. P. et al. Bromelain-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: formulation, chemical structure and antiproliferative effect against human breast cancer cells (mcf-7). **Pharmaceutical research**, New york, v. 8, p. 438-452, 2016.
23. SINGH, Rajesh; W. LILLARDJR., James. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and molecular pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.
24. ADORNE M. **One-pot síntese de nanocápsulas multiparedes funcionalizadas com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL(-): otimização do processo e seleção de formulação**. Dissertação de Mestrado, UFRGS, 2014.
25. WEB OF SCIENCE. **Web of science**. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez45.periodicos.capes.gov.br/wos_generalsearch_input.do?product=wos&search_mode=generalsearch&sid=7el2oamb4ytmpk84h5z&preference_ssaved=>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

26. MAYER, F. et al. Laronidase-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: promising formulation for a more effective treatment of mucopolysaccharidosis type i. **Pharmaceutical research**, v. 32, n. 3, p. 941-954, 2015.
27. HRNČÍŘOVÁ, Michaela; POSPÍŠIL, Jiří; ŠPILÁČEK, Michal. Size analysis of solid particles using laser diffraction and sieve analysis. **Engineering mechanics**, v. 20, p. 309-318, 2013.
28. STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean A.; PATEL, Trushar R.. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409-417, 2016.
29. SALOPEK, Branko; KRASIĆ, Dragan; FILIPOVIĆ, Suzana. Measurement and application of zeta-potential . **Rudarsko-geoloiko-naftni zbornik** , v. 4, p. 147-151, 1992.
30. BALL, Stephen. Measuring protein mobility with electrophoretic light scattering. **Biopharm international**, v. 26, n. 5, 2013.
31. SMITH, P. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, Rockford, illinois, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.
32. Sigma-Aldrich Technical Bulletin: QuantiProä BCA Assay Kit . Acesso em 08 nov 2018.
33. OLIVEIRA, C. P. de et al. Enhanced and selective antiproliferative activity of methotrexate-functionalized-nanocapsules to human breast cancer cells (mcf-7). **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, 2018.
34. ANTONOW, M. B. et al. Arginylglycylaspartic acid-surface-functionalized doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to target alpha(v) beta(3) integrin expressed on tumor cells. **Nanomaterials**, v. 8, n. 2, 2017.

35. CALGAROTO, S. et al. Chemical stability, mass loss and hydrolysis mechanism of sterile and non-sterile lipid-core nanocapsules: the influence of the molar mass of the polymer wall. **Reactive and functional polymers**, v. 133, p. 161-172, 2018.