

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
Departamento de Farmácia - Escola de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos
Sub-área: Estudo e Desenvolvimento de Medicamentos

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE POLOXÂMERO 407 CONTENDO
INSULINA E ÓLEO DE BURITI E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO
HIPOGLICÊMICO APÓS ADMINISTRAÇÃO RETAL EM RATAS FISCHER.**

Luana Christian Gonçalves da Silva

Orientador: Prof. Dr. José Mario Barichello
Co-orientador: Dr.^a Prof.^a Daniela Caldeira Costa

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil
Novembro de 2015

LUANA CHRISTIAN GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE POLOXÂMERO 407 CONTENDO
INSULINA E ÓLEO DE BURITI E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO
HIPOGLICÊMICO APÓS ADMINISTRAÇÃO RETAL EM RATAS FISCHER.**

Dissertação, como requisito parcial,
para obter o grau de mestre em
Ciências Farmacêuticas, submetida
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Escola de
Farmácia da Universidade Federal de
Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. José Mario
Barichello – UFOP
Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Daniela
Caldeira Costa

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

Novembro de 2015

S586d Silva, Luana Christian Gonçalves da.
Desenvolvimento de formulação de poloxâmero 407 contendo insulina e óleo de buriti e avaliação in vivo do efeito hipoglicêmico após administração retal em ratas Fischer [manuscrito] / Luana Christian Gonçalves da Silva. - 2015.
71f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Mario Barichello.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Farmácia. Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Diabetes - Aspectos nutricionais. 2. Insulina. 3. Ácido Oleico. 4. Óleo de Buriti. I. Barichello, José Mario. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.379.008.64



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIAS
FARMACEUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Luana Christian Gonçalves da Silva

Desenvolvimento de formulação de poloxâmero 407 contendo insulina e óleo de buriti e avaliação *in vivo* do efeito hipoglicêmico após administração retal em ratas fisher

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de novembro de 2015.

Membros da banca

Doutor José Mário Barichello - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutor Whocely Victor de Castro - Universidade Federal de São João Del Rei
Doutora Glenda Nicioli da Silva - Universidade Federal de Ouro Preto

José Mário Barichello, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 22/02/2016.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Morais Ruela, COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**, em 15/06/2022, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0345876** e o código CRC **BA7B8259**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.007894/2022-70

SEI nº 0345876

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: - www.ufop.br

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof.^a Dr.^a Daniela Caldeira
Msc. Pedro Henrique de Amorim Miranda
Laboratório de Bioquímica Metabólica
Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas - ICEB
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Ouro Preto, MG

Prof.^a Dr.^a Ivanildes Vasconcelos Rodrigues - UFJF
Msc. Janaína Brandão Seibert - UFOP
Laboratório de Química Orgânica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo – USP
Ribeirão Preto, SP

Dedico este trabalho ao meu irmão. Eu sei que aonde ele estiver está sempre torcendo por mim e me protegendo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu sempre agradeço a Deus, pela força e a esperança que ele me dá para correr atrás dos meus sonhos;

Aos meus pais, que com certeza sem a ajuda deles e o amor eterno eu não teria chegado tão longe na vida;

A minha irmã Paloma pelo apoio e amor. Ao meu irmão Hans Müller (*in memoriam*), que apesar da ausência física nessa etapa da minha vida, me proporcionou muitos momentos e lembranças felizes e eu sei que de alguma forma ele está sempre presente;

A minha família, em especial a minha prima Isabela, por ser minha segunda irmã;

A gloriosa Escola de Farmácia, pelos ensinamentos e por me proporcionar mais um título;

Ao meu orientador José Mario Barichello e a professora Daniela Caldeira Costa, pela orientação;

Ao professor Bibó, pela ajuda, conselhos e chocolates;

Ao Lucas, pelo companheirismo durante esses dois anos, pela amizade e pelo apoio, principalmente nos momentos difíceis;

A minha querida amiga Janine, e meu amigo Renan por me ajudarem e me apoiarem nos momentos mais difíceis, nunca deixaram eu desistir;

Aos jovens do laboratório, Tamires, Janaína, Fernanda, Regislaine, Tatiane, Simone, Karen e Pedro pela amizade, happy hours e risadas que sempre alegravam meus dias;

A Janaína, Tatiane e Regislaine, pela imensa ajuda nas análises cromatográficas. E agradeço também a Janaína e todos do antigo Laboratório de Farmacognosia por terem aberto as portas do laboratório e nos recebido muito bem.

A todos os técnicos, funcionários e amigos do Cipharma, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho;

Aos alunos do laboratório, Bruna e Elite, pela ajuda.

Ao Pedro, mestre Ralf, pela sua ajuda, por me passar os seus conhecimentos que foram extremamente importantes para a realização desse projeto e pelas suas imensas zuações;

A Thaís, pequena, pela amizade e pelos momentos de distração;

Ao Aldo, técnico do biotério da Escola de Nutrição, por toda sua ajuda e boa vontade;

A Kênia, e a Brenda, pela sua amizade sincera, apoio e por sempre acreditarem no meu potencial;

Aos meus amigos de BH, Nayara, Chris e Samuel;

A Ingridy e a Letícia, por sempre me escutarem, pela amizade e companhia de todos os dias;

Ao Breno e a Vanessa, pela imensa confiança, ajuda, apoio, compreensão, ensinamentos, amizade, pela oportunidade e pela experiência, que contribuíram muito com a minha vida profissional e pessoal, muito obrigada.

A mansão e gloriosa República Tan Tan e todas as moradoras (Nathalia, Brenda, Rebeca, Taís Kuster, Thaís Lacerda e Marina), por ser sempre a minha segunda família, me recebendo sempre bem.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

“Tem uma verdade que se carece de aprender, do encoberto, e que ninguém não ensina; o beco para a liberdade se fazer. Sou um homem ignorante. Mas, me diga o senhor: a vida não é coisa terrível?! O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. **O que ela quer da gente é coragem.**”

Guimarães Rosa

RESUMO

O Diabetes mellitus é uma doença metabólica que afeta milhões de pessoas no mundo, levando a diversos problemas. A descoberta da insulina, em 1921, permitiu o tratamento desta doença. Porém, a via de administração do fármaco é a injetável, a qual representa um grande desconforto, limitando a adesão de pacientes ao tratamento com insulina. A via oral seria a mais confortável para a administração da insulina, entretanto a degradação enzimática no trato gastrointestinal e sua baixa lipofilia impedem o seu uso por essa via. O óleo de buriti (OB) é um produto natural contendo várias substâncias de interesse terapêutico e tecnológico, como, por exemplo, carotenoides, α -tocoferol e vitamina C, além de conter grande quantidade de ácidos graxos, principalmente o ácido oleico (AO), reconhecido promotor de permeação de moléculas como a INS. Nesse estudo, solução micelar de poloxâmero 407 (P407) contendo OB e INS foi desenvolvida e o efeito hipoglicêmico desta formulação contendo INS foi avaliado *in vivo*. A análise quantitativa do OB realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas demonstrou o ácido oleico como ácido graxo majoritário do óleo (71,67%), seguido do ácido palmítico (15,61%). A avaliação do microambiente micelar da formulação P407+OB+INS por espectrofluorimetria utilizando o pireno como sonda fluorescente demonstrou que a adição de OB reduziu consideravelmente a polaridade das micelas. A formulação P407+OB+INS apresentou tamanho médio de gotículas de 300 nm, com índice de polidispersão de 0,46 e potencial zeta de -44 mV. No estudo *in vivo* utilizando ratas albinas da linhagem Fischer, P407+OB+INS administrada por via retal apresentou importante efeito hipoglicemiante ao longo do tempo de 6 horas do experimento, enquanto a formulação contendo AO utilizado como controle positivo, apresentou um forte pico hipoglicêmico em 1 hora, retornando aos níveis glicêmicos normais ao final do tempo de 6 horas. Em ratas diabéticas, a formulação P407+OB+INS apresentou resultados semelhantes, porém, o efeito hipoglicêmico foi mais acentuado que nos animais saudáveis. Com isso, conclui-se, que OB, apresentou potencial para se tornar um importante agente promotor de permeação de fármacos, incluindo proteínas e peptídeos, sendo uma alternativa interessante para o desenvolvimento de formulações não invasivas de INS.

Palavras chaves: Diabetes Mellitus, Insulina, Poloxâmer 407, Óleo de Buriti, Ácido oleico.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disorder that affects millions of people worldwide, leading to several problems. The discovery of insulin (INS) in 1921 enabled the treatment of this disease. However, INS is usually administered by injections, which causes a great discomfort, limiting patient adhesion to the treatment with INS. Oral administration would be most appropriate for administering INS, however, enzymatic degradation in the gastrointestinal tract and its low lipophilicity limit its use by this route. Buriti oil (OB) is a natural product containing several substances with therapeutic and technological interest such as, carotenoids, α -tocopherol and vitamin C, it also contains large amounts of fatty acids, mainly oleic acid (AO), a well-known permeability enhancer of molecules like INS. In this study, a micellar solution of poloxamer 407 (P407) containing OB and INS was developed and the hypoglycemic effect of this formulation containing INS was evaluated *in vivo*. The quantitative analysis of OB realized by gas chromatography coupled to mass spectrometry showed oleic acid as the major fatty acid (71,67%), followed by palmitic acid (15,61%). The evaluation of the micellar microenvironment of P407+OB+INS by spectrofluorimetry using pyrene as a fluorescent probe showed that the addition of OB significantly reduced the polarity of the micelles. The P407+OB+INS formulation had an average droplet size of 300 nm with a polydispersity index of 0,46 and a zeta potential of -44 mV. In the *in vivo* study using female Fischer rats, P407+OB+INS administered rectally showed an important hypoglycemic effect along of the 6 hours of the experiment while the formulation containing AO used as positive control, showed a strong hypoglycemic peak in 1 hour, returning to the normal glucose levels at the end of 6 hours. In diabetic female rats, the P407+OB+INS showed similar results, however, the hypoglycemic effect was more pronounced than in healthy female rats. Therewith, it is concluded that OB showed potential to become an important enhancer of permeation of drugs, including proteins and peptides, been an interesting alternative for the development of noninvasive INS formulation.

Key words: Diabetes Mellitus, Insulin, poloxamer 407, Buriti oil, oleic acid.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AG	ácido graxo
AO	ácido oleico
Et. al	Colaboradores
FDA	food and drugs administration
g	Gramas
HCl	ácido clorídrico
HLB	equilíbrio hidrófilo-lipófilo
HPLC	high performance liquide chromatography
INS	Insulina
mg/g	miligramas/gramas
M	Mol
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
NaOH	hidróxido de sódio
OB	óleo de buriti
OE	óxido de etileno
OP	óxido de propileno
p/p	peso/peso
P407	poloxâmer 407
P407+OB	poloxâmer 407 + óleo de buriti
P407+INS	poloxâmer 407 + insulina
P407+AO+INS	poloxâmer 407 + ácido oleico + insulina
P407+OB+INS	poloxâmer 407 + óleo de buriti + insulina
R ²	coeficiente de correlação linear
v/v	volume/volume
μL	Microlitros

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Distribuição de pessoas diabéticas no mundo (Adaptado de OMS, 2011)	18
Tabela 2 Início e duração de ação das insulinas e análogos (Adaptado de WANNMACHAR, 2005)	24
Tabela 3 Ácidos graxos presentes no óleo de buriti (Adaptado de INDUSTRY, 2015)	38
Tabela 4 Descrição das formulações desenvolvidas e avaliadas no estudo <i>in vivo</i>	42
Tabela 5 Compostos encontrados no óleo de buriti	49
Tabela 6 Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta das micelas/gotículas das formulações	51
Tabela 7 Valores obtidos da relação I1/I3 das formulações	55

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Produção da molécula de insulina	22
Figura 2.	Estrutura da pró-insulina	22
Figura 3.	Monômero, dímero e hêxamero da insulina humana	23
Figura 4.	Farmacocinética das insulinas humanas e análogos disponíveis no mercado	24
Figura 5.	Estrutura dos análogos da insulina humana: Lispro, asparte, glulisina, glargina e detemir	27
Figura 6.	Difusão Paracelular e Transcelular	28
Figura 7.	Dispositivo aprovado para administração de insulina inalável	31
Figura 8.	Poloxamer 407 copolímero tribloco	33
Figura 9.	Representação esquemática dos mecanismos de associação dos monômeros do Poloxâmero 407 em água	34
Figura 10.	Fotografia representativa da palmeira de buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	35
Figura 11.	Frutos do buriti descascados	36
Figura 12.	Imagem ilustrativa do óleo de buriti	37
Figura 13.	Fórmula estrutural do ácido oleico	39
Figura 14.	Fórmula estrutural do ácido linoleico (ômega 6)	39
Figura 15.	Fórmula estrutural do ácido palmítico	40
Figura 16.	Aspecto da formulação de P407 contendo óleo de buriti em diferentes estágios de preparação.	45
Figura 17.	Comatograma do ácido oleico puro. Análise realizada no aparelho Shimadzu, modelo QP2010	46
Figura 18.	Cromatograma obtido da análise do óleo de buriti em GC-MS. Análise realizada no aparelho Shimadzu, modelo QP2010	46
Figura 19.	Comparação dos espectros de massas referente ao pico do ácido palmítico encontrado no OB (A) e do ácido palmítico puro encontrado na base de dados da Wiley Mass Spectral Database.	47
Figura 20.	Comparação dos espectro de massas referente ao pico do ácido oleico encontrado no OB (A) e do ácido oleico puro (B) encontrado na base de dados da Wiley Mass Spectral Database.	48
Figura 21.	Comparação dos espectro de massas referente ao pico do ácido linoleico	49

encontrado no OB (A) e do ácido linoleico puro encontrado na base de dados da Wiley Mass Spectral Database

- Figura 22.** Espectro de fluorescência das formulações 54
- Figura 23.** Curva dos níveis séricos de glicose, após administração retal das 5
formulações preparadas em ratas albinas, saudáveis, da linhagem Fischer 56
- Figura 24.** Níveis séricos de glicose após administração retal da formulação
P407+OB+INS em ratas albinas Fischer diabéticos e saudáveis 59

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE SIGLAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Diabetes Mellitus	18
3.2. Insulina	21
3.3. Poloxâmero – 407	33
3.4. Óleo de Buriti	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Materiais	41
4.2. Análise do óleo de buriti por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas	41
4.3. Preparo das formulações	42
4.4. Determinação do tamanho médio e do potencial zeta das micelas/gotículas da formulação	42
4.5. Análise espectrofluorimétrica da formulação	43
4.6. Avaliação <i>in vivo</i> efeito hipoglicêmico das formulações	43
4.6.1. Animais saudáveis	43
4.6.2. Avaliação do efeito hipoglicêmico da formulação P407 + OB + INS em ratas albinas da linhagem Fischer diabéticas	44
4.6.3. Análise Estatística	44

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Análise do óleo de buriti por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas	45
5.2. Tamanho médio e potencial zeta das micelas/gotículas das formulações	50
5.3. Leitura espectrofluorimétrica	53
5.4. Avaliação do efeito hipoglicêmico <i>in vivo</i>	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus sempre foi um grande problema para os sistemas de saúde no mundo inteiro. Diversos fatores, como, sedentarismo, dieta inadequada, obesidade, entre outros, são responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do diabetes no mundo, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Os tipos de diabetes prevalentes são do tipo 1 e tipo 2. No diabetes do tipo 1 os pacientes necessitam da administração da insulina para controlar a hiperglicemia. Já no diabetes tipo 2, os pacientes utilizam, além de medicamentos hipoglicemiantes para o tratamento, a insulina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A insulina (INS) é um hormônio secretado pelas células do pâncreas, sendo principalmente administrada pela via subcutânea, no intuito de se obter níveis plasmáticos deste hormônio idênticos aos da secreção fisiológica de indivíduos saudáveis (SILVA *et al.*, 2003b).

Existem diversos estudos propondo vias alternativas não invasivas de administração de INS (HOFFMAN; ZIV, 1997), devido aos inconvenientes ocasionados pela administração parental como dor local, injeções múltiplas, hipoglicemia (no caso de superdose), coceira, alergia, hiperglicemia e lipodistrofia em torno do local da injeção (PAMNANI, 2008), que comprometem a adesão do paciente ao tratamento (SILVA *et al.*, 2003).

Porém, muitas destas vias também apresentam fatores limitantes a administração da INS, como, por exemplo, a via oral, que limita à administração de fármacos peptídicos devido a degradação proteolítica no trato gastrointestinal, além da baixa permeabilidade da molécula através da mucosa (SILVA *et al.*, 2003b).

Estratégias para melhorar as formulações, proteger a INS e aumentar a sua biodisponibilidade oral incluem encapsulamento em sistemas de liberação de fármacos, uso de promotores de absorção (sais biliares, salicilatos, ácidos graxos insaturados) e substâncias inibidoras de proteases (ONUKE *et al.*, 1999), além do uso de formulações específicas, como sistemas micelares, emulsões, sistemas bioadesivos (SILVA *et al.*, 2003a). Os promotores de absorção do tipo ácidos graxos têm a vantagem de serem compostos endógenos presentes como lipídios da pele humana e de biomembranas (ONUKE *et al.*, 1999).

Os géis aquosos do poloxâmico 407 (P407), um tensoativo não iônico, apresentam a propriedade de serem sistemas bioadesivos termo reversíveis, quando a concentração do polímero usada for igual ou maior que 20% (SCHMOLKA, 1991; DUMORTIER *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Barichello e colaboradores (1999a) demonstraram que as características de P407, combinadas às propriedades dos ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, resultaram num marcante efeito hipoglicêmico de INS após administração retal em ratos normais. Além disso, resultados sugerem que o uso do ácido oleico na formulação de P407, além de aumentar a viscosidade dessas soluções, também, controla a liberação de INS a partir da matrix do gel obtido (MORISHITA *et al.*, 2001).

O óleo extraído dos frutos da *Mauritia flexuosa*, comumente chamado de óleo de buriti (OB), é rico em β -caroteno, vitamina A, tocoferóis e ácidos graxos (MANHÃES; SABAA-SRUR, 2011). O OB, devido ao elevado teor de α -tocoferol possui potente ação antioxidante. Além disso, os carotenoides presentes possuem ação muco-protetor (MANHÃES; SABAA-SRUR, 2011).

Considerando a riqueza da flora brasileira e o importante estudo sobre as suas espécies vegetais, o uso do OB, extraídos dos frutos do buriti, espécie vegetal rica na flora brasileira, contribui para o cultivo e a produção dos frutos dessa espécie nativa, gerando renda associada ao processo de extração, produção e recuperação das espécies. Contribuindo também para o meio ambiente e conservação desse bioma.

Desta forma, neste projeto propõe-se desenvolver e caracterizar formulação de P407 contendo OB e INS, e avaliar e comparar *in vivo* o efeito hipoglicêmico desta formulação com outras formulações contendo INS após administração retal em ratas albinas da linhagem Fischer.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos geral

Desenvolver e caracterizar formulação P407 contendo INS e OB e avaliar *in vivo* o efeito hipoglicêmico após administração retal em ratas albinas da linhagem Fischer.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a composição do óleo de buriti;
- Preparar formulação de P407 contendo INS e OB;
- Determinar o tamanho médio das micelas/gotículas utilizando o aparelho Nanosizer N5 (Beckman Coulter, EUA);
- Determinar o potencial zeta das micelas/gotículas utilizando o aparelho Nanosizer N5 (Beckman Coulter, EUA);
- Avaliar o microambiente micelar (hidrofilicidade das formulações por espectrofluorimetria usando o pireno como sonda fluorescente);
- Avaliar *in vivo* o efeito hipoglicêmico das formulações contendo INS após administração retal em ratas albinas Fischer saudáveis.
- Comparar o efeito hipoglicêmico da formulação contendo INS e OB administradas por via retal em ratas albinas Fischer saudáveis e diabéticas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus é uma doença metabólica em que, o paciente apresenta um quadro hiperglicêmico associado a diversas complicações e disfunções de vários órgãos. A hiperglicemia pode ser devido a defeitos na secreção ou ação da INS causada por processos patogênicos específicos, como, destruição das células beta do pâncreas, resistência à ação da INS, distúrbios da secreção da INS, etc. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O número de indivíduos diabéticos vem crescendo ao redor do mundo (Tabela 1). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2015), a quantidade de pessoas diabéticas no mundo chega a cerca de 382 milhões, com perspectiva de atingir 471 milhões de pessoas em 2035. Dados publicados em um relatório da OMS em 2015 mostram que o diabetes mellitus está entre as três doenças não transmissíveis, responsáveis pelo maior número de mortes no mundo, com aproximadamente 1,3 milhões, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares e do câncer.

Tabela 1

Distribuição de pessoas diabéticas no mundo

Países	Quantidade em milhões
AMÉRICA DO NORTE	37,0
AMÉRICA DO SUL E CENTRAL	24,0
EUROPA	56,0
ÁFRICA	45,0
PACÍFICO	49,0
SUDESTE DA ÁSIA	72,0
MEDITERRÂNEO ORIENTAL E ORIENTE MÉDIO	138,0

Fonte: (Adaptado da OMS, 2015).

De acordo com o Sociedade Brasileira de Diabetes (2015), o Brasil se encontra atualmente na 4ª posição, atrás apenas da China em 1º lugar (92,3 milhões), Índia em 2º lugar (63 milhões) e dos Estados Unidos, 3º lugar (24,1 milhões) com cerca de 11,6 milhões de diabéticos, 8,7% da população na faixa etária de 20 a 79 anos. O aumento da prevalência da diabetes mellitus está relacionado a diversos fatores, como, por exemplo, o crescimento e o

envelhecimento da população, a urbanização, os hábitos alimentares, obesidade, sedentarismo entre outros (SBD, 2014).

O diabetes pode ser classificado em quatro categorias clínicas (SBD, 2014):

- Diabetes mellitus Tipo 1: também conhecida como diabetes juvenil, é causada pela destruição por processos autoimunes da célula beta do pâncreas, o que leva a uma deficiência absoluta de INS. A administração de INS nesses casos é fundamental, evitando o processo de cetoacidose, coma e morte.
- Diabetes mellitus Tipo 2: é o mais prevalente, conhecida como diabetes do adulto, é causada por uma deficiência relativa de INS, a administração de INS nesses casos, tem como objetivo controlar a hiperglicemia, que se desenvolve lentamente, podendo permanecer assintomática por vários anos.
- Diabetes mellitus gestacional (DMG): o diabetes gestacional é um estágio pré-clínico da doença, detectado durante o pré-natal da gestante e geralmente se resolve depois do pós-parto, mas com possibilidade de retorno no futuro.
- Outros tipos específicos de diabetes: resultam de defeitos genéticos da função das células β , defeitos genéticos da ação da INS, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, efeito colateral de medicamentos, infecções e outras síndromes genéticas associadas ao diabetes mellitus.

O diagnóstico precoce da doença pode ser realizado através de sintomas como: fadiga, poliúria, sede excessiva, cansaço, fome, perda de peso, má cicatrização, formigamento e visão turva (GUIMARÃES, 2012). O Diabetes mellitus pode ser confirmado por exames laboratoriais, pela quantidade aumentada de açúcar no sangue e por sua presença na urina. Indivíduos que apresentam uma taxa de glicemia de jejum entre 100-126 mg/dl são considerados pré-diabéticos e acima do valor de 126 mg/dl são classificados como diabéticos (ALMEIDA, 2014).

Quando os níveis de glicemia de jejum estão acima dos valores indicados, recomenda-se realizar o teste de tolerância oral à glicose (TTGO), que deve ser realizado também em pessoas que possuem risco de desenvolver a doença. Neste teste é determinada a glicemia de jejum, e a glicemia 120 minutos após a ingestão de 75 g de glicose anidra em 300 mL de água. O paciente é considerado diabético quando a glicemia de jejum apresenta valores maiores ou iguais a 126 mg/dL ou a glicose plasmática após o TTGO apresentar valores maiores ou iguais a 200 mg/dL (ALMEIDA; FERRÃO; ZANGERONIMO, 2014).

As análises de hemoglobina glicada (HbA1c), tem o objetivo de monitorar o controle do diabetes. Essa hemoglobina é formada através de reações entre a hemoglobina contida nas hemácias e a glicose plasmática. O exame deve ser realizado trimestralmente, permitindo analisar a glicemia de paciente diabético por um período de 60 a 90 dias. Os valores desejáveis devem estar abaixo de 6,5% (ALMEIDA; FERRÃO; ZANGERONIMO, 2014).

A hiperglicemia traz inúmeras complicações agudas e crônicas para o paciente diabético, e são as responsáveis pela morbidade e mortalidade destes. As complicações agudas do diabetes mellitus incluem a cetoacidose diabética, o estado hiperglicêmico hiperosmolar que apresenta mortalidade na faixa de 15% e a hipoglicemia, que apresenta elevada mortalidade, na faixa de 5% (KLAFKE et al., 2014). As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte (52%) em pacientes diabéticos do tipo 2 (GROSS; NEHME, 1999), seguido pela retinopatia que acomete cerca de 40% dos pacientes diabéticos, sendo a principal causa de cegueira em pacientes entre 25 e 74 anos. Além disso, o diabetes é a principal causa de amputações no Brasil, causada pelas complicações do pé diabético (ALMEIDA, 2014).

As suas complicações, natureza crônica e o tratamento, torna o diabetes uma doença com alto custo tanto para o paciente e família, como para o sistema de saúde. Os custos não são apenas econômicos para o indivíduo, causando grande impacto na vida dos doentes e nas de seus familiares (SBD, 2015). De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015), os custos diretos para o Brasil chegam a cerca de 3,9 bilhões de dólares. O Sistema Único de Saúde brasileiro tem um custo com o tratamento ambulatorial na ordem de 2.108,00 dólares por paciente. Além disso, pessoas diabéticas perdem a capacidade de trabalhar devido as complicações crônicas causada pela doença ou adquirem alguma limitação no seu desempenho profissional, o que diminui a sua produtividade.

O tratamento recomendado para pacientes diabéticos Tipo 2 é a realização de exercícios físicos diários, dieta adequada e uso de medicamentos hipoglicemiantes e aplicação de INS para o controle da glicemia, quando necessário, evitando ou retardando assim, as complicações da doença. No caso de pacientes diabéticos Tipo 1, que são considerados insulino dependentes, apenas a INS é usada como forma de tratamento (SBD, 2014).

A prevenção do diabetes pode ser realizada mediante prevenção do início da doença, prevenção primária, ou de suas complicações, prevenção secundária. A prevenção primária protege os indivíduos geneticamente suscetíveis de desenvolver a doença, principalmente em casos de pessoas que apresentam obesidade, hipertensão arterial e dislipidemia. As intervenções primárias além de evitar o surgimento de diabetes, também evitam doenças

cardiovasculares. Alterações no estilo de vida, como, por exemplo, modificando a alimentação e a realização de atividades físicas, são fatores que ajudam a combater o peso de pessoas com maior risco de desenvolver a doença (SBD, 2015).

Já na prevenção secundária, o controle metabólico tem papel importante no surgimento ou na progressão das complicações crônicas. Além disso, o tratamento da hipertensão arterial e dislipidemia reduz o risco de complicações. A prevenção de ulcerações nos pés e de amputações de membros inferiores podem reduzir a frequência e a duração de hospitalizações, além da incidência de amputações em 50%. A cegueira, causada na maioria dos pacientes diabéticos, pode ser evitada através do rastreamento para diagnóstico e do tratamento precoce da retinopatia. O diagnóstico precoce da microalbuminúria previne ou retarda a progressão da insuficiência renal. Além disso, medidas que reduzam o consumo de cigarro auxiliam no controle do diabetes, uma vez que o tabagismo está associado ao mau controle do diabetes e, conseqüentemente, da hipertensão e das doenças cardiovasculares nos indivíduos (SBD, 2015).

3.2 Insulina

A INS é um hormônio sintetizado pelas células betas das ilhotas pancreáticas. Ela foi descoberta em 1921, fato que permitiu o tratamento do diabetes mellitus Tipo 1, considerada até então uma doença fatal (DAVIS; GRANNER, 2005). Ela possui elevada massa molecular, cerca de 6 KDa (SILVA *et al.*, 2002), sendo sintetizada (Figura 1), a partir de um precursor de 110 aminoácidos de cadeia simples, a pré-pró-insulina. Este atravessa a membrana do retículo endoplasmático rugoso sendo clivado na posição do peptídeo de sinalização N terminal de 24 aminoácidos, formando a pró-insulina, dobrando a estrutura da molécula, levando a formação das pontes de dissulfeto. A pró-insulina (Figura 2) é então convertida em INS e em uma molécula de peptídeo C nas células do complexo de Golgi, onde 4 aminoácidos básicos (resíduo 31, 32, 64 e 65) são removidos, produzindo as duas cadeias peptídicas A e B da molécula de INS, a qual contém uma ponte dissulfeto intra-subunidade e duas inter-subunidades. A cadeia A é formada por 21 aminoácidos e a B por 30. As cadeias da molécula quando separadas a tornam inativa (DAVIS; GRANNER, 2005).

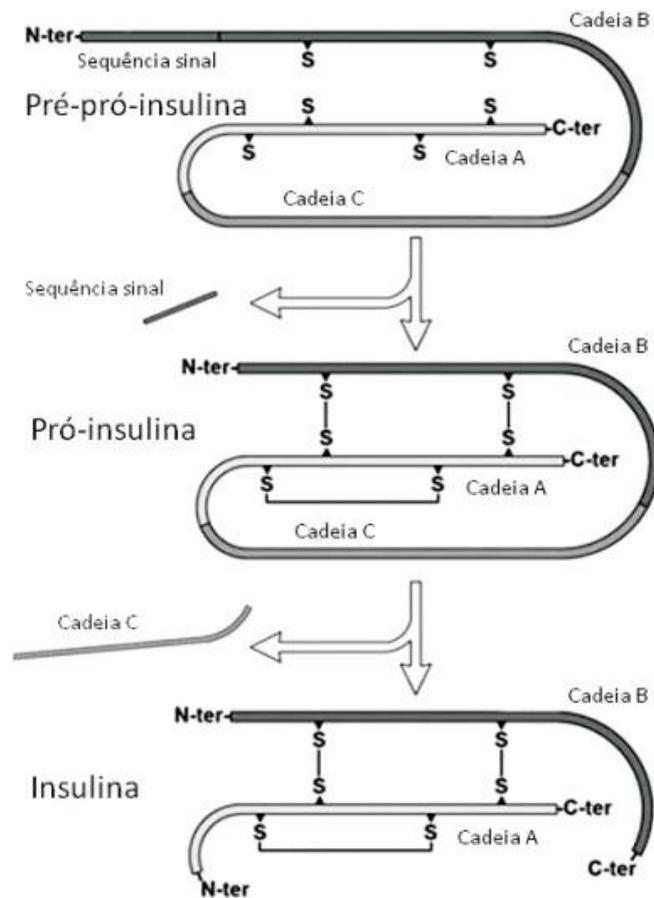


Figura 1 - Produção da molécula de insulina (Fonte: REIS, 2008).

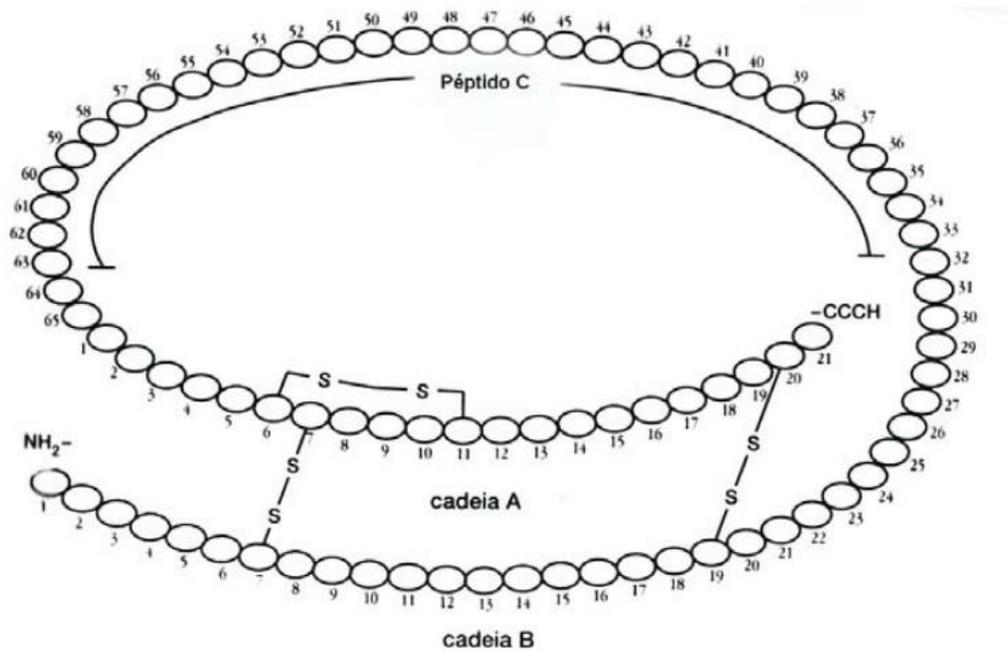


Figura 2 - Estrutura da pró-insulina (Fonte: DAVIS; GRANNER, 2005)

A molécula de INS, quando colocada em solução pode existir na forma de monômeros, dímeros ou hexâmeros (Figura 3) (SILVA *et al.*, 2003b). Na forma de hexâmero, a INS é armazenada nos grânulos das células β do pâncreas, onde as moléculas de Zn^{2+} são coordenadas no hexâmero, essas moléculas auxiliam na formação dos cristais de INS, facilitando a conversão da pró-insulina em INS, além de auxiliar no armazenamento (DAVIS; GRANNER, 2005).

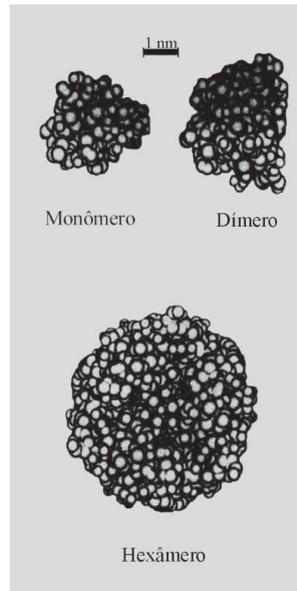


Figura 3 - Monômero, dímero e hexâmero da insulina humana (Fonte: SILVA *et al.*, 2003b).

Nas formulações de INS preparadas para a terapia, a INS está presente na forma hexomérica e, após a sua absorção, a concentração de INS baixa a níveis nanomolares, e a molécula se dissocia em monômeros (forma biologicamente ativa), ocorrendo então, a difusão paracelular (DAVIS; GRANNER, 2005).

A insulino terapia tem como objetivo a reposição lenta, contínua e de longa duração de INS, mimetizando o funcionamento normal do organismo humano. Por exemplo, a administração de uma forma de ação rápida e curta desse fármaco antes das refeições imita a secreção rápida e normal da INS estimulada pelas refeições. A INS é usualmente administrada pelas vias intravenosa, subcutânea e intramuscular (DAVIS; GRANNER, 2005), sendo que para tratamento de pacientes diabéticos Tipo 1 é utilizada a via subcutânea.

O perfil farmacocinético das diversas formulações de INS de administração subcutânea existentes no mercado varia de paciente para paciente, assim como no mesmo indivíduo em dias diferentes da aplicação. A quantidade de INS absorvida na via subcutânea varia de acordo com o local de aplicação, a profundidade e a angulação da agulha, a

temperatura ambiente e, se o paciente realizou exercícios físicos com o membro que recebeu a aplicação. A região abdominal é o local onde ocorre menor variação de resultados. Apesar dessas variações, o uso contínuo de INS, seguindo os mesmos padrões diários proporcionam resultados positivos no tratamento da doença (GENUTH, 2008).

Para alcançar uma insulino terapia adequada para cada paciente, diversos tipos de INS estão disponíveis no mercado, como, por exemplo, a regular, os análogos de ação rápida e intermediária, os análogos de INS basal e as pré-misturas (PIRES; CHACRA, 2008). Cada tipo possui uma farmacocinética diferente como demonstrado no gráfico da Figura 4 e descrito na Tabela 2 (PIRES; CHACRA, 2008).

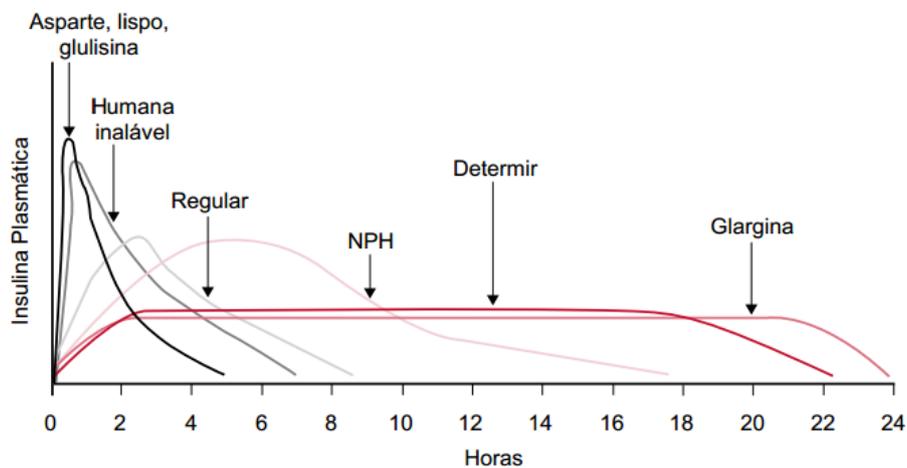


Figura 4 – Farmacocinética das insulinas humanas e análogos disponíveis no mercado (Fonte: Adaptado de HIRSCH, 2005).

Tabela 2

Início e duração de ação das INS e análogos

Preparação de INS	Início de ação	de	Pico	Duração da ação	Conteúdo de Zn ²⁺ mg/100U
Regular	30-60 minutos	2-4 horas		6-10 horas	0,01-0,04
Humana inalável (1º lançada no mercado)	5-15 minutos	1-2 horas		6-8 horas	-
NPH/lenta	1-2 horas	4-8 horas		10-20 horas	0,016-0,04
Lispro/Asparte/Glulisina	5-15 minutos	1-2 horas		4-6 horas	0,02
Glargina/Determir	1-2 horas	Pouco pronunciado		<24 horas	0,03

Fonte: Adaptado de WANNMACHER, 2005.

- **INS Asparte, Lispro e Glulisina:** são análogos da INS regular, as mudanças estruturais realizadas nas moléculas de INS (Figura 5) proporcionaram alterações na farmacocinética como: absorção subcutânea mais rápida permitindo uma maior quantidade de INS na circulação em curto intervalo de tempo; início de resposta hipoglicêmica mais rápida com menor duração de efeito. Porém, quando administradas com o objetivo de controlar a hiperglicemia prandial, apresentam a mesma resposta clínica que a INS regular, quando são administradas 10-15 e 30 minutos antes das refeições, aumentando o seu tempo de ação, com maior duração de efeito. A INS lispro e a asparte reduz a hipoglicemia noturna em cerca de 20 a 30%, além de proporcionar uma leve melhora nos níveis de hemoglobina glicosilada (de 0,3% a 0,5%). A INS glulisina apresenta as mesmas características das outras citadas e a possibilidade de ser administrada junto as refeições ou em até 20 minutos após, ajustando a sua dose de acordo com o alimento ingerido (PIRES; CHACRA, 2008).

- **Regular:** É a INS humana solúvel. Quando administrada por via subcutânea possui um início de ação na faixa de 30 a 60 minutos, apresentando um pico de ação entre 2 e 4 horas, com duração de 6 a 10 horas. É usada em casos de cetoacidose diabética e também pode ser usada associada a INS de ação intermediária ou análogos basais 20 a 30 minutos antes das refeições, para reduzir o pico de glicemia pós-prandial (PIRES; CHACRA, 2008).

- **NPH (Neutral Protamine Hagedorn):** É classificada como INS de ação intermediária por apresentar início de ação entre 1 e 2 horas, com um pico entre 4 e 8 horas e término de ação de 12 a 20 horas após a sua administração. Podem ser administradas duas ou mais doses diárias, com o objetivo de obter concentrações basais. NPH pode ser usada concomitante com a INS regular com o objetivo de facilitar a adesão do paciente a insulino terapia, principalmente em casos de crianças (WANNMACHER, 2005).

- **Dertermir e Glargina:** Essas INS são análogos (Figura 5) das formulações de longa duração ou basais, apresentando a farmacodinâmica e a farmacocinética próximas do esperado reposição lenta, contínua e de longa duração de INS. A Detemir apresenta início de ação entre 1 e 2 horas após administração, alcançando um platô entre 4 e 6 horas, com término de ação entre 20 e 24 horas. A glargina pode ser administrada antes do café da manhã, do jantar ou antes de dormir em pacientes portadores de diabetes Tipo 1. Esse análogo, devido ao seu caráter ácido, não deve ser administrada concomitante com outras INS (PIRES; CHACRA, 2008).

- **Pré-misturas:** Esse tipo de formulação é usado em casos de diabetes do Tipo 1 e 2, onde a INS lispro na forma cristalizada é combinada com protamina e usada como uma formulação de ação prolongada, sendo denominada de Neutral Protamine Lispro (NPL). Se INS lispro não cristalizada é usada, a pré-mistura é denominada de Humalog MIX 75/25, sendo composta de 75% de NPL e 25% de lispro. Outro análogo usado é comercializado como INS Novo Mix 30, a qual é composto de 30% de asparte solúvel e 70% de asparte ligado à protamina. Essas pré-misturas de INS são usadas com o objetivo de ajustar doses individuais, principalmente para diabéticos Tipo 1 (PIRES; CHACRA, 2008).

É importante salientar que a administração de INS pela via subcutânea pode causar diversas complicações, tal como, hiperinsulinemia periférica, proliferação de células musculares lisas e a incorporação de glicose nos lipídeos das paredes arteriais, criando o quadro de angiopatia diabética (KHAFAGY *et al.*, 2007). Adicionalmente, uma grande quantidade da INS administrada pela via subcutânea também atinge alvos errados, como os músculos e rins (STILL, 2002). Além disto, esta via de administração encontra a rejeição de muitos pacientes, devido ao incomodo das injeções, stress psicológico, dor, desconforto, custos, riscos a infecções entre outros problemas (DAVIS; GRANNER, 2005).

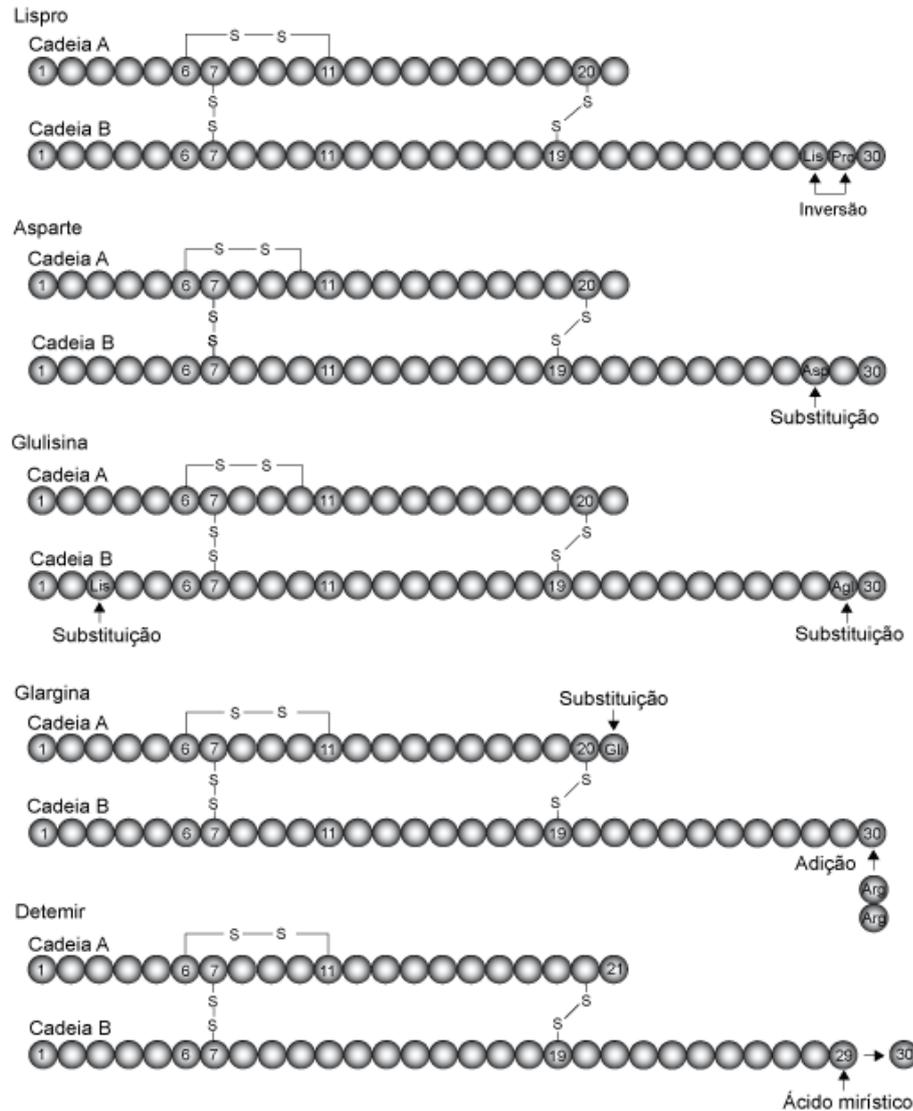


Figura 5 – Estrutura dos análogos da insulina humana: lispro, asparte, glulisina, glargina e detemir (Fonte: Adaptado de HIRSCH, 2005).

As formulações de INS possuem uma concentração definida de 100 unidades de INS por 1 mL (U-100), no qual corresponde cerca de 3,6 mg de INS por mililitro (0,6 mM) (DAVIS; GRANNER, 2005).

Há vários estudos sobre o desenvolvimento de formulações para a administração de INS por vias não invasivas (nasal, retal, pulmonar, oral e bucal) (KHAFAGY *et al.*, 2007).

- **Via oral:** É considerada a via preferencial de administração de fármacos por pacientes devido a comodidade, além disso, a INS pode atingir concentrações mais elevadas na circulação sistêmica (ONUKEI *et al.*, 1999), sendo entregue diretamente ao fígado, fato que mimetiza a farmacocinética da INS e proporciona uma melhor homeostase da glicose. Essa

via, também diminuiria a incidência de hiperinsulinemia periférica, a qual está associada a diversas complicações da aplicação subcutânea, como a neuropatia e a retinoendopatia, melhorando a qualidade de vida do paciente diabético (KHAFAGY *et al.*, 2007). Entretanto, a INS, por ser uma proteína, é degradada por enzimas proteolíticas presentes no estômago e no intestino delgado. A INS também possui elevado peso molecular e baixa lipofilia, o que dificulta o seu transporte através das mucosas (ONUKE *et al.*, 1999).

A permeabilidade de fármacos peptídicos pela membrana de mucosas pode ocorrer por difusão paracelular, através das junções paracelulares (Figura 6). Essas junções estão associadas a um anel de actina-miosina que se contrai causando um relaxamento na estrutura da membrana provocando a passagem do fármaco. A passagem do fármaco por essa via depende da forma das moléculas, tamanho, carga, seletividade e dimensões da via (SILVA *et al.*, 2002). Além disso, a camada de muco sobre a mucosa realiza interações com os fármacos peptídicos influenciando na sua absorção. Os fármacos com cargas aniônicas ou neutras possuem menor interação com a superfície da membrana. As substâncias com massa molecular maiores que 5 KDa não conseguem atravessar essa camada de muco (SILVA *et al.*, 2002).

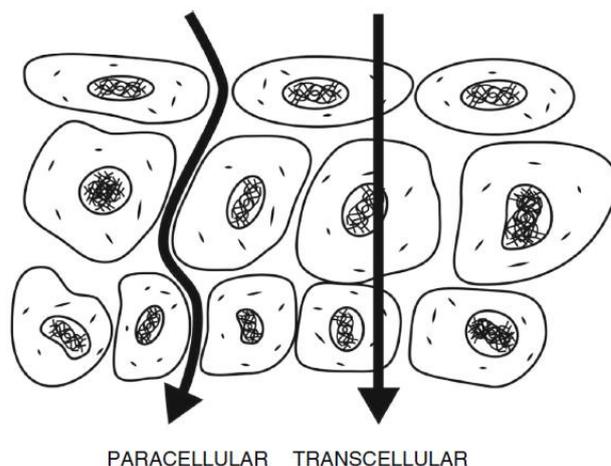


Figura 6 - Difusão paracelular e transcelular (Fonte: CAON *et al.*, 2015).

O problema da absorção reduzida da insulina em mucosas por meio do processo de difusão paracelular ocorre em parte devido a agregação da molécula. Em baixas concentrações a molécula de insulina se apresenta na forma de monômero exercendo a sua atividade biológica. Porém em concentrações maiores que 0,1 mM a insulina dimeriza. Em meios neutros ou fracamente ácidos, na presença de íons de zinco e em concentrações maiores que 10 mM, os dímeros da molécula de insulina se associam formando um hexâmero, cuja

forma é esférica e parcialmente achatada, com um tamanho na faixa de 50 Å de comprimento e 35 Å de espessura. Já os poros da monocamada epitelial do intestino delgado por onde essa molécula realizará a difusão paracelular possui um raio em torno de 7-15Å, dificultando esse processo e com isso diminuindo a biodisponibilidade da insulina (SILVA *et al.*, 2003b). Após a sua difusão, a INS reduz a glicemia por meio do bloqueio da produção hepática de glicose e por estimular a captação e o metabolismo deste açúcar pelo músculo e pelo tecido adiposo.

Diversos estudos foram realizados usando estratégias farmacêuticas para aumentar a biodisponibilidade de INS administrada por via oral, como, por exemplo, nanopartículas poliméricas, inibidores enzimáticos, promotores de permeação e absorção e modificações químicas na molécula de INS. Os adjuvantes utilizados devem possuir características que promovam a liberação da INS na circulação sistêmica de forma controlada, devendo ser biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicos e que promovam uma bioadesão na mucosa (KHAFAGY *et al.*, 2007). Várias indústrias farmacêuticas têm desenvolvido sistemas de liberação oral de INS, sendo que alguns já avançaram para as etapas do estudo clínico, como, por exemplo, Emisphere, Altus, BioSante, Generex e Nobex (PARK *et al.*, 2011).

- **Via nasal:** Essa via permite a fácil administração, evita o metabolismo de primeira passagem hepático, além de possuir elevada superfície de absorção (150 cm²). O perfil farmacocinético da INS administrada por essa via foi semelhante a obtida com a injeção intravenosa pois essa via possui uma semelhança com o padrão pulsátil de secreção de INS endógena durante as refeições, possuindo potencial para o uso por pacientes diabéticos Tipo 1, controlando a hiperglicemia pós-prandial (KHAFAGY *et al.*, 2007).

Porém, essa via possui algumas desvantagens que limitam a absorção nasal da INS, como a função mucociliar, que diminui o contato de INS com a mucosa e há presença de enzimas proteolíticas na cavidade nasal. Além disso, há fatores como as propriedades físico-químicas das partículas, como dose, tempo e frequência de administração, concentração, tipo e volume do fármaco ou a presença de agentes de absorção (inibidores enzimáticos e promotores de absorção, como sais biliares, fosfolípidos e surfactantes), que influenciam na biodisponibilidade do fármaco. Entretanto, o uso contínuo dessas substâncias pode causar irritação nasal, lesões na mucosa e perturbação da função mucociliar (FADISTA, 2011).

- **Via pulmonar:** Os pulmões apresentam uma elevada superfície de absorção (50-140 m²) com cerca de 500 milhões de alvéolos, sendo altamente vascularizado (CAVAIOLA; EDELMAN, 2014). Além disso, os alvéolos são cobertos por uma fina camada

de células epiteliais (0,1 – 0,2 mm), o que auxilia na absorção sistêmica de moléculas, evitando o metabolismo de primeira passagem hepático e a degradação do fármaco (FADISTA, 2011). A baixa quantidade de enzimas permite aumentar de 4 a 40 vezes a absorção deste fármaco, quando comparado com outras vias, como oral, nasal, retal (CAVAIOLA; EDELMAN, 2014).

A deposição de INS no sistema respiratório depende de fatores como, tamanho de partícula, velocidade, recarga do fármaco, complexidade do dispositivo, além da adesão do paciente a nova via de administração (CAVAIOLA; EDELMAN, 2014).

A primeira INS inalável lançada no mercado foi a Exubera[®], produzida pela Pfizer, e aprovada em janeiro de 2006, essa INS era uma alternativa eficaz e segura a pacientes com diabetes Tipo 1 ou 2. A insulina inalável é a própria INS humana na forma de pó. Estudo comparativo realizado por Pires e Chacra (2008) comparou à INS lispro, administrada por via subcutânea, com a INS inalável administrada pela via pulmonar. A INS lispro apresentou um rápido início de efeito similar ao da INS inalável, porém, a INS inalável apresentou um efeito mais prolongado, sendo que ambas apresentaram boa tolerabilidade. Em estudos comparando a INS inalável a INS regular, a primeira apresentou um início de efeito mais rápido, porém, o tempo de duração de ambas foram similares. O uso da INS inalável foi indicado como alternativa para suplementação pré-prandial (WANNMACHER, 2005). Porém, essa formulação foi retirada do mercado cerca de 6 meses depois, pois de acordo com a empresa, vários pacientes não se adaptaram a nova forma de administração de INS e com o tamanho do dispositivo inalador (JUSTE, 2015).

Contudo, foi lançado este ano uma nova formulação de INS inalável, denominada Afrezza[®] (Figura 7), a qual será produzida pela indústria farmacêutica Sanofi Aventis. A administração ocorrerá com a ajuda de um inalador pequeno e de fácil uso. Após a administração e a formulação alcançar os pulmões, se dissolverá rapidamente e a INS será liberada, sendo absorvida (REUTERS, 2015).

Entretanto, de acordo com a presidente do Departamento de Diabetes da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, Ellinger (2015), essa nova formulação conterà INS de ação rápida, como no primeiro lançamento, e deverá ser usada apenas para corrigir ou prevenir os picos de hiperglicemia, não livrando o paciente totalmente das injeções, o paciente ainda precisará da aplicação de INS basal. Além disso, a nova formulação não deverá ser usada por pessoas que possuem asma, ou que têm algumas complicações respiratórias e também por fumantes ou ex-fumantes (REUTERS, 2015).

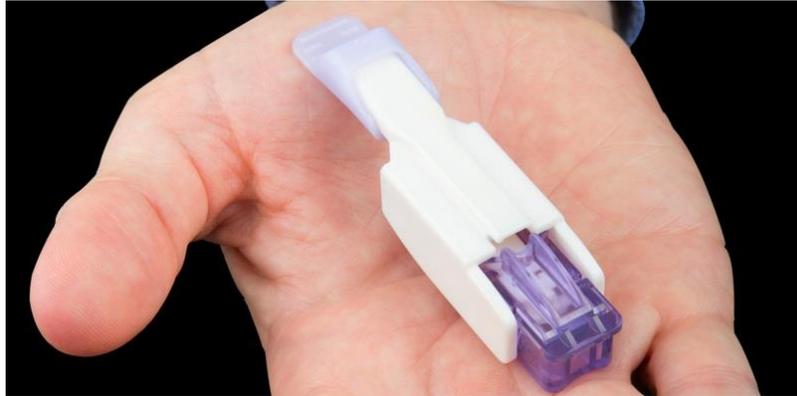


Figura 7 - Dispositivo aprovado para administração insulina inalável. (Fonte: REUTERS, 2015).

- **Via bucal:** A mucosa bucal apresenta boa acessibilidade física e robustez, é uma mucosa imóvel, e possui acesso diretamente a circulação sistêmica por meio da veia jugular interna, evitando o metabolismo hepático de primeira passagem, aumentando a biodisponibilidade da INS (KHAFAGY *et al.*, 2007). A mucosa bucal possui de 40 a 50 camadas de células não queratinizadas, sendo mais permeável que as outras membranas, fato pode levar a diminuição da dose necessária, diminuindo os custos do tratamento, formulação e o surgimento de efeitos colaterais causado por doses mais elevadas. Esta via também apresenta baixa quantidade de enzimas, responsáveis pela degradação da INS. Além disso, em caso de reações adversas há a possibilidade de remover fácil e rapidamente a formulação do organismo (CAON *et al.*, 2015).

Entretanto, a área superficial disponível na mucosa bucal para absorção é pequena e existe o fluxo constante de saliva, fatores que podem diminuir a quantidade de INS absorvida. Além disso, fármacos com sabor forte apresentam baixa adesão por essa via, por isso, os sabores das formulações devem ser levados em consideração antes da aplicação (CAON *et al.*, 2015).

Estudo realizado por Morishita e colaboradores (2001), onde foi administrado pela via bucal formulações de P407 contendo INS e ácidos graxos, como promotores de absorção em ratos foi observado uma redução significativa nos níveis de glicose nos soros desses animais. A mucosa bucal oferece um perfil de liberação de fármacos de maneira sustentada, devido a sua capacidade de depósito, e o uso de promotores de absorção nas formulações, como os ácidos graxos promovem uma modificação na membrana das mucosas, facilitando a absorção de fármacos proteicos.

- **Via retal:** A administração de INS por essa via oferece a possibilidade de evitar o metabolismo de primeira passagem hepático, diminuindo a degradação, aumentando a

absorção do fármaco. Essa via é independente da motilidade intestinal, tempo de esvaziamento gástrico e dieta. Além disso, a presença de enzimas que degradam esse fármaco diminui a partir da extremidade proximal para a extremidade distal do intestino e do reto (KHAFAGY *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que um supositório composto de gel bioadesivo que sofre transição de fase a temperatura do corpo, interagindo com a mucosa retal, aumentou o tempo de contato do fármaco com a mucosa aumentando a absorção de INS (KHAFAGY *et al.*, 2007).

Morishita e colaboradores (1998) desenvolveram uma emulsão múltipla A/O/A contendo INS e ácidos graxos, como ácido oleico, linoleico e linolênico, e administraram no cólon e no íleo do intestino de ratos Wistar machos. Todas as formulações foram capazes de aumentar ligeiramente a absorção da INS em ambas as partes do intestino, diminuindo os níveis de glicose no soro, em comparação ao grupo controle, sem causar danos nos tecidos. A formulação que continha ácido oleico apresentou maior efeito hipoglicêmico, e foi mantido por período de 4 horas após a administração. Os maiores efeitos hipoglicêmicos foram observados no cólon, do que no íleo. Esses resultados foram confirmados nos experimentos realizados por Suzuki e colaboradores (1998), onde emulsão múltipla A/O/A contendo INS e ácidos graxos foram administrados em ratos no cólon e no reto. Nesse caso foram usados os ácidos eicosapentaenoico e docosahexanóico, sendo que, nesse caso a absorção foi maior na mucosa retal, do que no cólon, e os valores do T_{máx} no reto foram inferiores a 1 hora.

Estudos realizados por Barichello e colaboradores (1999a) demonstraram que formulações de hidrogéis de P407 contendo INS e ácidos graxos insaturados, administrados em ratos Wistar machos pela via retal apresentaram uma absorção significativamente aumentada da INS, causando um efeito hipoglicemiante em todas as formulações. Os níveis de INS no soro dos animais permaneceu por um período de 6 horas, quando atingiu níveis basais. Onuki e colaboradores (2000) realizaram experimentos com emulsão múltiplas A/O/A de polímero, INS e ácidos graxos insaturados, e avaliaram a hipoglicemia dos animais após a administração de múltiplas doses da formulação e a variação da dose de INS em administração de dose única pela via retal. Assim como no estudo anterior, também foi observado um efeito hipoglicêmico acentuado e a quantidade de INS absorvida no reto foi proporcional a sua dose. Nos experimentos de administração múltipla foi obtido perfis estáveis de hipoglicemia e não foi observado danos a mucosa ao longo do período de experimento.

Essas formulações são alternativas muito promissoras para a administração de INS, e outros fármacos peptídicos, pois apresentaram resultados muito eficazes como os apresentados pela administração de injeções subcutâneas (KHAFAGY *et al.*, 2007).

3.3 Poloxâmero 407:

Poloxâmero 407 (P407), também denominado Lutrol, Pluronic F-127 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), Synperonic, Tetronic (DUMORTIER *et al.*, 2006), é um copolímero tribloco composto de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP) (Figura 8), obtido por meio da polimerização sequencial destes monômeros na presença de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (DUMORTIER *et al.*, 2006).

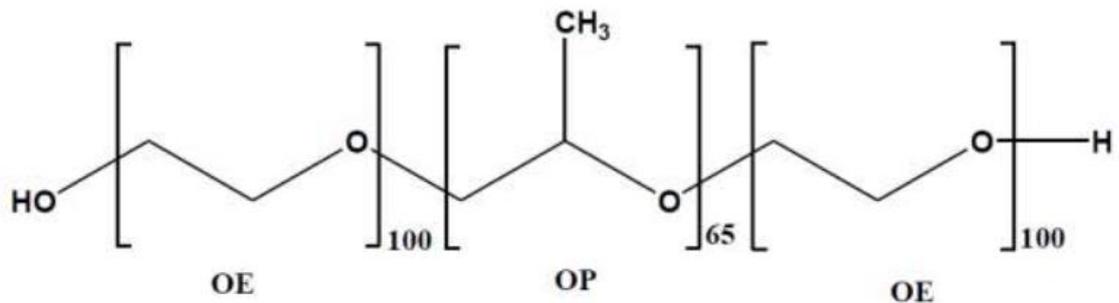


Figura 8- Poloxâmero 407 copolímero tribloco. (Fonte: Adaptado de KABANOV *et al.*, 2002).

Em soluções aquosas, as cadeias individuais do polímero se agregam formando micelas, as quais consistem de um centro de óxido de polipropileno (porção hidrofóbica) circundado por camadas de óxido de polietileno (porção hidrofílica). Em baixas temperaturas (entre 0~ 18°C) e em concentrações elevadas (aproximadamente 20%), esta solução se apresenta na forma de líquidos micelares. A alta temperatura (entre 18 ~ 40°C), estas micelas se enovelam originando um gel homogêneo. Na Figura 9 é demonstrado o processo de micelização e formação de gel. Este gel apresenta uma estrutura que favorece a solubilização/dispersão de fármacos e aditivos de baixa solubilidade aquosa, de modo que proteínas e peptídeos dispersos em sua estrutura podem ser protegidas frente às degradações hidrolíticas e enzimáticas (DUMORTIER *et al.*, 2006). Outra característica importante destes géis é a tendência a aderir a superfícies, como a pele e a mucosa do intestino (DUMORTIER *et al.*, 2006). A bioadesão pode aumentar o tempo de permanência de um fármaco no organismo, e conseqüentemente aumenta a sua biodisponibilidade, diminuindo a quantidade de doses administradas diariamente (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

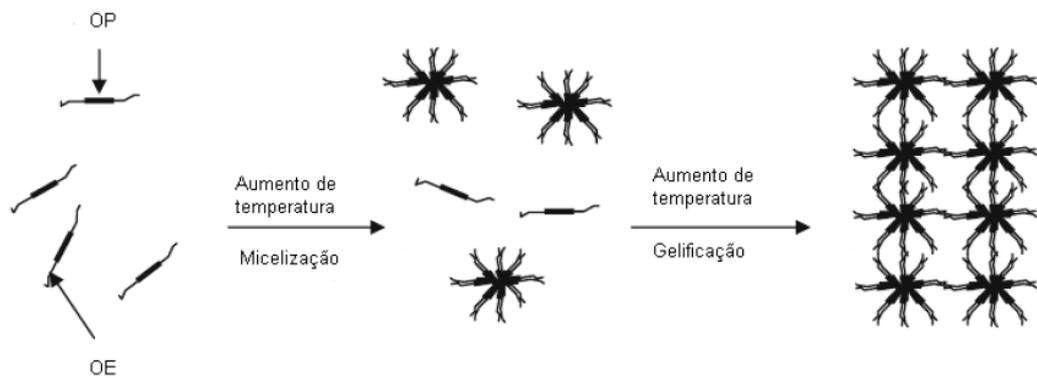


Figura 9- Representação esquemática do mecanismo de associação dos monômeros do Poloxâmero 407 em água. (Fonte: Adaptado de DUMORTIER *et al.*, 2006).

As micelas poliméricas de P407 são nano estruturas esféricas constituídas de uma porção hidrofóbica interna que possui a capacidade de encapsular fármacos hidrofóbicos e uma porção hidrofílica externa que protege o núcleo e serve para acomodar fármacos solúveis em água ou anfóteros.

Além da capacidade de formar micelas poliméricas, o copolímero P407 também possui a função de agente de dispersão, emulsionante, agente de solubilização, lubrificante e agente molhante. Na indústria farmacêutica são utilizados como bases de supositórios, géis, como aglutinantes e revestimentos de comprimidos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). De acordo com FDA, P407 é um adjuvante inativo, que pode ser usado em diversos tipos de formulações, como, soluções parenterais, incluindo as formulações de administração intravenosa, solução oral, suspensão ou formulações tópicas e oftálmicas.

Estudos *in vivo* em ratos Wister realizados por Barichello e colaboradores (1999b) demonstrou que formulações de P407 contendo insulina administrados por via subcutânea produziram um perfil hipoglicêmico prolongado, ao contrário das formulações que continham apenas insulina. Observaram que quanto maior a concentração do P407, mais lenta e prolongada foi à liberação da insulina nas formulações. Concluíram que a diminuição da velocidade de liberação do fármaco dependeu da concentração de P407 (BARICHELLO *et al.*, 1999b).

3.4 Óleo de Buriti:

O buriti (*Mauritia flexuosa*), também denominada de coqueiro-buriti, miriti, muriti, muritim, palmeira-dos-brejos, é uma palmeira da família *Palmae* (BATISTA *et al.*, 2012) presente nas regiões alagadas, encontrada principalmente na região Amazônica (PEREIRA, 2008). Na Figura 10 é apresentada uma fotografia representativa da palmeira de buriti (*Mauritia flexuosa*). Há buritis machos e fêmeas, os machos produzem cachos que resultam em flores, e as fêmeas produzem cachos, sendo que cada cacho por ano resulta em cerca de 400 a 500 frutos. Os frutos ficam apropriados para a colheita após um ano, entre o mês de dezembro e fevereiro (ISPN, 2015). Seus frutos têm despertado grande interesse, devido a composição química e farmacológica e das propriedades física do óleo (PEREIRA, 2008).



Figura 10 – Fotografia representativa da palmeira de buriti (*Mauritia flexuosa*) (Fonte: ISPN, 2015).

Dos frutos do buriti são extraídos dois tipos de óleo vegetal que possuem inúmeras utilidades. Da polpa dos frutos, são extraídos os óleos graxos, ricos em ácido oleico. Da semente dos frutos, se extrai o óleo láurico, utilizado na produção de xampu e sabão. Em uma região que contenha cerca de 150 plantas fêmeas por hectares, podem ser produzidos cerca de 3,6 toneladas por hectare de óleo, quantidade maior que a obtida a partir de outras plantas

como, soja, amendoim e girassol (CYMERYYS; FERNANDES; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2005).

O óleo de buriti (OB), por ser comestível, é muito utilizado em fritura pela comunidade nativa da região de produção dos frutos, sendo que 200 Kg de frutos rendem em média de 5 a 6 litros de óleo (INDUSTRY, 2015). Na Figura 11 é apresentada uma fotografia representativa dos frutos de Buriti descascados. O OB também é utilizado como desintoxicante e antialérgico para picadas de cobra e escorpião, aplicando-se o óleo na região da ferida e ingerindo certa quantidade. Outro uso é em casos de asma no alívio da tosse e na melhoria da respiração (INDUSTRY, 2015).



Figura 11 – Frutos do Buriti descascados (Fonte: ISPN, 2015)

O OB tem sido usado na produção de biodiesel, porém este uso não é viável economicamente, pois esse óleo possui um elevado valor devido as suas propriedades e benefícios (SAMPAIO; CARRAZZA, 2012).

Estudos realizados por Batista e colaboradores (2012) demonstram que o OB apresentou atividade antibacteriana, inibindo o crescimento bacteriano de quatro das cinco espécies gram positivas e gram negativas testadas. Eles também avaliaram o efeito cicatrizante do óleo em feridas causadas em 40 ratos Wistar. Foi observada uma aceleração no processo de cicatrização das feridas cutâneas após a aplicação do óleo.

Na Figura 12 é apresentado uma imagem ilustrativa do OB. O OB é considerado a maior fonte natural de β -caroteno (BATISTA et al., 2012; INDUSTRY, 2015). O β -caroteno é responsável pela cor alaranjada do óleo (PEREIRA, 2008). Além de ser um antioxidante e

sequestrar oxigênio, diminuindo os danos causados pelos radicais livres, este composto também possui grande capacidade de estimular a renovação celular (INDUSTRY, 2015). O fruto do buriti, além de ácidos graxos, também é rico em vitamina C, cálcio, ferro e proteínas (ISPN, 2015).



Figura 12– Imagem ilustrativa do Óleo de Buriti (Fonte: SABEDORIA NATURAL, 2015).

Devido a esta composição química e a capacidade de lubrificar e regenerar a barreira hidrolípida da pele, o OB é muito utilizado na indústria de cosméticos, principalmente na produção de produtos pós-sol, pois ele evita danos provocados pela radiação ultravioleta (BATISTA et al., 2012), além disso ele pode ser usado na fabricação de protetor solar, pois esse óleo quando misturado com polímeros transformam-se em plásticos absorvendo as radiações eletromagnéticas na região do UV (CYMERYYS; FERNANDES; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2005).

A Tabela 3 apresenta os principais ácidos graxos encontrados no OB e a suas concentrações. Observa-se que os ácidos graxos em maior quantidade são o ácido oleico (70,55%), o ácido palmítico (17,44%) e o ácido linoleico (7,03%), sendo que o ácido oleico é de longe o composto majoritário em OB (INDUSTRY, 2015). O OB também contém tocoferol (PEREIRA, 2008).

Os ácidos graxos são compostos endógenos presentes como lipídios da pele humana e de biomembranas (FISCHER, 1989). Eles também atuam nos processos metabólicos e na produção dos eicosanoides, como o ômega 3 e o ômega 6 (PERINI *et al.*, 2010) e são oxidados gerando ATP (HATANAKA; CURI, 2007). Esses compostos fazem parte de várias etapas do processo inflamatório, como a contração vascular, quimiotaxia, adesão, diapedese, ativação e morte celular (HATANAKA; CURI, 2007).

Tabela 3 Ácidos Graxos presentes no óleo de buriti

Ácidos Graxos	Átomos de Carbono	Composição Percentual
Valérico	05:0	0,95
Mirístico	14:0	0,10
Palmítico	16:0	17,44
Esteárico	18:0	2,18
Oleico	18:1	70,55
Linoleico	18:2	7,03
Linolênico	18:3	1,08
Aráquico	20:0	0,27
Gadoléico	20:1	0,30

Fonte: (Adaptado de INDUSTRY, 2015).

Os ácidos graxos são classificados conforme o número de insaturações na cadeia de carbono de sua molécula. Os ácidos graxos saturados, não possuem insaturações, os ácidos graxos monoinsaturados possuem uma ligação dupla, já os ácidos graxos poli-insaturados, possuem duas ou mais ligações duplas (PERINI *et al.*, 2010).

Os ácidos graxos poli-insaturados, além de possuírem função estrutural, atuam como moduladores das interações célula-célula e a sinalização intracelular. Com isso, a alteração de ácidos graxos e fosfolipídios presente na membrana das mucosas, podem alterar a sua fluidez (HATANAKA; CURI, 2007). Os ácidos graxos, como, por exemplo, ácido eicosapentaenoico, docosahexaenóico, oleico e palmítico, são considerados promotores de absorção/permeação (FISCHER, 1999) por facilitarem o transporte de fármacos peptídicos, como a insulina, através de mucosas (MORISHITA *et al.*, 1998).

O uso de promotores de absorção, como o ácido oleico presente no óleo de buriti, provoca um aumento na solubilidade dos fármacos proteicos, pois eles dissociam os agregados dessas moléculas formadas, como os dímeros e hexâmeros da insulina, inibem a ação de enzimas proteolíticas, reduzem a viscosidade da camada de muco aderente a mucosa além de diminuir a integridade mucosa (SILVA *et al.*, 2002), facilitando o processo de difusão paracelular do fármaco.

O ácido oleico é um ácido graxo insaturado, utilizado como um agente emulsionante na indústria alimentícia e em formulações farmacêuticas tópicas. Na Figura 13 é apresentado

a estrutura química do ácido oleico. Esse ácido graxo, também pode ser utilizado como agente promotor de permeação de fármacos em formulações transdérmicas, melhorando a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água em formulações de comprimidos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). O ácido oleico também demonstrou um importante efeito hipoglicêmico quando formulado em emulsões múltiplas contendo insulina destinada a administração oral (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

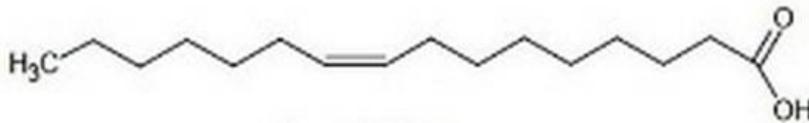


Figura 13– Fórmula estrutural do ácido oleico (Fonte: ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O ácido linoleico é considerado um ácido graxo essencial, sendo responsável pela formação de eicosanoides, compostos importantes no processo inflamatório do organismo (PIMENTEL *et al.*, 2005). Na Figura 14 é apresentado a estrutura do ácido linoleico. O ácido linoleico também é utilizado em formulações transdérmicas, orais, aumentando a absorção dos fármacos, além de ser um agente emulsionante para formulações cosméticas tópicas e microemulsões aquosas. Pode também ser usado, em emulsões parenterais e em suplementos dietéticos orais. Além disso, foi demonstrado que o ácido linoleico reduz a irritação da pele após agressões agudas, melhorando a integridade do epitélio (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

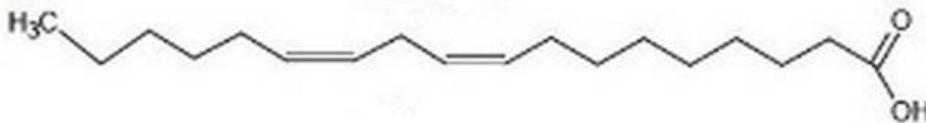


Figura 14 – Fórmula estrutural do Ácido Linoleico (ômega 6) (Fonte: ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O ácido palmítico é um ácido graxo saturado, utilizado em formulações orais e tópicas. A Figura 15 está apresentada a estrutura do ácido palmítico. Ele tem sido usado como agente de penetração em implantes administrados em ratos para liberação contínua da insulina (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

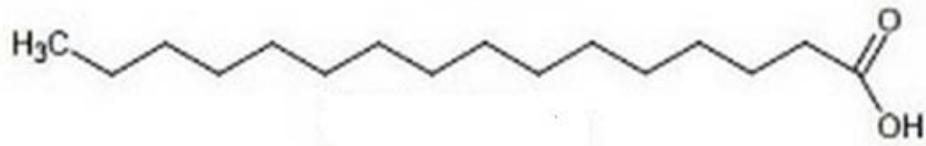


Figura 15 – Fórmula estrutural do Ácido Palmítico (Fonte: ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais:

A INS Humana foi gentilmente cedida pela Novonordisk[®] (Montes Claros, Brasil). P407, ácido oleico (AO) e pireno foram adquiridos da Sigma Aldrich[®] (Saint Louis, EUA). Óleo de buriti (OB) foi adquirido da Amazon Oil Industry (Ananindeua-PA, Brasil). Os sais cloreto de sódio, monohidrogenofosfato de potássio e dihidrogenofosfato de potássio foram adquiridos da Merck[®] (Darmstadt, Alemanha). Ácido clorídrico (HCl) solução titulante foi adquirida da Synth[®], Brasil, e hidróxido de sódio (NaOH) solução titulante foi adquirida da Cromoline[®], Brasil.

4.2 Análise do óleo de buriti por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas:

A caracterização química do óleo de buriti e do ácido oleico puro foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O procedimento de derivatização das amostras foi realizado adicionando-se 20 µl das amostras, 50 µl de piridina e 50 µl de Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de tetrametilclorosilano (TMCS), mantendo a mistura em aquecimento na temperatura de 60°C por 4 horas. Por fim, o volume final da solução foi ajustado para 1 ml com hexano. O BSTFA é utilizado como agente de sililação de compostos orgânicos e o TMCS é utilizado como catalisador dessas reações.

A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (Shimadzu, modelo QP2010 com coluna capilar de sílica fundida DB-5MS com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) foi realizada no laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). As amostras foram injetadas sob as seguintes condições de uso: temperatura do injetor: 240°C; gás de arraste: Hélio; temperatura inicial do forno: 250 °C por 12 minutos atingindo a temperatura de 290 °C a uma velocidade linear de 42,4 cm/s e permanecendo nessa temperatura por 35 minutos. O banco de dados utilizado foi o “Wiley Mass Spectral Database”.

4.3 Preparo das formulações:

Uma quantidade definida de P407 foi adicionada aos poucos a um becker contendo tampão fosfato pH 7,4 (cloreto de sódio, monohidrogenofosfato de potássio e

dihidrogenofosfato de potássio) e mantido sob agitação magnética moderada em banho de gelo (4-8°C) até completa dispersão do polímero (BARICHELLO *et al.*, 1999a). A solução foi então mantida em repouso em geladeira por 12 horas. O OB (10%p/p) ou AO (5%p/p) (BARICHELLO *et al.*, 1999a) foi adicionado à solução de P407 e disperso sob agitação magnética vigorosa usando banho de gelo. A INS, 15U (0,694 mg/g de solução) foi dissolvida em 100µL de HCl 0,1M e incorporada à solução de P407 após completa dispersão dos óleos. O HCl foi neutralizado pela adição de 100µL de NaOH 0,1M diretamente à dispersão de OB ou AO em P407. Na Tabela 4 estão listadas as formulações desenvolvidas e avaliadas no estudo *in vivo*.

Tabela 4 - Descrição das formulações desenvolvidas e avaliadas no estudo *in vivo*.

FORMULAÇÃO	COMPOSIÇÃO
P407	Solução de poloxâmero a 16%
P407+OB	P407 a 16% e OB a 10%
P407+INS	P407 a 16% e INS 15U/Kg
P407+AO+INS	P407 a 16%, AO a 5% e INS 15U/Kg
P407+OB+INS	P407 a 16%, OB a 10% e INS 15 U/Kg

4.4 Determinação do tamanho médio e do potencial zeta das micelas/gotículas das formulações

O tamanho médio e o índice de polidispersão das micelas/gotículas das formulações foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando Nanosizer N5 (Beckman Coulter, EUA). As formulações contendo INS foram diluídas na proporção de 1:500 em água Mili-Q[®]. As amostras de cada formulação foram análises em triplicata.

O potencial zeta das micelas/gotículas das formulações foram analisados através da técnica de microeletroforese Doppler a laser, onde um campo elétrico foi aplicado em uma solução de moléculas ou em uma dispersão de gotículas, que passaram a se mover com uma velocidade que está relacionada ao seu potencial zeta. Essa velocidade é medida por uma técnica interferométrica a laser. Para realizar a análise foi utilizado um medidor Green de 3 mL. As leituras foram realizadas em triplicada.

4.5 Análise espectrofluorimétrica das formulações

Após o preparo das formulações conforme descrito no item 4.3, pireno foi adicionado como sonda fluorescente na proporção de 50 µL (concentração de 0,6 µM em metanol) para cada 20 g da formulação. As formulações foram transferidas para cubetas de quartzo com capacidade para 3 mL e submetidas a análises espectrofluorimétricas em espectrofluorímetro RF-5301PC Shimadzu (Tóquio, Japão). O comprimento de onda de excitação foi 335 nm, e a emissão foi lida entre os comprimentos de onda de 350 e 550 nm. A temperatura foi de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para a viabilidade da leitura dos espectros e pela sensibilidade do aparelho, o tamanho da abertura do feixe de luz foi fixado em 5 nm para a excitação e a emissão. Em seguida realizou-se o cálculo da escala Py, através da divisão da intensidade de emissão de fluorescência do pireno correspondente ao comprimento de onda de 378nm (banda I1) pela intensidade obtida no comprimento de onda de 390nm (Banda I3).

4.6 Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicêmico das formulações

4.6.1 Animais saudáveis

Para a avaliação *in vivo* foram utilizadas ratas albinas da linhagem Fischer, com idade aproximada de 120 dias e peso médio de 200 g. As ratas foram provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição (ENUT) da UFOP e divididas em 5 grupos de cinco animais cada, e denominados: P407; P407 + INS; P407 + OB; P407 + AO + INS e P407 + OB + INS. O uso dos animais foi autorizado pela comissão de ética no uso de animais - CEUA/UFOP sob o protocolo de número 2014/33 (Anexos). A dose de INS administrada foi de 15U/kg de peso do animal. Antes da avaliação *in vivo* propriamente dita os animais foram submetidos a jejum de 48h. Aproximadamente 5 minutos antes da administração das formulações, o nível de glicose foi medido por meio de um glicosímetro Contour TS Bayer (Mishawaka, IN, USA) através do sangue retirado da veia caudal dos animais. Depois, cerca de 0,2 ml de cada formulação foi administrado por via retal a cada rato dos respectivos grupos de tratamento. Um clip foi utilizado para fechar o reto de cada animal e evitar que a formulação fosse expelida. Os níveis de glicose foram determinados no sangue retirado da veia caudal dos animais nos tempos de 1, 3 e 6 horas após administração da formulação, utilizando o glicosímetro Contour TS Bayer para a quantificação da glicemia.

4.6.2 Avaliação do efeito hipoglicêmico da formulação P407 + OB + INS em ratas albinas da linhagem Fischer diabéticas

A avaliação do efeito hipoglicêmico em ratas albinas da linhagem Fisher diabéticas foi realizado apenas com a formulação P407 + OB + INS, pois muitos animais não resistiram a indução da doença. Para a indução do diabetes, após 8 horas de jejum, os animais receberam dose única de Aloxano monohidratado (Sigma Aldrich) (135mg/Kg de peso animal) dissolvido em 0,2 mL de NaCl 0,9% por injeção intraperitoneal. Posteriormente à indução aos animais foi fornecida uma solução de glicose 10% como única fonte hídrica, por aproximadamente 4 horas, para evitar hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina que ocorre após a destruição das células beta do pâncreas (MAZZANTI *et al.*, 2003). Para confirmação do estado de diabetes, três dias após a indução os animais foram submetidos a uma avaliação dos níveis de glicose plasmática em jejum de 8 horas, empregando-se amostra de sangue coletada na cauda. Os níveis de glicose foram medidos por meio de um glicosímetro Contour TS Bayer (Mishawaka, IN, USA). Os animais com glicemia de jejum superior a 126 mg/dL (~13mmol/L) foram considerados diabéticos e utilizados no experimento. Após a confirmação da diabetes, o experimento foi realizado conforme descrito para os animais saudáveis.

4.6.3 Análise Estatística

Análise estatística foi utilizada para avaliar a existência de diferença significativa entre as médias das glicemias dos 5 grupos, utilizando o teste paramétrico Two-way ANOVA com Teste de comparações múltiplas de Tukey. O programa estatístico Graph Pad Prism[®] 6 foi usado na análise estatística dos dados, adotando-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Cinco formulações foram preparadas conforme descrito na Tabela 4. Todas as formulações continham a mesma concentração de P407 (16%). Na Figura 16 são ilustradas as etapas do processo de preparação da formulação de P407 + OB + INS. Na Fig. 16A é observado o aspecto da solução de P407 em tampão fosfato pH 7,4 na temperatura de 4°C . A Figura 16B ilustra o aspecto da solução de P407 a 16% após a adição de OB, sendo observado a formação de duas fases. Após a dispersão do óleo (Fig. 16C) ocorreu à formação de uma emulsão de aspecto leitoso e cor amarelada.

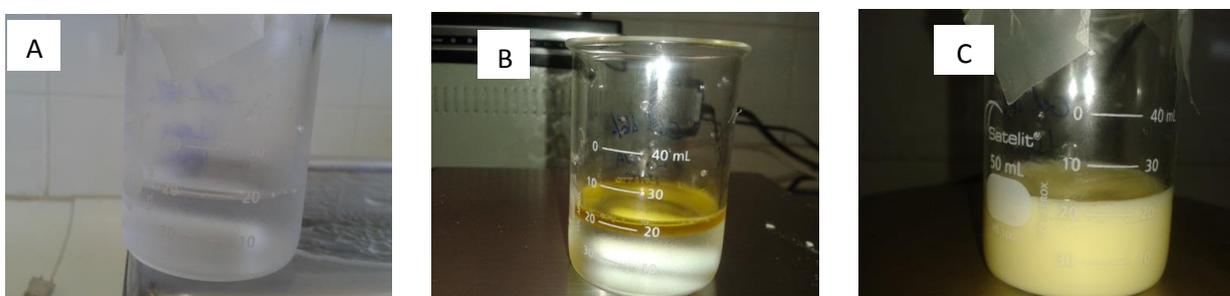


Figura 16 – Aspecto da formulação de P407 contendo óleo de buriti em diferentes estágios da preparação. A: solução de P407; **B:** solução de P407 adicionada de óleo de buriti e; **C:** após dispersão do óleo de buriti na solução de P407.

5.1 Análise do óleo de buriti por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas

A técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) permite obter informações sobre a composição de substâncias sintéticas ou naturais. Nessa técnica, o espectrômetro de massas é usado como um sistema de detecção universal com alta especificidade (FERREIRA, 2011).

Na Figura 17 é apresentado o cromatograma obtido da análise do ácido oleico puro, usado como controle positivo no estudo *in vivo*. É possível observar (Fig. 18) que o pico de maior intensidade apresentou um tempo de retenção de 27,66 minutos. Em comparação ao pico de maior intensidade observado na Fig. 17, e dado as condições de análise que foram idênticas, sugere-se que os pico localizado nos tempos de retenção 27,89 minutos se trata do mesmo composto, o ácido oleico. A comparação dos cromatogramas apresentados nas Fig. 17

e Fig. 18 se observa a semelhança entre o pico e seu tempo de retenção (27,89, 27,66), confirmando a presença do ácido oleico no OB como composto majoritário.

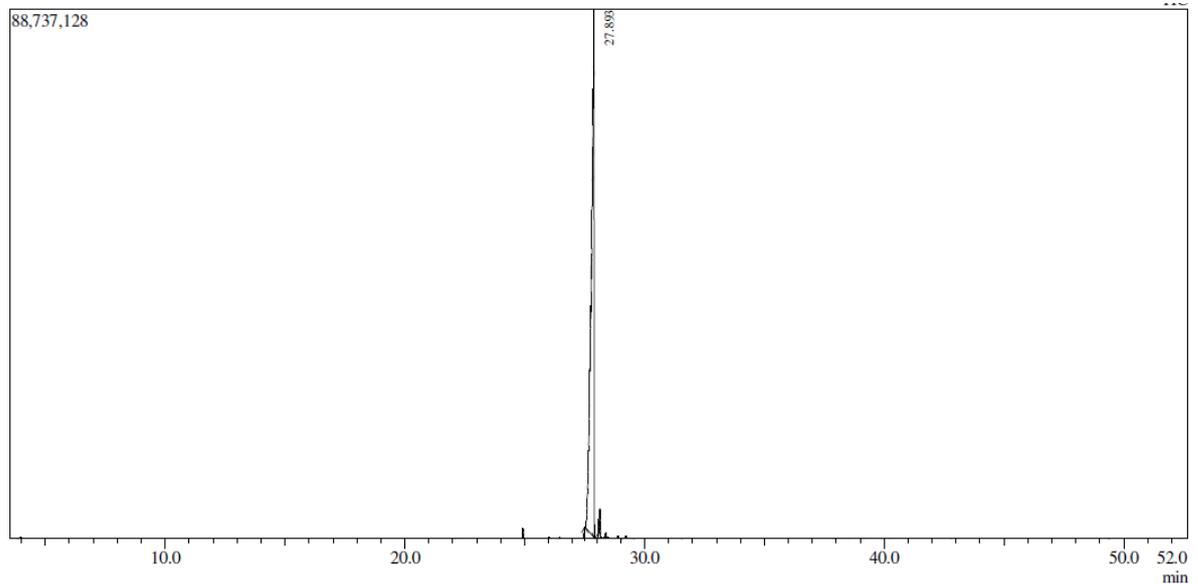


Figura 17 - Cromatograma do ácido oleico puro. Análise realizada no aparelho Shimadzu, modelo QP2010.

Na Figura 18 é apresentado o espectro de massa de todos os compostos presentes no OB usado.

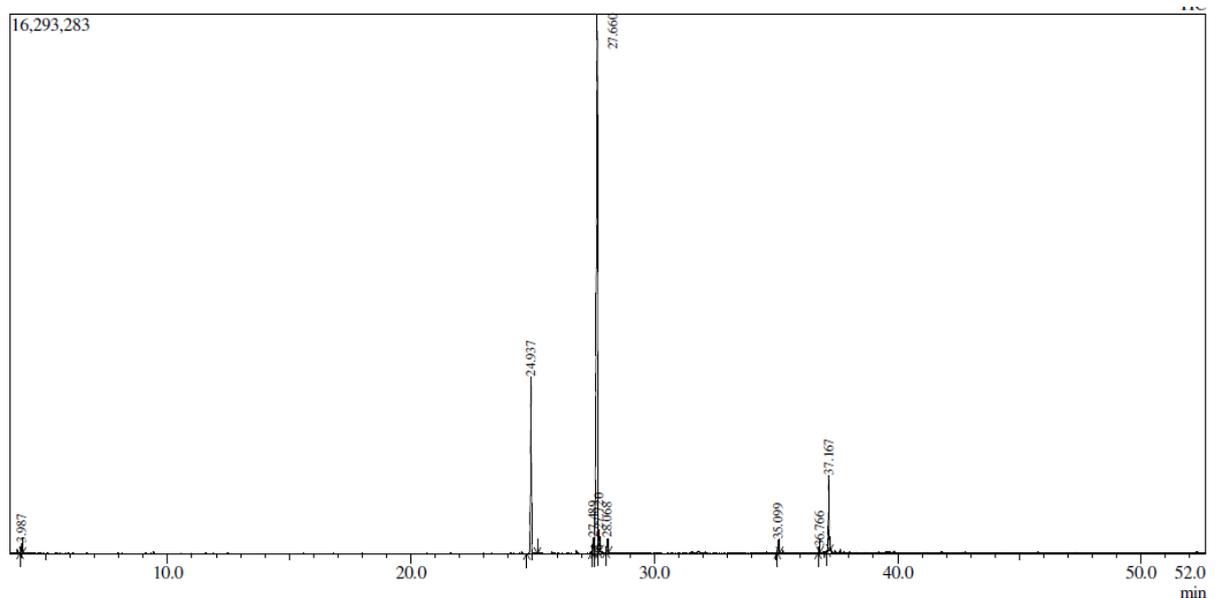


Figura 18 – Cromatograma obtido da análise do óleo de buriti em GC-MS. Análise realizada no aparelho Shimadzu, modelo QP2010.

Como observado na figura 18, o primeiro pico, no tempo de retenção de 24,93 minutos, corresponde a um ácido graxo, o ácido hexadecanóico (ácido palmítico), onde a área sobre o pico equivale a sua concentração na amostra analisada, sendo cerca de 15,61%. O segundo pico, no tempo de retenção 27,48, equivale ao ácido linoleico, presente em uma concentração, de acordo com a sua área sobre o pico, cerca de 1,39%. O pico no tempo de retenção 27,66, equivale ao ácido graxo, ácido oleico, no qual de acordo com a área sobre esse pico indica que ele é o composto majoritário da amostra, presente em uma concentração cerca de 71,67%.

Para identificar as substâncias, comparou-se o espectro de massas de cada pico com os dados da biblioteca *Wiley Mass Spectral Database*.

Na Figura 19 são apresentados os espectros de massas do pico com tempo de retenção de 24,937 minutos da análise do OB (A) e do ácido palmítico (B) encontrado na biblioteca de base de dados *Wiley Mass Spectral Database*.

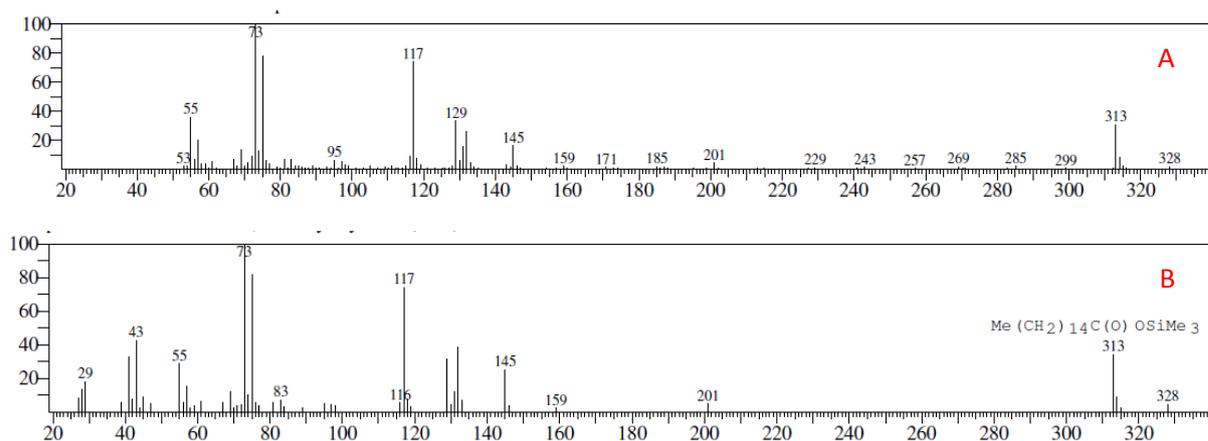


Figura 19– Comparação dos espectros de massas referente ao pico do ácido palmítico encontrado no OB (A) e do ácido palmítico puro encontrado na base de dados da *Wiley Mass Spectral Database*.

Na comparação dos espectros pode ser observado que se trata da mesma substância visto que foram gerados fragmentos de mesma massa no processo de fragmentação. Desta forma, o composto encontrado no OB foi identificado como ácido hexadecanóico, o ácido palmítico, sendo encontrado numa concentração de 15,61% e o segundo composto encontrado em maior quantidade no OB. O ácido palmítico é um ácido graxo, usado em formulações farmacêuticas orais e tópicas, sendo considerado não tóxico e não irritante (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A Figura 20 é apresentado o espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 27,66 minutos (A). Esse pico corresponde a substância majoritária do óleo de buriti,

estando presente em uma proporção de 71,67%. De acordo com os dados da biblioteca (B), ela foi identificada como ácido trans-9-octadecenóico, o ácido oleico.

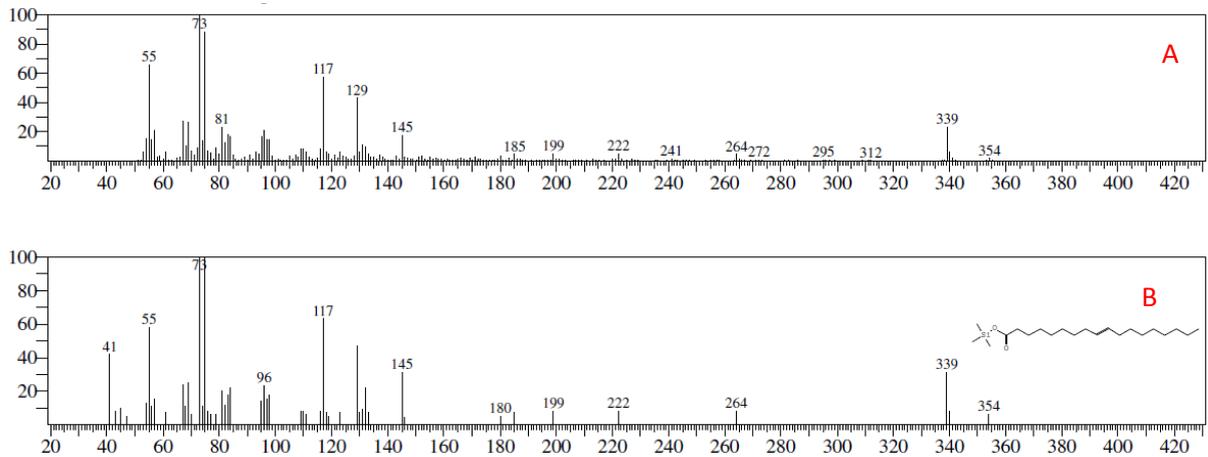
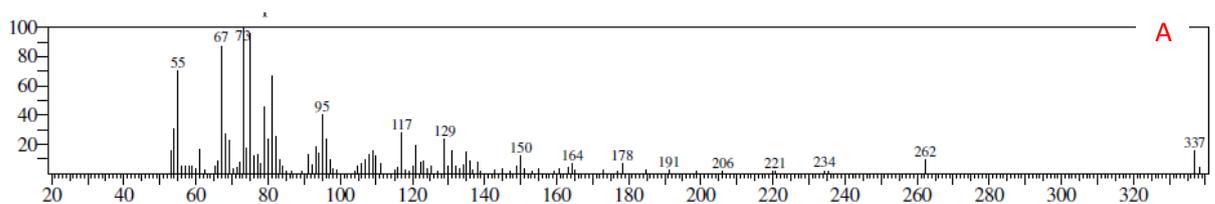


Figura 20- Comparação dos espectro de massas referente ao pico do ácido oleico encontrado no OB (A) e do ácido oleico puro (B) encontrado na base de dados da *Wiley Mass Spectral Database*.

Na Figura 21, está apresentado o espectro de massa referente ao pico no tempo de retenção 27,48 minutos (A). Este pico corresponde a substância 9,12- ácido octadecadienóico, o ácido linoleico, presente em uma concentração de 1,39%. Esse ácido graxo é usado na indústria farmacêutica em formulações transdérmicas, em formulações orais como um agente de absorção e em formulações cosméticas como um agente emulsionante e em micromulsões aquosas. Também é usado em emulsões parentéricas para a nutrição parenteral e em suplementos dietéticos orais. Há estudos que sugerem que o ácido linoleico é capaz de melhorar a integridade do epitélio da mucosa após uma lesão (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Estudos têm mostrado que o ácido linoleico aumenta a permeabilidade paracelular através de monocamadas de células intestinais Caco-2, e, conseqüentemente, pode também, como um suplemento dietético, aumentar a absorção de cálcio *in vivo* (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).



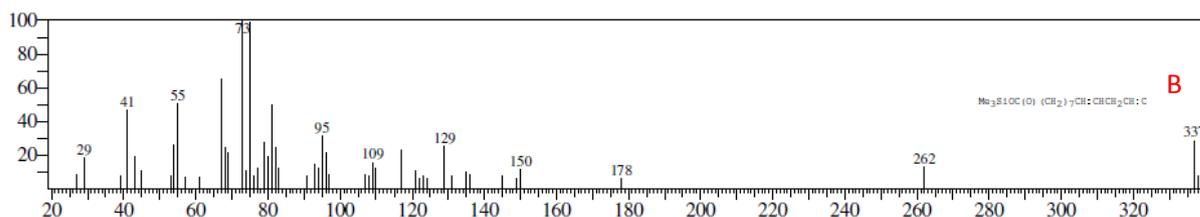


Figura 21- Comparação dos espectro de massas referente ao pico do ácido linoleico encontrado no OB (A) e do ácido linoleico puro encontrado na base de dados da *Wiley Mass Spectral Database*.

Na Tabela 5 são listados os compostos encontrados no OB, os seus tempos de retenção, a área dos picos e a porcentagem desses compostos no óleo.

Tabela 5 Compostos encontrados no óleo de buriti

Compostos	Tempo de retenção (min.)	Área dos picos	Porcentagem (%)
Ciclohexano	3,987	828584	0,97
Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)	24,937	13393521	15,61
9,12-Ácido Octadecadienóico (Ácido Linoleico)	27,489	1195829	1,39
Ácido trans-9-octadecenóico (Ácido Oleico)	27,660	61500931	71,67
Ácido 11-cis-octadecenóico	27,720	1467411	1,71
Ácido Octadecanóico (Ácido esteárico)	28,068	1084641	1,26
Monopalmitina	35,099	1009587	1,18
Mono-oleil glicerol	36,766	384590	0,45
Não identificado	37,167	4942697	5,76

Analisando-se os resultados na Tabela 5, observa-se que o OB apresentou dois compostos majoritários, o composto ácido trans-9-octadecenóico, no tempo de retenção de 27,66 minutos, presente em 71,67% e o ácido hexadecanóico, no tempo de retenção de 24,9 minutos, presente em uma concentração de 15,61%. E apresentou outros ácidos graxos presentes em menores concentrações, como o 9,12-ácido octadecadienoico, no tempo de retenção 27,48 minutos, presente em uma concentração de 1,39 %.

Esse resultado está de acordo com dados da literatura, onde demonstram que o ácido oleico é o composto presente em maior quantidade no OB (INDUSTRY, 2015). Análise em

cromatografia gasosa realizada por Figueira (2012), demonstrou que o ácido oleico estava presente em 78,11% no OB, sendo o ácido graxo em maior quantidade. Figueira (2012) demonstrou que o OB extraídos dos frutos da palmeira presente na região Amazônica, parte da sua composição secundária é composta de ácidos graxos saturados e insaturados, como ácido palmítico presente em 17,07%, linoleico em 1,37% e o ácido estearico em 1,50%. A quantidade de ácidos graxos presentes nos óleos vegetais, como o OB, variam de acordo com o cultivo da planta, o processo de extração e a maneira de conservação do óleo (FIGUEIRA, 2012).

Santos (2013) encontrou altos teores de ácidos graxos monoinsaturados no óleo extraído dos frutos do buriti, valores semelhantes ao encontrados para o óleo de azeite. O ácido oleico estava presente em uma concentração de 71,6%, o ácido palmítico era cerca de 20,8%. Também estava presente o ácido linoleico, ácido linolênico entre outros.

5.2 Tamanho médio e potencial zeta das micelas/gotículas das formulações

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da avaliação do tamanho médio, o potencial zeta e o índice de polidispersão das formulações. O tamanho médio das micelas/gotículas depende de vários fatores, como, por exemplo, a concentração do polímero utilizado, as características físico-químicas do fármaco, o método de preparação da formulação, etc. Além disso, a determinação da alteração do tamanho das partículas é um parâmetro usado para controlar a tendência à agregação e sedimentação dessas partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Juntamente com o tamanho médio das micelas/gotículas, a lipofilicidade, a carga superficial e a capacidade dos ligantes da superfície de realizar ligações de hidrogênio, são parâmetros importantes à adesão das micelas/gotículas as membranas biológicas, fator que pode facilitar a permeação do fármaco através da bicamada lipídica das células epiteliais e endoteliais da mucosa.

É possível observar na Tabela 6 que os valores de tamanho médio das micelas/gotículas variaram consideravelmente dependendo da formulação. A formulação P407+INS apresentou o maior tamanho médio de micelas/gotículas ($886,3 \pm 316,60$ nm) entre as formulações avaliadas, enquanto a formulação de P407 apresentou um tamanho médio intermediário ($553,0 \pm 15,81$ nm) entre as formulações avaliadas. Basak e Bandyopadhyay (2013) sugeriram que o encapsulamento de moléculas de fármacos em micelas do copolímero P407 aumentou o raio das micelas formadas.

Tabela 6 -Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das micelas/gotículas das formulações.

Formulações	Tamanho médio ± DP (nm)	Polidispersão Média ± DP	Potencial Zeta Médio ± DP (mV)
P407	553,0 ± 15,81	0,56 ± 0,090	-13,5 ± 7,14
P407+INS	886,3 ± 316,60	0,74 ± 0,074	-20,0 ± 2,42
P407+AO+INS	72,7 ± 7,02	0,55 ± 0,080	-36,6 ± 2,02
P407+OB	330,0 ± 15,81	0,44 ± 0,051	-10,8 ± 0,10
P407+OB+INS	335,2 ± 32,91	0,46 ± 0,037	-44,0 ± 1,01

Legenda: **P407:** Poloxâmero -407; **P407+OB:** Poloxâmero + Óleo de Buriti; **P407+INS:** Poloxâmero + Insulina; **P407+AO+INS:** Poloxâmero + Ácido Oleico + Insulina; **P407+OB+INS:** Poloxâmero + Óleo de Buriti + Insulina e **DP:** Desvio Padrão.

Além disso, estudo realizado por Andreani e colaboradores (2015) demonstrou que a agregação entre micelas/gotículas pode ocorrer devido à presença de pequenos e grandes fragmentos dos polímeros, ou ainda, estar relacionados à alta densidade das cadeias do polímero. De forma que o tamanho médio medido pode estar relacionado aos agregados de unidades pequenas.

O tamanho médio das micelas/gotículas da formulação P407+AO+INS foi entorno de $72,75 \pm 7,02$ enquanto o tamanho médio das micelas/gotículas de P407+OB+INS e P407+OB foram de aproximadamente $335,2 \pm 32,91$ nm e $330,0 \pm 15,81$ nm, respectivamente. Estas diferenças no tamanho médio destas formulações podem ser devido à presença do OB que foi adicionado em maior quantidade que o ácido oleico puro. OB é constituído de várias substâncias apolares que podem interagir de formas variadas com a porção hidrofóbica das micelas formadas no meio, possivelmente causando um aumento no volume das micelas formadas (BASAK; BANDYOPADHYAY, 2013). Por outro lado, o ácido oleico diminui a interação micela-micela por se posicionar na interface hidrofílica/lipofílica da micela, com isso, devido a carga negativa do ácido carboxílico, há uma maior dispersão das micelas/gotículas resultando em um tamanho médio menor (FERREIRA, 2012). De acordo com Basak e Bandyopadhyay (2013), substâncias apolares adicionadas a soluções de P407 resultaram em redução nos tamanhos micelares e no número de agregados destes.

Adicionalmente, experimentos realizados por Basak e Bandyopadhyay (2013), demonstraram que quanto menos hidrofóbico é o fármaco encapsulado, maiores e mais dispersas são as micelas formadas, e fármacos e substâncias altamente hidrofóbicas

encapsuladas contribuem para a formação de micelas menores e mais compactas, como observadas nos resultados para as formulações que contém óleo de buriti e ácido oleico, compostos altamente hidrofóbicos.

O índice de polidispersão dá informações sobre a homogeneidade de distribuição de tamanho das micelas/gotículas. Os resultados na Tabela 6 demonstram que índice de polidispersão médio das formulações variou conforme a composição da formulação. O índice de polidispersão da formulação P407+OB+INS foi entorno de 0,46, mais próximo do valor considerado ideal ($<0,3$) (KÜLKAMP et al., 2009) para esse tipo de formulação, o qual indica que a distribuição de tamanho das micelas/gotículas desta formulação está próxima da monodispersão. A formulação P407+OB apresentou ($0,44 \pm 0,051$) resultados próximos a formulação P407+OB+INS, obtendo também uma distribuição de tamanho das micelas/gotículas próxima a monodispersão. Por outro lado, as formulações P407 e P407+AO+INS apresentaram resultados de índice de polidispersão levemente acima de 0,5, sugerindo que estas duas formulações foram polidispersas em comparação as formulações que continham OB. A formulação P407+INS foi a mais polidispersa de todas com valores de $0,74 \pm 0,074$, apresentando micelas/gotículas com distribuição de tamanho heterogêneo.

O potencial zeta fornece informações sobre a carga das micelas/gotículas formadas na formulação e representa um critério importante para a estabilidade física em longo prazo e propriedades de mucoadesão de um sistema coloidal (ANDREANI *et al.*, 2015). O seu valor e a sua carga dependem das mudanças ocorridas na interface da partícula com o meio dispersante, ocasionadas pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas que estão no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Todas as formulações apresentaram potencial zeta com carga negativa. As formulações P407 e P407+OB apresentaram potencial zeta de $-13,5 \pm 7,14\text{mV}$ e $-10,8 \pm 0,10\text{mV}$, respectivamente, enquanto que a formulação P407+INS apresentou potencial zeta de $-20,0 \pm 2,42\text{mV}$. Adicionalmente, as formulações P407+AO+INS ($-36,6 \pm 2,02\text{mV}$) e P407+OB+INS ($-44,0 \pm 1,01\text{mV}$) apresentaram os maiores valores de potencial zeta entre as formulações avaliadas.

Duas explicações podem ser usadas para explicar os valores elevados de potencial zeta apresentados por estas formulações: primeiro, a presença dos ácidos graxos, que por sua característica hidrofílica/lipofílica, se posicionam na interface das micelas, direcionando sua cauda apolar para o interior das micelas, onde se encontram as cadeias de óxido de propileno, e posicionado a cabeça polar na região superficial onde se encontram as cadeias de

polietileno, contribuindo superficialmente para a carga negativa das micelas/gotículas da formulação. Como a quantidade de OB adicionada à formulação foi maior do que a de AO, a concentração de ácidos graxos totais na formulação de P407+OB+INS foi maior, rendendo o maior valor de potencial zeta observado. Este resultado está em acordo com os resultados apresentados por Calvo e colaboradores (1996), que analisaram o efeito de diferentes formulações e concluíram que as formulações que continham fase oleosa contribuíram para o potencial zeta negativo das partículas formadas.

Segundo, a INS possui ponto isoelétrico em pH 5,4, (FERNANDES *et al.*, 2007) e em valores de pH maiores que esse, ela apresenta carga negativa. Como o pH do tampão usado no preparo das formulações foi 7,4, sugere-se que a INS estará carregada negativamente nas formulações onde for adicionada. Adicionalmente, devido ao seu comportamento anfótero, a INS deverá se posicionar na interface hidrofílica/hidrofóbica das micelas/gotículas, podendo de certa forma, contribuir para o aumento da carga negativa das micelas/gotículas.

Valores de potencial zeta altamente negativos causarão repulsão eletrostática entre as micelas/gotículas, evitando a ocorrência de agregação e promovendo a estabilidade do sistema em longo prazo (ANDREANI *et al.*, 2015). Além disso, a absorção de fármacos contidos em micelas/partículas poliméricas é influenciada pela carga elétrica da superfície, visto que este fator pode influenciar a aderência e interação com a camada de muco que reveste as células da camada epitelial. Além disso, as partículas com cargas negativas conduzem a uma melhor adesão a mucosa, devido à presença de vários grupos carboxila e hidroxila presentes na superfície dessas partículas, através de ligações de hidrogênio com cadeias de oligossacarídeos da mucina, substância presente no muco que reveste a mucosa (ANDREANI *et al.*, 2015).

5.3 Leitura Espectrofluorimétrica:

Alterações da intensidade de fluorescência emitida pelo pireno a partir das formulações estão relacionadas com a perda ou aumento da solubilidade deste composto, a qual esta relacionada a alteração da polaridade do microambiente micelar. Desta forma, com o uso de pireno é possível avaliar as alterações que ocorrem no interior das micelas quando os componentes das formulações são variados.

Na Figura 22 está representado o espectro de emissão de fluorescência do pireno das formulações avaliadas. As curvas das formulações P-407, P-407+INS e P-407+AO+INS, apresentam emissão de fluorescência do pireno em comprimento de onda de 366 a 434 nm.

Observando a Figura 22, percebe-se que as curvas da intensidade de fluorescência do pireno relativo às formulações P407 e P407+INS foram semelhantes. Porém, é possível observar que a adição de insulina causou pequeno deslocamento da curva da formulação P407+INS para a direita do gráfico.

Com a presença do AO e INS na formulação (P407+AO+INS) ocorreu uma diminuição na intensidade de fluorescência emitida pelo pireno, com pequeno deslocamento da curva para a direita do gráfico. Por outro lado, a adição de OB a formulação (curva em zoom) houve redução considerável na intensidade de fluorescência emitida pelo pireno. Além disso, as bandas apresentaram emissão na faixa de comprimento de onda entre 389 e 441 nm. Observa-se também a presença de um pico de emissão do pireno em torno 530 nm, o qual é característico da presença de micelas (FERREIRA *et al.*, 2012).

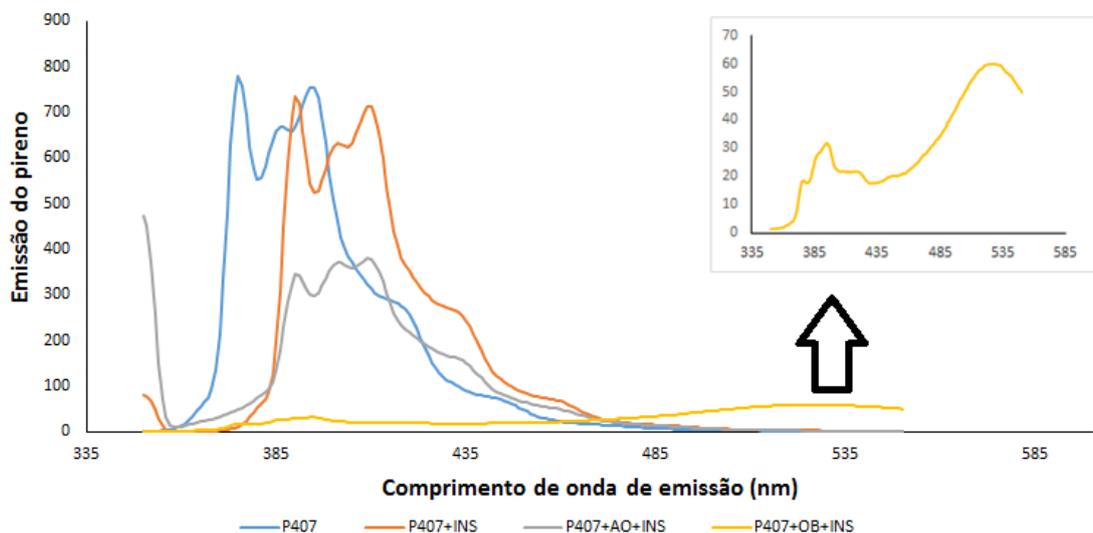


Figura 22 - Espectro de Fluorescência das formulações. **Legenda:** **P407:** Poloxâmero 407; **P407+OB:** P407+ Óleo de Buriti; **P407+INS:** P407 + Insulina; **P407+AO+INS:** P407 + Ácido Oleico + Insulina e **P407+OB+INS:** P407 + Óleo de Buriti + Insulina.

O cálculo da escala Py, se dá pela divisão da intensidade de emissão do pireno correspondente ao comprimento de onda de 378nm (banda I1) pela intensidade obtida no comprimento de onda de 390nm (banda I3).

Na Tabela 7 são apresentados os valores da relação I1/I3 obtidos dos espectros de emissão de fluorescência do pireno das formulações avaliadas.

Tabela 7- Valores obtidos da relação I1/I3 das formulações.

Formulação	I1	I3	I1/I3
P407	777,87	754,16	1,031
P407+INS	734,47	699,54	1,050
P407+AO+INS	344,23	375,61	0,916
P407+OB+INS	17,84	29,02	0,612

Onde: **P407**: Poloxâmero 407; **P407+INS**: P407 + Insulina; **P407+AO+INS**: P407 + Ácido Oleico + Insulina e **P407+OB+INS**: P407 + Óleo de Buriti + Insulina.

A escala “Py” mede a mudança na estrutura vibracional do pireno, sendo expressa como uma relação de intensidades I1/I3. Esta relação depende fortemente da polaridade do microambiente, sendo utilizada para fornecer informações sobre o interior das micelas. Essa relação das bandas, I1/I3, aumenta de acordo com o aumento da polaridade no interior da micela (DONG; WINNIK, 1982).

De acordo com os dados da Tabela 7, observa-se que as formulações P407 e P407+INS apresentaram valor de relação I1/I3 de 1,031 e 1,050, respectivamente, indicando que os ambientes das micelas/gotículas dessas formulações foram polares. A formulação P407+AO+INS apresentou valor de relação I1/I3 de 0,916, sendo menor que os valores das formulações P407 e P407+INS, indicando que o ambiente destas micelas/gotículas foi levemente menos polar que o das formulações P407 e P407+INS.

O valor da relação I1/I3 para a formulação P407+OB+INS foi de 0,612, demonstrando que a adição do OB reduziu consideravelmente a polaridade das micelas e, conseqüentemente, aumentou a solubilidade do pireno. O OB é rico em compostos apolares, como, por exemplo, carotenoides e tocoferol, além de conter boa percentagem de ácidos graxos saturados (MANHÃES; SABAA-SRUR, 2011; INDUSTRY, 2015). A presença destes componentes explica o comportamento do pireno nessa formulação, pois a relação I1/I3 tende a diminuir à medida que o ambiente em torno do pireno se torna mais hidrofóbico (PERRY *et al.*, 2011).

5.4 Avaliação do efeito hipoglicêmico *in vivo*:

Na figura 23 estão representados os resultados dos níveis séricos de glicose após administração retal das formulações em ratas albinas Fischer saudáveis.

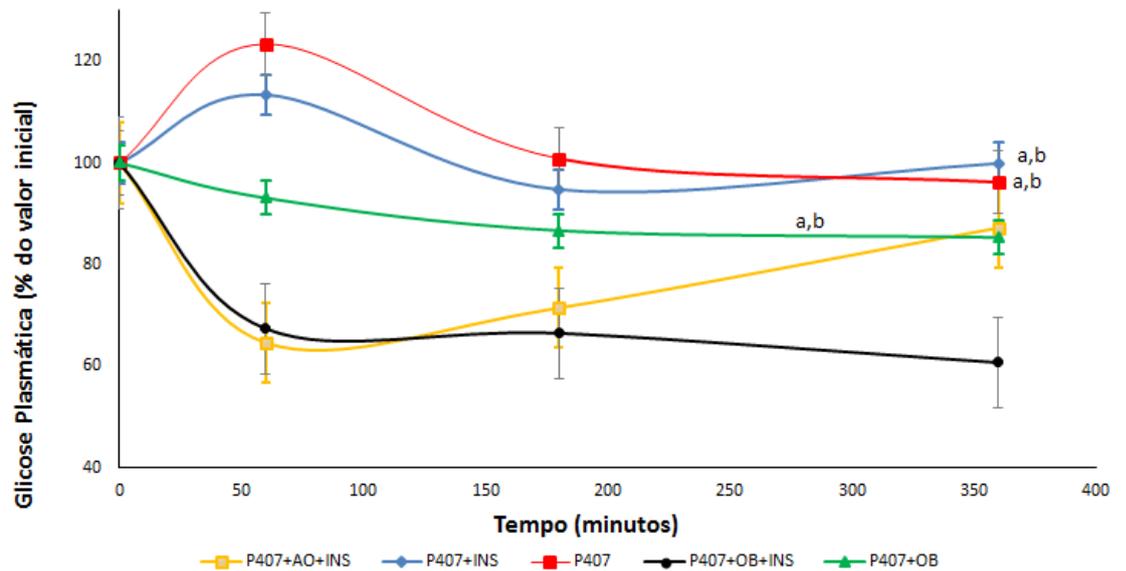


Figura 23 – Curva dos níveis séricos de glicose, após administração retal das 5 formulações preparadas em ratas albinas, saudáveis, da linhagem Fischer. **Legenda:** Formulação contendo solução de poloxâmero a 16% (P407); formulação contendo poloxâmero a 16% e OB a 10% (P407+OB); formulação contendo poloxâmero a 16% e INS 15U/Kg (P407+INS); formulação contendo poloxâmero a 16%, AO a 5% e INS 15U/Kg (P407+AO+INS), formulação contendo solução de poloxâmero a 16%, OB a 10% e INS 15U/Kg (P407+OB+INS). ^(a) indica diferença estatística significativa entre P407 x P407+OB+INS, P407+INS x P407+OB+INS, P407+OB x P407+OB+INS ($p < 0,5$), ^(b) indica diferença estatística significativa entre P407 x P407+AO+INS, P407+INS x P407+AO+INS, P407+OB x P407+AO+INS ($p < 0,5$). Os valores representam as médias de cinco animais e o desvio padrão.

As formulações P407, P407+OB e P407+INS foram utilizadas como controles no experimento. Como controle positivo foi usado a formulação P407+AO+INS visto que estudos anteriores demonstraram o efeito da formulação de P407 contendo AO na absorção de INS através das mucosas retal (BARICHELLO et al., 1999a) e bucal (MORISHITA et al., 2001).

Na Figura 23 é possível observado que as formulações P407 e P407+INS não apresentaram efeito hipoglicêmico. Estes resultados estão em acordo com as observações realizadas por Caldwell e colaboradores (1982), que administraram formulações contendo INS sem a presença de promotores de absorção, e não observaram mudanças estatisticamente significativas na glicemia dos animais.

Na Figura 23 é possível observar que a administração retal da formulação P407+OB causou um leve efeito hipoglicêmico comparada às formulações controle P407 e P407+INS, mas esta alteração não foi estatisticamente significativa.

A formulação P407+AO+INS, utilizada como controle positivo, apresentou um forte efeito hipoglicêmico entre 60 e 180 minutos após sua administração, com retorno aos níveis glicêmicos normais ao final de 360 minutos. Esse resultado está em acordo com os resultados apresentados por Barichello e colaboradores (1999a), onde foi observado que as formulações que continham ácidos graxos insaturados, administrados por via retal, levaram a uma redução significativa dos níveis de glicose no soro dos animais e os efeitos hipoglicemiantes foram contínuos. Além disso, as formulações que continham o ácido oleico apresentaram uma maior biodisponibilidade da INS.

Estudos com géis de P407 contendo ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico, apresentaram valores médios de $T_{máx}$ baixos, indicando que a INS é absorvida rapidamente no reto (ONUKI *et al.*, 1999). A formulação P407+AO+INS apresentou resultado parecido, pois demonstrou ter um $T_{máx}$ baixo, em torno das primeiras três horas, após a sua administração na mucosa retal.

A administração da formulação de P407+OB+INS resultou num efeito hipoglicêmico semelhante à formulação P407+AO+INS no tempo de 60 minutos. Por outro lado, o efeito hipoglicêmico desta formulação se manteve constante ao longo dos 360 minutos em que foi realizado o experimento. Estas formulações, comparadas às formulações controles (P407+INS, P407 e P407+OB) apresentaram diferença estatisticamente significativa. Polímeros como P407, que formam um sistema bioadesivo, proporcionam um aumento de contato da formulação com o muco que reveste a mucosa, diminuindo a degradação enzimática da INS no percurso entre a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e a ação do agente promotor de absorção na mucosa. A permanência da formulação próxima à mucosa proporciona um gradiente de concentração favorável a absorção da INS (SILVA *et al.*, 2003b).

Estudo realizado por Onuki e colaboradores (2000) demonstrou que formulações do tipo emulsão contendo INS, P407 e ácidos graxos insaturados, induziram uma diminuição gradual do nível de glicose no soro dos animais e este efeito foi mantido até seis horas após a administração da formulação. Isso pode ser explicado também, pelo fato que, formulações de hidrogel que contém ácido oleico apresentaram menores tamanho de partículas/micelas, aumentando a liberação e absorção da insulina.

É importante considerar que as formulações P407+AO+INS e P407+OB+INS, apresentaram micelas/gotículas com tamanho médio pequeno, $72,7 \pm 7,02$ e $335,2 \pm 32,31$ respectivamente, característica que podem ter influenciado na absorção da INS presente nas formulações, levando a uma diminuição dos níveis de glicose dos animais.

De acordo com os estudos de Morishita e colaboradores (2004), que avaliaram hidrogéis poliméricos contendo INS, partículas menores demonstraram uma rápida liberação de INS e uma elevada absorção em comparação a partículas de tamanhos maiores, resultando num maior efeito hipoglicemiante sem causar dano observável a mucosa. Os autores sugeriram que isso se deve ao fato de partículas menores possuírem uma elevada capacidade mucoadesiva no trato intestinal, demonstrando que o tamanho das partículas foi um parâmetro importante em relação ao aumento da biodisponibilidade de INS.

Morishita e colaboradores (2001) demonstraram em seus experimentos que a presença dos ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, como, por exemplo, o ácido oleico, ácido graxo que se encontrou em grandes quantidades no óleo de buriti, modificaram o processo de liberação do fármaco na matriz do gel de P407. Além disso, os hidrogéis de P407 após dissolução em água formam duas regiões anfifílicas distintas, com isso a partição do fármaco nessas duas regiões do polímero influencia a difusão e a liberação dos fármacos através da matriz do gel. A adição de substâncias hidrofóbicas, como os ácidos graxos, aumenta a viscosidade da formulação, reduzindo o número e a dimensão dos canais aquosos na matriz do gel, por onde os fármacos hidrofílicos, como a INS se difundem.

A presença de OB na formulação P407+OB+INS também demonstrou reduzir a hidrofília do microambiente micelar, fator que pode ter levado a uma diminuição da difusão de INS através das micelas do gel, resultando num prolongamento do efeito hipoglicêmico pelo período de 6 horas. A análise do OB revelou que o óleo é constituído também por outros ácidos graxos além do AO, que atribuem outras características importantes a formulação, como o ácido palmítico, presente no óleo cerca de 15,61%. O ácido palmítico é um ácido graxo saturado, usado em formulações orais, não possuindo características irritantes na pele (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Devido a sua alta concentração no OB, pode ter favorecido a absorção da INS, levando a liberação prolongada e contínua desse fármaco.

Estudos realizados por Hashizume e colaboradores (1992), demonstraram que o uso do ácido palmítico (Palinis) como agente modificador químico da molécula de INS, obteve dois derivados, o B1-monopalmitoil (Palins-1) e o B1, B229-dipalmitoil (PALins-2). Esses derivados elevaram a lipofilia da molécula e diminuiu a sua degradação no tecido mucoso do

intestino grosso. Além disso, o ácido palmítico resultante da degradação do Palins contribuiu para aumentar a absorção da INS.

Mesiha e colaboradores (1994) administraram por via oral em coelhos saudáveis emulsões de INS contendo diversos ácidos graxos. Esse estudo demonstrou que a emulsão contendo ácido palmítico reduziu a glicose no sangue de 105 para 75 mg/dL em 30 min. O efeito se estendeu por 150 minutos com diferença estatisticamente significativa em comparação com as outras emulsões.

A presença do ácido linoleico na composição do OB, apesar de ser em baixas concentrações, cerca de 1,39%, como observa-se na análise de CG, é um dos componentes do óleo que contribui pela ação protetora da mucosa, protegendo-a contra possíveis danos causados pela alta concentração do AO. A sua presença é muito benéfica à saúde pois ele é um ácido graxo essencial, no qual faz partes de rotas metabólicas importantes no organismo, principalmente na produção dos eicosanoides, que são moléculas mediadoras do processo inflamatório (PIMENTEL *et al.*, 2015).

Na Figura 24 é apresentado os resultados dos níveis séricos de glicose após administração retal da formulação P407+OB+INS em ratas albinas Fischer diabéticas e saudáveis.

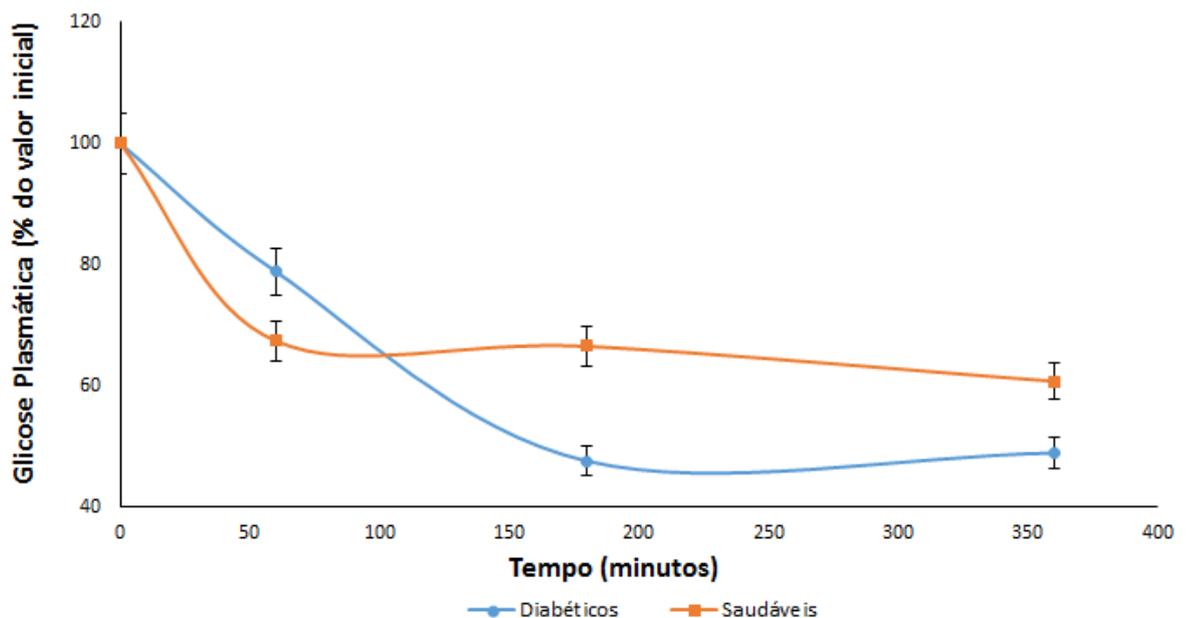


Figura 24 – Níveis séricos de glicose após administração retal da formulação P407+OB+INS em ratas albinas Fischer diabéticas e saudáveis. Os valores representam as médias de cinco animais e o desvio padrão.

Na Figura 24 é observado que o efeito hipoglicêmico 60 minutos após a administração da formulação foi mais expressivo nos animais saudáveis. Por outro lado, o efeito hipoglicêmico da formulação nos tempos de 180 e 360 minutos foi mais expressivo nas ratas diabéticas do que nas ratas saudáveis. Em ambos os casos o efeito hipoglicêmico foi contínuo até o tempo de 360 minutos em que foram realizado os estudos.

Correia (2014), realizou experimentos, onde foram administrados pela via oral, emulsão múltipla A/O/A, contendo um polímero e insulina, em ratas diabéticas. Foi observado em seu experimento um efeito hipoglicemiante prolongado e contínuo durante as cinco horas do experimento.

Estudo realizado por Mascarenhas e colaboradores (2013) onde foram administrados em camundongos suíços, machos e diabéticos, um sistema polimérico de micropartículas contendo insulina, foi observado um declínio da glicemia na fase inicial do experimento semelhante ao observado em humanos após a administração de insulina regular, porém a formulação testada apresentou efeito hipoglicêmico por um período de tempo maior e contínuo até 48 horas após a administração da formulação pela via subcutânea.

A formulação P407+OB+INS, apresentou resultados semelhantes, na primeira hora após a sua administração, com um declínio na glicemia dos ratos, efeito semelhante ao da INS humana regular quando administrada em humanos diabéticos, onde a sua faixa de atuação é cerca de 2 a 5 horas, semelhante ao efeito contínuo e prolongado apresentado pela formulação testada, que apresentou um efeito mais duradouro que o apresentado pela INS em humanos. O uso do polímero P407 ajuda a estabilizar a INS contra a sua auto-agregação, fator responsável pela perda da sua função biológica (Barichello et al., 1999b).

De acordo com Khafagy e colaboradores (2007), a via retal é considerada uma rota mais fisiológica para a aplicação da INS, pois a administração desse fármaco por essa via evita o metabolismo de primeira passagem pelo fígado, além disso, essa via é livre de enzimas proteolíticas que degradam a INS. Estudos realizados por esses autores, onde foi administrado um supositório, contendo P407, INS e o agente promotor de permeação salicilato de sódio, demonstrou que esse sistema termo reversível que sofre transição de fase de líquido para gel bioadesivo à temperatura corpórea, aumentou a biodisponibilidade da insulina, podendo ser um sistema promissor, seguro e eficaz para a administração não invasiva de insulina (KHAFAGY et al., 2007).

Cabe salientar que estudos realizados por Morishita e colaboradores (2000), onde foi administrado emulsões múltiplas A/O/A contendo 2% de ácido oleico puro como promotor de absorção retal de INS em ratos Wistar saudáveis, foi observado um efeito hipoglicêmico, entretanto houve pequenos danos, irritação da mucosa retal causados pelo ácido oleico. Esse fator pode limitar o estudo e o uso contínuo dessas formulações por pacientes diabéticos.

Os resultados deste trabalho demonstram que a formulação proposta possui perperspectiva futura para a administração de insulina por uma via não invasiva em pacientes diabéticos, no qual os sistemas bioadesivos, com o auxílio de promotores de absorção, como os ácidos graxos presentes no óleo de buriti, podem aderir a mucosa, melhorando a biodisponibilidade de fármacos protéicos e peptídicos, assim como a sua absorção, transporte, e evitar ou diminuir efeitos adversos causados pela necessidade de administrar inúmeras doses do fármaco.

Desta forma, o P407, combinado com o OB, que por conter outros compostos, como carotenoides e tocoferol, além dos ácidos graxos, podem acrescentar outros efeitos importantes à formulação como, por exemplo, efeito antioxidante e protetor da mucosa, permitindo o uso contínuo desta formulação exigido no tratamento do diabetes, evitando os danos causados pelo uso apenas do ácido oleico na formulação, aumentando a adesão do paciente ao tratamento, além de melhorar a sua qualidade de vida.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A formulação P407+OB+INS preparada e caracterizada neste trabalho, apresentou tamanho de partícula na faixa de 300 nm com índice de polidispersão de cerca de 0,46 e valores de potencial zeta de -44 mV.

A análise do óleo de buriti realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas evidenciou os ácidos oleico e palmítico como compostos majoritários do óleo.

A avaliação das micelas de P407+OB+INS por meio da técnica de espectrometria de fluorescência utilizando o pireno como sonda fluorescente demonstrou que a adição de óleo de buriti a 10% reduziu consideravelmente a polaridade das micelas em comparação à adição de 5% de AO.

A formulação P407+OB+INS administrada por via retal apresentou efeito hipoglicêmico contínuo durante o tempo de 6 horas em comparação a formulação de P407+AO+INS, a qual teve um pico em 1 hora e o retorno aos níveis glicêmicos normais ao final do tempo de 6 horas. Resultados semelhantes foram observados na avaliação do efeito hipoglicêmico da formulação P407+OB+INS em ratas albinas Fischer diabéticas, porém os animais apresentaram um efeito hipoglicêmico mais acentuado, após a primeira hora do experimento.

Com isso, conclui-se, que o óleo de buriti, por conter ácidos graxos de cadeias e insaturações variadas, pode ser utilizado como agente promotor de permeação em mucosas, sendo uma alternativa promissora para o desenvolvimento de formulação não invasiva para a administração de INS. Adicionalmente, a descrição da presença de substâncias com efeito antioxidante como, por exemplo, carotenoides, vitamina C e α -tocoferol no óleo de buriti, poderá proporcionar a formulação um efeito protetivo da mucosa frente ao efeito dos agentes promotores de absorção presentes no óleo de buriti.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMINISTRATION, U.s. Food And Drug. **Poloxâmer 407**. Disponível em: <http://google2.fda.gov/search?q=poloxamer+407&client=FDAgov&site=FDAgov&lr;=&proxystylesheet=FDAgov&requiredfields=archive:Yes&output=xml_no_dtd&getfields;=*>.

Acesso em: 02 fev. 2015.

ALMEIDA, B. **O Diagnóstico da Diabetes**. Disponível em: <<http://www.apdp.pt/index.php/diabetes/a-pessoa-com-diabetes/o-diagnostico-da-diabetes>>.

Acesso em: 19 dez. 2014.

ALMEIDA, M. O.; FERRÃO, A. L. M.; ZANGERONIMO, M. G. Aspectos farmacológicos da insulino-terapia no Diabetes Mellitus Tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, Lavras, v. 5, n. 8, p.1-17, mar. 2014.

ANDRADE, F.; FONTE, P.; OLIVA, M.; VIDEIRA, M.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Solid state formulations composed by amphiphilic polymers for delivery of proteins: characterization and stability. **International Journal Of Pharmaceutics**. Lisboa, p. 195-206. Mar. 2015.

ANDREANI, T.; MIZIARA, L.; LORENZÓN, E. N.; SOUZA, A. L. R.; KIIL, C. P.; FANGUEIRO, J. F.; GARCIA, M. L.; GREMIÃO, P. D.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**. Porto, p. 118-126. abr. 2015.

BARICHELLO, J. M.; MORISHITA, M; TAKAYAMA, K; CHIBA, Y; TOKIWA, S.; NAGAI, T. Enhanced rectal absorption of insulin-loaded Pluronic® F-127® gels containing unsaturated fatty acids. **International Journal of Pharmaceutics**, v.183, n.2, p.125-132, 1999a.

BARICHELO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Absorption of insulin from Pluronic® F127 gels following subcutaneous administration in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 184, n. 2, p.189-198, 1999b.

BARICHELO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.25, n.4, p.471-476, 1999c.

BASAK, Rajib; BANDYOPADHYAY, Ranjini. Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Pluronic F127 Micelles: Effects of Drug Hydrophobicity, Solution Temperature, and pH. **Langmuir**. Bangalore, p. 4350-4356. Mar. 2013.

BATISTA, J. S.; OLINDA, R. G.; MEDEIROS, V. B.; RODRIGUES, C. M. F.; OLIVEIRA, A. F.; PAIVA, E. S.; FREITAS, C. I. A.; MEDEIROS, A. C. Antibacterial and healing activities of buriti oil *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 1, p.136-141, 2012.

CALDWELL, L.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J. H.; HIGUCHI, T. Lymphatic uptake of water-soluble drugs after rectal administration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.34, n. 8, p.520-522, 1982.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**. Santiago, p. 530-536. Maio 1996.

CAON, T.; JIN, L.; SIMÕES, C. M. O.; NORTON, R. S.; NICOLAZZO, J. A. Enhancing the Buccal Mucosal Delivery of Peptide and Protein Therapeutics. **Pharm Res**. Parkville, p. 1-21. Ago. 2015.

CAVAIOLA, T. S.; EDELMAN, S. Inhaled Insulin: A Breath of Fresh Air? A Review of Inhaled Insulin. **Clinical Therapeutics**, San Diego, v. 36, n. 8, p.1275-1289, ago. 2014.

CERTO, T. S. Desenvolvimento de produto liofilizado que se transforma em gel no trato gastrointestinal e promove a absorção de insulina na mucosa do intestino. 2013. 78 f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

CORREIA, C. J. **Nanopartículas de insulina para administração oral**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.

CYMERYS, M.; FERNANDES, N. M. P.; RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C. Buriti. In: **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Pará: Novatec, 2005. p. 187-194.

DAVIS, S. N.; GRANNER, D. K. Insulina, Hipoglicemiantes orais, e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2005. Cap. 61. p. 1262-1285.

DIABETES, Sociedade Brasileira de. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: Gen, 2014.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of Poloxamero 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n.12, p. 2709-28, 2006.

ELLINGER, V. **Tirando Dúvidas: Insulina Inalável**. 2015. Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/tirando-duvidas-insulina-inalavel/>>. Acesso em: 07 jun. 2015.

FADISTA, A. F. S. **Insulinoterapia: vias e sistemas de administração alternativos**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade do Algarve, Faro, 2011.

FERNANDES, V. C.; DENADAI, A. M. L.; MILLÁN, R. D. S. Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil- β - ciclodextrina e insulina:hidroxipropil- β - ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Belo Horizonte, v. 43, n. 4, p.543-553, dez. 2007.

FERREIRA, L. A.; CERTO, T. S.; BORGES, G. S. M.; SANTOS, G. O.; BARICHELO, José M. Estudo da fluorescência de hidrogéis micelares de poloxamero 407 para uso no tratamento da leishmaniose tegumentar. In: ESTUDOS CIENTÍFICOS APLICADOS A NOVAS TECNOLOGIAS, 1., 2012, Alegre. **Anais**. Alegre: Caufes, 2012. p. 1 - 130.

FIGUEIRA, L. C. **Espectroscopia vibracional (no infravermelho e raman) e espectrofotometria de absorção uv-vis dos óleos de buriti (*Mauritia flexuosa*) e de patauá (*Oenocarpus bataua*)**. 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2012.

FISCHER, S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. **Advanced Lipid Research**, v.23, p.169-198, 1989.

GILBERT, J. C.; HADGRAFT, J.; BYE, A.; BROOKES, L. G. Drug release from Pluronic® F-127 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 32, n. 2-3, p.223–228, 1986.

GENUTH, S. Type 1 diabetes mellitus. **ACP Medicine**, p. 1-19, 2008.

GROSS, J.I.; NEHME, M. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. **Revista Associação Médica do Brasil**, São Paulo, v. 45, n. 3, p.279-284, dez. 1999.

GUIMARÃES, C. **Sintomas da Diabetes**. 2012. Disponível em: <<http://saboridades.net/2012/09/12/sintomas-do-diabetes-tipo-2/>>. Acesso em: 19 dez. 2014.

M. Hashizume; T. Douen M; Murakami, A; Yamamoto, K; Takado, S; Muranishi. Improvement of large intestinal absorption of insulin by chemical modification with palmitic acid in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 44, p. 555-559, 1992.

HIRSCH, I.B. Insulin analogues. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 174-183, 2005.

HOFFMAN, A.; ZIV, E. Pharmacokinetics considerations of new insulin formulations and routes of administration. **Drug Disposition**, v.3, n.4, p.285-301, 1997.

INDUSTRY, Amazon Oil. **ÓLEO BURITI - BURITI (Mauritia flexuosa, Arecaceae)**. Disponível em: <<http://www.amazonoil.com.br/produtos/oleos/buriti.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

ISPN, Instituto Sociedade População Natureza. **Cerratinga, produção sustentável e consumo consciente: Buriti**. Disponível em: <<http://www.cerratinga.org.br/buriti/>>. Acesso em: 02 fev. 2015.

JONES, M.-c.; LEROUX, J.-c. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal Of Pharmaceutics e Biopharmaceutics**. Quebec, p. 101-111. set. 1999.

JUSTE, M. **Insulina inalável deixará de ser produzida mundialmente**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Ciencia/0,,MUL153238-5603,00-INSULINA+INALAVEL+DEIXARA+DE+SER+PRODUZIDA+MUNDIALMENTE.html>>. Acesso em: 07 jun. 2015.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic[®] block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2-3, p. 189-212, 2002.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Tóquio, v. 47, n. 1, p.113-131, mar. 2001.

KHAFAGY, E.; MORISHITA, M.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K. . Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Tokyo, p. 1521-1546. ago. 2007.

KLAFKE, A.; DUNCAN, B. B.; ROSA, R. S.; MOURA, L.; MALTA, D. C.; SCHMIDT, M. I. Mortalidade por complicações agudas do diabetes melito no Brasil, 2006-2010. **Epidemiologia Serviço de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 3, p.455-462, set. 2014.

KÜLKAMP, I. C.; GUTERRES, K. P. e S. S.; POHLMANN, A. R.. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, Porto Alegre, v. 8, n. 32, p.2078-2084, set. 2009.

LAGE, N. N. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA FARINHA DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) IN VITRO E EM RATOS DIABÉTICOS**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

MÄLKIÄ, A.; MURTOMÄKI, L.; URTTI, A.; KONTTURI, K. Drug permeation in biomembranes: in vitro and in silico prediction and influence of physicochemical properties. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 23, n. 1, p. 13-47, 2004.

MANHÃES, L. R. T.; SABAA-SRUR, A. U. O. Centesimal composition and bioactive compounds in fruits of buriti collected in Pará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 4, p.856-863, dez. 2011.

MAZZANTI, C. M., SCHOSSLER, D. R., FILAPPI, A., PRESTES, D., BALZ, D., MIRON, V., MORSCH, A., SCHETINGER, M. R. C., MORSCH, V. M., CECIM, M. Extrato da casca de *Syzyium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, 33, 6, 1061-1065, 2003.

MORISHITA, M.; MATSUZAWA, A.; TAKAYAMA, K.; ISOWA, K.; NAGAI, T. Improving insulin enteral absorption using water-in-oil-in-water emulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 172, n. 1-2, p. 189-198, out 1998.

MORISHITA, M.; KAJITA, M.; SUZUKI, A.; TAKAYAMA, K.; CHIBA, Y.; TOKIWA, S.; NAGAI, T. The dose-related hypoglycemic effects of insulin emulsions incorporating highly purified EPA and DHA. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, n. 2, p.175-185, 2000.

MORISHITA, M.; BARICHELLO, J. M.; TAKAYAMA, K.; CHIBA, Y.; TOKIWA, S.; NAGAI, T. Pluronic® F127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for

bucca delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.212, n. 2, p.289-293, 2001.

MORISHITA, M.; GOTO, T.; PEPPAS, N. A.; JOSEPH, J. I.; TORJMAN, M. C.; MUNSICK, C.; NAKAMURA, K.; YAMAGATA, T.; TAKAYAMA, K.; LOWMAN, A. M. Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: effect of particle size on insulin enteral absorption. **Journal of controlled release**, v. 97, n. 1, p. 115-24, 2004.

ONUKE, Y.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; TOKIWA, S.; CHIBA, Y.; ISOWA, K.; NAGAI, T.. In vivo effects of highly purified docosahexaenoic acid on rectal insulin absorption. **International Journal Of Pharmaceutics**. Tokyo, p. 147-156. dez. 1999.

ORGANIZATION, World Health. **Diabetes action now**. Geneva: Who Library, 2011.

PAMNANI, D. Reality Check on Oral Insulin. **Pharma Express**, p.16-31, 2008.

PANKAJ, M. **Sistema de liberação micelar misto e método de preparação**. BR nº PI9804295-5 B1, 27 out. 1998, 04 nov. 2008. p. 1-44.

PENA, A. **Bioquímica da Célula: Água e Sua Importância Biológica**. 2011. Disponível em: <<http://biochemistryofcell.blogspot.com.br/2011/10/agua-e-sua-importancia-biologica.html>>. Acesso em: 06 jul. 2015.

PEREIRA, N. S. **Estudo comparativo entre PS/beta caroteno e PS/ácido oleico com PS/óleo de buriti (Mauritia flexuosa) e preparação e caracterização dos materiais PS/óleo de açaí (Euterpe oleraceae Mart)**. 2008. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

PERINI, J. A. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER, J. E. L.; DALALIO, M. M. O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, Maringá, v. 6, n. 23, p.1075-1086, dez. 2010.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1.

Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 52, p. 268-278, 2008.

PERRY, C. C.; SABIR, T. S.; LIVINGSTON, W. J.; MILLIGAN, J. R.; CHEN, Q.; MASKIEWICZ, V.; BOSKOVIC, D. S. Fluorescence of commercial Pluronic F127 samples: Temperature-dependent micellization. **Journal Of Colloid And Interface Science**. Loma Linda, p. 662-669. out. 2011.

PIMENTEL, S. A.; KUMAGAI, E. E.; CARUSO, M. S. F.; TAKEMOTO, E.; TAVARES, M. Composição de ácidos graxos e tocoferóis em óleos especiais. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2. 2005, Lavras. **Anais...** Lavras: Sbeb, 2005. p. 511 - 515.

REIS, C. P. Novas Alternativas Terapêuticas Para a Administração Oral da Insulina. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, Lisboa, v. 5, n. 2, p.174-205, out. 2008.

REUTERS, D. **Laboratório lança insulina inalável para diabéticos nos Estados Unidos**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2015/02/laboratorio-lanca-insulina-inalavel-para-diabeticos-nos-estados-unidos.html>>. Acesso em: 7 jun. 2015.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. P. In: ROWE, Raymond C; SHESKEY, Paul J; QUINN, Marian e. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. Washington: Pharmaceutical Press, 2009. p. 506.

SAMPAIO, M. B.; CARRAZZA, L. R. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto e da Folha do Buriti (Mauritia flexuosa)**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2012.

SANTOS, M. F. G; MARMESAT, S; BRITO, E. S.; ALVES; DOBARGANES, M. C. Major components in oils obtained from Amazonian palm fruits. **Grasas y Aceites**, Macapá, v. 64, n. 3, p.328-334, jun. 2013.

SAÚDE, Organização Mundial de. **Diabetes action now**. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/actionnow/en/DANbooklet.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

SAÚDE, Ministério da; A SAÚDE, Secretaria de Atenção; BÁSICA, Departamento de Atenção. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica diabetes mellitus**. Brasília: Ms-os, 2013.

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**, Porto Alegre, v. 26, n. 5, p.726-737, 27 fev. 2003.

SCHMOLKA, I. R. Poloxamers in the pharmaceutical industry. In: TARCHA, P.J. *Polymers for Controlled Drug Delivery*. cap. 10, p.189-214. **CRC Press: Boca Raton**, 1991.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Coimbra, v. 38, n. 2, p.125-140, jun. 2002.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Coimbra, v. 39, n. 1, p.1-20, mar. 2003a.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F. Administração oral de peptídios e proteínas: III. Aplicação à insulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Coimbra, v. 39, n. 1, p.21-40, mar. 2003b.

STILL, J.G. **Development of oral insulin**: progress and current status. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18, S29–S37. 2002.

SUZUKI, A.; MORISHITA, M.; KAJITA, M.; TAKAYAMA, K.; ISOWA, K.; CHIBA, Y.; TOKIWA, S.; NAGAI, T.; Enhanced Colonic and Rectal Absorption of Insulin Using a Multiple Emulsion Containing Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**. Tokyo, p. 1196-1202. out. 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (Rio de Janeiro). Camile Moreira Mascarenhas; Eduardo Ricci Júnior; Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima; Luis

Henrique Guerreiro Rosado. **Sistema polimérico de confinamento de insulina, processo e uso de dito sistema**. BR nº PI 1103164-6 A2, 13 jun. 2011, 23 jul. 2013.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Belo Horizonte, v. 20, n. 1, p.51-64, nov. 2010.

WANNMACHER, L. Novas insulinas: qual a real vantagem? **Temas selecionados. OPAS. Ministério da Saúde**, v. 3, p. 1-6, 2005.