

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANDRÉ LUIS DE LIMA**

**INFLUÊNCIA DA INSULINA ORAL NO EPITÉLIO INTESTINAL: UMA AVALIAÇÃO  
DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
CONTENDO INSULINA EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA  
HIPERCALÓRICA**

**PONTA GROSSA**

**2021**

ANDRÉ LUIS DE LIMA

**INFLUÊNCIA DA INSULINA ORAL NO EPITÉLIO INTESTINAL: UMA AVALIAÇÃO  
DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
CONTENDO INSULINA EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA  
HIPERCALÓRICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski

Coorientadora: Prof. Dra. Márcia Regina Carletto

PONTA GROSSA

2021

L732 Lima, André Luis de  
Influência da insulina oral no epitélio intestinal: uma avaliação dos efeitos da administração de nanopartículas poliméricas contendo insulina em animais alimentados com dieta hipercalórica / André Luis de Lima. Ponta Grossa, 2021. 70 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski.

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Carletto.

1. Diabetes. 2. High-fat diet. 3. Insulina oral. 4. Nanopartículas. 5. Eudragit s100. I. Lipinski, Leandro Cavalcante. II. Carletto, Márcia Regina. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 616.462

ANDRÉ LUIS DE LIMA

**INFLUÊNCIA DA INSULINA ORAL NO EPITÉLIO INTESTINAL: UMA AVALIAÇÃO  
DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
CONTENDO INSULINA EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA  
HIPERCALÓRICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 17 de setembro de 2021



---

Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski – Orientador



---

Profa. Dra. Adriana Yuriko Koga



---

Profa. Dra. Carla Rosa Dubiela

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem feito em minha vida, por estar presente em todos os momentos, por me fazer acreditar que seria possível, por me manter firme nesse propósito e por ter me dado forças para continuar estudando e trabalhando na UPA - Unidade de Pronto Atendimento 24h de Castro – Paraná, nesse momento tão difícil que estamos vivendo de pandemia de COVID-19. Algo sem precedentes, que não tínhamos nenhuma noção ou ideia do que estávamos enfrentando e que agora esperamos superar brevemente.

À minha esposa, que sempre acreditou em mim, por estar sempre ao meu lado, por todos incentivos e compreensão. Olha o quão longe nós chegamos querida!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski, que me deu essa tamanha oportunidade, sempre serei grato, não teria como eu não deixar registrado aqui a grande honra que foi ter essa experiência de trabalhar junto nessa pesquisa, muito obrigado por tudo que esse mestrado me proporcionou e ainda vai me proporcionar, e também pela paciência, por toda dedicação, confiança e conhecimento compartilhado, esse conhecimento vou levar pra sempre.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marcia Regina Carletto (Marciah), que me acolheu, muito obrigado pelos seus ensinamentos, pelas reuniões e conselhos, foi uma oportunidade única, tenho um grande respeito e admiração.

As então, agora doutoras, Adriana Yuriko Koga e Bruna Carletto que sempre me ajudaram, desde o início da pesquisa, “meu Deus”, vocês duas são um sinônimo de dedicação, obrigado pelos conhecimentos, por serem prestativas nas diferentes etapas deste trabalho, eu não teria conseguido finalizar sem vocês. Desejo a vocês duas, o maior sucesso.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, que nesse período de pandemia travou sua maior batalha... Mas Deus é soberano e literalmente como que com um “sopro”, o trouxe de volta a vida, trazendo alívio e alegria para todos os familiares, amigos, alunos e conhecidos, foram muitos os que tiveram fé e não desistiram de orar. Muito obrigado Professor! Foi uma honra ser seu aluno, obrigado pelo conhecimento que me proporcionou, obrigado pela infraestrutura e equipamentos de seu laboratório sem o qual não teríamos conseguido finalizar essa pesquisa.

À Dr<sup>a</sup>. Traudi Klein, por seu precioso tempo, paciência e boa vontade que demonstrou, sou muito grato por ter me recebido com todo carinho desde a nossa primeira conversa, por me auxiliar sempre que precisei, foram muitas orientações para o desenvolvimento desta pesquisa. Tenha certeza que vou sempre me lembrar com muita gratidão.

À agora Dr<sup>a</sup>. Janaina Emiliano, por toda paciência, pelos “puxões de orelha”, hoje sei que devo anotar tudo, “mas tudo mesmo”, pelo companheirismo, dedicação e palavras de incentivo, nunca vou esquecer do seu esforço, sua ajuda foi essencial. Muito obrigado pelos seus ensinamentos e amizade.

Às Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Dionízia Xavier Scomparin e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Márcia Thaís Pochapski, por terem aceitado o convite de participação no exame de qualificação, pelo carinho e compreensão, disponibilidade, interesse e por todas as observações e apontamentos que ajudaram e muito na finalização do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos ensinamentos e exemplo profissional.

Aos colegas de turma do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial aos amigos Aline Scottini, Marília Rizzi e Simonei Bonatto, pessoas excelentes que tive o prazer de conhecer e conviver nesse período, foram muitos momentos de desabafo, mas também alegrias.

Aos funcionários e técnicos de laboratório pelo respeito e disposição, por toda ajuda durante essa pesquisa, em especial, a Ester e o Lucas.

Ao Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos auxílios com os animais e procedimentos que foram realizados.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela grande oportunidade de ser um de seus alunos. Será sempre uma honra ter sido parte desta excelente Instituição.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

**Isac Newton**

## RESUMO

A insulina é o hormônio mais utilizado e eficaz no controle do Diabetes *Mellitus* (DM). No entanto, sua aplicação é limitada à via subcutânea. Por se tratar de uma via invasiva, está associada a uma série de desvantagens, levando a complicações, resultando em baixa adesão ao tratamento. A via oral é mais segura, devido ao caráter não invasivo e efeito terapêutico prolongado, porém medicamentos administrados por essa via devem ter propriedades que garantam sua biodisponibilidade. Entre esses fatores, a solubilidade adequada, estabilidade nos diferentes ambientes do trato gastrointestinal, além da permeabilidade intestinal. A insulina sendo hormônio peptídico, se ingerida, imediatamente seria clivada pelas enzimas estomacais, perdendo sua função. Além disso, alto peso molecular e presença de cargas superficiais tornam a permeabilidade intestinal da insulina outra questão a ser superada. Com objetivo de aumentar a biodisponibilidade da insulina por via oral, foram desenvolvidas nanopartículas de insulina oral (INOR) a partir da insulina Humulin® Regular (IHR) e do polímero Eudragit® S100 (ES-100) pelo método de *spray-drying*. As INOR obtidas tiveram valores de rendimento superior a 99%. A quantificação foi realizada por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC). O método mostrou-se específico e linear ( $R=0,999$ ), com tempo de análise de 3,0 minutos. Para avaliação dos efeitos das INOR no epitélio intestinal realizou-se o estudo em 60 ratos Wistar divididos em 4 Grupos: Grupo 1 (Controle), Grupo 2 (Diabetizados), Grupo 3 (Tratados com INOR) e Grupo 4 (Diabetizados tratados com INOR). Todos os grupos receberam ração *high-fat diet* (HFD). Para a diabetização, os Grupos 2 e 4 receberam 20 mg/kg de estreptozotocina (STZ). Os animais foram pesados quinzenalmente, por 60 dias. Após este período e a eutanásia, coletaram-se as amostras para realização dos testes bioquímicos. Durante as 8 semanas, nos 4 grupos, ocorreu leve hiperglicemia e um leve aumento da massa, mesmo aos submetidos a STZ e INOR. Analisando os tamanhos dos vilos e criptas do duodeno, houve diferença estatística no Grupo 3, ratos tratados com INOR, evidenciando um aumento do tamanho da cripta em relação aos demais grupos. As INOR apresentaram como efeito local o aumento da profundidade da cripta intestinal, e atuação em nível de gorduras mesentérica e retroperitoneal mesmo em animais sujeitos a HFD, conseguindo sensibilizar o metabolismo de lipídios pelas gorduras viscerais.

**Palavras-chave:** Diabetes. *High-fat Diet*. Insulina Oral. Nanopartículas. Eudragit S100. Epitélio Intestinal. *spray-drying*. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.



## ABSTRACT

Insulin is the most used and effective hormone in the control of Diabetes Mellitus (DM). Its application, however, is limited to the subcutaneous route. As it is an invasive route, it is associated with a series of disadvantages, leading to complications, resulting in low adherence to the treatment. The oral route is safer, due to its non-invasive character and prolonged therapeutic effect, but drugs administered by this route must have properties that guarantee their bioavailability. Among these factors, adequate solubility, stability in different environments in the gastrointestinal tract, in addition to intestinal permeability. Insulin, being a peptide hormone, if ingested, would immediately be cleaved by stomach enzymes, losing its function. Furthermore, its high molecular weight and the presence of surface charges make intestinal permeability to insulin another issue to be overcome. In order to increase the bioavailability of insulin by the oral route, oral insulin nanoparticles (INOR) were developed from Humulin® Regular insulin (IHR) and the polymer Eudragit® S100 (ES-100) by the spray-drying method. The INORs that were obtained had yield values greater than 99%. Quantification was performed by Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). The method was specific and linear ( $R=0.999$ ), with an analysis time of 3.0 minutes. To evaluate the effects of the INOR on the intestinal epithelium, the study was carried out in 60 Wistar rats divided into 4 Groups: Group 1 (Control), Group 2 (Diabetized), Group 3 (treated with INOR) and Group 4 (Diabetized treated with INOR). All groups received high-fat diet (HFD). For the diabetization, Groups 2 and 4 received 20 mg/kg of streptozotocin (STZ). The animals were weighed every fortnight, for 60 days. After this period and after euthanasia, samples were collected to perform the biochemical tests. During the 8 weeks, in the 4 groups, there was mild hyperglycemia and a slight increase in mass, even in those undergoing STZ and INOR. Analyzing the sizes of the villi and crypts of the duodenum, there was a statistical difference in Group 3, rats treated with INOR, showing an increase in the size of the crypt in relation to the other groups. The INORs had as a local effect the increase in the depth of the intestinal crypt, and action at the level of mesenteric and retroperitoneal fats even in animals subjected to HFD, managing to sensitize the lipid metabolism by visceral fats.

**Keywords:** Diabetes. High-fat Diet. Oral Insulin. Nanoparticles. Eudragit S100. Intestinal Epithelium. spray-drying. Ultra High Performance Liquid Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Octeto Sinistro.....	20
Figura 2: Estrutura primária da insulina humana.....	22
Figura 3: Estrutura química da estreptozotocina.....	25
Figura 4: Modelos de estruturas das nanopartículas.....	27
Figura 5: Estrutura química genérica do polímero Eudragit® S100.....	29
Figura 6: Equipamento de <i>spray-dryer</i> .....	30
Figura 7: Divisão dos grupos conforme tratamento.....	35
Figura 8: Fotos das lâminas.....	38
Figura 9: Análise do duodeno com câmera 0,5x em zoom de 4x.....	39
Figura 10: Cromatograma de UHPLC correspondente ao padrão analítico da IHR na concentração de 50 µg.mL <sup>-1</sup> .....	41
Figura 11: Cromatograma da nanopartícula sem INOR.....	41
Figura 12: Cromatograma da nanopartícula com INOR.....	42
Figura 13: Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da IHR obtida por UHPLC ( $\lambda = 273$ nm).....	42
Figura 14: Fotomicrografias obtidas por FEG: Nanopartículas sem IHR e nanopartículas com IHR (Aumento de 40.0KX).....	46
Figura 15: Perfil glicêmico dos animais ao longo do tempo.....	47
Figura 16: Peso dos animais realizado no último dia do experimento.....	48
Figura 17: Peso dos animais medidos conforme a variação no tempo.....	49
Figura 18: Resultado análise histológica dos vilos e criptas duodenais.....	50
Figura 19: Resultado análise histológica dos vilos e criptas ilíacas.....	51
Figura 20: Pesos do duodeno e íleo - Avaliação das amostras após a limpeza	53
Figura 21: Peso das gorduras mesentéricas - Avaliação após 60 dias de tratamento sob HFD.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados de ANOVA para linearidade do método.....	43
Tabela 2: Teor de IHR incorporada nas nanopartículas.....	43
Tabela 3: Diâmetro médio das nanopartículas.....	45
Tabela 4: Valores de potencial zeta das nanopartículas.....	45
Tabela 5: Médias das medidas do duodeno.....	50
Tabela 6: Médias das medidas do íleo.....	51
Tabela 7: Médias das medidas do retroperitônio.....	54
Tabela 8: Médias das medidas do mesentério.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AMC	<i>Analytical Methods Committee</i>
ANOVA	Análise de Variância
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM1	DM Tipo 1
DM2	DM Tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EFEN	Eficiência de encapsulação
ES-100	Eudragit® S100
FEG	Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2
HE	Hematoxilina e Eosina
HFD	<i>High-fat diet</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on the Harmonisation</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IHR	Humulin® Regular
IHRt	IHR teórica
IHRne	IHR não encapsulada
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IMC	Índice de massa corporal
INOR	Nanocápsulas de insulina oral
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato receptor de insulina
LGR5	<i>Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NPs	Nanopartículas poliméricas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPAR $\gamma$	Receptor $\gamma$ ativado por proliferador de peroxissoma
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SCFAs	Ácidos graxos de cadeia curta
SGLT1	<i>Sodium-glucose linked transporter 1</i>
SNC	Sistema nervoso central
STZ	Estreptozotocina
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 GERAL .....	17
2.2 ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
3.1 DIABETES.....	17
3.2 OBESIDADE .....	20
3.3 INSULINA ORAL .....	21
3.4 <i>HIGH-FAT DIET</i> .....	23
3.5 ESTREPTOZOTOCINA.....	24
3.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS.....	26
3.6.1 Polímeros e sistemas pH dependentes.....	28
3.6.2 Eudragit® S100.....	28
3.6.3 <i>Spray-drying</i> .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PELO MÉTODO DE <i>SPRAY-DRYING</i> .31	
4.1.1 Desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).....	32
4.1.2 Preparo da Solução Padrão .....	32
4.1.3 Desenvolvimento do método para quantificação da IHR incorporada às nanopartículas.....	32
4.1.4 Quantificação e eficiência da IHR encapsulada às nanopartículas .....	33
4.1.5 Espectrometria de difração a laser.....	34
4.1.6 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo ( <i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy</i> – FEG-SEM) .....	34

4.2 MODELOS ANIMAIS.....	34
4.2.1 Diabetização.....	35
4.2.2 Verificação da glicemia.....	36
4.2.3 Tratamento.....	36
4.2.4 Coleta de materiais.....	36
4.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....	37
4.4 HISTOMORFOMETRIA.....	38
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
5.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	40
5.1.2 Desenvolvimento do método para quantificação da IHR incorporada às nanopartículas.....	40
5.1.3 Quantificação e eficiência da IHR encapsulada às nanopartículas.....	43
5.1.4 Diâmetro médio e índice de polidispersão.....	44
5.1.5 Potencial zeta.....	45
5.1.6 Análise Morfológica de Superfície.....	46
5.2 GLICEMIA.....	47
5.3 PESO DOS ANIMAIS.....	48
5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	49
5.5 PESO INTESTINAL.....	52
5.6 PESOS DAS GORDURAS MESENTÉRICAS.....	53
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* (DM), popularmente conhecido apenas como diabetes, tornou-se a doença mais epidêmica no mundo desde o século 20, é uma doença metabólica crônica que afeta a forma como o corpo transforma os alimentos em energia (CDC, 2020), é caracterizada pela alta concentração de glicose sanguínea (hiperglicemia), resultante da deficiência de insulina e/ou resistência à insulina, ocorre quando o pâncreas não consegue mais produzir insulina ou o corpo não consegue fazer uso adequado da insulina produzida (WHO, 2019; ALHARBI; THOMACOS; MCLELLAND, 2019; HUNG; HUNG, 2020).

O DM é um grande desafio da saúde pública, tanto em nações desenvolvidas como em nações em desenvolvimento (AWAD *et al.*, 2018). Nas últimas décadas, a prevalência de diabetes aumentou drasticamente no mundo todo, alimentada pelo envelhecimento da população mundial e por aumentos generalizados na obesidade. Essa epidemia silenciosa acarreta custos econômicos e sociais profundos (WEISMAN *et al.*, 2018). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimavam que 180 milhões de adultos tinham diabetes em 1980 (DODDS, 2017), já em 2015, 8,8% ou 415 milhões de pessoas viviam com diabetes em todo o mundo, quase o dobro dos 4,6% (151 milhões) que foram estimados no ano de 2000 (AWAD *et al.*, 2018; KOYE *et al.*, 2018).

O DM, se não tratado, pode causar problemas médicos graves, como doenças cardiovasculares, derrame, doença renal crônica, úlceras nos pés, lesões oculares e doenças renais prolongadas. Ainda não há cura definitiva para o DM e os pacientes muito mais do que medicações precisam confiar em um estilo de vida saudável pois tratar o DM vai muito além da terapêutica medicamentosa, engloba medidas de educação em saúde, atividade física e alimentação (ALHARBI; THOMACOS; MCLELLAND, 2019; SBD, 2020).

Até o momento a insulina é o hormônio mais utilizado e mais eficaz no controle do DM, no entanto sua aplicação é limitada a via subcutânea e pode requerer mais de uma dose diária, por se tratar de uma via invasiva está associada a uma série de desvantagens como eventos hipoglicêmicos, dor indesejada no local da aplicação, reações alérgicas, desconforto, hiperinsulinemia periférica e outros efeitos colaterais, resultando em baixa adesão ao tratamento. Concentrações excessivamente altas de insulina periférica estão associadas a doenças cardíacas coronárias, hipertensão,



dislipidemia e ganho de peso (HERRADOR ORTIZ; LLANOS MÉNDEZ, 2010; LI *et al.*, 2016; PAUL *et al.*, 2017).

A via oral continua sendo a via mais aceita e é a preferida para administração de medicamentos, considerando sua facilidade de administração sem a necessidade de um profissional especializado, ou mesmo de internação. Por diversos fatores, é considerada uma via mais segura, principalmente devido ao seu caráter não invasivo, com efeito terapêutico prolongado, dependente dos processos absorptivos e da dinâmica do trato gastrointestinal. Em geral, o tratamento realizado por via oral é de baixo custo, uma vez que essas formas farmacêuticas dispensam a necessidade de esterilização ou preparo em sala esterilizada. Soma-se a essas vantagens o fato de que uma ampla gama de classes terapêuticas de medicamentos, bem como diferentes formas farmacêuticas podem ser administradas por via oral (HOMAYUN; CHOI, 2020; UPPAL *et al.*, 2018; ALEXANDER, 2009)

Apesar das vantagens inerentes à via oral, medicamentos administrados por essa via devem ter uma série de propriedades que garantam sua biodisponibilidade. Entre esses fatores, a solubilidade adequada e a constante de dissociação de ácido, a estabilidade nos diferentes ambientes do trato gastrointestinal, são os mais importantes, além da permeabilidade intestinal. No entanto, proteínas e peptídeos terapêuticos são geralmente moléculas suscetíveis à desnaturação sob pH ácido do estômago, bem como degradação enzimática no estômago e no intestino delgado, causando perda da atividade terapêutica com a consequente incapacidade de serem administrados por via oral em sua forma livre (FONTE, 2013; AL RUBEAN; RAFIULLAH; JAYAVANTH, 2016; LIU, 2016).

Procurando aumentar e garantir a biodisponibilidade da insulina na administração por via oral, faz-se o uso da nanotecnologia, um campo de pesquisa altamente interdisciplinar, que tem sido usado em muitas áreas da ciência, como física, química, ciência farmacêutica, medicina e agricultura, com a nanotecnologia são desenvolvidas abordagens como o uso de inibidores de enzimas proteolíticas, potencializadores da absorção proteica (uso de polímeros mucoadesivos), uso de micelas, microemulsões, nanogeis, microsferas, nanopartículas e micropartículas (DUHAN *et al.*, 2017; JAIN; HALLIHOSUR; RANGAN, 2011; KEÇILI; BÜYÜKTIRYAKI; HUSSAIN, 2019).

As micro/nanopartículas são particularmente atraentes para a administração de medicamentos devido à sua composição, estrutura e características de superfície

variadas. Essa grande variedade permite que os transportadores sejam ajustados para aplicações e objetivos específicos. Dentre as arquiteturas mais comuns para aplicações de entrega de medicamentos direcionadas estão as nanoesferas e nanocápsulas (STEICHEN; CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013). Por isso as nanopartículas poliméricas são consideradas especialmente, uma alternativa para a administração da insulina, devido ao aumento significativo da biodisponibilidade (FONTE, 2015; HIRLEKAR, 2017). A encapsulação polimérica permite a proteção da insulina contra a ação das enzimas proteolíticas, aumentando o tempo de liberação da insulina, devido a propriedade de mucoadesão, o que facilita a passagem pelo trato gastrointestinal, permitindo a ação nos órgãos alvo, principalmente no fígado, tecido adiposo e no tecido muscular (DAMGÉ, 2008; REIS, 2012).

Os polímeros derivados do ácido metacrílico, metilmetacrilato e etilacrilato (denominados comercialmente como Eudragit, principalmente em sua formulação S100), são os mais comumente utilizados. O Eudragit® S100 (ES-100) sendo insolúvel em pH ácido, mas solúvel no meio intestinal (pH 7,0), concede resistência gástrica para as formulações, propriedades que são imprescindíveis para formulações que precisam proteger o composto bioativo no estômago para liberá-lo para absorção na porção intestinal (CHOURASIA; JAIN, 2003; SUNOQROT; ABUJAMOUS, 2019).

Assim, esse trabalho teve por objetivo desenvolver e quantificar nanopartículas poliméricas contendo insulina para uso por via oral, obtidos por *spray-drying* e avaliar seu efeito local no epitélio intestinal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Desenvolver e avaliar nanopartículas poliméricas pH dependentes contendo insulina visando um aumento da biodisponibilidade do princípio ativo para uso por via oral.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanopartículas poliméricas contendo insulina utilizando polímero dependente do pH 6,8 (Eudragit® S100) pelo método de secagem por pulverização (*spray-drying*);
- Desenvolver um método de cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography* - UHPLC) para quantificação das nanopartículas de insulina oral (INOR);
- Realizar análise morfológica e quantificar a insulina incorporada nas nanopartículas utilizando o método UHPLC, avaliando a eficiência de encapsulação da insulina;
- Avaliar o efeito da administração oral das nanopartículas de INOR no epitélio intestinal de ratos Wistar alimentados com *high-fat diet* (HFD).
- Avaliar os efeitos da administração oral das nanopartículas de INOR mediante ao ganho de peso e morfometria do tecido adiposo do mesentério e retroperitônio em ratos Wistar alimentados com HFD.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 DIABETES

O *diabetes mellitus* (DM) é causado por deficiência de secreção de insulina, dano às células  $\beta$  pancreáticas ou resistência à insulina relacionada ao não uso de insulina. O estilo de vida sedentário pode ser a principal razão para o aumento

contínuo do número de pacientes diabéticos em todo o mundo, que deve atingir 366 milhões em 2030 na população idosa (> 65 anos) (SBD, 2020; WILD *et al.*, 2004).

Segundo a IDF (2017), em 2017 houve 4 milhões de mortes decorrentes dessa enfermidade. Nesse mesmo ano, o Brasil apresentava 12,5 milhões de diabéticos, ocupando a quarta colocação no ranking de países com maiores índices da doença, perdendo apenas para China (1º), Índia (2º) e Estados Unidos (3º). De acordo com um relatório da IDF (2017), o número total de adultos (20-79 anos) com diabetes em 2045 será de 629 milhões de 425 milhões em 2017 (aumento de 48%).

Existe uma série de complicações associadas ao DM, pois o açúcar elevado no sangue danifica órgãos e tecidos por todo o corpo. Quanto mais tempo o corpo lida com níveis elevados de açúcar no sangue, aumenta o risco de complicações adicionais. As complicações do DM podem ser microvasculares, que incluem nefropatia, retinopatia, perda de visão e macrovasculares como doenças cardíacas, ataque cardíaco, derrame e neuropatia, infecções e feridas que não curam infecções bacterianas e fúngicas, depressão e demência (SBD, 2020; PAPTODOROU *et al.*, 2018; BRASIL, 2013).

São três tipos principais de diabetes: tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e gestacional (DMG) (IDF, 2020; ALHARBI; THOMACOS; MCLELLAND, 2019).

- DM1 ocorre com mais frequência em crianças e adolescentes, mas pode se desenvolver em qualquer idade. É caracterizado pela destruição de células beta no pâncreas, em geral secundária a um processo autoimune, precisando assim de injeções diárias de insulina para manter o controle dos níveis de glicose no sangue (IDF, 2020).
- DM2 é mais comum em adultos, é responsável por cerca de 90% de todos os casos de diabetes. É caracterizado pela hiperglicemia devido à resistência à insulina e relativa falta de insulina. Um estilo de vida saudável, incluindo aumento da atividade física e dieta saudável, são ações extremamente eficazes no tratamento do DM2. No entanto, com o tempo, a maioria das pessoas com DM2 necessitará de medicamentos orais e/ou insulina para manter os níveis de glicose no sangue sob controle (IDF, 2020).
- DMG consiste em níveis elevados de glicose no sangue durante a gravidez e está associado a complicações para a mãe e o filho. O DMG geralmente desaparece após a gestação, mas as mulheres afetadas e seus filhos têm maior risco de desenvolver diabetes tipo 2 no decorrer da vida (IDF, 2020).

A insulina é muito utilizada para tratar pacientes com DM, tanto no DM1 quanto no DM2, ainda assim, muitas vezes há necessidade da associação a outras drogas via oral, esses fármacos possuem ação específica e sua associação tem importante auxílio a terapêutica. As principais classes de medicamentos para o tratamento da hiperglicemia incluem sulfonilureias (aumentam a liberação de insulina das ilhotas pancreáticas); biguanidas (reduz a produção hepática de glicose); agonistas do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ) (aumenta a ação da insulina); Inibidores da  $\alpha$ -glucosidase (interfere na absorção de glicose no intestino) (CHAUDHURY *et al.*, 2017; BRASIL, 2013).

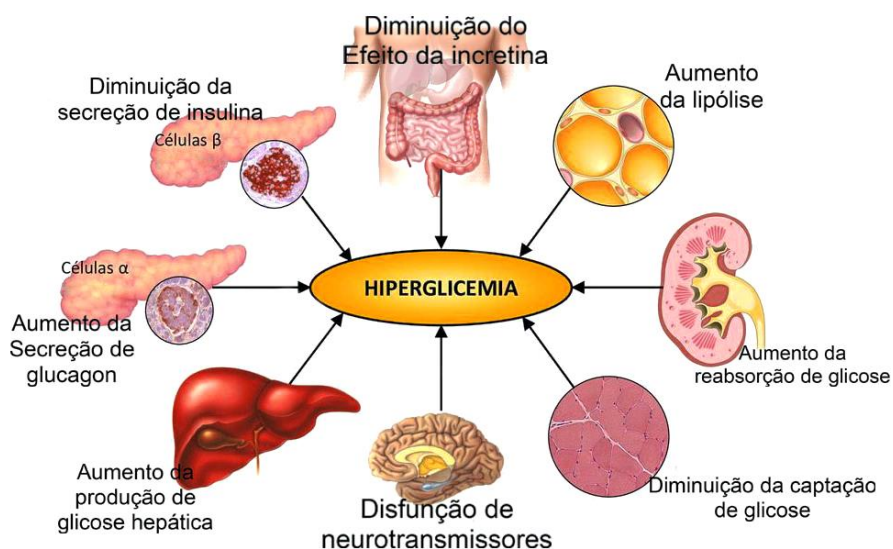
Os medicamentos dessas classes de fármacos podem ser utilizados em monoterapia (tratamento com apenas um dos medicamentos) ou combinando dois ou mais medicamentos de múltiplas classes com diferentes mecanismos de ação. Entre as principais desvantagens associadas ao uso desse método convencional estão o ganho de peso, hipoglicemia grave, eficácia terapêutica inferior devido ao regime de dosagem ineficaz ou impróprio, baixa potência e efeitos colaterais alterados devido ao metabolismo da droga e falta de especificidade do alvo, problemas de solubilidade e permeabilidade (FEINGOLD, 2020).

A patogênese do DM2 foi atribuída aos mecanismos do "Octeto Sinistro" (Figura 1), além dos três conceitos tradicionais de diminuição da secreção de insulina pelo pâncreas, aumento da gliconeogênese no fígado e diminuição da captação de glicose pelo músculo esquelético, havia cinco aspectos adicionais dos mecanismos que contribuem para a hiperglicemia no diabetes (DEFRONZO, 2009). A fisiopatologia do DM2 pode incluir um ou combinação de mecanismos do "Octeto Sinistro", conforme descrição abaixo:

- Secreção reduzida de insulina pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans;
- Secreção elevada de glucagon pelas células  $\alpha$  de ilhotas de Langerhans;
- Aumento da produção de glicose no fígado;
- Disfunção do neurotransmissor e resistência da insulina no cérebro;
- Aumento da lipólise;
- Aumento da reabsorção de glicose pelo rim;

- Redução do efeito da incretina no intestino delgado;
- Comprometimento ou diminuição da captação de glicose pelos tecidos periféricos, como músculo esquelético, fígado e tecido adiposo.

FIGURA 1: OCTETO SINISTRO



Fonte: Adaptado de: DEFRONZO (2009)

Apesar do advento de agentes anti-hiperglicêmicos promissores, os principais desafios no tratamento eficiente do diabetes incluem otimizar as terapias existentes para garantir concentrações ideais e balanceadas de glicose, bem como reduzir complicações relacionadas ao diabetes em longo prazo (TAN *et al.*, 2019).

### 3.2 OBESIDADE

Em paralelo a incidência do DM, está a obesidade, que nas últimas quatro décadas triplicou, chegando a 20% da população mundial. Está bem estabelecido que o estilo de vida sedentário pode resultar em desequilíbrio entre o gasto e a ingestão de calorias, o que pode levar à adiposidade e hiperinsulinemia (CARRETERO GÓMEZ *et al.*, 2021; DI ANGELANTONIO *et al.*, 2016).

A obesidade é uma doença complexa com várias etiologias. É causada pela ingestão excessiva de gordura e falta de exercícios. As características mais aparentes da obesidade são a deposição de tecido adiposo e um alto índice de massa corporal

(IMC). O IMC é agora o critério aceito internacionalmente. A obesidade é definida como um IMC  $\geq 30,0$  kg / m<sup>2</sup> (CARRETERO GÓMEZ *et al.*, 2021; DIXON *et al.*, 2011).

A obesidade e o estilo de vida sedentário estão associados a muitos problemas relacionados à saúde, incluindo perda de massa muscular, alterações metabólicas, dificuldades respiratórias e do aparelho locomotor, osteoartrite, osteoporose, doenças cardiovasculares, resistência à insulina e DM2 (SHAWAHNA *et al.*, 2021; WANDERLEI; FERREIRA, 2010). Por outro lado, atividade física e exercícios, têm muitos benefícios para a saúde, a curto e em longo prazo (SHAWAHNA *et al.*, 2021). Recentes evidências epidemiológicas mostraram que 85% dos adultos com DM2 também são obesos, e a previsão para 2025 é que mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo terão DM2 como consequência da obesidade (CHAIT; DEN HARTIGH, 2020; ZHOU *et al.*, 2016).

Indivíduos não obesos e saudáveis não têm grandes quantidades de gordura visceral, que se enquadra amplamente na categoria de gordura ectópica. A gordura visceral é altamente ativa metabolicamente, é constituída principalmente, pela gordura omental, mesentérica e retroperitoneal, o conteúdo de gordura visceral contribui para várias características da síndrome metabólica, como hiperinsulinemia, inflamação sistêmica, dislipidemia e aterosclerose (CHAIT; DEN HARTIGH, 2020).

### 3.3 INSULINA ORAL

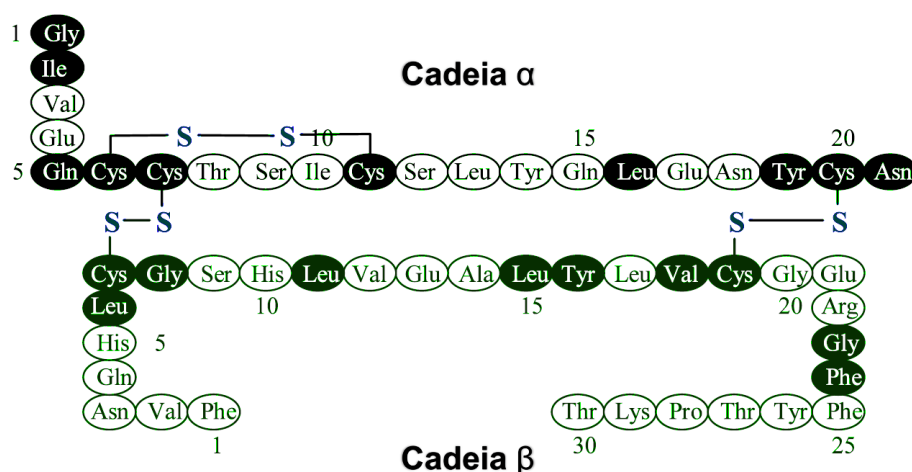
O ano de 2021 marca o centenário da descoberta da insulina em Toronto em 1921, um evento importante na medicina moderna. Nos últimos 100 anos a insulina ficou conhecida não apenas como um medicamento que salva vidas para pessoas com diabetes, mas também como um agente farmacológico complexo com uma janela terapêutica estreita (KURTZHALS *et al.*, 2021).

A glicose é nossa principal fonte de energia, o sistema nervoso central (SNC) precisa de glicose continuamente para suprir sua demanda de energia, e assim manter a homeostase metabólica (VERBERNE; SABETGHADAM; KORIM, 2014).

A insulina (Figura 2) é um hormônio, que consiste de duas cadeias polipeptídicas: a cadeia  $\alpha$ , com 21 resíduos de aminoácidos, ligada por duas pontes de dissulfetos à cadeia  $\beta$ , constituída de 30 resíduos de aminoácidos (KURTZHALS *et al.*, 2021; MOSLEMI; NAJAFABADI; TAJERZADEH, 2003). A insulina secretada

pelas células beta pancreáticas tem um papel vital na regulação da homeostase energética. Ao se ligar a seus receptores no fígado, músculo e tecido adiposo, exerce seus efeitos por meio de vias de sinalização complexas que levam à deposição de energia e preservação dos estoques de energia. A biossíntese e a secreção da insulina são rigidamente reguladas para manter a glicose no sangue dentro de uma faixa fisiológica estreita, e a falha das células beta em produzir quantidades adequadas de insulina leva à hiperglicemia, conforme observado em pacientes com vários subtipos de DM (HAY; DOCHERTY, 2006).

FIGURA 2: ESTRUTURA PRIMÁRIA DA INSULINA HUMANA



Fonte: Adaptado de: Moslemi; Najafabadi; Tajerzadeh (2003)

Aplicar formulações farmacêuticas, engenharia química, biotecnologia e tecnologia de entrega para tornar possível imitar os padrões naturais de liberação de insulina das células β pancreáticas o mais próximo possível e reduzir o tempo gasto em hiperglicemia ou hipoglicemia tem sido o objetivo geral de estudos ao longo do século. Porém, apesar dessas inovações sobre a insulina, o nível geral de controle glicêmico no DM1 e DM2 está longe de ser normalizado. Isso exige um foco contínuo de pesquisa com o objetivo de aperfeiçoar ainda mais as opções de tratamento com insulina para pessoas com DM (KURTZHALS *et al.*, 2021).

A insulina sendo hormônio de natureza peptídica, se ingerida, imediatamente, seria clivada pelas enzimas peptidases estomacais, perdendo sua função. Além disso, o alto peso molecular, a alta hidrofiliabilidade, a presença de cargas superficiais e peptidases tornam a permeabilidade intestinal da insulina outra questão a ser superada (AL RUBEAN; RAFIULLAH; JAYAVANTH, 2016; DAMGÉ, 2008; REIS,



2008). Com isso, diversos estudos têm sido realizados buscando estratégias inovadoras para possibilitar a administração oral da insulina. Entre esses estudos, estão o uso de nanopartículas, micropartículas, intensificadores de absorção, inibidores de enzimas, sistemas carreadores e micelas (AGARWAL; REDDY; KHAN, 2001; BRAVO-ALFARO *et al.*, 2020; FANG *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2018; HECQ; AMIGHI; GOOLE, 2016; HU *et al.*, 2019; KATSUMA *et al.*, 2006; KUMARI *et al.*, 2020; MOMOH *et al.*, 2020; SUDHAKAR *et al.*, 2020; WONG; AL-SALAMI; DASS, 2018). Pesquisas recentes de Lipinski e colaboradores (2017) com ratos diabéticos demonstraram que a insulina oral atua no epitélio intestinal promovendo alterações, outro estudo mostrou que a administração da insulina oral em ratos, consegue reverter a hiperplasia intestinal diabética, possivelmente resultado de uma “*down regulation*” de receptores de insulina no epitélio (SUKHOTNIK *et al.*, 2011).

### 3.4 HIGH-FAT DIET

A dieta é um fator importante em nutrição experimental de animais; dietas hipercalóricas, também conhecidas como *high-fat diet* (HFD) tem sido utilizadas com êxito para reproduzir modelos experimentais de síndrome plurimetabólica e obesidade. Roedores quando submetidos à dieta rica em lipídios, a partir de três semanas, apresentam quantidade aumentada dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, ficando propensos a alterações nas etapas iniciais da sinalização de insulina e a disfunções no perfil lipídico (ALAMRI *et al.*, 2020; DUARTE *et al.*, 2006; SHARMA; TALIYAN, 2018).

A HFD aumenta a massa corporal adiposa e o tamanho do adipócito, reduz os níveis plasmáticos de leptina e adiponectina, reduz à tolerância oral a insulina e altera a microbiota intestinal. A HFD proporciona grande quantidade de ácidos graxos de cadeia curta, que são rapidamente absorvidos e implicados com a regulação da sensibilidade a insulina (MARQUES *et al.*, 2016; SCHEITHAUER *et al.*, 2016).

Modelos de ratos espontaneamente diabéticos, obtidos por meio de cepas geneticamente insulino-resistentes e modelos de ratos diabéticos não espontâneos, obtidos tanto pelo uso de toxinas como a estreptozotocina (STZ) ou por administração de longa duração de HFD têm sido os principais modelos usados para estudar o DM2 em roedores (MELO *et al.*, 2021).

De acordo com Gheibi e colaboradores (2016) o modelo de dieta rica em gordura com STZ é um modelo adequado e com boa relação custo-benefício para estudar o DM2, pois, tem características metabólicas semelhantes às do DM2 humano, podendo ser usado para investigar os efeitos de medicamentos antidiabéticos mais recentes disponíveis para a doença.

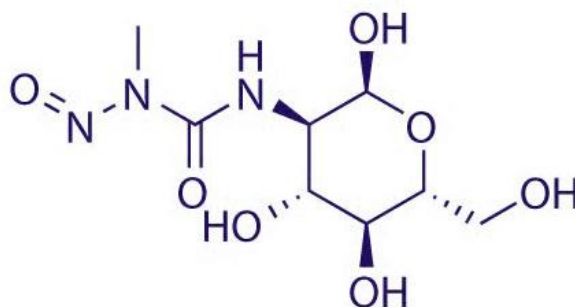
### 3.5 ESTREPTOZOTOCINA

A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico derivado do *Streptomyces achromogenes*, é amplamente usada para induzir diabetes experimental em animais, foi usada pela primeira vez em 1963, podendo ser usada para indução do DM1 e DM2 (EZZAT *et al.*, 2021; RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016; WU; HUAN, 2008).

A STZ é captada pelas células pancreáticas que contêm transportadores de glicose (GLUT2), assim, as células  $\beta$  pancreáticas são mais sensíveis a STZ, enquanto que as células que não expressam o GLUT2 são resistentes. A alcalinização do DNA celular e subsequente ativação da poli-ADP ribose sintetase causam uma letal e rápida depleção de NAD nas células pancreáticas, com subsequente redução no nível de ATP e posterior inibição da síntese e secreção da insulina (EITAH *et al.*, 2019; MALLEK *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2011).

A STZ (Figura 3) possui em sua estrutura uma porção nitrosuréia, porção essa que causa danos às células  $\beta$ , e apresenta também um grupo metil ligado a uma extremidade e uma molécula de glicose na outra extremidade [2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosureia)-1-D-glicopirranose)], a porção desoxiglicose é responsável pelo transporte da molécula nativa através das membranas celulares (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016; NCBI, 2021).

FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DA ESTREPTOZOTOCINA



Fonte: Adaptado de National Center for Biotechnology Information (2021).

Altas doses de STZ prejudicam gravemente a secreção de insulina, característica semelhante ao DM1, também pode levar à formação de corpos cetônicos, liberados na urina, características do DM1 descompensado. No entanto, o uso de STZ em baixas doses, causa um leve comprometimento na secreção de insulina que é mais semelhante nos estágios decorrentes do DM2 (GHEIBI; KASHFI; GHASEMI, 2017). No estudo de Silva e colaboradores (2011) é mencionada a existência de evidências que indicam que os radicais livres podem ter um papel essencial no efeito diabetogênico da STZ, ainda relatam que hamsteres desenvolvem diabetes quando tratados com STZ, mas que não existem trabalhos na literatura que avaliem em hamsteres diabéticos, os produtos do estresse oxidativo e defesas antioxidantes.

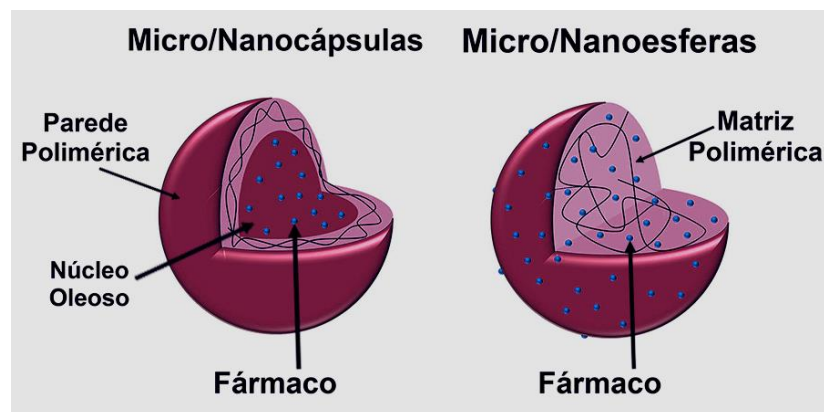
A alimentação com HFD leva ao desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e hiperinsulinemia, mas não a hiperglicemia ou DM, com isso, para induzir o DM, seria necessário administrar STZ em baixa dosagem. Este modelo, relatado primeiramente por Reed e colaboradores (2000), mostrou que animais submetidos à HFD exibiram níveis elevados de insulina no sangue, mas essencialmente tinham concentrações normais de glicose no sangue, um modelo que tem as características marcantes da resistência à insulina em humanos com DM2 (GHEIBI; KASHFI; GHASEMI, 2017).

### 3.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

As Nanopartículas poliméricas (NPs) podem ser definidas como estruturas nanométricas sólidas compostas por polímeros biodegradáveis ou biocompatíveis. Elas se destacam como sistemas carreadores de ativos, conferem vantagens importantes como maior eficácia terapêutica, liberação progressiva e controlada do fármaco, diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de ação, além do direcionamento a alvos específicos sem imobilização significativa das espécies bioativas (GUERRERO-ARELLANO, 2017; FARAGO, 2007; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; AHMAD *et al.*, 2011). Elas protegem o fármaco da degradação, pois garantem estabilidade física durante o armazenamento e em fluídos biológicos, propiciam interessantes propriedades *in vivo*, como o aumento da sua absorção, maior capacidade de ultrapassar barreiras biológicas e a distribuição diferenciada e otimizada. Podem ser direcionadas para células e tecidos específicos, uma vez que a superfície e a carga superficial podem ser modificadas pela inserção de determinados ligantes como, anticorpos, tensoativos e polímeros (ZAVISOVA *et al.*, 2019; GUERRERO-ARELLANO, 2017; ALLÉMAN *et al.*, 1993).

As NPs podem ser divididas em nanocápsulas ou nanoesferas (Figura 4), diferenciadas pela composição e organização estrutural. As nanocápsulas são estruturas vesiculares heterogêneas compostas por um núcleo confinado por uma parede polimérica, onde fármaco pode ser dissolvido ou disperso no núcleo e/ou adsorvido no material polimérico. As nanoesferas não tem núcleo definido, mas um sistema monolítico onde o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica (ZHANG; ZHANG; ZHU, 2019; UPPAL *et al.*, 2018; KHAN; SAEED; KHAN, 2017; KUMARI *et al.*, 2010).

FIGURA 4: MODELOS DE ESTRUTURAS DAS NANOPARTÍCULAS



Fonte: adaptado de UPPAL *et al.* (2018)

Nota: Nanocápsulas: fármaco no núcleo oleoso, podendo ter uma quantidade do fármaco adsorvido na parede polimérica; Nanoesferas: fármaco retido na matriz polimérica e também adsorvido ou disperso na matriz polimérica.

As nanocápsulas, se comparadas às nanoesferas, apresentam características mais promissoras na liberação de fármacos, isso devido a sua capacidade aumentada de transportar ativos empregando pequenas quantidades da matriz polimérica. Soma-se ainda o fato de o princípio ativo encapsulado ficar protegido pelo revestimento polimérico, o que evita a liberação rápida induzida por pH ou degradação, temperatura, enzimas, entre outros fatores. As propriedades dos polímeros exercem uma influência expressiva sobre a eficiência de encapsulação, biodistribuição das nanocápsulas no organismo, perfil de liberação e estabilidade (DENG, 2020; ZHANG; ZHANG; ZHU, 2019 KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

A microencapsulação é o processo onde o fármaco é encapsulado por matriz polimérica biocompatível e/ou biodegradável, produz partículas com diâmetros geralmente entre 1 a 1000  $\mu\text{m}$ , essa técnica tem incontáveis aplicações farmacêuticas como preparação de medicamentos com liberação prolongada ou comprimidos com ativos incompatíveis, utilizada também em novos conceitos de formulações para cremes, aerossóis, emplastros, curativos cirúrgicos e injetáveis (KRAJIŠNIK; ČALIJA; CEKIĆ, 2017; MITHU *et al.*, 2017; AHMAD *et al.*, 2011). As nanopartículas representam um sistema simples, mas eficaz de liberação de fármacos. Muitos fármacos hidrofóbicos podem ser encapsulados por técnicas de evaporação do solvente, contudo a taxa de remoção do solvente afeta fortemente as características das nanopartículas formadas, dependendo da temperatura, pressão, características de solubilidade do polímero e do solvente (SHAHANI; PANYAM, 2011).

### 3.6.1 Polímeros e sistemas pH dependentes

Os polímeros são macromoléculas, naturais ou sintéticas, caracterizadas por sua estrutura química, tamanho e interações intra e intermoleculares, possuindo unidades químicas ligadas por covalências, repetidas regularmente ao longo da cadeia, denominadas meros, das classes de materiais existentes, estão entre as mais versáteis, apresentando inúmeras aplicações, inclusive no setor farmacêutico, na produção de medicamentos e cosméticos (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; MANO; MENDES, 2004; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Os excipientes poliméricos constituem um grande e vasto grupo de substâncias, incluindo compostos macromoleculares de origem natural (gelatina, quitosana, celulose), polímeros semissintéticos (derivados da celulose, polietilenoglicóis, poliamidas) e produtos de fermentação (goma xantana). Esses polímeros são empregados em inúmeras formas medicamentosas através de muitas vias de administração (oral, parenteral, inalatória, etc.) (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; SEVERINO *et al.*, 2011; KAROLEWICZ, 2016).

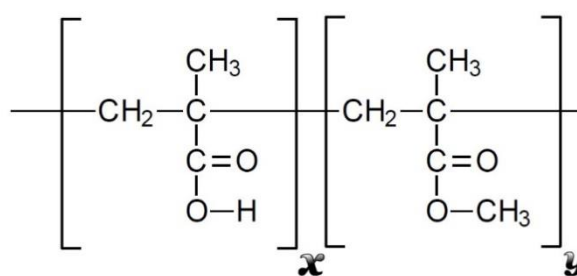
Além de suas funções básicas, os polímeros podem ter propriedades adicionais, como sensibilidade a estímulos, muco adesão, inibição de enzimas, aumento da capacidade de penetração no epitélio intestinal, propriedades absorptivas, habilidade de mascarar sabores, atividades farmacológicas, aumento de capacidade tampão e capacidade de interação ou conjugação com enzimas responsáveis pelo metabolismo de fármacos, sendo todas características muito importantes no emprego da tecnologia farmacêutica em sistemas inteligentes de liberação de fármacos (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; KAROLEWICZ, 2016).

### 3.6.2 Eudragit® S100

Os polímeros Eudragit são copolímeros derivados de ésteres do ácido acrílico e metacrílico, possuem propriedades físico-químicas determinadas por grupos funcionais. Estão disponíveis em diferentes formas físicas como na forma de pós, dispersão aquosa e grânulos de solução orgânica. O Eudragit® S100 (ES-100) é uma substância sólida na forma de pó branco com um odor característico fraco, têm peso molecular, valor ácido e temperatura de transição vítrea de aproximadamente 125.000 g/mol, 190 mg KOH/g de polímero e  $> 150^{\circ}$  C, respectivamente, está entre os

polímeros com características de sensibilidade a estímulos, neste caso aos estímulos de pH (pH dependentes), sua estrutura química genérica pode ser observada na Figura 5 (DE ARCE VELASQUEZ *et al.*, 2014; PATRA *et al.*, 2017).

FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA GENÉRICA DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100



Fonte: autor, 2020

Nota: O “**x**” representa os grupos carboxílicos livres e o “**y**” os esterificados.

O Eudragit® S100 (ES-100) é usado para a liberação de drogas direcionadas ao intestino, é um copolímero aniônico, baseado em ácido metacrílico e metacrilato de metila, insolúvel em meio ácido, mas solúvel em meio intestinal pH 7, promovendo gastroresistência e propriedades de liberação controlada às formulações (DE ARCE VELASQUEZ *et al.*, 2014; PATRA *et al.*, 2017).

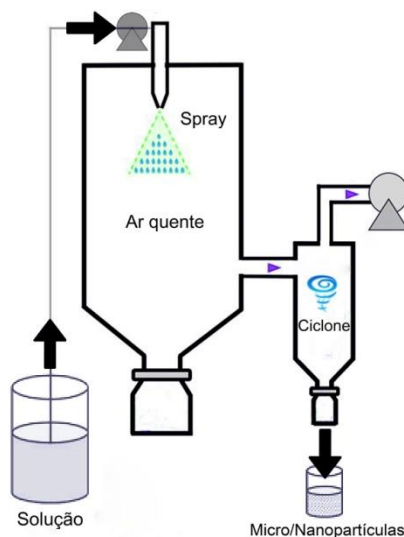
### 3.6.3 *Spray-drying*

A tecnologia de micro/nanoencapsulação de revestimento entérico tem atraído considerável atenção no campo da medicina, especialmente para administração oral, devido à sua capacidade de prevenir a dissolução no meio gástrico, aumentar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos, melhorando assim sua biodisponibilidade que é um grande desafio para indústria farmacêutica. Muitas técnicas têm sido utilizadas para melhorar a hidrossolubilidade e a liberação de fármacos, e as dispersões sólidas apresentam os melhores resultados. Um dos métodos existentes para o preparo dispersões sólidas é o método por *spray-drying* (método de evaporação de solvente). A produção de nano e micropartículas pelo método de *spray-drying* tem grande aplicabilidade e facilidade de produção em larga escala cumprindo as exigências requeridas, por isso tem sido inserida nos processos

da indústria farmacêutica (ASHOUR *et al.*, 2016; BASHA; SALAMA; EL AWDAN, 2017; P. A. FERREIRA *et al.*, 2020; TOKUNAGA *et al.*, 2021).

No método de *spray-drying* (Figura 6), a formulação (solução, suspensão ou emulsão) em estado fluido é transformada em partículas secas, por meio de pulverização dos produtos de alimentação em meio de secagem a quente. Esse processo ocorre em três estágios, a atomização de um líquido alimentando o spray, a mistura no spray das gotículas de alimentação com a corrente de gás aquecida para evaporar o solvente e a separação e coleta do pó seco da corrente de gás (LIU; CHEN; SELOMULYA, 2015; MITHU *et al.*, 2017).

FIGURA 6: EQUIPAMENTO DE SPRAY-DRYER



Fonte: Adaptado de Ramos; Silveira Júnior; Prata (2021).

Nota: Com auxílio da bomba a solução é carregada até o atomizador, que transforma o líquido em gotículas, que entram em contato com o ar aquecido no interior da câmara de secagem, o ar aquecido remove a água das gotículas, resultando em um pó fino, que passa por um ciclone e é acondicionado no coletor.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades de pesquisa foram realizadas no Complexo de Laboratórios Multiusuários e no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Processo 044/2018 CEUA-UEPG).

### 4.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PELO MÉTODO DE *SPRAY-DRYING*

A obtenção das nanopartículas foi conduzida pelo método de secagem por aspersão ou *spray-drying*.

A partir da insulina Humulin<sup>®</sup> Regular (IHR) - insulina humana (derivada de ADN recombinante) e do polímero Eudragit<sup>®</sup> S100 (ES-100), foi desenvolvida a formulação das nanopartículas de insulina oral (INOR). A concentrações teóricas de insulina utilizada foi 10% (400 mg). Com o método utilizado, 3,6g do polímero ES-100 foi disperso em 115,3 mL (400mg) de IHR em agitação magnética, sendo em seguida acrescentado solução tampão fosfato pH 7,4. Após isso, a solução foi mantida sob agitação por 24h. Transcorrido esse período, as formulações foram conduzidas à secagem por aspersão, utilizando o equipamento *Spray-Dryer* LABMAQ, modelo MSD 0.5, operando nas seguintes condições: sob as seguintes condições: pressão 1,68 bar, fluxo 0,22 L.hora<sup>-1</sup>, 60 °C. Todas as formulações foram obtidas em triplicata e os produtos foram armazenados sob refrigeração, em recipientes hermeticamente fechados. As condições estabelecidas (tempo de agitação, pressão, fluxo e temperatura) foram mantidas constantes para minimizar as flutuações. Foram preparadas nanopartículas sem fármaco, nas mesmas proporções, para fins comparativos.

#### 4.1.1 Desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

##### 4.1.1.1 Equipamentos e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu Nexera X2 (Quioto, Japão), equipado com detector DAD SPD-M20A, degaseificador DGU-20A5RA, bomba LC-30AD, amostrador automático SIL-30AC, forno CTO-20A, módulo comunicador CBM-20A e software Labsolutions versão 5.73. Foi utilizada coluna C18 Shim-pack XR-ODS III, 200x2 mm, com tamanho de partícula 2,2  $\mu\text{m}$ . A eluição foi realizada a 30°C, fase móvel acetonitrila:água acidificada com 0,1% de ácido acético, em modo gradiente de 70 a 80% de acetonitrila (ACN) por 3 min, e mantido a 70% de ACN por 1 min para retorno da condição inicial, com fluxo de 0,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ . O tempo de análise foi de 3,0 minutos e a detecção UV-Vis ocorreu em 273 nm.

##### 4.1.2 Preparo da Solução Padrão

A solução padrão de IHR foi preparada em ACN:água acidificada com 0,1% de ácido acético (50:50, V/V), 500,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Diluições foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentração entre 10,0 e 50,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , onde a concentração de 30,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi definida como 100%. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as soluções foram filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil® Xtra, 0,45  $\mu\text{m}$  x 22 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha).

##### 4.1.3 Desenvolvimento do método para quantificação da IHR incorporada às nanopartículas

Para avaliar a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, variando a concentração de ACN de 5 a 100% em 60 minutos. Após isso, as condições cromatográficas foram otimizadas para se obter melhor resolução do pico da IHR. O método analítico por UHPLC foi realizada segundo os principais critérios propostos pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for*

*Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017). Avaliaram-se os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação.

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas da solução de nanopartículas sem IHR (controle negativo) em comparação com as nanopartículas com IHR. Assim, o objetivo desta análise foi confirmar que nenhum componente da formulação interfere na quantificação da IHR.

A linearidade do método foi avaliada por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, pela média dos pontos de três curvas analíticas autênticas, nas concentrações de: 10,0; 30,0; 50,0; 70,0 e 90,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A inclinação e outros parâmetros das curvas analíticas foram calculados por regressão linear e análise de variância (ANOVA). Avaliação de cada ponto foi realizada em triplicata. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão (DP) e inclinação (S) das curvas analíticas, por meio das Equações (1) e (2).

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{S} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{S} \quad (2)$$

#### 4.1.4 Quantificação e eficiência da IHR encapsulada às nanopartículas

A eficiência de encapsulação (EFEN) das nanopartículas de INOR foi obtida pelo método indireto, por meio da quantificação de IHR presente nos sobrenadantes (solução aquosa), quantificação do princípio ativo não encapsulado. O valor da EFEN foi determinado através da razão entre a massa de IHR encapsulada e a massa de IHR teórica (IHR<sub>t</sub>), sendo a massa de IHR encapsulado determinada pela diferença entre IHR<sub>t</sub> e a massa de IHR não encapsulada (IHR<sub>ne</sub>). Antes da corrida analítica, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  da solução em um dispositivo de ultrafiltração Amicon® Ultra 0.5 (EMD Millipore, Darmstadt, Alemanha) e o mesmo centrifugado em Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha) por 30 min a 6000 rotações. Os sobrenadantes resultantes foram recolhidos, as amostras foram diluídas para se obter concentrações teóricas de 10,0; 30,0 e 50,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O doseamento da IHR<sub>ne</sub> foi realizado em

triplicata, frente ao método analítico (UHPLC), na faixa de 0,50 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e no comprimento de onda de 273 nm, comprimento semelhante ao encontrado no estudo de Zhang e colaboradores (2009). A EFEN foi calculada de acordo com a Equação (3).

$$\text{EFEN} = \frac{\text{IHRt} - \text{IHRne}}{\text{IHRt}} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.1.5 Espectrometria de difração a laser

O tamanho da partícula foi determinado por espalhamento de luz dinâmico, o potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética, após o preparo de uma suspensão com as nanopartículas com e sem IHR (1:500, V/V) em água ultrapura. As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, Reino Unido).

#### 4.1.6 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* – FEG-SEM)

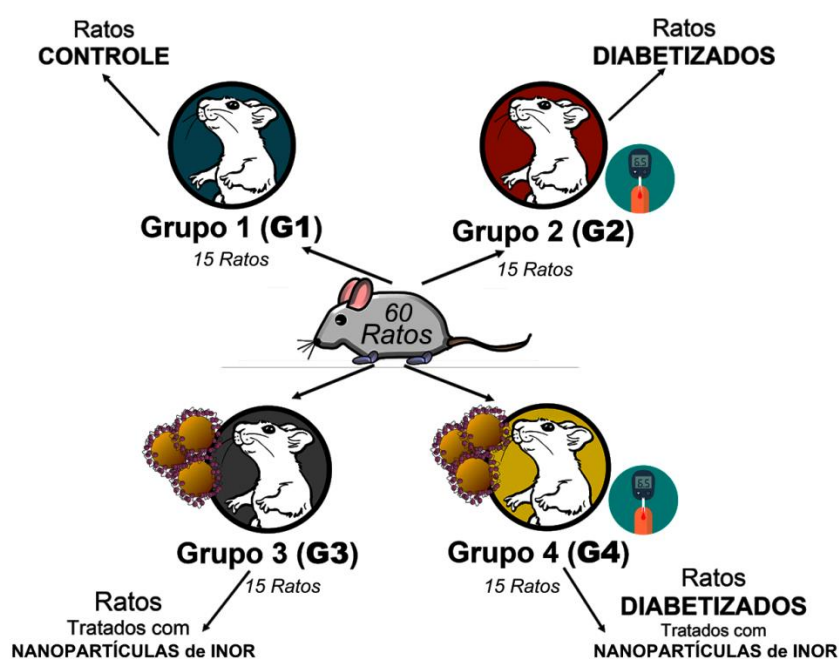
A avaliação morfológica e de superfície foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). Para o preparo da amostra diluiu-se a nanosuspensão em água na proporção 1:500 (v/v) e uma gota foi depositada sob o Stub e seca em temperatura ambiente. Submeteu-se as amostras à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, empregou-se voltagem de aceleração de 15 kV, utilizou-se software específico (Electron Optical Design).

## 4.2 MODELOS ANIMAIS

Os animais usados neste trabalho foram ratos da linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), machos, entre 2 e

3 meses de idade, peso aproximado de 300 gramas, totalizando 60 ratos. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas com 5 animais cada e mantidos numa sala com condições ambientais de: 24°C sob luz artificial em e ciclos claro e escuro (12 horas / 12 horas) com água potável *ad libitum* e *high-fat diet* (HFD). A preparação da dieta foi obtida na concentração: 5.000 gramas de ração padrão Nuvilar®, 5.000 gramas de farinha de trigo, 2.000 gramas de leite condensado e 2.000 gramas de gordura animal. A mistura da ração foi seca em geladeira para se obter as características ideais de alimentação dos roedores. Os animais foram distribuídos em quatro grupos conforme a Figura 7:

FIGURA 7: DIVISÃO DOS GRUPOS CONFORME TRATAMENTO



Fonte: autor, 2020

#### 4.2.1 Diabetização

Para indução do DM, foram selecionados os ratos wistar dos grupos G2 e G4, os 30 roedores receberam uma aplicação única intraperitoneal de 20 mg/kg de estreptozotocina (STZ) (Cayman chemical company – USA). Aplicou-se STZ em baixa dosagem, tendo como objetivo juntamente com a dieta HFD levar o desenvolvimento do DM2 nos animais.

#### 4.2.2 Verificação da glicemia

Verificou-se a glicemia 18 dias após o início do experimento, 42 dias depois e após o último dia do experimento, foi utilizado o glicosímetro portátil Accu-Chek® Active, linha de monitores e tiras de glicemia desenvolvida pela Roche.

#### 4.2.3 Tratamento

Os ratos dos grupos G3 e G4 receberam nanopartículas de INOR associada à diluição de ácido clorídrico (HCl 0,1%) por gavagem. Este tratamento foi realizado durante 60 dias entre às 14:00h e 17:00h. O HCl foi utilizado na diluição para evitar a liberação da insulina antes de chegar ao intestino delgado.

Os grupos G1 e G2 que não receberam as nanopartículas de INOR foram submetidos apenas a gavagem para padronização, ambos recebiam 20 µL HCl 0,1%.

Os animais foram pesados durante o período de tratamento a cada 15 dias.

#### 4.2.4 Coleta de materiais

No 60º dia do experimento os ratos ficaram em jejum por 8-12 horas, devidamente marcados e submetidos à cirurgia para a coleta de sangue e órgãos. O procedimento foi realizado no laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UEPG sendo que a equipe era constituída de um cirurgião, um auxiliar de cirurgião, e o restante da equipe composta por 6 pessoas que se dividiram em pesagem, acondicionamento e identificação das peças cirúrgicas.

Para anestésiar os animais, utilizou-se o isoflurano, até que ocorre-se a perda da consciência e de respostas a estímulos. Logo após, em decúbito dorsal, foi realizada uma incisão mediana e abertura dos planos até a cavidade pleural e exposição do coração, sendo realizada punção cardíaca e aspiração de 4 a 10 mL de sangue e armazenada para análise.

Retiraram-se as peças intestinais (duodeno e íleo) padronizando com 10 cm cada segmento intestinal, após, foram limpos internamente com água e realizou-se a

pesagem em balança de precisão, em seguida imediatamente acomodadas em recipientes contendo solução salina de formol a 10% e identificados individualmente.

Retiraram-se as gorduras omentais, mesentéricas e retroperitoneais e epididimais, em seguida pesagem em balança de precisão e imediatamente acomodadas em recipientes contendo solução salina de formol a 10% e identificados individualmente.

Foram excluídos da coleta animais que no momento estavam inapropriados para o experimento com alterações patológicas como diarreia ou alterações morfológicas (intussuscepção intestinal).

#### 4.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

As lâminas foram preparadas no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental. Foram excluídos os 3 cm iniciais do duodeno e íleo e extraídos 3 recortes em comprimentos de 0,5 cm. Excluiu-se as peças que não se conservaram com o formol. Tais amostras foram acondicionadas e identificadas em cassetes e após processadas em etanol 70% (2 banhos), 80% (2 banhos), 90% (4 banhos) e 100% (2 banhos) todos com duração de 30 minutos cada, xilol (2 banhos) e se finalizou com parafina por 1 hora em 60°C.

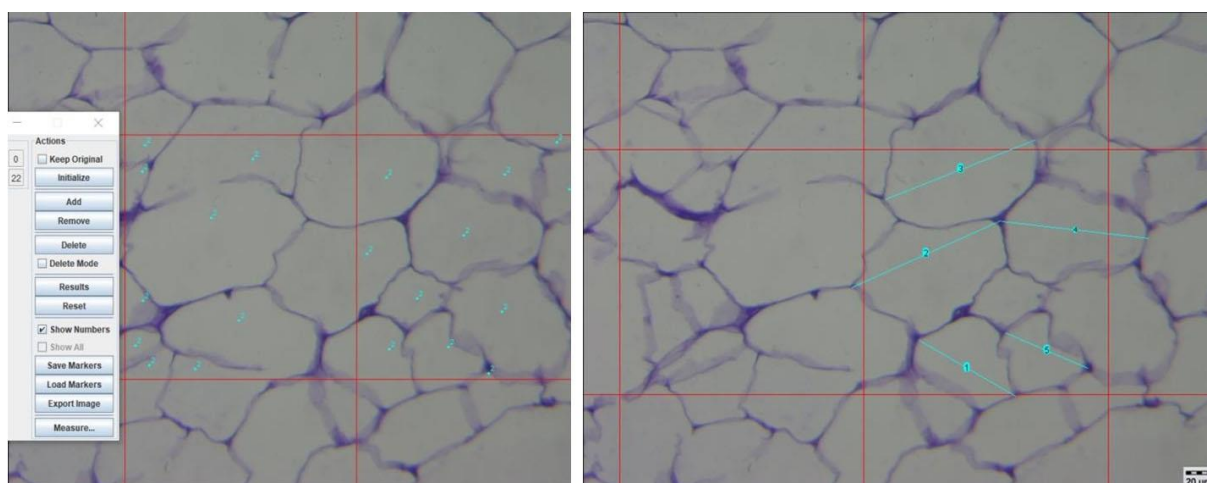
As amostras foram reposicionadas e preenchidas em blocos de parafina para a realização de corte transversal. Após a secagem foi utilizado o micrótomo com corte de 5 micrômetros de espessura e imediatamente postos em banho maria a 40°C, selecionou-se as amostras com melhor visualização sem rasgaduras ou bolhas para posterior colocação na lâmina recoberta de albumina que aumenta a aderência do tecido a peça, por fim deixadas secar por no mínimo 48 horas.

Para coloração histológica foi utilizado Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram processadas e se removeu a resina em excesso com xilol para análise dos resultados. Optou-se pela realização de 3 lâminas para cada amostra tecidual de duodeno, íleo, retroperitônio e mesentério, o que resultou num total de 720 lâminas, sendo 180 lâminas de cada.

#### 4.4 HISTOMORFOMETRIA

Foram realizadas 3 micrografias de cada lâmina, com o fotomicroscópio (Olympus AX70), e com auxílio do software TCapture os campos foram selecionados conforme a disponibilidade de adipócitos intactos na sua maior parte e selecionando as melhores lâminas. Foi utilizada a intensidade de luz 3, a objetiva de 10 para captura da imagem, com White balance. Foi analisado o diâmetro de 5 células por foto e a quantidade de adipócitos em dois campos de 3 campos diferentes da lâmina (Figura 8). A histomorfometria foi realizada pelo programa Image J<sup>®</sup> permitia a seleção dos campos mais intactos por meio do filtro Grid, sob configurações: Lines, Área per point 1000000.

FIGURA 8: FOTOS DAS LÂMINAS



Fonte: autor, 2020

O tecido foi processado pela técnica de hematoxilina-eosina e fotomicrografias realizadas em aumento de 10x, demonstrando as medidas dos adipócitos e a contagem de células.

Foram realizadas 3 micrografias de cada peça com o microscópio trinocular (Novel Optics) com câmera acoplada (Tucsen 1080P) e com auxílio do software TCapture (Figura 9) os campos foram selecionados conforme a disponibilidade das vilosidades integras na sua maior parte e selecionando as melhores lâminas.

As peças foram avaliadas pela medição de 9 vilosidades, analisando 3 diferentes campos dentre as 3 micrografias por meio do programa ImageJ<sup>®</sup>. As medidas foram padronizadas de forma a medir o maior comprimento do vilo e da



cripta. O comprimento do vilão foi obtido pela medida correspondente à distância entre o ápice da vilosidade e o início da cripta; já a cripta obtida pelo início da cripta ao início da submucosa.

FIGURA 9: ANÁLISE DO DUODENO COM CÂMERA 0,5X EM ZOOM DE 4X



Fonte: autor, 2020

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS STATISTICS (IBM version 20) e no ambiente R (R Core Team, 2021). Foi realizada análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey, análise descritiva com estimativa de média, mediana, desvio padrão, percentil 25% e 75% do tempo e da área das curvas. Verificou-se a aderência quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk. Coeficientes de correlação, modelos de regressão linear e gráficos de pontos foram construídos da área em função da concentração para encontrar a melhor equação que explicasse o comportamento das variáveis, foram aceitas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas de INOR preparadas a partir do ES-100 foram obtidas com sucesso por spray-drying, apresentaram aspecto físico de pó ultrafino branco, tonalidade semelhante também foi observada nas nanopartículas que foram preparadas sem IHR.

#### 5.1.2 Desenvolvimento do método para quantificação da IHR incorporada às nanopartículas

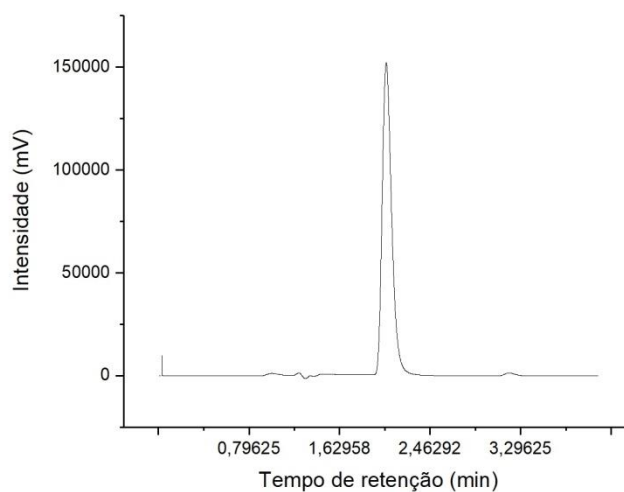
Antes de iniciar os testes para a definição das condições cromatográficas, utilizou-se como base o estudo de Moslemi, Najafabadi e Tajerzadeh (2003), onde foi descrito uma metodologia para determinação da insulina, porém por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Após a corrida em gradiente exploratório, foi definida a fase móvel acetonitrila:água acidificada com 0,1% de ácido acético (V/V), em modo gradiente de 70 a 80% de acetonitrila (ACN) por 3 min, e mantido a 70% de ACN por 1 min para retorno da condição inicial, com fluxo de  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e volume de injeção de  $10 \mu\text{L}$ , como sendo as condições padrão para o restante das análises. O tempo de análise foi de 3,0 minutos, o que é adequado para rotina laboratorial, onde é imprescindível que as análises sejam simples e rápidas.

A especificidade é a habilidade de um método analítico diferenciar o analito em presença de impurezas ou outros componentes na amostra (ICH, 2005). O cromatograma da Figura 10 na concentração de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mostra a especificidade do método para a IHR, frente a possíveis impurezas. A especificidade em relação às nanopartículas foi demonstrada por comparação do cromatograma das nanopartículas com e sem fármaco, ilustrados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Comparando os cromatogramas obtidos (Figura 11 e 12), demonstrou-se a especificidade do método, sem apresentar interferentes no tempo de retenção do analito, em concordância com as especificações oficiais (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Os resultados mostram que não há interferência na quantificação e no tempo de

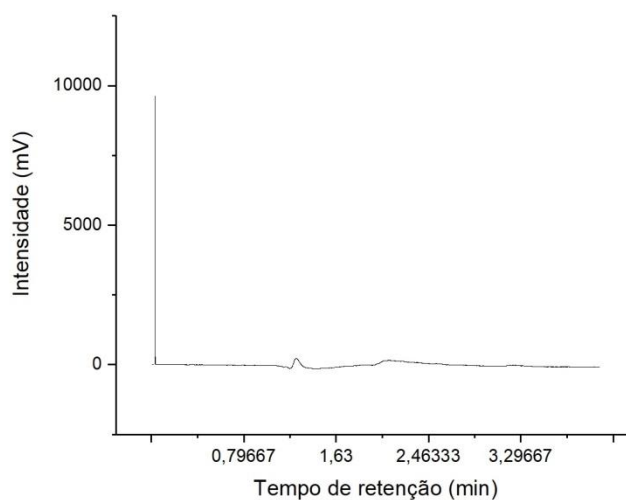
retenção da IHR. Sendo assim, é possível confirmar a especificidade do método proposto para a quantificação da IHR e nanopartículas com ES-100.

FIGURA 10: CROMATOGRAMA DE UHPLC CORRESPONDENTE AO PADRÃO ANALÍTICO DA IHR NA CONCENTRAÇÃO DE 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$



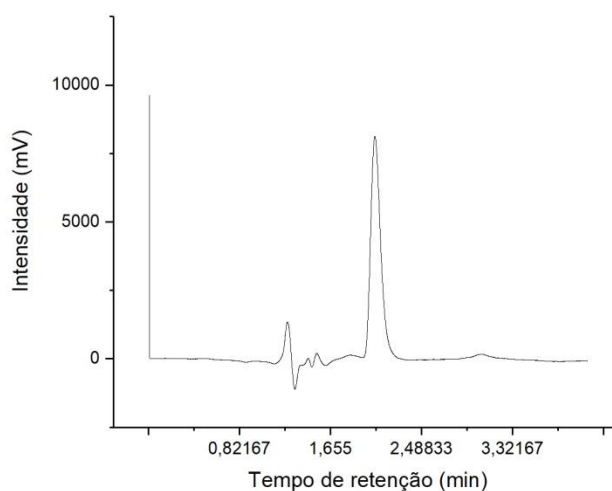
Fonte: autor, 2020

FIGURA 11: CROMATOGRAMA DA NANOPARTÍCULA SEM INOR



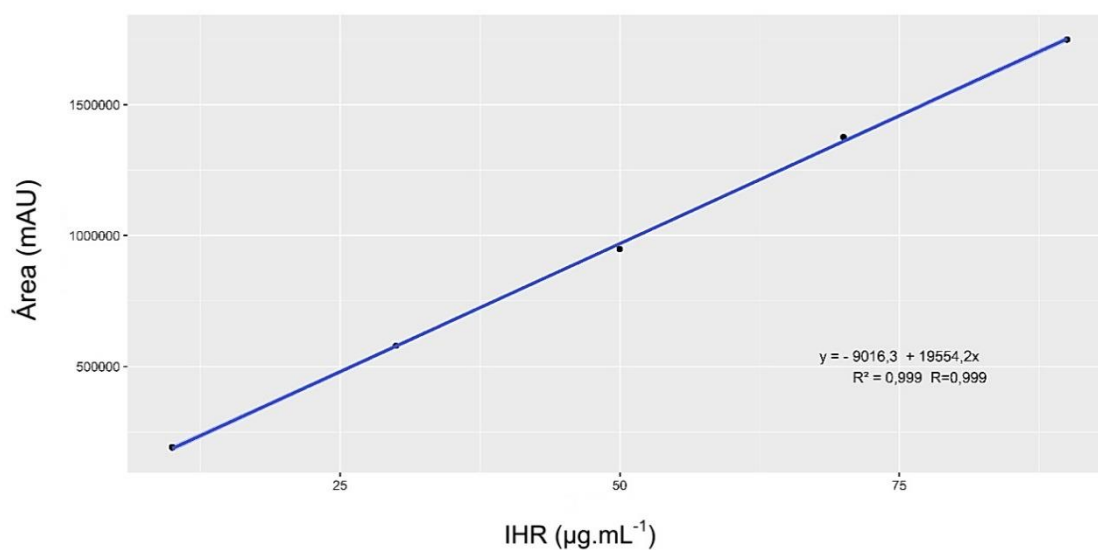
Fonte: autor, 2021

FIGURA 12: CROMATOGRAMA DA NANOPARTÍCULA COM INOR



Fonte: autor, 2021

A linearidade do método foi avaliada por meio de cinco níveis de concentração: 10,0; 30,0; 50,0; 70,0 e 90,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Foi observada relação linear entre a área do pico e a concentração da Insulina em uma faixa de concentração de 10,0 a 90,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A equação linear obtida para o método foi  $y = -9016,3 + 19554,2x$  ( $R^2 = 0,999$ ) (Figura 13).

FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DA IHR OBTIDA POR UHPLC ( $\lambda = 273 \text{ nm}$ )

Fonte: autor, 2020

Em concordância com o *Analytical Methods Committee* (AMC), o coeficiente de correlação com valor próximo a 1 não é impreterivelmente um resultado de relação linear, por esse motivo, deve ser aplicado o teste de falta de ajuste (*lack of fit*). Teste que avalia a variação dos valores residuais (GOMES *et al.*, 2015; HADAD; EMARA; MAHMOUD, 2009). O teste ANOVA para a linearidade está apresentado na Tabela 1. Para falta de ajuste, o valor de *F* foi menor que o valor de *F* tabelado, para o intervalo de 95% de confiança ( $\alpha=0,05$ ), portanto, a regressão linear não apresentou falta de ajuste (KLEIN; LONGHINI; DE MELLO, 2012).

TABELA 1: RESULTADOS DE ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO

	SS	DF	MS	F	F <sub>tab</sub>
Modelo	1,866363 x 10 <sup>13</sup>	1	1,866363 x 10 <sup>13</sup>	15958,37	4.600
Resíduo	1,637328 x 10 <sup>10</sup>	14	1,169520 x 10 <sup>9</sup>		Linear
Falta de ajuste	2,455186E+09	4	613796388	0,441006	3.478
Erro puro	1,391810 x 10 <sup>10</sup>	10	1,391810 x 10 <sup>9</sup>		Não há falta de ajuste

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, *F*: valor *F* do teste; *F*<sub>tab</sub>: valor do *F* tabelado

Fonte: autor, 2020

### 5.1.3 Quantificação e eficiência da IHR encapsulada às nanopartículas

A IHR encapsulada apresentou teor de fármaco superior a 99%, com baixos valores de desvio padrão e desvio padrão relativo para as análises em triplicata (Tabela 2). Foi observada relação linear entre a área do pico e a concentração da IHRne em uma faixa de concentração de 30,0 a 70,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

TABELA 2: TEOR DE IHR INCORPORADA NAS NANOPARTÍCULAS

Concentração	Doseamento (%±DP*)	DPR*
30	99,43±0,55	0,56
50	99,38±2,54	2,56
70	99,34±1,59	1,61

\*DP: desvio padrão; \*\* DPR: desvio padrão relativo

Fonte: autor, 2021

A formulação mostrou-se estável e com resultado satisfatório frente ao procedimento realizado, quantificação determinada por UHPLC, demonstrando que o sistema polimérico desenvolvido e realizado por meio do *spray-drying*, tem efetividade de encapsulamento, outros estudos como o de D'Souza e colaboradores prepararam micropartículas poliméricas de insulina com  $\beta$ -ciclodextrina, também utilizando o método por *spray-drying*, de acordo com a análise cromatográfica eles alcançaram uma EFEN de aproximadamente 95% (D'SOUZA *et al.*, 2015).

Agrawal e colaboradores prepararam Microesferas com insulina humana contendo inibidor de protease e Eudragit® S100 (ES-100), o método utilizado foi o de evaporação do solvente de emulsão múltipla, no entanto eles obtiveram uma menor EFEN, perto de 77%, a quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) por meio do doseamento do princípio ativo presente nos sobrenadantes (AGRAWAL; WAKTE; SANTOSH SHELKE, 2017). Em estudo mais recente, Chen e seus colaboradores desenvolveram por um método de emulsão dupla, dois tipos de nanopartículas de insulina, uma revestida com alginato e outra revestida com quitosana. A EFEN obtida foi em torno de 82% para as nanopartículas revestidas com alginato e para as revestidas com quitosana o valor foi próximo a 55%, o tamanho dessas nanopartículas ficou entre 200 e 300 nm (CHEN *et al.*, 2019).

No estudo de Lopes e colaboradores foi utilizada uma técnica modificada de emulsificação e gelificação interna para o preparo de nanopartículas de insulina com alginato e sulfato de dextrana, obtiveram uma EFEN de  $99,3\% \pm 0,5\%$ , uma eficiência superior ao que foi relatado por eles anteriormente em outros estudos (LOPES *et al.*, 2015).

#### 5.1.4 Diâmetro médio e índice de polidispersão

O tamanho da partícula, o índice de polidispersão e o potencial zeta das nanopartículas podem influenciar a captação celular gastrointestinal e na eficácia dos agentes terapêuticos (WONG; AL-SALAMI; DASS, 2020). Com base nos resultados indicados (Tabela 3), pode-se observar que as nanopartículas sem IHR apresentaram tamanho em torno de 199,20 nm e as com IHR apresentaram diâmetro médio de 228,50 nm, estando de acordo com o esperado, o tamanho em nanoescala pode aumentar a absorção oral de insulina (WONG; AL-SALAMI; DASS, 2020). As

suspensões apresentaram valores de índice de polidispersão variando entre 0,16 (com IHR) e 0,19 (sem IHR), possuindo uma pequena variação de tamanho entre as partículas.

TABELA 3: DIÂMETRO MÉDIO DAS NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão (PDL)
Com IHR	228,50±12,39	0,16±0,005
Sem IHR	199,20±14,74	0,19±0,013

Média (n=3) ± desvio padrão

Fonte: autor, 2021

### 5.1.5 Potencial zeta

De acordo com o estudo de Zaichiko e colaboradores (2020), o potencial zeta está entre os parâmetros que são cruciais em relação às propriedades de permeação dos sistemas de liberação de drogas por meio de barreiras fisiológicas, como muco e membranas celulares. Cargas negativas podem facilitar a penetração através do muco carregado negativamente, minimizando o aprisionamento. Na Tabela 4 é possível verificar os resultados de potencial zeta obtidos para as nanopartículas, tanto as formulações com IHR e sem IHR apresentaram valores de potencial zeta negativos. No estudo já mencionado de Chen e seus colaboradores, onde dois tipos de nanopartículas foram desenvolvidas, a revestida com alginato apresentou potencial zeta negativo e a revestida com quitosana apresentando potencial zeta positivo (CHEN *et al.*, 2019).

TABELA 4: VALORES DE POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas	Potencial Zeta ( $\zeta$ )
Com IHR	-43,7±5,91
Sem IHR	-45,6±4,08

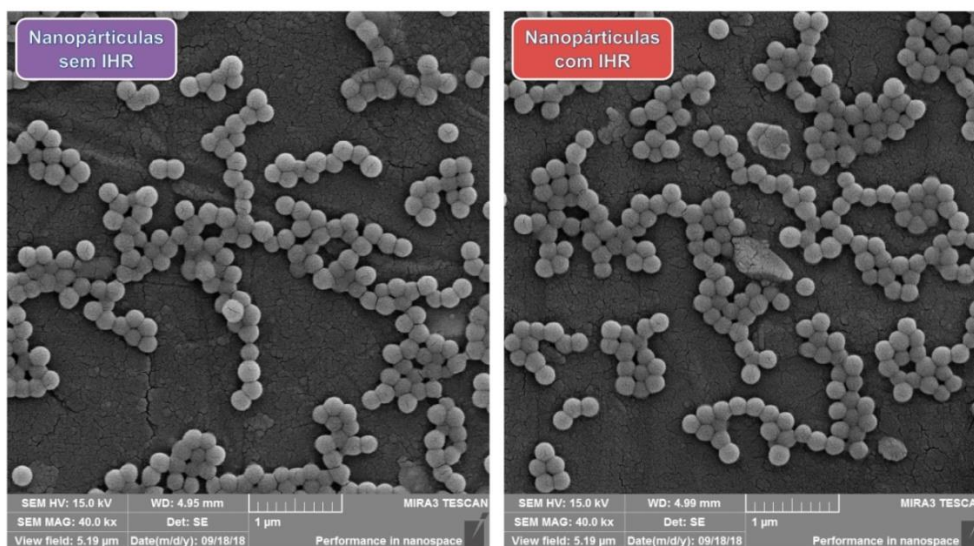
Média (n=3) ± desvio padrão

Fonte: autor, 2021

### 5.1.6 Análise Morfológica de Superfície

A análise morfológica das partículas foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (FEG), as fotomicrografias obtidas para as nanopartículas estão apresentadas na Figura 14. As imagens confirmaram a formação de nanopartículas através da metodologia por *spray-drying* bem como as dimensões nanométricas das formulações em estudo. As formulações apresentaram partículas com formato esférico bem definido, com superfície lisa e sem a presença de poros, a forma esférica é comumente esperada quando se utiliza a técnica de *spray-drying* para secagem, isso pode ser observado na literatura (SANCHEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2019; PRADHAN *et al.*, 2016; SÓTI *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2008). Não foi verificada a presença de cristais, nem outros componentes da formulação na superfície da partícula.

FIGURA 14: FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR FEG: NANOPARTÍCULAS SEM IHR E NANOPARTÍCULAS COM IHR (AUMENTO DE 40.0KX)



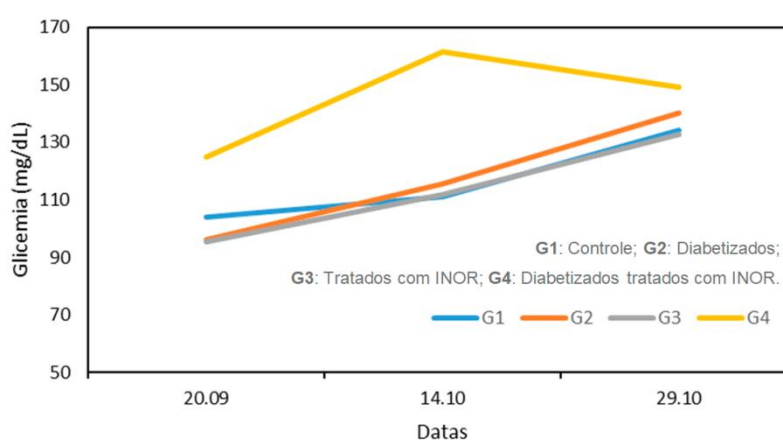
Fonte: autor, 2021



## 5.2 GLICEMIA

Com finalidade de averiguar se com a dieta hipercalórica (HFD) e a baixa dose de STZ, os roedores se tornariam diabéticos, realizou-se a análise da glicemia ao longo do tempo (Figura 15). Ratos foram considerados DM>250 mg/dL. No Gráfico 1 observar-se que uma leve hiperglicemia, no entanto não há diferença significativa entre os grupos.

FIGURA 15: PERFIL GLICÊMICO DOS ANIMAIS AO LONGO DO TEMPO



Fonte: autor, 2020

O pré-DM é considerado uma etapa precursora para o desenvolvimento da doença, é definido pela tolerância diminuída à glicose, sendo inferior ao DM, no entanto acima dos valores normais, devido à resistência insulínica e disfunção das células beta (RHEE, WOO, 2011).

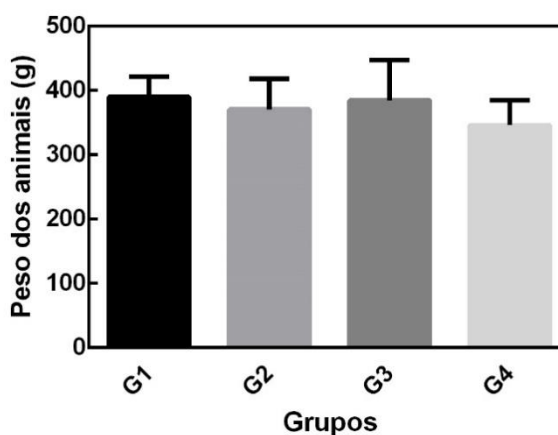
Neste estudo constatou-se que a dose de 20 mg/kg e o período de 8 semanas, com a dieta HFD não foi suficiente para deixar os animais diabéticos no modelo DM2. Os animais apresentaram um estado levemente hiperglicêmico provavelmente devido a dieta hipercalórica, pois isso foi verificado em todos os grupos. Resultado este, diferente de alguns artigos encontrados na literatura com baixas doses de STZ (MANSOR *et al.* 2013; GUO *et al.* 2018), entretanto há outros relatos onde utilizou-se 30-40 mg/kg de STZ com dieta HFD para o desenvolvimento do DM2 (SHATWAN *et al.*, 2013; JI *et al.*, 2015).

Provavelmente não houve sucesso no modelo de DM2 devido ao tempo não ser suficiente perante a baixa dose de STZ utilizada, pois em estudos como o de Guo e colaboradores (2018) foi relatado 13 semanas de experimento com dose de 25 mg/kg, também existem diferenças de composição nas dietas HFD em cada estudo, não havendo uma padronização. Além da idade do animal ser um fator importante, pois ratos jovens possuem maior capacidade de aumentar a massa de células beta do que os ratos idosos (> 1 ano) (KUSHNER, 2013), do mesmo modo os ratos jovens tendem a ter deficiência de insulina, enquanto que os ratos idosos resistência à insulina (PANI, NATHAN, GRANT, 2008).

### 5.3 PESO DOS ANIMAIS

Para verificar a ação das nanopartículas de INOR e o resultado da dieta HFD com a aplicação de STZ, os animais foram pesados durante o período do experimento. Não se observou diferença significativa entre os grupos conforme pode ser visualizado na Figura 16, que demonstra os resultados da pesagem aos 60 dias de experimento.

FIGURA 16: PESO DOS ANIMAIS REALIZADO NO ÚLTIMO DIA DO EXPERIMENTO



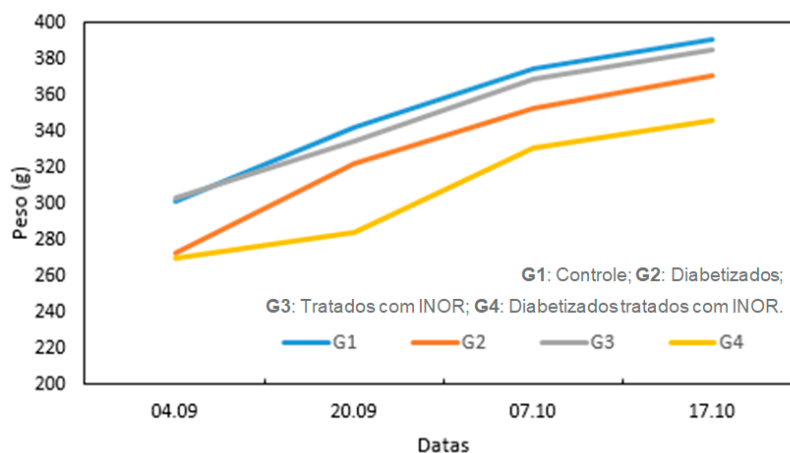
Fonte: autor, 2020

Nota: **G1**: Controle; **G2**: Diabetizados; **G3**: Tratados com INOR; **G4**: Diabetizados tratados com INOR.

Analisando o peso conforme a variação do tempo (Figura 17), durante essas 8 semanas, houve apenas um leve aumento da massa, isso ocorreu em todos os grupos, mesmo no submetidos a STZ e a nanopartículas de INOR, no entanto

estatisticamente não há diferença entre eles. Resultados assim, também foram encontrados em outros estudos com HFD como o de Marques (2016).

FIGURA 17: PESO DOS ANIMAIS MEDIDOS CONFORME A VARIAÇÃO NO TEMPO



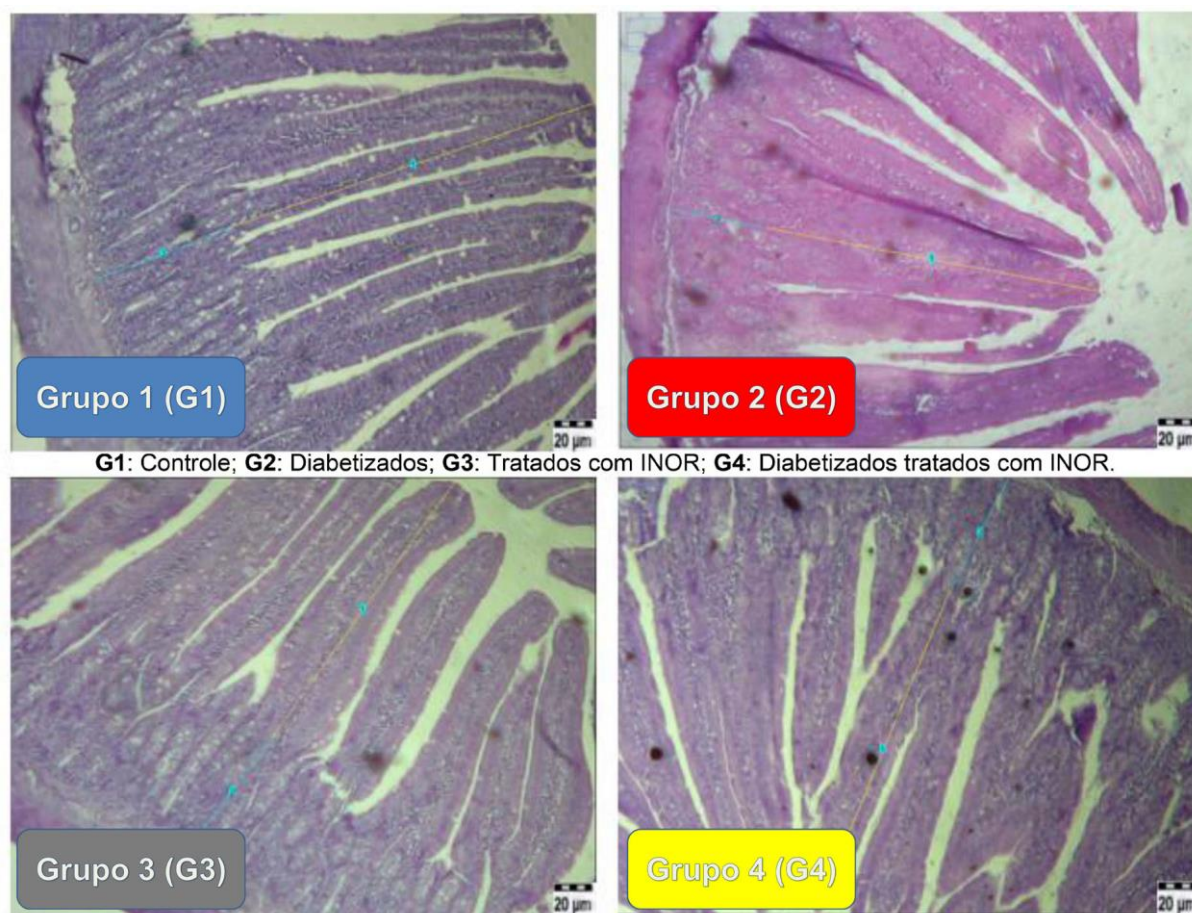
Fonte: autor, 2020

Os resultados demonstraram que as nanopartículas de INOR não foram capazes de influenciar no peso de ratos Wistar perante uma dieta hipercalórica. A dieta HFD é um grande fator de impacto independente do grupo exposto a STZ ou não, pois além de aumentar a massa de todos os animais gerando sobrepeso, deixou-os todos em um estado levemente hiperglicêmico, realizando uma possível pré-DM. Outros estudos demonstraram aumento de peso com HFD em comparação com dieta padrão (MARQUES, 2016; TOWNSEND, LORENZI, WIDMAIER, 2008).

#### 5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Analisando os tamanhos dos vilos e criptas do duodeno, percebe-se diferença estatística no Grupo 3, ratos tratados com nanopartículas de INOR, evidenciando um aumento do tamanho da cripta em relação aos demais grupos (Figura 18). Quanto ao tamanho do vilo duodenal não se verificou diferença estatística entre os grupos. Os dados encontrados para as análises histológicas estão na Tabela 5.

FIGURA 18: RESULTADO ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS VILOS E CRIPTAS DUODENAIS



Fonte: autor, 2020

TABELA 5: MÉDIAS DAS MEDIDAS DO DUODENO

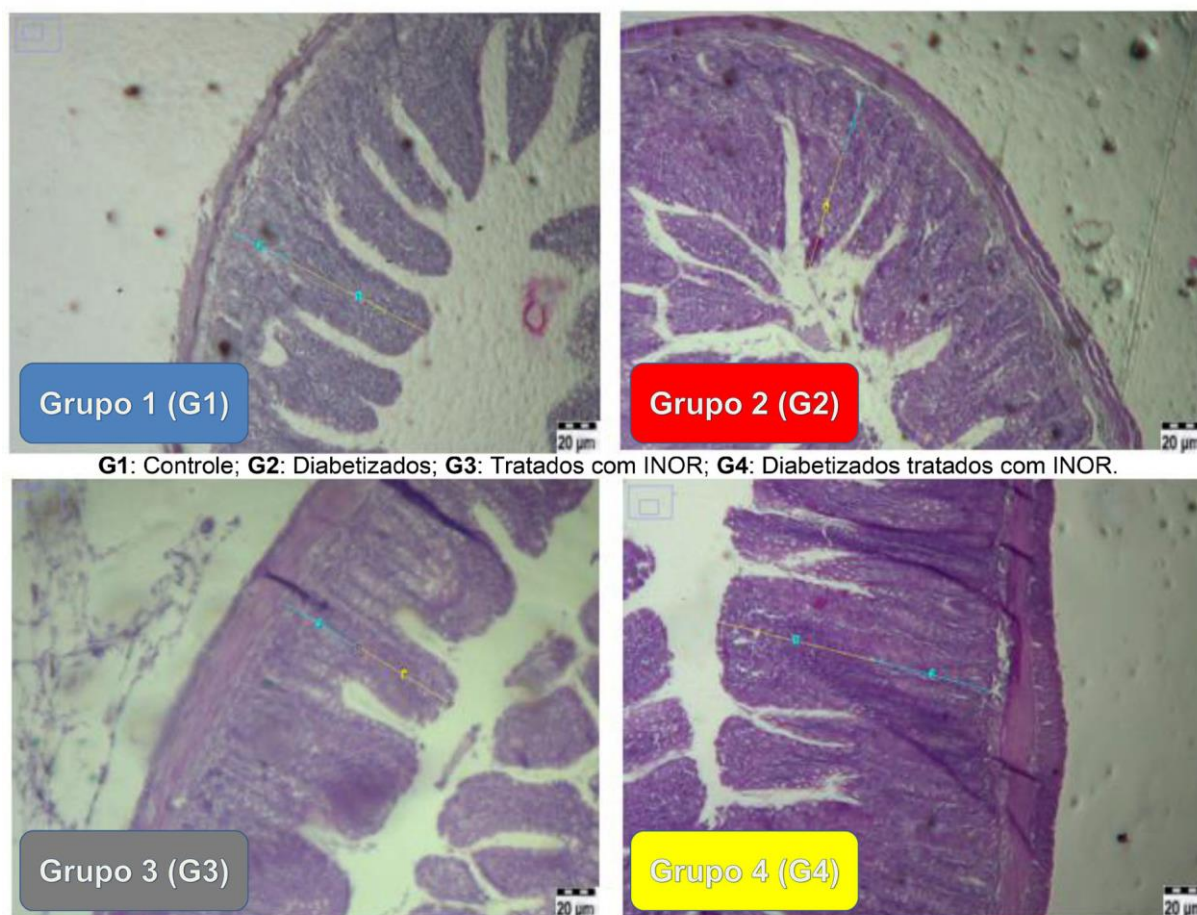
Grupos	1	2	3	4	Total
Tamanho do vilos	310,517± 70,933 <sup>(a)</sup>	323,839± 36,320 <sup>(a)</sup>	314,608± 50,118 <sup>(a)</sup>	308,027± 29,346 <sup>(a)</sup>	314,633 ±46,449 <sup>(a)</sup>
Tamanho da cripta	124,327± 20,182 <sup>(a)</sup>	124,356 ±16,578 <sup>(a)</sup>	143,713± 17,496 <sup>(b)</sup>	128,772± 16,348 <sup>(a)</sup>	130,264 ±18,792 <sup>(a)</sup>

Fonte: autor, 2020

Nota: **G1:** Controle; **G2:** Diabetizados; **G3:** Tratados com INOR; **G4:** Diabetizados tratados com INOR. Resultado da análise histológica medida em micrômetros. Letras diferentes na mesma linha denotam diferença significativa  $p < 0,05$ .

Ao verificar a histologia do íleo na Figura 19 e Tabela 6, não há diferença estatística entre os grupos seja no tamanho do vilos ou da cripta.

FIGURA 19: RESULTADO ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS VILOS E CRIPTAS ILIACAS



**G1:** Controle; **G2:** Diabetizados; **G3:** Tratados com INOR; **G4:** Diabetizados tratados com INOR.

Fonte: autor, 2020

TABELA 6: MÉDIAS DAS MEDIDAS DO ÍLEO

Grupos	1	2	3	4	Total
Tamanho do vilos	165,351± 20,685 <sup>(a)</sup>	167,302± 31,965 <sup>(a)</sup>	159,410± 30,724 <sup>(a)</sup>	156,912± 18,165 <sup>(a)</sup>	162,282 ±25,602 <sup>(a)</sup>
Tamanho da cripta	122,064± 19,209 <sup>(a)</sup>	122,629± 18,471 <sup>(a)</sup>	118,526± 19,275 <sup>(a)</sup>	112,143± 13,027 <sup>(a)</sup>	118,938 ±17,613 <sup>(a)</sup>

Fonte: autor, 2020

Nota: **G1:** Controle; **G2:** Diabetizados; **G3:** Tratados com INOR; **G4:** Diabetizados tratados com INOR. Resultado da análise histológica medida em micrômetros. Letras diferentes na mesma linha denotam diferença significativa  $p < 0,05$ .

Em relação à hipertrofia intestinal não há diferença estatística entre os grupos, exceto no grupo G3, com isso, não foi possível afirmar se a dieta HFD promoveu

aumento do tamanho intestinal, a inclusão de outro grupo controle com uma dieta normal/padrão poderia permitir uma melhor identificação.

O grupo G3 apresentou diferença estatística com aumento da cripta duodenal, sinalizando que as nanopartículas de INOR agem no intestino estimulando hiperproliferação celular por mecanismos ainda desconhecidos.

No estudo de Nasciutti e colaboradores (2016) menciona-se que as células-tronco intestinais estão inseridas geralmente nas bases das criptas de Lieberkühn que são responsáveis pela diferenciação de todo o epitélio intestinal. Tais células possuem marcadores denominados LGR5, que são receptores acoplados a proteína G, ricos em leucina, essas estão em maiores proporções em ratos diabéticos (ZHONG *et al.*, 2015), assim, sugere-se haver nesta pesquisa um aumento de células-tronco pela hiperglicemia.

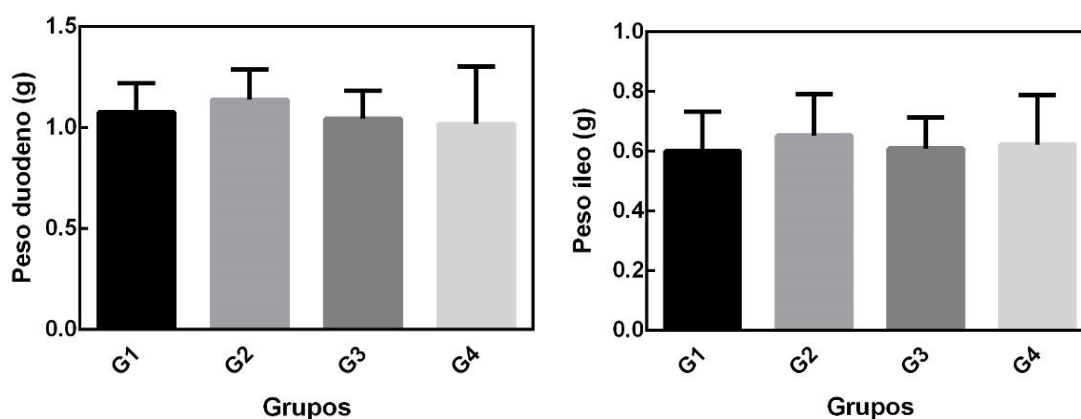
Além disso, sabe-se que a obesidade aumenta as células troncos e o número total de células epiteliais, comprimento da vilosidade e profundidade da cripta (MAH *et al.*, 2014), e com isso é capaz de aumentar a absorção intestinal, assim, podendo alterar a função, crescimento e proliferação do tecido intestinal (ZHOU, ROWITZ, DAILEY, 2018).

De acordo com Winessett e colaboradores (1995), o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1), produzido nas células mesenquimais, também pode alterar o crescimento do intestino delgado. Altos níveis de insulina e IGF-1 estimulados pela obesidade afetam a proliferação de células tronco no intestino de roedores, deste modo receptores de insulina e o IGF-1 tem participação de alguma forma na modulação da cripta (MAH *et al.*, 2014).

## 5.5 PESO INTESTINAL

Os intestinos (duodeno e íleo) foram pesados buscando encontrar efeitos ao tratamento com as nanopartículas de INOR (Figura 20), não houve diferença no peso do intestino entre os grupos.

FIGURA 20: PESOS DO DUODENO E ÍLEO - AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS APÓS A LIMPEZA



Fonte: autor, 2020

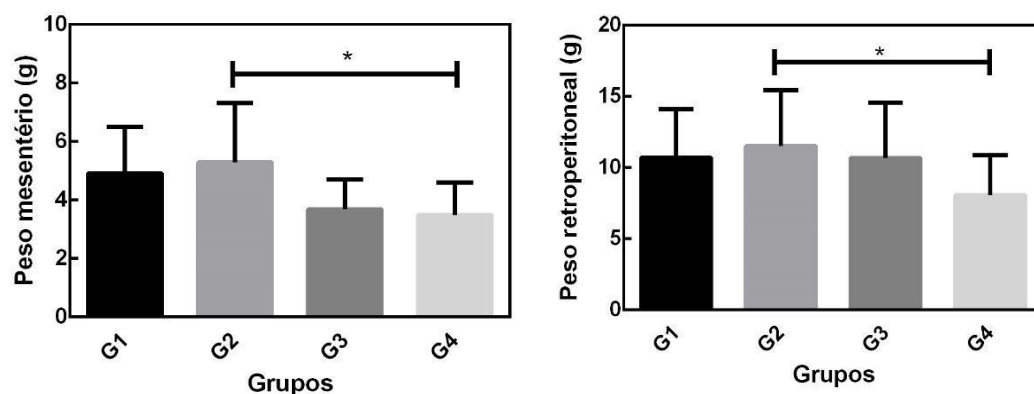
Nota: **G1**: Controle; **G2**: Diabetizados; **G3**: Tratados com INOR; **G4**: Diabetizados tratados com INOR.

Animais com resistência à insulina ou DM1 tem aumento da massa intestinal (GRANNEMAN, STRICKER, 1984), contudo nesse estudo não foi observada alteração pois todos estão em uma condição leve de hiperglicemia num modelo mais próximo de pré-DM. A hiperglicemia, procedente da dieta HFD, conseqüentemente leva a uma leve hiperinsulinemia (aumento da produção de insulina). A hiperinsulinemia pode ocasionar câncer de cólon em ratos, por ter um efeito mitótico local (TRAN, MEDLINE, BRUCE, 1996), assim, sugere-se que pode promover hiperplasia intestinal que pode ou não ter sido significativa entre os grupos do trabalho, logo se necessita um grupo controle com dieta padrão para uma melhor identificação.

## 5.6 PESOS DAS GORDURAS MESENTÉRICAS

Observa-se na Figura 21, que os pesos das gorduras mesentéricas tiveram significância estatística  $p < 0,05$  em todas as gorduras quando comparamos G2, que recebia 20  $\mu\text{L}$  HCl 0,1% e G3 e G4 que recebiam nanopartículas de INOR. Ainda com a mesma comparação, é possível observar, que os pesos das gorduras retroperitoneais foram significativamente menores  $p < 0,05$ .

FIGURA 21: PESO DAS GORDURAS MESENTÉRICAS - AVALIAÇÃO APÓS 60 DIAS DE TRATAMENTO SOB HFD



Fonte: autor, 2020

Nota: **G1**: Controle; **G2**: Diabetizados; **G3**: Tratados com INOR; **G4**: Diabetizados tratados com INOR.

A Tabela 7 demonstra as médias dos 4 grupos de animais tanto referente a hipertrofia como também hiperplasia do gordura retroperitoneal. Apresentando-se que não houve diferenças entre os grupos, mesmo nos animais dos grupos G3 e G4 que receberam nanopartículas de INOR.

TABELA 7: MÉDIAS DAS MEDIDAS DO RETROPERITÔNIO

Grupos	1	2	3	4	Total
Hipertrofia	502,586 ±109,447 <sup>(a)</sup>	518,586 ±90,427 <sup>(a)</sup>	484,445 ±109,447 <sup>(a)</sup>	520,782 ±100,760 <sup>(a)</sup>	507,993 ± 90,531 <sup>(a)</sup>
Hiperplasia	23,000 ±4,271 <sup>(a)</sup>	25,499 ±5,341 <sup>(a)</sup>	25,408 ±4,461 <sup>(a)</sup>	24,8539 ±6,334 <sup>(a)</sup>	24,853 ± 5,211 <sup>(a)</sup>

Fonte: autor, 2020

Nota: **G1**: Controle; **G2**: Diabetizados; **G3**: Tratados com INOR; **G4**: Diabetizados tratados com INOR. Resultado da análise histológica medida em micrômetros. Letras diferentes na mesma linha denotam diferença significativa  $p < 0,05$ .



A Tabela 8 demonstra as médias dos 4 grupos tanto referente a hipertrofia como também hiperplasia da gordura do mesentério. Demonstrando que não houve diferenças entre os grupos, mesmo entre G3 e G4 que receberam as nanopartículas de INOR.

TABELA 8: MÉDIAS DAS MEDIDAS DO MESENTÉRIO

Grupos	1	2	3	4	Total
Hipertrofia	290,973 ±46,998 <sup>(a)</sup>	277,148 ±41,613 <sup>(a)</sup>	323,120 ±86,084 <sup>(a)</sup>	315,242 ±64,344 <sup>(a)</sup>	301.042± 63,784 <sup>(a)</sup>
Hiperplasia	41,055 ±8,151 <sup>(a)</sup>	42,485 ±6,178 <sup>(a)</sup>	45,266 ±14,408 <sup>(a)</sup>	40,615 ±11,471 <sup>(a)</sup>	42,490± 10,616 <sup>(a)</sup>

Fonte: autor, 2020

Nota: **G1**: Controle; **G2**: Diabetizados; **G3**: Tratados com INOR; **G4**: Diabetizados tratados com INOR. Resultado da análise histológica medida em micrômetros. Letras diferentes na mesma linha denotam diferença significativa  $p < 0,05$ .

O mesentério também se relaciona com a obesidade, distúrbios glicêmicos e lipidêmicos. Em estado disfuncional a leptina produzida por ele é capaz de ativar células T elevando os níveis de TNF-alfa, IL-6 e IL-12 (RIVERA *et al.*, 2019). Possivelmente os animais do grupo G1 e G2 estavam em estado inflamatório pela maior densidade de lipídeos presente em seus adipócitos, o que desregula ação da leptina, evidenciando maior intensidade metabólica e acúmulo de lipídeos.

Nos dados apresentados verificou-se que houve diferenças significativas entre os pesos de gorduras viscerais. Esse contraste, foi notado entre os grupos G2 e G4, alimentados com mesma dieta HFD. No entanto, não houve diferenças entre hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Acredita-se então a existência de uma maior densidade lipídeos por adipócitos, sem, no entanto, capaz de promover um aumento volumétrico celular ou promotor da proliferação celular.

Como todos os animais do estudo estavam sujeitos a mesma dieta, proporcionalmente todos teriam o mesmo grau de hiperplasia e hipertrofia, embora houvesse possivelmente a influência das nanopartículas de INOR tornando os tecidos mais sensíveis ação insulínica. Evidenciado pelos grupos com menor densidade de lipídios, entretanto, disponham aproximadamente mesmo diâmetro celular e hiperplasia. Comparações entre animais normal diet e HFD evidenciou-se a existência de hiperplasia e hipertrofia (HAN *et al.*, 2018).

Foi verificado que, a acumulação de lipídios, consegue ativar diversas isoformas de cinases C, fatores nucleares pró-inflamatórios e redução da fosforilação do substrato receptor de insulina (IRS) (HEOM; CHOUNG, 2018). Essas alterações

poderiam ter a capacidade de promover aumento da massa lipídica dos adipócitos, não o suficiente para estimular a hiperplasia ou a hipertrofia do tecido adiposo visceral.

Entende-se que a insulina oral administrada consiga agir em nível de receptor IR (receptor de insulina) mediando melhor captação de glicose via SGLT1 e GLUT-2 (USSAR *et al.*, 2017). Assim, ocorreria melhor controle glicêmico e metabólico dos tecidos, sobretudo, aqui do tecido adiposo visceral. Desta forma, o grupo de animais teria menos densidade de triglicerídeos por adipócito sob ação possivelmente da nanocápsula uma vez que a dieta era idêntica.

Houve alterações da microbiota induzida por dieta rica em gorduras e carboidratos simples. O que resulta em alterações metabólicas como estado pró-inflamatório leve, constatado pelo aumento de IL-1, IL-6 e aumento LPS (SCHEITHAUER *et al.*, 2016). Deste modo, a HFD a qual os animais foram expostos seria capaz de induzir disfunções ao tecido adiposo visceral por um estado pró-inflamatório leve e suficiente para provocar alteração na função adipócitos. Possivelmente evidenciado pela massa lipídica com maior concentração nos animais controle G1.

Vale salientar a capacidade de produzir maior quantidade de adiponectina e maior atividade lipolítica das gorduras viscerais. Todavia, em estado obesogênico a adiponectina acaba reduzida e a leptina disfuncional (SENA *et al.*, 2017). Os animais dos grupos os quais recebiam nanopartículas de INOR teriam as funções da adipocinas mais preservadas pela menor densidade lipídica, uma vez que a adiponectina tem ação sensibilizadora da insulina favorecendo maior equilíbrio metabólico celular.

Por fim, tem-se conhecimento da patogenicidade da gordura visceral em humanos obesos, em parte, pelo acesso direto de ácidos graxos livres a circulação portal (MIYATA *et al.*, 2016) e maior secreção de adiponectinas pró inflamatórias. Foi observado que a remoção do mesentério reduz os efeitos da resistência insulina (ANDREW *et al.*, 2018). Aponta-se que os animais em HFD sem nanopartículas de INOR tenham maior acesso aos SCFAs e, por isso tenham maior aquisição de massa lipídica por célula.

Baseando-se em toda a discussão sugere-se neste estudo que os diversos fatores relacionados: o leve estado hiperglicêmico associado à dieta HFD e o sobrepeso, que leva a um leve estado hiperinsulinêmico, e o efeito local das

nanopartículas de INOR estimulam uma hiperplasia na cripta, ocasionada possivelmente pelo aumento de células-tronco.

## 6 CONCLUSÃO

As nanopartículas contendo insulina, formuladas a partir do polímero Eudragit® S100 foram obtidas com sucesso pelo método de *spray-drying*;

O método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography – UHPLC*), foi desenvolvido em concordância com os principais parâmetros estabelecidos pelas normativas internacionais e nacionais, teve picos bem definidos e com boa resolução mostrou-se capaz de quantificar as micropartículas desenvolvidas, é um método seletivo, linear e simples, que pode ser uma boa opção para uso na rotina laboratorial;

As nanopartículas de INOR apresentaram efeito local como o aumento da profundidade da cripta intestinal, e atuação em nível de gorduras mesentérica e retroperitoneal mesmo em animais sujeitos a HFD, conseguindo sensibilizar o metabolismo de lipídios pelas gorduras viscerais. São muitos os mecanismos que podem estar envolvidos, como a microbiota com produção dos SCFAs, densidade maior lipídica promovendo desequilíbrio das adipocinas e o baixo estado pró-inflamatório. As nanopartículas de INOR não reduziram a glicemia e não apresentaram efeito na redução do peso dos animais alimentados com HFD, sendo necessários ainda mais estudos para um melhor entendimento da ação da insulina no epitélio intestinal.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V.; REDDY, I. K.; KHAN, M. A. Polymethacrylate based microparticulates of insulin for oral delivery: Preparation and in vitro dissolution stability in the presence of enzyme inhibitors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1–2, p. 31–39, ago. 2001.
- AGRAWAL, G. R.; WAKTE, P.; SHELKE, S. Formulation, physicochemical characterization and in vitro evaluation of human insulin-loaded microspheres as potential oral carrier. **Prog Biomater**, v. 6, p. 125–136, 2017.
- AHMAD, M. *et al.* Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 5, p.254-257, 2011.
- AL RUBEAN, K.; RAFIULLAH, M.; JAYAVANTH, S.. Oral insulin delivery systems using chitosan-based formulation: A review. **Expert opinion on drug delivery**, v. 13, n. 2, p. 223-237, 2016.
- ALAMRI, O. D. *et al.* Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities as well as the renal protective potential of green coffee extract in high fat-diet/streptozotocin-induced diabetes in male albino rats. **Journal of Functional Foods**, v. 71, p. 103996, ago. 2020.
- ALEXANDER, K. Dosage Forms and Their Routes of Administration. In: **Pharmacology**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 9–29.
- ALHARBI, T.; THOMACOS, N.; MCLELLAND, G. Core competencies for diabetes educators: A scoping review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 4, p. 2671–2682, 2019.
- ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, p. 173-191, 1993.
- ANDREW, M. S. *et al.* Mesenteric Visceral Lipectomy using Tissue Liquefaction Technology reverses insulin resistance and causes weight loss in baboons. **Surg Obes Relat Dis**, v. 14, n. 6, p. 833-841, 2018.
- ASHOUR, E. A. *et al.* Hot melt extrusion as an approach to improve solubility, permeability and oral absorption of a psychoactive natural product, piperine. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 989-998, 2016.
- AWAD, S. F. *et al.* Forecasting the burden of type 2 diabetes mellitus in Qatar to 2050: A novel modeling approach. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 137, p. 100–108, 2018.

BASHA, M.; SALAMA, A. H.; EL AWDAN, S. Reconstitutable spray dried ultra-fine dispersion as a robust platform for effective oral delivery of an antihyperlipidemic drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 478–490, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: Diabetes Mellitus. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 36. Brasília, 2013.

BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Aprova “Critérios para a validação de métodos analíticos”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412)>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2021.

BRAVO-ALFARO, D. A. *et al.* Encapsulation of an insulin-modified phosphatidylcholine complex in a self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral insulin delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101622, 2020.

CARRETERO GÓMEZ, J. *et al.* Obesity is a chronic disease. Positioning statement of the Diabetes, Obesity and Nutrition Workgroup of the Spanish Society of Internal Medicine (SEMI) for an approach centred on individuals with obesity. **Revista Clínica Española (English Edition)**, maio 2021.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Diabetes Basics.**, 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/diabetes/basics/diabetes.html>>. Acesso em: 04 abr. 2020.

CHAIT, A.; DEN HARTIGH, L. J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, 25 fev. 2020.

CHAUDHURY, A. *et al.* Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 24 jan. 2017.

CHEN, T. *et al.* Self-assembly pH-sensitive chitosan/alginate coated polyelectrolyte complexes for oral delivery of insulin. **Journal of Microencapsulation**, v. 36, n. 1, p. 96–107, 2 jan. 2019.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. **J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 1, p. 33-66, 2003.

D'SOUZA, B. *et al.* Development of  $\beta$ -cyclodextrin-based sustained release microparticles for oral insulin delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 8, p. 1288–1293, 3 ago. 2015.

DAMGÉ, C.; REIS, C.P.; MAINCENT, P. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. **Expert opinion on drug delivery**, v. 5, n. 1, p. 45-68, 2008.

DE ARCE VELASQUEZ, A. *et al.* Novel Pullulan-Eudragit(R) S100 blend microparticles for oral delivery of risedronate: formulation, in vitro evaluation and tableting of blend microparticles. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 38, p. 212-217, 2014.

DEFRONZO, R. A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 773–795, abr. 2009.

DENG, S.; GIGLIOBIANCO, M. R.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, **Challenges and Opportunities. Nanomaterials**, v. 10, p. 1-36, 2020.

DI ANGELANTONIO, E. *et al.* Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. **The Lancet**, v. 388, n. 10046, p. 776–786, ago. 2016.

DIXON, J. B. *et al.* Bariatric surgery: An IDF statement for obese Type 2 diabetes. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 5, n. 3, p. e171–e189, 2011.

DODDS, S. The How-To for Type 2: An Overview of Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes Mellitus. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. 513–522, 2017.

DOMINGUES, G. S. *et al.* Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966–1972, 2008.

DUARTE, A. C. G. DE O. *et al.* Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 341–348, jun. 2006.

DUHAN, J. S. *et al.* Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 11–23, 2017.

EITAH, H. E. *et al.* Modulating impacts of quercetin/sitagliptin combination on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 365, p. 30–40, 2019.

EZZAT, S. M. *et al.* Phenolics from *Physalis peruviana* fruits ameliorate streptozotocin-induced diabetes and diabetic nephropathy in rats via induction of autophagy and apoptosis regression. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 111948, 2021.

FANG, Y. *et al.* Gastrointestinal Responsive Polymeric Nanoparticles for Oral Delivery of Insulin: Optimized Preparation, Characterization, and In Vivo Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 9, p. 2994–3002, 2019.

FARAGO, P. V. **Desenvolvimento de sistemas poliméricos para a liberação modificada do cloridrato de metformina**. 2007. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

FEINGOLD, K. R. **Oral and Injectable (Non-Insulin) Pharmacological Agents for Type 2 Diabetes**. [Atualizado 12/07/2020]. In: FEINGOLD, K. R. et al. (Eds.). South Dartmouth (MA): [s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279141/>>. Acesso em 05 de abril de 2021.

FONTE, P. *et al.* Oral insulin delivery: how far are we?. **Journal of diabetes science and technology**, v. 7, n. 2, p. 520-531, 2013.

FONTE, P. *et al.* Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. **Biotechnology Advances**, v. 33, n.6, p.1342-1354, 2015.

GHEIBI, S.; BAKHTIARZADEH, F.; GHASEMI, A. A Review of High Fat Diet-Streptozotocin Model for Induction of Type 2 Diabetes in Rat TT - پر رژیم مدل بر مروری - صحرائی موش در 2 نوع دیابت ایجاد برای استرپتوزوتوسین-چرب **IJEM**, v. 18, n. 2, p. 135–148, 1 jul. 2016.

GHEIBI, S.; KASHFI, K.; GHASEMI, A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 605–613, 2017.

GOMES, M. L. S. *et al.* A Simple RP-HPLC/UV Method for Determination of Cilostazol in Polymeric Nanoparticles Suspensions: Development and Validation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 4, p.803-809, 2015.

GUERRERO-ARELLANO, H. E. La Nanotecnología farmacéutica es una realidad. **Revista Científica Domínio de Las Ciências**, [s. l.], v. 3, p. 526–538, 2017.

GRANNEMAN, J. G.; STRICKER, E. M. Food intake and gastric emptying in rats with streptozotocin-induced diabetes. **The American journal of physiology**, v. 247, n. 6 Pt 2, p. R1054-61, dez. 1984.

GUO, X.X. *et al.* Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 19, n. 7, p. 559–569, jul. 2018.

HADAD, G. M.; EMARA, S.; MAHMOUD, W. M. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. **Talanta**, v. 79, n. 5, p.1360-1367, 2009.

HAN, W. *et al.* Influence of food texture on energy metabolism and adiposity in male rats. **Experimental Physiology**, v. 3, n. 103, p. 1347-1356, 2018.

HAY, C. W.; DOCHERTY, K. Comparative Analysis of Insulin Gene Promoters: Implications for Diabetes Research. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3201–3213, 1 dez. 2006.

HE, H. *et al.* Biomimetic thiamine- and niacin-decorated liposomes for enhanced oral delivery of insulin. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 1, p. 97–105, jan. 2018.

HECQ, J.; AMIGHI, K.; GOOLE, J. Development and evaluation of insulin-loaded cationic solid lipid nanoparticles for oral delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 36, p. 192–200, dez. 2016.

HEOM, M. G.; CHOUNG, S. Y. Anti Obesity effects of Spirulina máxima in High fat diet obese rats through activating AMPK pathway and SIRT1. **Food e Function**, v.14, n.10, p. 1-29, 2018.

HERRADOR ORTIZ, Z.; LLANOS MÉNDEZ, A. Eficacia de la insulina de administración oral/bucal en el tratamiento de la diabetes mellitus. **Atención Primaria**, v. 42, n. 6, p. 316–321, 2010.

HIRLEKAR, R.S. Oral Insulin Delivery: Novel Strategies. **Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)**: Free full text articles from Asian J Pharm, v. 11, n. 03, 2017.

HOMAYUN, B.; CHOI, H.-J. Halloysite nanotube-embedded microparticles for intestine-targeted co-delivery of biopharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 579, p. 119152, abr. 2020.

HU, W. Y. *et al.* Smart pH-responsive polymeric micelles for programmed oral delivery of insulin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 183, p. 110443, nov. 2019.

HUNG, W.-W.; HUNG, W.-C. How gut microbiota relate to the oral antidiabetic treatment of type 2 diabetes. **Medicine in Microecology**, v. 3, p. 100007, 2020.

ICH. International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use guideline, **Validation of analytical procedures: text and methodology**. Q2 (R1), v. 1, 2005.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 8th, 2017. Disponível em: <https://www.idf.org/>. Acesso em 12 de julho de 2019.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATIONS. **IDF Diabetes Atlas**. 9th, 2019. Disponível em: <https://www.idf.org/>. Acesso em 01 de abril de 2020.

JAIN, A.; HALLIHOSUR, S.; RANGAN, L. Dynamics of nanotechnology patenting: An Indian scenario. **Technology in Society**, v. 33, n. 1, p. 137–144, 2011.

Ji, J. *et al.* Effect of stay-green wheat, a novel variety of wheat in China, on glucose and lipid metabolism in high-fat diet induced type 2 diabetic rats. **Nutrients**. v. 7, n. 7, p.5143–5155, 2015.

KAROLEWICZ, B. A review of polymers as multifunctional excipients in drug dosage form technology. **Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 24, n. 5, p. 525-536, 2016.

KATSUMA, M. *et al.* Effects of absorption promoters on insulin absorption through colon-targeted delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 156–162, jan. 2006.



KEÇILI, R.; BÜYÜKTIRYAKI, S.; HUSSAIN, C. M. Advancement in bioanalytical science through nanotechnology: Past, present and future. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 259–276, 2019.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], 2017.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p.502-506, 2012.

KOYE, D. N. *et al.* The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 25, n. 2, p. 121–132, 2018.

KRAJIŠNIK, D.; ČALIJA, B.; CEKIĆ, N. Polymeric Microparticles and Inorganic Micro/Nanoparticulate Drug Carriers: An Overview and Pharmaceutical Application. In: **Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 31–67.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

KUMARI, Y. *et al.* Modified apple polysaccharide capped gold nanoparticles for oral delivery of insulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 976–988, 2020.

KURTZHALS, P. *et al.* Commemorating insulin's centennial: engineering insulin pharmacology towards physiology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 42, n. 8, p. 620–639, 2021.

KUSHNER, J. A. The role of aging upon beta cell turnover. **J Clin Invest**. v. 123, p. 990-995, 2013.

LI, L. *et al.* A composite hydrogel system containing glucose-responsive nanocarriers for oral delivery of insulin. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 37–45, 2016.

LIPINSK, L.C., *et al.* Oral insulin improves metabolic parameters in high fat diet fed rats. **An. Acad. Bras. Ciênc**, v. 89, n. 3, p. 1699-1705, 2017.

LIU, C. *et al.* A novel ligand conjugated nanoparticles for oral insulin delivery. **Drug delivery**, v. 23, n. 6, p. 2015-2025, 2016.

LOPES, M. A. *et al.* Probing insulin bioactivity in oral nanoparticles produced by ultrasonication-assisted emulsification/internal gelation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5865–5880, 2015.

MAH, A. T. *et al.* Impact of Diet-Induced Obesity on Intestinal Stem Cells: Hyperproliferation but Impaired Intrinsic Function That Requires Insulin/IGF1. **Endocrinology**, v. 155, p. 3302–3314, 2014.

MALLEK, A. *et al.* Experimental diabetes induced by streptozotocin in the desert gerbil, *Gerbillus gerbillus*, and the effects of short-term 20-hydroxyecdysone administration. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 354–361, 2018.

MANO, E. B.; MENDES L.C. **Introdução a Polímeros** - 2.ed. rev. e ampl. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

MANSOR, L. S. *et al.* Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. **Cardiovascular diabetology**, v. 12, p. 136, set. 2013.

MARQUES, C. *et al.* High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. **Adipocyte**, v. 5, n. 1, p. 11–21, 3 fev. 2016.

MELO, B. P. *et al.* Thirty days of combined consumption of a high-fat diet and fructose-rich beverages promotes insulin resistance and modulates inflammatory response and histomorphometry parameters of liver, pancreas, and adipose tissue in Wistar rats. **Nutrition**, v. 91–92, p. 111403, nov. 2021.

MITHU, S. H. *et al.* Evaluation of the surface chemistry and drug-polymer interaction of semi-crystalline micro-particles for the development of controlled release formulations. *Materials science & engineering. C*, **Materials for biological applications**, v. 76, p. 559-567, 2017.

MIYATA, U. *et al.* Identification of Mouse Mesenteric and Subcutaneous in vitro Adipogenic Cells. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 8, p. 1-13, 2016.

MOMOH, M. A. *et al.* Microemulsion-based approach for oral delivery of insulin: formulation design and characterization. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03650, 2020.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-42, 2010.

MOSLEMI, P.; NAJAFABADI, A. R.; TAJERZADEH, H. A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 1, p. 45–51, 2003.

NASCIUTTI, L. E. *et al.* Histologia do Tubo Digestório. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**, p.273-314, São Paulo, Editora Edgard Blücher, 2016.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem **Compound Summary for CID 7067772, Streptozotocin**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Streptozotocin>>. Acesso em: 21 ago. 2021.

P. A. FERREIRA, M. *et al.* **Chapter 9 - Spray-drying for the formulation of oral drug delivery systems.** In: MARTINS, J. P.; SANTOS, H. A. B. T.-N. FOR O. D. D. (Eds.). [s.l.] Academic Press, 2020. p. 253–284.

PANI, L. N.; NATHAN, D. M.; GRANT, R. W. Clinical predictors of disease progression and medication initiation in untreated patients with type 2 diabetes and A1C less than 7%. **Diabetes Care.** v. 31, p. 386-390, 2008.

PAPATHEODOROU, K. *et al.* Complications of Diabetes 2017. **Journal of Diabetes Research,** v. 2018, p. 1–4, 2018.

PATRA, C. N. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 3, n. 1, p. 33-45, 2017.

PAUL, P. K. *et al.* Improvement in insulin absorption into gastrointestinal epithelial cells by using molecularly imprinted polymer nanoparticles: Microscopic evaluation and ultrastructure. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 530, n. 1, p. 279–290, 2017.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova,** [s. l.], v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PRADHAN, R. *et al.* Preparation and characterization of spray-dried valsartan-loaded Eudragit® E PO solid dispersion microparticles. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 11, n. 6, p. 744–750, 2016.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,** v. 78, p. 13–31, 2016.

RAMOS, F. DE M.; SILVEIRA JÚNIOR, V.; PRATA, A. S. Impact of vacuum spray drying on encapsulation of fish oil: Oxidative stability and encapsulation efficiency. **Food Research International,** v. 143, p. 110283, 2021.

REED, M. J. *et al.* A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism,** v. 49, n. 11, p. 1390–1394, 2000.

REIS, C.P.; DAMGE, C. **Nanotechnology as a promising strategy for alternative routes of insulin delivery.** In: Methods in enzymology. Academic Press, 2012. p. 271-294.

RHEE, S. Y.; WOO, J.-T. The prediabetic period: review of clinical aspects. **Diabetes & metabolism journal,** v. 35, n. 2, p. 107–116, abr. 2011.

RIVERA, E. D. *et al.* **The Mesentery, Systemic Inflammation, and Crohn's Disease.** *Inflamm bowel Dis,* v. 25, n. 2, p. 226-234, 2019.

SANCHEZ-VAZQUEZ, B. *et al.* Solid lipid nanoparticles self-assembled from spray dried microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, p. 118784, 2019.

SCHEITHAUER, T. P. M. *et al.* Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 9, p. 759–770, set. 2016.

SENA, M. C. *et al.* Adiponectin improves endothelial function in mesenteric arteries of rats fed a high-fat diet: role of perivascular adipose tissue. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 15, p. 3514-3526, 2017.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B. Polímeros Sintéticos biodegradáveis: Matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em drug delivery e liberação controlada. **Polímeros**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 286–292, 2011.

SHAHANI, K.; PANYAM, J. Highly loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 7, p. 2599-2609, 2011.

SHARMA, S.; TALIYAN, R. High fat diet feeding induced insulin resistance exacerbates 6-OHDA mediated neurotoxicity and behavioral abnormalities in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 351, p. 17–23, out. 2018.

SHATWAN, I.; AHMED, L.; MOHAMED, M. Effect of Barley Flour, Crude Cinnamon, and Their Combination on Glycemia, Dyslipidemia, and Adipose Tissue Hormones in Type 2 Diabetic Rats. **Journal of medicinal food**, v. 16, p. 656–662, 1 jul. 2013.

SHAWAHNA, R. *et al.* Exercise as a complementary medicine intervention in type 2 diabetes mellitus: A systematic review with narrative and qualitative synthesis of evidence. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 15, n. 1, p. 273–286, jan. 2021.

SILVA, M. *et al.* Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, p. 46-53, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v55n1/06.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2020.

SÓTI, P. L. *et al.* Comparison of spray drying, electroblowing and electrospinning for preparation of Eudragit E and itraconazole solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 23–30, 2015.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 416–427, 2013.

SUDHAKAR, S. *et al.* Biodistribution and pharmacokinetics of thiolated chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 281–288, maio 2020.

SUKHOTNIK, I. *et al.* Effect of Oral Insulin on Diabetes-Induced Intestinal Mucosal Growth in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 9, p. 2566–2574, 5 set. 2011.

SUNOQROT, S.; ABUJAMOUS, L. pH-sensitive polymeric nanoparticles of quercetin as a potential colon cancer-targeted nanomedicine. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 670–676, 2019.

TAN, S. Y. *et al.* Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 1, p. 364–372, jan. 2019.

TOKUNAGA, S. *et al.* Microencapsulation of drug with enteric polymer Eudragit L100 for controlled release using the particles from gas saturated solutions (PGSS) process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 167, p. 105044, 2021.

TOWNSEND, K. L.; LORENZI, M. M.; WIDMAIER, E. P.; High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. **Endocrine**. v. 33, n. 2, p. 176-188, 2008.

TRAN, T.T.; MEDLINE, A.; BRUCE, W. R. Insulin promotion of colon tumors in rats. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 5, p. 1013–1015, 1996.

UPPAL, S. *et al.* Nanoparticulate-based drug delivery systems for small molecule anti-diabetic drugs: An emerging paradigm for effective therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 81, p. 20–42, 2018.

USSAR, S. *et al.* Regulation of Glucose Uptake and enteroendocrina Function by the Intestinal Epithelial Insulin Receptor. **Diabetes**, v. 66, p. 886-896, 2017.

VERBERNE, A. J. M.; SABETGHADAM, A.; KORIM, W. S. Neural pathways that control the glucose counterregulatory response. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, 2014.

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

ZAICHIK, S. *et al.* Zeta potential changing nanoemulsions: Impact of PEG-corona on phosphate cleavage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 581, p. 119299, 2020.

WANDERLEY E. N., FERREIRA V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p 185-194, 2010.

WEISMAN, A. *et al.* Evolving Trends in the Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Type 2 Diabetes: A Review. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 34, n. 5, p. 552–564, 2018.

WILD, S. *et al.* Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047–1053, 1 maio 2004.

WINESETT, D. E. *et al.* Regulation and localization of the insulin-like growth factor system in small bowel during altered nutrient status. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 4 Pt 1, p. G631-40, abr. 1995.

WONG, C. Y.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Formulation and characterisation of insulin-loaded chitosan nanoparticles capable of inducing glucose uptake in skeletal muscle cells in vitro. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101738, 2020.

WONG, C. Y.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Recent advancements in oral administration of insulin-loaded liposomal drug delivery systems for diabetes mellitus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 549, n. 1–2, p. 201–217, out. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diabetes**, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>. Acesso em: 10 de mar. de 2019.

WU, K. K.; HUAN, Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 40, 5.47.1-5.47.14, 2008.

ZAVISOVA, V.; KONERACKA, M.; GABELOVA, A.; SVITKOVA, B.; URSINYOVA, M.; KUBOVCIKOVA, M.; ANTAL, I.; KHMARA, I.; JURIKOVA, A.; MOLCAN, M.; OGNJANOVIĆ, M.; ANTIĆ, B.; KOPCANSKY, P. Effect of magnetic nanoparticles coating on cell proliferation and uptake. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 472, p. 66–73, 2019.

ZHANG, L. *et al.* Improving the Stability of Insulin in Solutions Containing Intestinal Proteases in Vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 9, p. 2376–2387, jan. 2009.

ZHANG, Y.; ZHANG, P.; ZHU, T. Ovarian carcinoma biological nanotherapy: Comparison of the advantages and drawbacks of lipid, polymeric, and hybrid nanoparticles for cisplatin delivery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 475–483, 2019.

ZHONG, X.Y. *et al.* Lgr5 positive stem cells sorted from small intestines of diabetic mice differentiate into higher proportion of absorptive cells and Paneth cells in vitro. **Development, growth & differentiation**, v. 57, n. 6, p. 453–465, ago. 2015.

ZHOU, B. *et al.* Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1513–1530, abr. 2016.

ZHOU, W.; ROWITZ, B. M.; DAILEY, M. J. Insulin/IGF-1 enhances intestinal epithelial crypt proliferation through PI3K/Akt, and not ERK signaling in obese humans. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 243, n. 11, p. 911–916, jul. 2018.

## ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

**UEPG**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

## CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 044/2018

Protocolo UEPG – 15924/2018

Título – Projeto aula “Desenvolvimento, caracterização e avaliação do efeito de micropartículas contendo insulina na prevenção do Diabetes Mellitus tipo II”

## Interessados:

- Leandro Cavalcante Lipinski ([leandrolipinski@yahoo.com.br](mailto:leandrolipinski@yahoo.com.br))

Data de Entrada – 11/10/2018

Prezado Professor Leandro:

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 220 (duzentos e vinte) ratos de dois meses de idade, aproximadamente 300 g – para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 14 de dezembro de 2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
CEUA – Comissão de Ética e Bem-Estar Animal  
Ponta Grossa  
Dra. Dioneia Xavier Scamparín  
Coordenadora