

Administração oral de peptídios e proteínas: III. Aplicação à insulina

Catarina Silva¹, António Ribeiro², Domingos Ferreira³ e Francisco Veiga^{1*}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal,

²Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Instituto Superior da Ciências da Saúde do Norte, Gandra, Paredes,

Portugal, ³Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

A insulina é um peptídeo biologicamente ativo, normalmente administrado por via subcutânea, pelos obstáculos que se colocam a sua administração oral. O desenvolvimento de uma forma farmacêutica passível de ser administrada oralmente tem sido razão de uma investigação persistente, acentuada na última década, conforme é descrito. As estratégias utilizadas têm sido muito variadas, a saber, a utilização de inibidores das enzimas proteolíticas, promotores da absorção, modificação química e fórmulas farmacêuticas específicas, como sistemas de partículas, emulsões, sistemas de liberação targeting e sistemas bioadesivos. Embora ainda nenhuma abordagem tenha sido suficientemente eficaz, os resultados são encorajadores. A microencapsulação e, em particular, os métodos que utilizam polímeros naturais, mostram-se promissores neste propósito, pelas características vantajosas que apresentam.

Unitermos:

- Inibidores das proteases
- Insulina oral
- Microencapsulação
- Polímeros naturais
- Promotores da absorção

* Correspondência:

F. Veiga
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
3000 Coimbra
Portugal
E-mail: fveiga@ci.uc.pt

INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Quando a produção de insulina é inadequada ocorre o diabetes *mellitus*, cujo tratamento com insulina tem como objetivo obter níveis plasmáticos idênticos aos da secreção fisiológica bimodal em indivíduos não diabéticos. A terapêutica normal consiste na administração parenteral de insulina, em especial pela via subcutânea (s.c.). A duração de ação normal é curta, ou seja, 4-8 horas, o que exige 2-4 injeções diárias para um controle apropriado da doença (Chien, 1996; Trehan, Ali, 1998). Embora o prolongamento da atividade insulínica tenha sido alcançado pela investigação tecnológica, a administração crônica por via subcutânea conduz a efeitos secundários de lipoatrofia e lipoipertrofia nos locais de injeção, agravados pelo desconforto causado aos doentes (Chien, 1996; Ramkissoon-

Ganorkar *et al.*, 1999). Por outro lado, em termos fisiológicos, a insulina é secretada para a veia pancreática para ser primeiramente transportada para o fígado, onde cerca de metade das moléculas são degradadas e removidas da circulação hepática (Ramkissoon-Ganorkar *et al.*, 1999). Quando a insulina é administrada para a circulação geral, todos os tecidos são expostos a uma concentração igual de insulina, o que implica que o fígado receba apenas uma fração da dose injetada e que os músculos e adipócitos respondam à dose injetada sem que a insulina presente na circulação tenha sido monitorada pelo fígado. A exposição excessiva dos vasos e músculos lisos à insulina (hiperinsulinemia periférica) pode causar superestimulação indesejável das respostas metabólicas, associada às complicações do diabetes (Saffran *et al.*, 1997). Deste modo, para responder aos anseios dos doentes diabéticos e para proporcionar insulina ao fígado por uma via mais fisiológica, tem-se procurado desenvolver um sistema de

liberação recorrendo a outras vias de administração (Trehan, Ali, 1998).

A obtenção de uma forma farmacêutica oral de insulina com biodisponibilidade adequada (10-20%) seria uma grande contribuição para o tratamento do diabetes e mesmo que não substituísse a terapia parenteral poderia complementá-la (Schilling, Mitra, 1990).

Na primeira e segunda partes desta revisão (Silva *et al.*, 2002a; Silva *et al.*, 2002b) foram descritos aspectos associados à administração oral de fármacos peptídicos, em especial, as estratégias possíveis a adotar para alcançar esse fim, com um particular destaque para a microencapsulação. Nesta terceira parte, estes aspectos serão aplicados na administração da insulina por via oral.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA INSULINA

A insulina é uma proteína formada por duas cadeias de aminoácidos (a.a.), A e B, que contêm 21 e 30 a.a., respectivamente, interligadas por duas pontes de dissulfeto. A massa molecular (MM) é de ~6 KDa. A composição em a.a. é variável para diferentes animais, mas em cada cadeia 10 resíduos são comuns. Na cadeia A existe uma ponte de dissulfeto intra-cadeia (A₆-A₁₁). Alguns a.a. da molécula não são essenciais à atividade biológica da insulina, como os resíduos em B₃₀ ou A₂₁. O octapeptídeo terminal da cadeia B (B₂₃-B₃₀) é importante na ação hipoglicêmica, visto que a separação deste segmento conduz à perda de 85% da atividade biológica (Chien, 1996).

Os resíduos invariáveis das cadeias A e B são responsáveis pela integridade estrutural da molécula de insulina e ajudam a definir a conformação da mesma (através das pontes de dissulfeto inter- e intracadeias entre os resíduos de cisteína). Os resíduos variáveis interagem no enrolamento da molécula para formar uma estrutura tridimensional. Apesar das diferenças na composição da estrutura primária o enrolamento e o empacotamento das cadeias A e B numa conformação tridimensional são, essencialmente, os mesmos para todas as moléculas de insulina. A estrutura tridimensional da insulina é determinada primariamente pelas pontes de dissulfeto e depende muito de forças de Van der Waals. A conformação estrutural da insulina é essencial para a sua atividade hipoglicemiante (Chien, 1996).

A molécula de insulina existe como um monômero apenas em baixas concentrações (<0,1 mM ou ~0,6 mg/mL). Em condições fisiológicas, a insulina é normalmente mantida a concentração inferior a 10⁻³ mM, para assegurar sua circulação, e exerce sua atividade biológica como molécula monomérica. Para concentrações supe-

riores a 0,1 mM, a insulina dimeriza. Em soluções neutras ou ligeiramente ácidas (pH 4-8), na presença de íons zinco e para concentrações superiores a 10 mM, ocorre a associação de 3 dímeros para formar um hexâmero de forma esférica ligeiramente achatada e com diâmetro hidrodinâmico de ~5,6 nm, em comparação com o diâmetro de ~2,6 nm do monômero (Figura 1). Para concentrações superiores a 2 mM, o hexâmero forma-se em pH neutro mesmo na ausência íons de zinco (Chien, 1996).

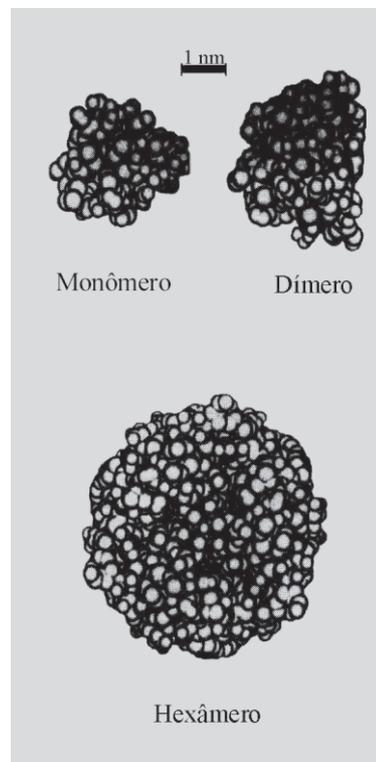


FIGURA 1 - Tamanhos relativos do monômero, dímero e hexâmero da insulina humana (Adaptado de Chien, 1996)

OBSTÁCULOS À ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA

Degradação enzimática pré-sistêmica

A tripsina e a α -quimotripsina, as principais enzimas proteolíticas secretadas pelo pâncreas para o lúme intestinal, clivam a molécula da insulina em 2 e 7 locais, respectivamente. Após 40 minutos de incubação, na presença de α -quimotripsina, cerca de 92% da insulina foram degradadas, enquanto que apenas 7,5% da insulina são degradadas após 3 horas de incubação com a tripsina. As primeiras 5 hidrólises catalisadas pela α -quimotripsina ocorrem muito rapidamente e em ligações expostas na superfície da molécula, logo suscetíveis ao ataque enzimático.

Se apenas uma ou duas ligações estivessem expostas à degradação inicial, seria possível conceber um análogo da insulina com boa atividade biológica e resistente à α -quimotripsina, mas com a necessidade de alterar 5 ligações é pouco provável conseguir modificar quimicamente a insulina para aumentar a estabilidade, sem perder a atividade biológica (Schilling, Mitra, 1991).

As carboxipeptidases A e B degradam a molécula de insulina por clivagem do resíduo do terminal carboxílico B₃₀ (Ala). Após 3 horas de incubação em concentrações fisiológicas destas enzimas, cerca de 50% da insulina inicial sofrem degradação. O resíduo C-terminal da cadeia A permanece estável ao ataque enzimático pelas exopeptidases estáveis. A incubação da cadeia B da insulina, pelo mesmo período de tempo, na presença das exopeptidases A e B, conduz a uma hidrólise da Ala-B₃₀ em cerca de 86%, o que significa que, na molécula nativa, este terminal da cadeia B deve estar estericamente protegido da degradação. Como o resíduo B₃₀ é um resíduo variável entre as diferentes espécies, não deve influenciar a atividade farmacológica, pelo que se conclui que a proteção contra as endopeptidases é mais importante do que contra as exopeptidases na administração oral de insulina (Marschutz, Caliceti, Bernkop-Schnurch, 2000).

No que respeita ao metabolismo da insulina pelas enzimas das microvilosidades intestinais, foram vários os estudos realizados. Após a exposição da insulina aos tecidos mucosos ou serosos de diferentes zonas do intestino (duodeno, jejuno ou íleo), o metabolismo foi mínimo ou nulo, já que não se registou degradação significativa (Schilling, Mitra, 1990), enquanto que em outro estudo a insulina foi degradada pelas microvilosidades, embora em menor extensão do que no citosol (Bai, Chang, 1996).

Nos enterócitos existe uma enzima citosólica específica designada por enzima de degradação da insulina (*Insulin-degrading enzyme*, IDE), que é a principal responsável pela degradação de insulina nos enterócitos (Chang *et al.*, 1997). A presença da IDE foi confirmada nas células mucosas ileais e colônicas humanas (Bai *et al.*, 1996). As enzimas lisossômicas têm um papel mínimo na degradação citosólica da insulina (Bai, Chang, 1995).

Fraca permeabilidade

A insulina intata pode atravessar o intestino delgado de ratos, coelhos e humanos, mas a biodisponibilidade é muito baixa devido à proteólise e/ou à função de barreira da membrana epitelial. A insulina é uma molécula hidrofílica, logo com um baixo coeficiente de participação em a pH 7,4. A difusão passiva não facilitada da insulina é baixa (<0,2%), com diferenças significativas ao longo do

intestino. Estudos *in vitro* revelaram que a absorção de insulina pelo duodeno é reduzida ou nula, enquanto que no jejuno e íleo os valores obtidos foram significativamente superiores aos do duodeno (Schilling, Mitra, 1990). Resultados idênticos foram obtidos por outros autores (Figura 2) (Uchiyama *et al.*, 1999). Não existe evidência de um processo de transporte ativo para a insulina (Schilling, Mitra, 1990). Perante estes fatos, denota-se que a liberação de insulina nos últimos 2/3 do intestino delgado poderá aumentar a biodisponibilidade.

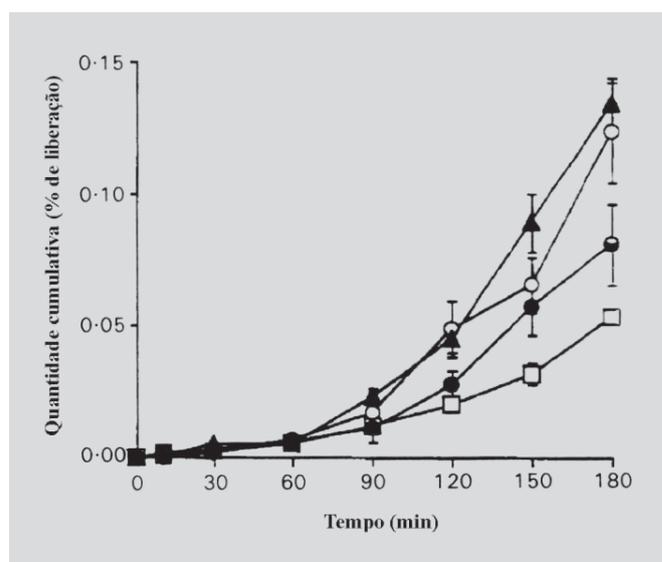


FIGURA 2 - Transporte de insulina através das várias membranas intestinais (duodeno ●, jejuno ▲, íleo ○ e cólon □). Cada valor representa a média \pm SE de, pelo menos, 3 ensaios (Adaptado de Uchiyama *et al.*, 1999)

Numa abordagem teórica efetuada por Sinko e colaboradores (1993), procurou-se calcular o limite superior para a absorção oral de insulina, assumindo que esta era estável no trato gastrointestinal (GI). A extensão máxima de absorção obtida para o duodeno foi de 1,6% e para o íleo de 13%. Se a degradação pelas enzimas α -quimotripsina e tripsina fosse considerada, a extensão da absorção seria inferior ou igual a 1,2%. Os autores concluíram que embora a degradação da insulina seja um fator limitante, a permeabilidade intestinal extremamente baixa é o obstáculo principal à administração oral de insulina (Sinko, Leesman, Amidon, 1993).

Instabilidade química e física

A difusão paracelular é geralmente reconhecida como a principal via de absorção para a insulina não

parenteral. O problema da baixa biodisponibilidade pode ser, em parte, a agregação da molécula. Os hexâmeros têm a forma de um disco achatado com cerca de 50 Å de comprimento e 35 Å de espessura e os poros da monocamada epitelial do intestino delgado têm um raio de apenas 7-15 Å. A dissociação da insulina hexamérica reduz as suas dimensões moleculares para 12-14 Å, tornando-a mais facilmente difundível através das junções paracelulares da mucosa intestinal (Shao *et al.*, 1993).

ADMINISTRAÇÃO ORAL DE UMA SOLUÇÃO DE INSULINA

Com o objetivo de administrar uma dose elevada e contínua de insulina, substituiu-se a água, fornecida a ratos normais e diabéticos, por uma solução de insulina. Os níveis de glicemia diminuíram temporariamente, mas os ratos tornaram-se hiperfágicos e perderam peso porque a insulina inibiu a motilidade GI e a digestão e absorção dos alimentos. As concentrações elevadas de insulina atuam diretamente no intestino para diminuir o fluxo sanguíneo do intestino para o fígado, diminuir a motilidade GI e diminuir a absorção de glicose, o que conduz a limitação do fluxo de glicose para o sangue e diminuição da glicemia (Saffran *et al.*, 1997).

Existe um eixo gastro-enteropancreático, pelo qual a ingestão de alimentos provoca não só a secreção de enzimas pancreáticas extrínsecas, mas também de insulina (Saffran *et al.*, 1997). Verificou-se, em ratos, que as células do estômago e do cólon, mas não do intestino delgado, podem sintetizar e armazenar insulina, possuindo receptores de insulina na superfície (Budd, Pansky, Saffran, 1993). Assim, a introdução de insulina no trato GI pode afetar o sistema de controle fisiológico, no qual a insulina GI e os receptores de insulina têm um papel importante. O sistema de insulina enteral poderá estar ausente apenas no intestino delgado, logo será este o melhor local para liberar insulina, se bem que é o mais ativo na destruição digestiva desta molécula (Saffran *et al.*, 1997).

ESTRATÉGIAS PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE INSULINA

Inibidores das proteases

O FK-448 e a quimostatina, inibidores da α -quimotripsina, inibem a degradação da insulina pelas enzimas pancreáticas e promovem a sua absorção intestinal em ratos e cães. A quimostatina é um potente inibidor da quimotripsina, mas tem o inconveniente de ser insolúvel em água. O FK-448 é vantajoso pela sua baixa toxicidade

e estabilidade em combinação com a insulina (Fujii *et al.*, 1985).

A aprotinina, um inibidor da tripsina e α -quimotripsina, aumenta significativamente o efeito hipoglicêmico da insulina por via oral (Morishita *et al.*, 1993a). Em ensaios *in situ*, o efeito mostrou-se dependente do local de administração no trato GI, tendo-se registado maior efeito hipoglicêmico ao nível do íleo. No cólon, a insulina não alterou os níveis de glicose sérica, na presença de aprotinina ou após um tratamento de lavagem da porção do intestino com tampão fosfato salino (Morishita *et al.*, 1993b). Estudo semelhante foi realizado por Yamamoto e colaboradores (1994). Estes autores estudaram 5 inibidores da protease: inibidor tripsínico de soja, glicocolato de sódio, aprotinina, bacitracina e mesilato de camostato. No nível do cólon foi observado efeito hipoglicêmico significativo com o glicocolato de sódio, o mesilato de camostato e a bacitracina, tendo o efeito hipoglicêmico diminuído após a administração, no intestino delgado, destes inibidores com a insulina. As diferenças observadas, relativamente ao trabalho de Morishita e colaboradores (1993b), foram explicadas pelo fato de, neste, a superfície luminal do intestino delgado ter sido lavada com uma solução salina, o que eliminou as enzimas luminiais e pode ter sido condição suficiente para aumentar significativamente a resposta hipoglicêmica no intestino delgado (Yamamoto *et al.*, 1994).

Promotores da absorção

Alguns promotores da absorção, embora eficazes, apresentam toxicidade elevada, conducente à sua rejeição, como por exemplo o SDS (Shao *et al.*, 1993), o EDTA e o desoxicolato de sódio (Uchiyama *et al.*, 1999). O glicocolato de sódio, o caprato de sódio e o *n*-lauril- β -D-maltopiranosídeo são considerados promotores úteis porque, aliada à sua elevada ação promotora de absorção, apresentam baixa toxicidade (Uchiyama *et al.*, 1999).

São vários os mecanismos pelos quais os promotores da absorção atuam (Zhou, 1994). A capacidade de dissociação do hexâmero de insulina mostrou-se diretamente correlacionada com a promoção da absorção (Shao *et al.*, 1993). O glicocolato de sódio exibiu essa capacidade (Shao *et al.*, 1993), mas o mesmo não ocorreu com o *n*-lauril- β -D-maltopiranosídeo (Uchiyama *et al.*, 1999). O salicilato de sódio, em concentrações crescentes, também aumenta consideravelmente a solubilidade da insulina, por interferência com o comportamento de auto-associação exibido pelo hormônio (Touitou *et al.*, 1987).

No que diz respeito à eficácia dos promotores da absorção nas diferentes regiões do intestino, observa-se,

de um modo geral, aumento da ação promotora em direção às regiões distais (Figura 3), como no cólon (Morishita *et al.*, 1993b; Uchiyama *et al.*, 1999). O glicocolato de sódio, em particular, apenas aumenta o efeito hipoglicêmico da insulina no cólon, o que pode ser justificado por maior resistência do intestino delgado aos sais biliares, já que no estado fisiológico está exposto a concentrações elevadas destes compostos (Morishita *et al.*, 1993b).

A complexação física da insulina com o dodecil-maltosídeo (DDM) permitiu elevada estabilização da proteína, em relação às suas propriedades de agregação, especialmente na proporção de 1:4. Os ensaios *in vitro* demonstraram que a complexação da insulina com o DDM permite a proteção enzimática da insulina contra a pepsina e a α -quimotripsina. Também foi avaliada a mucocompatibilidade da insulina. Os problemas de compatibilidade com o muco intestinal da insulina (pobre distribuição na camada de muco) foram ultrapassados pela estabilização com DDM. A administração intraduodenal de 50 UI/kg de insulina com 6,4 e 12,8% de DDM, a ratos normais, permitiu obter uma diminuição significativa nos níveis de glicemia. Nos ratos diabéticos, a administração intraduodenal de insulina (50 UI/kg) estabilizada com 6,4% de DDM causou um pico de insulina de ~ 125 mU/mL, que aumentou para ~ 240 mU/mL por administração de uma dose superior (150 UI/kg). A insulina não estabilizada não exerceu qualquer efeito (Hovgaard, Mack, Kim, 1992).

A dimetil- β -ciclodextrina (DM β CD) a 10% aumenta significativamente a absorção da insulina (20 UI/kg) no segmento jejuno distal/íleo proximal do rato, conduzindo à biodisponibilidade de 5,63%, à eficácia farmacodinâmica relativa de 1,75% e à diminuição da glicemia de 82%, em comparação com os valores de 0,06%, 0,24% e

17% obtidos para uma solução de insulina (20 UI/kg). A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) a 10% não aumentou a absorção da insulina significativamente, em relação ao controle (Figura 4). A dissociação parcial dos oligômeros de insulina, por complexação molecular das cadeias laterais hidrofóbicas dos a.a., parece ser o principal mecanismo pelo qual a DM β CD atuou. A toxicidade da DM β CD e da HP β CD para a mucosa intestinal é baixa (Shao *et al.*, 1994).

A formação de micelas mistas de ácidos graxos e sais biliares permite evitar os danos causados na mucosa que a mesma concentração de sais biliares produziria. A permeabilidade da insulina, quando administrada através de soluções micelares mistas de glicocolato de sódio e ácido linoléico, aumentou significativamente, através do duodeno e jejuno médio e distal, o mesmo não se tendo verificado no íleo (Schilling, Mitra, 1990). Possivelmente, a promoção da absorção oral ocorre por via transcelular. A administração de 10 UI/kg de insulina com 30 mM de glicocolato sódico e 40 mM de ácido linoléico aumentou significativamente a absorção enteral da insulina de um cão, após a administração endoscópica no jejuno médio, obtendo-se biodisponibilidade absoluta de 1,8% (Scott Moncrieff, Shao, Mitra, 1994). Ao administrar a mesma fórmula na região ileocolônica, a biodisponibilidade absoluta da insulina absorvida foi de 0,6%. O mecanismo subjacente à ação das micelas mistas é complexo, envolvendo a redução da integridade da membrana e facilitação do transporte transcelular e o aumento da difusão das junções paracelulares, por aumento dos poros da membrana intestinal e dissociação oligomérica da insulina.

Em alternativa ao ácido linoléico, o ácido palmítico, um ácido graxo saturado com o mesmo comprimento de

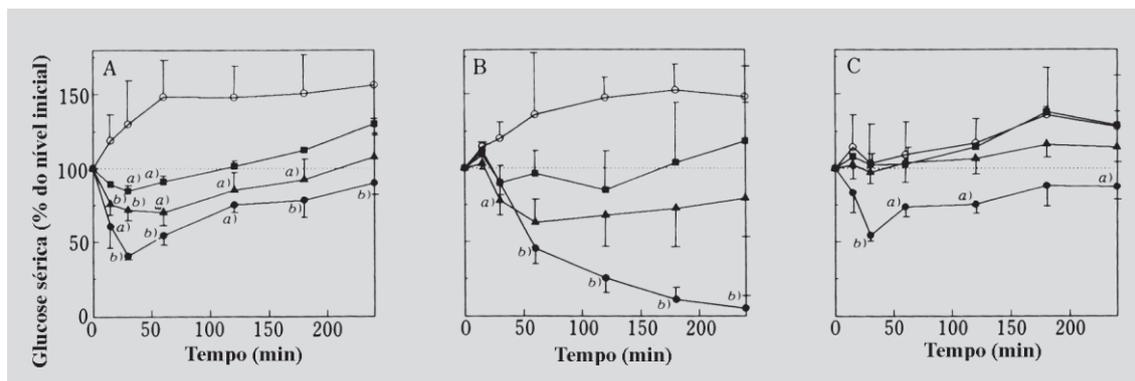


FIGURA 3 - Efeito de promotores da absorção após a administração intra-duodenal (○), intra-jejunal (■), intra-ileal (▲) e intra-colônica (●) da insulina (50 UI/kg). A – 1,0% de caprato de sódio; B – 1,0% de Na₂EDTA; C – 1,0% de glicocolato de sódio. Comparações calculadas a cada período para insulina vs. insulina com adjuvante: a) $p < 0,05$; b) $p < 0,01$ (Adaptado de Morishita *et al.*, 1993b).

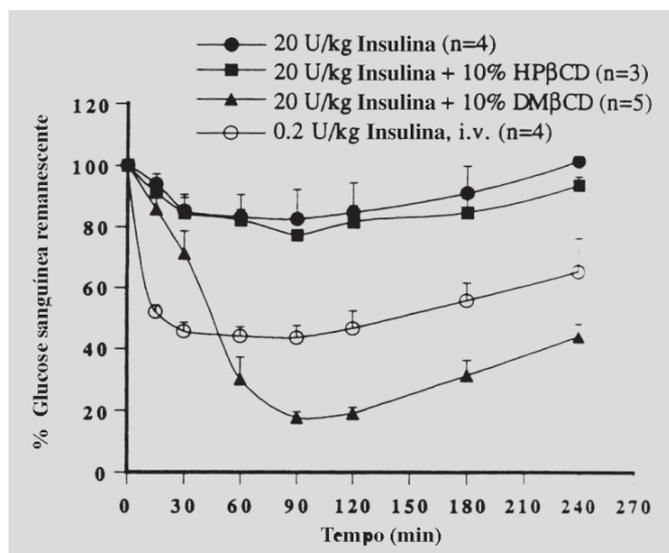


FIGURA 4 - Resposta farmacodinâmica após administração enteral de 20 UI/kg de insulina-zinco suína em tampão fosfato salino a 0,01 M, na ausência e presença de derivados da β -ciclodextrina a 10%. Os valores representam média \pm SE (Adaptado de Shao *et al.*, 1994).

cadeia, foi incorporado num sistema micelar com o glicocolato sódico. O efeito promotor de absorção foi superior ao obtido com o ácido linoléico, justificado pelo menor contato com a mucosa intestinal ou à formação de uma parede micelar menos rígida, logo menos suscetível de desordenar a membrana epitelial, por parte do ácido graxo insaturado (Mesiha, Plakogiannis, Vejsoth, 1994).

A bactéria *Vibrio cholera* produz uma proteína, a toxina da *zonula occludens* (ZOT), que atua especificamente nos filamentos de actina para aumentar a permeabilidade das junções paracelulares ao nível do jejuno e íleo mas não no cólon (Fasano, Uzzau, 1997). Este tipo de atuação seria preferível à ação não específica de ácidos graxos e sais biliares, capazes de alterar as propriedades físicas das membranas celulares do epitélio (Hochman, Artursson, 1994). A absorção *in vivo* da insulina aumentou, num fator de 10, quando administrada conjuntamente com a ZOT, no íleo e jejuno de coelho, não se tendo observado alterações significativas no cólon. A biodisponibilidade oral da insulina co-administrada com ZOT, a ratos diabéticos, foi suficiente para baixar a glicemia para níveis comparáveis aos obtidos após a injeção parenteral. Mais especificamente, a administração de 10 UI de insulina com 5 μ g de ZOT diminuiu significativamente a glicemia em relação à insulina oral (10 UI), com um efeito máximo aos 100 minutos. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos após a administração s.c. de 1,2-2,4 UI de insulina, o que resulta em biodisponi-

bilidade relativa de 8-16% para a fórmula oral (Fasano, Uzzau, 1997).

Modificação química

A modificação química da insulina com ácido palmítico (Palins) para obter 2 derivados, o B₁-mono-palmitoil (Palins-1) e o B₁,B₂₉-dipalmitoil (Palins-2), aumentou a lipofilia da molécula e diminuiu a sua degradação num homogenato de tecido mucoso do intestino grosso. O ácido palmítico resultante da degradação da Palins pode contribuir para promover a absorção da insulina (Hashizume *et al.*, 1992). A eficácia de derivados da insulina foi avaliada em função do comprimento da cadeia e do número de ácidos graxos ligados à molécula. A proteólise das insulinas monoaciladas na posição Phe-B₁ foi reduzida por aumento do número de carbonos do ácido graxo (ácido cáprico > ácido láurico > ácido palmítico), porém as insulinas diaciladas em Phe-B₁ e Lys-B₂₉ mostraram-se mais suscetíveis à hidrólise do que a insulina nativa, possivelmente devido à inibição da associação da molécula por impedimentos estéricos (Asada *et al.*, 1994).

A absorção da insulina acilada com o ácido capróico através do intestino delgado foi reduzida (biodisponibilidade inferior a 0,16%), mas no intestino grosso, onde a permeabilidade da insulina é menor, aumentou até 1,06%. O aumento da lipofilia ou a inibição da associação das moléculas de insulina pode estar subjacente ao efeito observado. A modificação química da insulina é preferível em relação aos inibidores das proteases e promotores da absorção, já que as caproil-insulinas não danificam as membranas mucosas, nem causam irritação local (Asada *et al.*, 1995).

A insulina pode ser modificada por reação com sacarídeos, na posição B₁ como o *p*-succinilamidofenil- α -D-glicopiranosídeo (SAPG). A insulina monossubstituída mostrou efeito hipoglicêmico superior ao da insulina nativa após administração intra-intestinal em ratos. A adsorção específica ao transportador da D-glicose dependente de sódio, presente nas microvilosidades intestinais, pode estar envolvida na ação hipoglicêmica. É possível que a interação da insulina modificada com o transportador promova a ligação às microvilosidades intestinais e a internalização do fármaco (Hashimoto *et al.*, 2000).

Fórmulas farmacêuticas

Sistemas de partículas poliméricas

A primeira abordagem à microencapsulação de insulina para administração oral foi feita, em 1982, por Oppenheim e colaboradores, que prepararam nanopartí-

culas de insulina. As partículas com 200 nm foram preparadas a partir de uma solução neutra de insulina, por dessolvatação do peptídeo seguida de reticulação com glutaraldeído. As nanosferas sólidas, quando da administração oral a ratos, permitiram redução de 15 a 20% do valor inicial de glicemia. O efeito pareceu lento, mas mais pronunciado do que o de uma fórmula s.c. de curta duração de ação (4-8 horas). As elevadas doses de nanopartículas necessárias inviabilizavam a comercialização do sistema, uma vez que as partículas não protegiam a insulina da atividade proteolítica e a reticulação alterava a atividade do peptídeo (Oppenheim *et al.*, 1982).

Em 1988, Damgé e colaboradores prepararam nanocápsulas de poli(isobutilcianoacrilato) (PIBCA), um polímero biocompatível e biodegradável, para administração oral da insulina. As partículas apresentaram tamanho médio de 250-300 nm e a taxa de associação da insulina às nanocápsulas variou de 55 a 98%. A administração intragástrica da fórmula, a ratos diabéticos, diminuiu a glicemia em jejum em 50-60%. O efeito surgiu 2 dias após a administração e prolongou-se por 20 dias. A insulina não encapsulada não afetou a glicemia, quando administrada nas mesmas condições. A redução da glicemia foi a mesma, independentemente da dose administrada (12,5-50 UI/kg), mas a duração do efeito foi dependente da dose (Figura 5) (Damgé *et al.*, 1990). A insulina não é modificada pelo processo de encapsulação, como mais tarde se verificou por Aboubakar e colaboradores (1999), pelo que o efeito biológico não se deve a interações químicas, ou até mesmo físicas, entre o polímero e a insulina. É provável que as nanocápsulas garantam a proteção do peptídeo contra a degradação pelas enzimas do trato GI. A insulina localiza-se, quimicamente intacta, no núcleo oleoso das nanocápsulas, assegurando a atividade biológica e também elevada eficiência de encapsulação (Aboubakar *et al.*, 1999). A influência do local de administração, na absorção GI das nanocápsulas em ratos diabéticos, foi estudada pelo mesmo grupo de trabalho (Michel *et al.*, 1991), tendo-se obtido, após administração de 100 UI/kg de insulina encapsulada, um efeito hipoglicêmico na ordem crescente, íleo, jejuno, duodeno e cólon.

Os resultados obtidos por Damgé e colaboradores foram diferentes dos de Lowe e Temple (1990). Estes autores estudaram não só o efeito hipoglicêmico provocado pelas nanopartículas de PIBCA preparadas por um método idêntico, mas também a extensão da absorção da insulina. Não se observou aumento significativo na absorção da insulina, apenas liberação prolongada devido ao aumento da resistência à degradação enzimática pelas nanocápsulas. A insulina apresenta efeitos locais no tecido intestinal, podendo diminuir a glicemia, não por ação

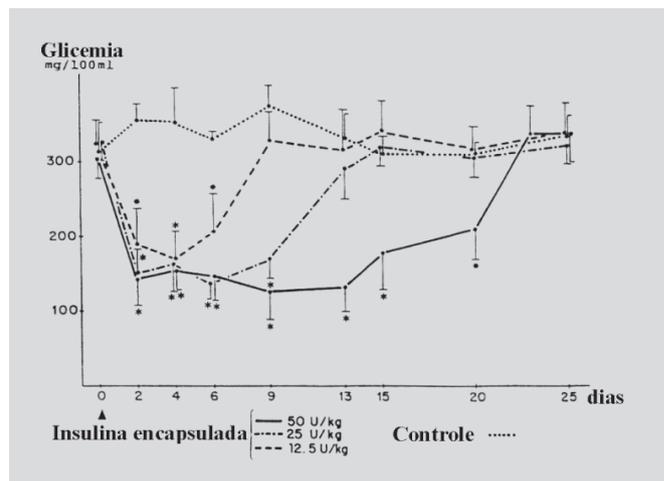


FIGURA 5 - Efeito de uma única administração intragástrica de nanocápsulas de insulina na glicemia de ratos diabéticos, após jejum noturno. Os resultados são a média \pm SEM para 7 ou 8 animais; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ (Adaptado de Damgé *et al.*, 1990).

sistêmica, mas por atuação direta nas células intestinais (Lowe, Temple, 1994).

Mais recentemente, a incorporação de insulina em nanosferas de PIBCA permitiu obter eficiência de encapsulação de 65-75% (Radwan, 2001). Nos ensaios *in vivo*, a administração oral desta fórmula (75 UI/kg) conduziu a redução lenta da glicemia. A redução máxima foi detetada em 15 horas, tendo os valores normalizados ao fim de 24 horas. A disponibilidade farmacológica, em relação à administração oral de uma solução de insulina, aumentou em $25,2 \pm 1,2\%$.

Em 1992, foi investigada por Morishita e colaboradores uma nova fórmula de insulina, na qual era utilizado, como veículo, o Eudragit® L100 (Eudragit L), um polímero solúvel em pH superior a 6. A eficiência de incorporação da insulina foi de aproximadamente 80% para um rendimento de encapsulação de 2% (m/m). Após incubação com uma solução ácida, durante 1 hora, mais de 90% da insulina incorporada era mantida na fórmula e, em fluido intestinal artificial em pH 6,8, a liberação ocorria rapidamente em 30-60 minutos. Os ensaios de degradação enzimática mostraram que as microsferas protegem a insulina da pepsina, mas, após a incubação em tripsina e a quimotripsina, a degradação foi completa (Morishita *et al.*, 1992b). O perfil de glicemia após a administração oral das microsferas (20 UI/kg), em ratos normais, foi idêntico ao obtido com as microsferas de controle não contendo a insulina. Em ratos diabéticos, os níveis de glicemia médios foram ligeiramente inferiores aos do controle. A

biodisponibilidade relativa da fórmula oral comparativamente à administração intravenosa (i.v.) foi de $0,9 \pm 0,3\%$, em ratos normais, e de $1,1 \pm 0,2\%$, em ratos diabéticos (Morishita *et al.*, 1992a). Os resultados de eficiência de encapsulação, efeito hipoglicêmico (Figura 6) e eficácia relativa para o Eudragit L foram superiores, em relação ao Eudragit® S100 (Eudragit S), solúvel acima de pH 7 e à mistura 1:1 dos 2 polímeros (Eudragit LS). As microsferas de Eudragit L transportam a insulina para o local ideal para a sua absorção (jejuno e íleo), em maiores concentrações do que as microsferas de Eudragit S ou LS (Morishita *et al.*, 1993a).

Utilizando uma técnica de extração de solvente para preparação de micropartículas de Eudragit L100, obteve-se eficiência de encapsulação de insulina de $95 \pm 2\%$. A fórmula é estável em pH ácido, porém, na ausência de inibidores enzimáticos, não se mostrou capaz de proteger a insulina da degradação em meio intestinal artificial (Agarwal, Reddy, Khan, 2001).

Kimura e colaboradores (1996) administraram, em ratos diabéticos, microsferas de álcool polivinílico (PVA) contendo insulina. A fórmula aumentou o tempo de residência da insulina no íleo, mas não se observou qualquer efeito hipoglicêmico. (Kimura *et al.*, 1996).

A administração oral de insulina em micropartículas de alginato-quitosana, obtidas por extrusão/gelificação ionotrópica, foi realizada por Ramdas e colaboradores. A eficiência de encapsulação da insulina foi de 11% para um rendimento de encapsulação de 2% (m/v). O alginato retrai-se em pH ácido, impedindo a liberação do conteúdo das micropartículas no meio gástrico. Em fluido intestinal

artificial, obteve-se liberação prolongada da insulina. As microcápsulas (4 UI) foram administradas em ratos diabéticos, tendo-se verificado diminuição da glicemia 3 horas após a administração. A glicemia normalizou ao fim de 6 horas e atingiu novamente valores diabéticos ao fim de 10 horas. O aumento da absorção de fármaco pode ser devido às propriedades bioadesivas do alginato e da quitosana, que prolongam o trânsito intestinal da fórmula e promovem o contato íntimo com a mucosa (Ramdas *et al.*, 2000).

A insulina foi microencapsulada em sistemas biodegradáveis obtidos por mistura de diferentes polímeros. Partículas de polianidrido fumárico e ácido poli(láctico-co-glicólico), P(FA:PLGA), foram preparadas pelo método de inversão de fases. Em pH 7,4 e a 37 °C as nanosferas com P(FA:PLGA) numa proporção de 50:50 liberaram 40% da insulina ao fim de 30 minutos, mostrando-se inadequadas para a liberação controlada por via oral. Num teste de tolerância à administração subcutânea de 800 mg/kg de glicose, realizado com ratos, a administração de 20 UI de insulina, impediu que os níveis de glicose aumentassem acima dos níveis de jejum e os valores de glicemia foram sempre inferiores aos de uma solução de insulina. Estes resultados sugeriram que a insulina era absorvida através da barreira intestinal e que era liberada da fórmula na forma biologicamente ativa (Mathiowitz *et al.*, 1997). Posteriormente, a insulina-zinco a 1,6% foi encapsulada em nanosferas constituídas por PLGA e oligômeros de ácido fumárico (FAO), FAO:PLGA, na proporção de 1:2, também obtidas por inversão de fases. Esta fórmula, na presença ou ausência de óxido de ferro (Fe_3O_4), mostrou ser eficaz, após administração oral, na

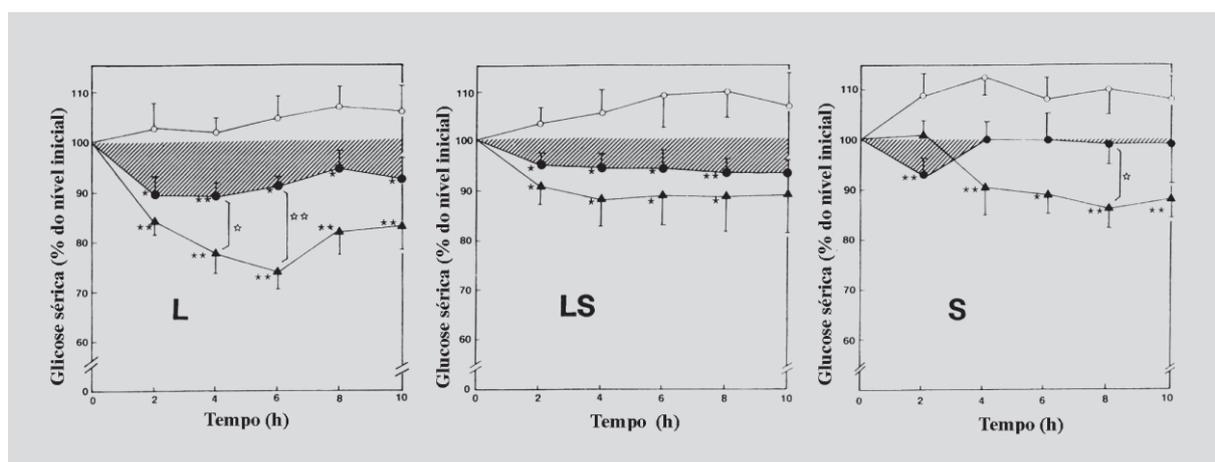


FIGURA 6 - Efeito hipoglicêmico das microsferas L, LS e S de insulina administradas a ratos: (○) controle (sem insulina); (●) com insulina; (▲) com insulina e AP. Cada ponto representa a média \pm SE. Comparações calculadas em cada período contra os controles: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Comparações calculadas em cada período para as microsferas de insulina vs. microsferas de insulina contendo AP: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Adaptado de Morishita *et al.*, 1993a).

redução da glicemia. O Fe_3O_4 foi utilizado para facilitar os estudos de microscopia eletrônica de varredura. Na presença de Fe_3O_4 , que possivelmente aumenta as propriedades bioadesivas das partículas, a eficácia oral da fórmula, comparativamente à administração intraperitoneal de insulina-zinco, foi de 11,4%, utilizando o rato como modelo animal. Para a eficácia oral contribuem várias propriedades da preparação, como o tamanho, cinética de liberação, bioadesividade e capacidade de atravessar o epitélio GI (Carino, Jacob, Mathiowitz, 2000).

A insulina foi microencapsulada por reticulação interfacial da quitosana pelo palmitato de ascorbila. A eficiência de encapsulação aproximou-se dos 100%. A cinética de liberação em tampão fosfato a 37 °C foi de ordem zero e a velocidade de liberação pode ser aumentada por diminuição da concentração em quitosana, na solução preparativa. Esta fórmula mostra-se promissora na produção de sistemas biodegradáveis de liberação controlada de insulina (Aiedeh *et al.*, 1997).

Lowman e colaboradores (1999) desenvolveram um hidrogel sensível ao pH, um co-polímero de ácido metacrílico e etilenoglicol, P(MAA- γ -EG), que utilizaram na preparação de microsferas de insulina, por polimerização, obtendo eficiência de encapsulação de 94±9%. Utilizando o rato como modelo animal, verificou-se que, 2 horas após a administração oral, surgia forte efeito hipoglicêmico, que se mantinha por 8 horas. A eficácia deste sistema foi superior à das microsferas de Eudragit L, anteriormente referidas (Morishita *et al.*, 1992a), e comparável à adição de outros aditivos, como inibidores da protease ou promotores da absorção, devendo-se ao comportamento de intumescimento sensível ao pH, demonstrado pelo gel, e à adição de polietilenoglicol (PEG) ao gel. Em ratos diabéticos, a diminuição dos níveis de glicose foi mais acentuada, 40% em 8 horas. A biodisponibilidade máxima foi de 4,22% em comparação com uma injeção i.v. (Lowman *et al.*, 1999).

Um sistema de liberação que utiliza polímeros sensíveis a pH/temperatura produzido a partir de *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm), butilmetacrilato (BMA) e ácido acrílico (AA) foi concebido por Ramkissoon-Ganorkar e colaboradores (1999). A insulina foi encapsulada em microsferas de poli(NIPAAm-co-BMA-co-AA). Em pH ácido e a 37 °C, as microsferas são insolúveis. Em pH 7,4, os polímeros hidrofílicos de baixo MM apresentam perfil de liberação rápida desagregando-se num período de duas horas, enquanto que os polímeros hidrofílicos de elevada MM apenas intumescem, liberando a insulina lentamente durante 8 horas. Os autores concluíram que este é um sistema potencial para a liberação em diferentes regiões do trato GI em função do tipo de

polímero utilizado: duodeno, intestino delgado e intestino grosso para os polímeros de baixo, intermediário e elevada MM, respectivamente.

Mais recentemente, a insulina foi encapsulada em microcápsulas de ácido polilático (PLA) preparadas por emulsão múltipla/extração de solvente (Ma *et al.*, 2000). As partículas de granulometria 2-5 μm apresentaram eficiência de encapsulação elevada (93%), tendo sido selecionadas para os ensaios *in vitro* e *in vivo*. A liberação da insulina, em pH 7,4 e a 37 °C, iniciou-se ao fim de 30 minutos, teve um pico entre 6-10 horas e durou 24 horas. A insulina nesta fórmula mantém sua bioatividade e por administração oral (2,5 mg) reduz a glicemia de ratos diabéticos em 57±21%, 1-3 horas após a administração. A fórmula protege a insulina da degradação proteolítica intestinal, para que esta difunda das partículas e atravesse a mucosa intestinal para a corrente sanguínea. A elevada variabilidade no efeito hipoglicêmico pode ser devida a diferenças na absorção da insulina pelo trato GI (Ma *et al.*, 2000).

Lipossomas

Patel e Ryman sugeriram a utilização de lipossomas para a administração oral de insulina após terem observado redução significativa da glicemia em cães diabéticos (Patel, Ryman, 1976).

A instabilidade dos lipossomas no trato GI conduziu ao desenvolvimento de fórmulas com maior eficácia e de maior estabilidade perante os ácidos e sais biliares. Uma das estratégias consistiu no desenvolvimento de lipossomas revestidos com polímeros mucoadesivos (Takeuchi *et al.*, 1996): quitosana, álcool polivinílico com cadeia alquílica longa (PVA-R) e ácido poliacrílico com um grupo colesteril (PAA-chol). Os lipossomas revestidos com quitosana apresentaram maior adesividade, dependendo esta da quantidade de quitosana na superfície. A sua administração intragástrica, em ratos normais (24 UI/rato), reduziu acentuadamente a glicemia basal, 30 minutos após a administração, em comparação com a redução mínima alcançada com os lipossomas não revestidos. O efeito hipoglicêmico manteve-se por 12 horas (Figura 7). A biodisponibilidade relativa desta preparação, em relação à injeção subcutânea de 5 UI e 1 UI de insulina, foi de 10% e 5%, respectivamente.

Após o revestimento de lipossomas com um derivado do PEG (PEG-Lip) ou uma cadeia sacarídica da mucina (Mucin-Lip) (Iwanaga *et al.*, 1997), verificou-se um aumento da resistência dos lipossomas à digestão no trato GI, o que se traduziu numa diminuição da glicemia, não registada com os lipossomas neutros ((N)-Lip), usados como controle dos lipossomas revestidos com PEG. Os

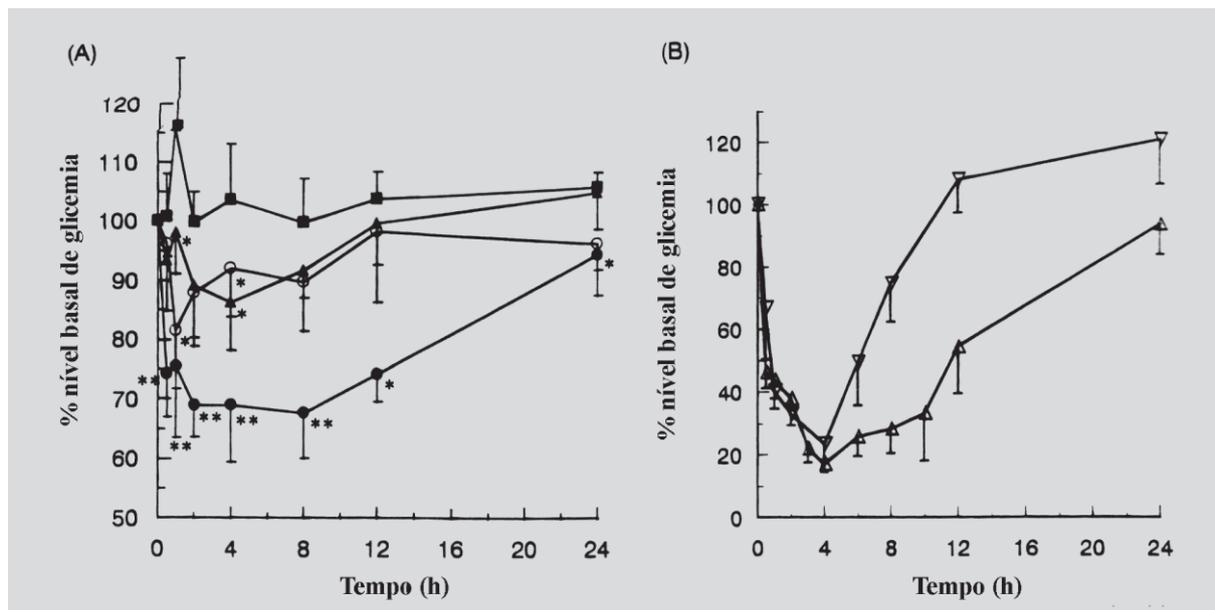


FIGURA 7 - Alteração no nível de glicemia basal (%) após (A) a administração oral de (▲) solução de insulina (24 UI/rato), da insulina encapsulada em lipossomas (24 UI/rato) (○) não revestidos e (●) revestidos com quitosana ou do (■) controle e (B) a injeção s.c. de uma solução de insulina a (D) 5 UI/rato ou (Ñ) 1 UI/rato. Os símbolos representam a média \pm DV (n=6 para lipossomas não revestidos ou revestidos com quitosana, n=5 para controle e solução oral de insulina e n=3 para injeção s.c. de insulina). Diferença estatisticamente significativa do controle: **p<0,01, *p<0,05 (Adaptado de Takeuchi *et al.*, 1996).

lipossomas carregados positivamente ((+)-Lip), usados como controle dos lipossomas revestidos com mucina, também diminuíram significativamente a glicemia. O efeito hipoglicêmico foi superior e mais prolongado para o revestimento com PEG, devido ao aumento do tempo de trânsito intestinal e à interação com a camada de muco (Iwanaga *et al.*, 1999). Por sua vez, o revestimento com mucina causa adesão preferencial à superfície do estômago, local onde os lipossomas são retidos (Iwanaga *et al.*, 1999). Contudo, mesmo para doses elevadas de insulina, os lipossomas revestidos apresentaram efeitos hipoglicêmicos modestos, isto porque a permeabilidade da insulina não é promovida, apenas a sua estabilidade no trato GI (Iwanaga *et al.*, 1997).

A administração oral de insulina encapsulada em lipossomas compostos por dipalmitoilfosfatidilcolina e dipalmitoilfosfatidiletanol (1:1), a ratos diabéticos, causou hiperinsulinemia e diminuição da glicemia (Kisel *et al.*, 2001). Por administração da insulina em lipossomas de fosfatidilcolina e fosfatidilinositol (1:1) também se verificou hiperinsulinemia, mas o efeito não foi acompanhado de diminuição na glicemia. Os resultados foram justificados pelo fato de os lipossomas contendo dipalmitoilfosfatidiletanol se apresentarem sólidos a 37 °C e com uma superfície carregada negativamente.

Células

Al-Achi e Greenwood utilizaram diferentes formas de membranas eritrocitárias como sistemas de transporte oral para a insulina humana: fantasmas (*erythrocyte-ghosts*) e vesículas (*erythrocyte-vesicles*). A insulina humana liga-se aos primeiros por 2 mecanismos: encapsulação e adsorção à superfície (Al Achi, Greenwood, 1993a). A administração intraduodenal da insulina veiculada nos 2 tipos de estruturas diminuiu significativamente a glicemia, em ratos diabéticos, em relação aos grupos controle (Al Achi, Greenwood, 1993b). Os mesmos resultados foram obtidos após a administração oral das preparações (Al Achi, Greenwood, 1998).

Emulsões

A administração intra-ileal a ratos de emulsões w/o/w de insulina, utilizando um colóide como agente de estabilidade da fase aquosa interna, diminuiu a glicemia numa proporcionalidade inversa à granulometria. Este efeito foi devido à promoção da absorção linfática da insulina e a maior área de superfície da emulsão filtrada que facilita a atividade das lipases. Estas enzimas são responsáveis pela liberação de ácidos graxos, que, em combinação com os sais biliares, podem formar micelas mistas, as quais atuam como promotores da absorção. O efeito

hipoglicêmico foi mais significativo nas regiões mais distais do trato GI, íleo e cólon, onde as enzimas digestivas são menos abundantes e a camada de muco é menos espessa (Figura 8). A biodisponibilidade da emulsão em relação à administração i.v. foi de 1,03% e 0,75% no íleo e no cólon, respectivamente (Matsuzawa *et al.*, 1995).

As microemulsões formadas com ésteres de ácidos graxos como agentes emulsificantes e álcoois de cadeia curta, como co-tensoativos, mostraram-se adequadas como sistema de administração oral da insulina, devido à sua maior estabilidade, viscosidade e eficácia de proteção em meio ácido (Ho, Hsiao, Sheu, 1996).

Revestimentos entéricos

Touitou e Rubinstein (1986) aplicaram revestimentos entéricos à liberação oral de insulina. Foram preparadas cápsulas de gelatina contendo insulina e mistura de tensoativo iônico, em meio oleoso, e revestidas externamente com um polímero poliacrílico. As cápsulas contendo 16 UI de insulina e revestidas com Eudragit® RS1 e RS2 reduziram significativamente a glicemia, quando administradas oralmente em animais normais em jejum. Em comparação com uma injeção intraperitoneal de 4 UI de insulina, estas fórmulas apresentaram biodisponibilidade de 9,3-12,7%.

As microsferas de Eudragit® (polímero entérico), descritas anteriormente, foram também revestidas com o mesmo tipo de polímero que as constituía (Morishita *et al.*, 1992a; Morishita *et al.*, 1993a; Morishita *et al.*, 1992b). Em pH 6,0, mais de 70% da insulina foram liberadas das microsferas de Eudragit L e menos de 30% foram liberados das microsferas de Eudragit S ou LS, durante um ensaio de 180 minutos. Em pH 7,5, todas as microsferas liberaram mais de 90% da insulina, durante 60 minutos. Embora as microsferas de Eudragit L tenham liberado o seu conteúdo na região mais proximal do intestino, o seu efeito hipoglicêmico foi superior (Morishita *et al.*, 1993a).

O revestimento entérico com shellac, de *pellets*, contendo insulina, aprotinina e colato de sódio, impediu a liberação do fármaco em pH ácido (1,2) durante duas horas. Em pH 7,5, ocorreu liberação rápida e completa do fármaco. Após administração oral (250 UI/kg) não se observou absorção significativa de insulina, o que foi atribuído à elevada sensibilidade desta à degradação enzimática e à sua fraca permeabilidade intestinal (Trenkrog *et al.*, 1996).

Cápsulas contendo 4,6 UI de insulina foram revestidas com Eudragit L ou Eudragit S e após administração intragástrica em ratos diabéticos não ocorreu qualquer redução da glicemia. O revestimento protege a insu-

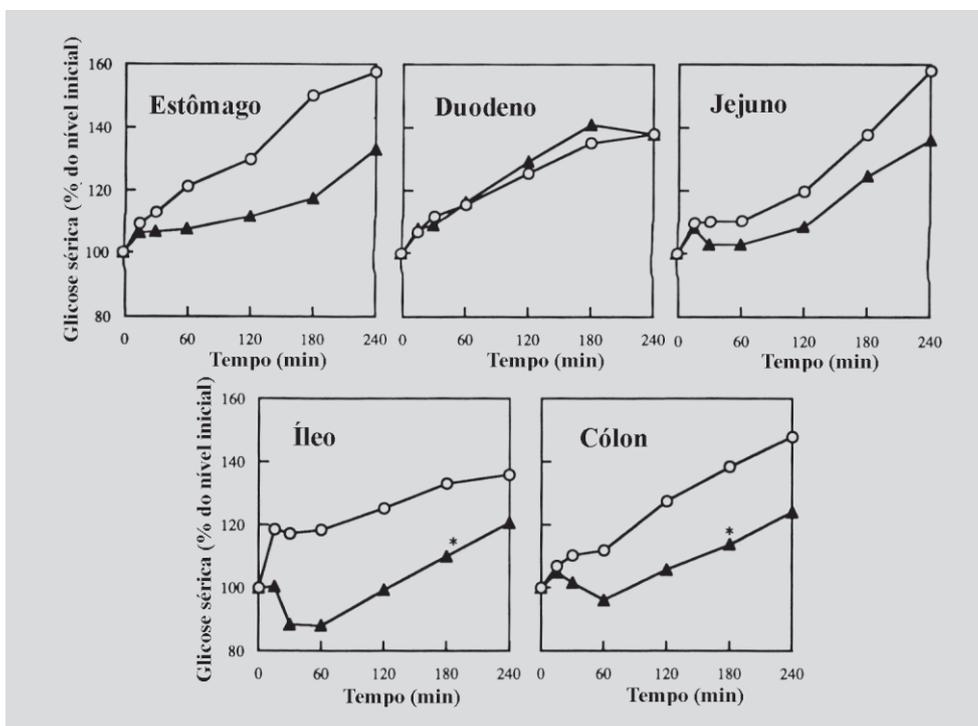


FIGURA 8 - Efeito da administração de emulsões a/o/a em vários locais do trato GI nos níveis de glicose sérica. ○, controle; ▲, emulsão filtrada preparada com 5% de gelatina. Comparações calculadas em cada ponto em relação aos controles: * $p < 0,05$ (Adaptado de Matsuzawa *et al.*, 1995).

lina em meio gástrico, mas não a protege da degradação no lúme intestinal, nas microvilosidades ou nos enterócitos (Hosny, Khan Ghilzai, Al Dhawalie, 1995)

Liberação no cólon

Saffran e colaboradores (1986) apresentaram um novo método de administração oral de cápsulas contendo insulina e revestidas com polímeros reticulados com grupos azoaromáticos. A administração desta fórmula em ratos diabéticos (1 UI de insulina) foi eficaz, embora o efeito tenha sido influenciado pelo tempo de permanência da forma farmacêutica no trato GI.

Foi utilizado por Tozaki e colaboradores (2001) um azopolímero diferente, rapidamente desintegrado pelas azorredutases do intestino grosso, para revestir *pellets* contendo insulina. A utilização de um marcador na preparação permitiu constatar pequena liberação em pH 7,4, na ausência de microrganismos, mas, na presença de conteúdo cecal de rato, a liberação aumentou acentuadamente. A administração oral de 12,5 UI de insulina causou ligeiro efeito hipoglicêmico, em relação a uma solução de insulina. A biodisponibilidade relativamente à administração i.v. de 0,1 UI/rato e a diminuição de glicemia foram de 0,89% e 4,92%, respectivamente.

Cápsulas de quitosana foram desenvolvidas no sentido de promover a liberação específica de insulina no cólon. Em fluido gástrico artificial (pH 1) e em fluido intestinal artificial (pH 7), a liberação de um marcador colocado na fórmula foi reduzida, mas a liberação foi acentuada na presença de conteúdo cecal de rato. O efeito hipoglicêmico da preparação contendo insulina (20 UI), administrada por via oral, foi reduzido e iniciou-se 8 horas após a administração das cápsulas, quando de sua chegada ao cólon. A biodisponibilidade relativamente à administração i.v. foi de 1,6% (Tozaki *et al.*, 1997).

Liberação específica no íleo

Com o objetivo de liberar a insulina especificamente no íleo, o local de máxima absorção no trato GI, utilizou-se um sistema de partículas, no qual uma substância inerte foi revestida com a insulina e mistura de polímeros entéricos (Eudragit® L30D) e de liberação controlada pelo tempo (Eudragit® RL30D e RS30D). Conseguiu-se liberação adequada de insulina, 3-5 horas após a administração, para relação de 2:3 entre o Eudragit® RL30D e o Eudragit® RS30D, numa concentração final de 10% (m/m). A liberação total de insulina ocorreu em 6 horas. A biodisponibilidade absoluta da fórmula administrada em ratos (60 UI/kg) foi inferior a 0,1 %, mesmo na presença de desoxicolato sódico e aprotinina (McPhillips *et al.*, 1997).

Transcitosse mediada pelo receptor

A conjugação da insulina com a transferrina (Tf) por uma ligação dissulfeto, numa proporção molar de 1:1, leva à formação de um conjugado In-Tf capaz de ser transportado através das células epiteliais (Shah, Shen, 1996). A ligação dissulfeto do conjugado é reduzida no fígado, o que permite a liberação da insulina para esta exercer a sua ação terapêutica. Após administração oral, em ratos diabéticos (6,7-80 UI/kg), do conjugado In-Tf, observou-se diminuição lenta, mas significativa, da glicemia. O efeito foi dependente da dose, tendo 80 UI/kg provocado redução de 70% da glicemia após 11 horas (Figura 9). É pouco provável que o conjugado possa permanecer no trato GI sem sofrer degradação ou excreção durante um período de tempo tão extenso, pelo que, provavelmente, será absorvido pelo epitélio intestinal na forma intata e acumulado no fígado ou outros tecidos utilizadores de glicose. Na verdade, o conjugado é detectado no plasma 4 horas após a sua administração (Xia, Wang, Shen, 2000).

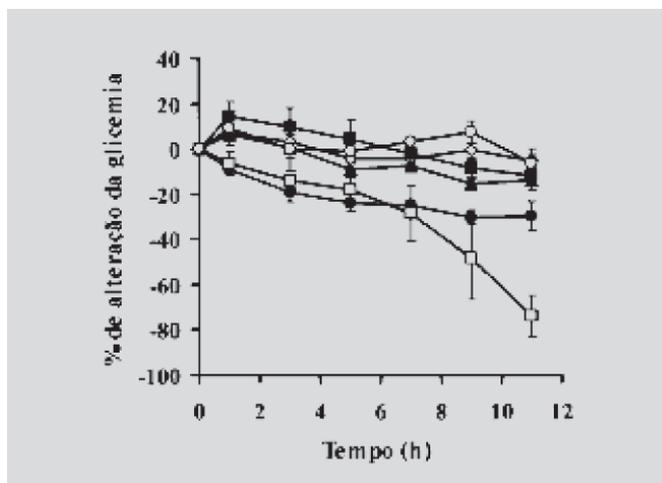


FIGURA 9 - Alterações nos níveis de glicemia em ratos diabéticos após a administração de In-Tf. Os níveis hipoglicêmicos após administração oral de In-Tf a 6,7 (■), 13,5 (▲), 27 (●) e 80 (□) UI insulina/Kg foram comparados com a insulina (80 UI/kg) (○) e tampão fosfato salino como controle (◇). Os resultados são expressos como média ± SE (n=3 ou 4, **p<0,01: teste de t para comparação da administração oral de insulina (80 UI/kg) e In-Tf (80 UI/kg)) (Adaptado de Xia, Wang, Shen, 2000).

Sistemas bioadesivos

O polímeros bioadesivos aumentam o contato com a membrana absorvente, reduzindo a degradação enzimática no percurso entre a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e a mucosa. A permanência

da forma farmacêutica no local de absorção proporciona um gradiente de concentração que favorece a absorção dos fármacos peptídicos (Bernkop-Schnurch, 1998; Lehr, 2000; Lueben *et al.*, 1994).

Os polímeros bioadesivos, embora não tenham sido utilizados como estratégia exclusiva para aumentar a biodisponibilidade oral da insulina, foram usados em combinação com lipossomas (Iwanaga *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1996), inibidores proteolíticos (Bernkop-Schnurch, Valenta, 1997; Marschutz, Caliceti, Bernkop-Schnurch, 2000), promotores da absorção (Mesiha, Sidhom, 1995) e com a microencapsulação (Aiedeh *et al.*, 1997; Carino, Jacob, Mathiowitz, 2000; Ramdas *et al.*, 2000).

Combinação de estratégias

Promotores da absorção + Inibidores proteolíticos

A co-administração de insulina suína com glicocolato de sódio, no cólon de ratos, reduziu a glicemia em 30-35%, valor 10 vezes superior ao obtido com uma solução salina de insulina. Quando se co-administra EDTA sódico, o efeito aumenta num fator de 2,8. A co-administração de glicocolato sódico e aprotinina não melhorou a eficácia do promotor administrado individualmente (Geary, Schlameus, 1993).

A combinação de um promotor da absorção com um inibidor proteolítico, permitiu aumento da biodisponibilidade oral da insulina, comparativamente ao efeito provocado pelos agentes isolados. A co-administração de insulina (12 UI) com 10 mg/mL de colato de sódio ou aprotinina, no íleo de ratos em jejum, reduziu a glicemia em aproximadamente 30%, enquanto que a co-administração simultânea dos 2 agentes permitiu uma redução de 70%. O efeito sinérgico observado é explicado por atuação simultânea nas barreiras enzimática e física à absorção intestinal de proteínas (Carino, Mathiowitz, 1999). Segundo Ziv e colaboradores, para se alcançar absorção adequada de peptídeos biologicamente ativos através da barreira mucosa intestinal, são necessárias duas condições, a presença de um promotor e a adição de inibidores das proteases (Ziv *et al.*, 1994).

Microencapsulação + Inibidores das proteases e/ou Promotores da absorção

Nos trabalhos de Morishita e colaboradores (1992b) com microsferas de Eudragit® foram incluídos, na fórmula de insulina, vários tipos de inibidores da protease. A proteção contra a degradação pela tripsina foi superior com o inibidor tripsínico (TI), do que com a quimostatina (CS), o inibidor de Bowman-Birk (BBI) ou a aprotinina (AP). No ensaio em a-quimotripsina, a CS mostrou-se mais efi-

caz. Numa segunda fase, estas fórmulas foram avaliadas quanto ao seu efeito hipoglicêmico após a administração oral em ratos normais e em ratos diabéticos. A eficácia relativa à administração i.v. foi, para os 4 inibidores, $AP \geq BBI > CS = TI$. A CS e o TI, bem como a fórmula sem inibidor proteolítico não apresentam resposta hipoglicêmica significativa (Morishita *et al.*, 1992a). Na seqüência destes resultados, a insulina foi encapsulada em microsferas de Eudragit L, S e LS, tendo-se registado que o efeito biológico foi favorecido pela incorporação de aprotinina (Figura 6). As microsferas estudadas por Morishita e colaboradores (1992b) são constituídas por um polímero entérico, que também é usado para revestir as partículas, acrescentando a combinação de um revestimento entérico, ao conjunto das estratégias utilizadas.

Num outro estudo (Agarwal, Reddy, Khan, 2001), no qual também foi utilizado o Eudragit L como polímero para a preparação de micropartículas contendo insulina, esta só se mostrou estável em meio intestinal artificial, quando em presença de inibidores enzimáticos ovomucóides.

A incorporação da aprotinina ou da bacitracina em micropartículas de PVA contendo insulina induz efeito hipoglicêmico, após administração oral a ratos diabéticos, que não se verifica na sua ausência. Os valores de biodisponibilidade absoluta da insulina com a aprotinina e bacitracina foram de $2,0 \pm 0,4\%$ e $1,8 \pm 0,8\%$, respectivamente. O aumento da biodisponibilidade oral de insulina é justificado pela liberação simultânea de insulina e do inibidor e pelo prolongamento do tempo de residência no íleo, local onde a insulina é mais absorvida (Kimura *et al.*, 1996).

A administração oral de nanosferas de PIBCA contendo insulina (75 UI/kg), a ratos diabéticos, na presença de tensoativos utilizados como promotores de absorção (0,5% de Pluronic F68 e 0,5% de colato de sódio), reduz significativamente a glicemia de 392 ± 32 mg/dL para 80 ± 13 mg/dL, em 2 horas, mantendo-se num valor inferior a 100 mg/dL por mais de 8 horas. A biodisponibilidade, relativamente à administração de uma solução oral de insulina, aumentou em 49,2%, enquanto que na ausência de tensoativos, o aumento foi de $37,6 \pm 3,7\%$ (Radwan, 2001).

Microencapsulação + Lipossomas

A microencapsulação de lipossomas contendo insulina foi realizada por Mansroi e Mansroi (1997) e por Ramdas e colaboradores (2000), com o objetivo de aumentar a estabilidade dos lipossomas no trato GI.

Numa primeira etapa a insulina foi complexada com um polímero de dietilaminoetil(DEAE)-dextrans e este complexo foi colocado em lipossomas, que, por sua vez, foram microencapsulados em acetobutirato de celulose

(CAB). A eficiência de encapsulação para as partículas contendo o complexo de insulina foi superior a 50%, embora superior nas partículas colocadas em lipossomas. Ambos os sistemas mostraram liberação prolongada de insulina, tendo a liberação sido mais lenta nas microcápsulas contendo o complexo em lipossomas (Manosroi, Manosroi, 1997).

A microencapsulação de lipossomas de insulina em micropartículas de alginato-quitosana permitiu obter maior eficiência de encapsulação de insulina (21,5-30%), em relação à encapsulação da insulina livre (11%). A liberação de insulina em meios gástrico e intestinal artificiais foi idêntica para as microcápsulas contendo insulina ou lipossomas de insulina. O efeito hipoglicêmico, após administração oral a ratos diabéticos, foi mais prolongado com a fórmula contendo lipossomas de insulina (4 UI). Verificou-se diminuição da glicemia 3 horas após a administração e 6 horas depois o aumento da glicemia foi ligeiro, sendo que ao fim de 10 horas os valores ainda estavam próximos do normal. Com base nestes resultados foi sugerida a influência dos lipossomas na liberação prolongada da insulina (Ramdas *et al.*, 2000).

Emulsões + Promotores da absorção

Com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade da insulina veiculada através de uma emulsão a/o/a incorporaram-se promotores de absorção na fase oleosa (Morishita *et al.*, 1998). Foram utilizados ácidos graxos insaturados (ácidos oléico, linoléico e linolênico) e monoterpenos cíclicos (limoneno e mentol). A administração a ratos, *in situ*, da emulsão de insulina (50 UI/kg) contendo 3% de limoneno ou mentol promoveu um efeito hipoglicêmico no íleo, mas não no cólon. Pela adição de 2% de ácidos graxos às emulsões, o efeito hipoglicêmico foi mais pronunciado no cólon do que no íleo. As emulsões contendo ácidos graxos insaturados promovem a absorção da insulina ao nível do íleo e do cólon, sem causar danos nos tecidos. A maior eficácia relativa (~10%) foi obtida com a emulsão contendo 2% de ácido linoléico.

Em seguida, procurou-se testar a influência de 2 ácidos graxos poli-insaturados, o ácido eicosapentanóico (20:5 ω 3, EPA) e o ácido docosaexaenóico (22:6 ω 3, DHA). O EPA e o DHA promoveram a absorção da insulina *in situ*, ao nível do cólon, assim como um efeito hipoglicêmico, sem provocar quaisquer danos na mucosa do cólon. A eficácia no aumento da biodisponibilidade foi por ordem decrescente: DHA \geq EPA $>$ ácidos graxos insaturados C18 \geq ácido graxo saturado C18 (Suzuki *et al.*, 1998). A administração de emulsões múltiplas de insulina (0-50 UI/Kg), *in situ*, no cólon, aumentou a insulina sérica e diminuiu a glicemia tendo-se registado um efei-

to dependente da dose de uma forma não linear (Morishita *et al.*, 2000).

Sistema bioadesivo + Inibidor proteolítico

As ligações covalentes entre polímeros bioadesivos e inibidores das proteases intestinais têm sido amplamente estudadas e desenvolvidas por Bernkop-Schnurch e colaboradores (1998). As propriedades mucoadesivas dos polímeros não são influenciadas por estas ligações. A imobilização dos inibidores nestes sistemas não absorvíveis permite um contato íntimo e prolongado com a membrana intestinal.

O objetivo pretendido consiste na obtenção de um conjugado polímero-inibidor eficaz na administração oral de peptídios e proteínas. Alguns dos sistemas estudados, que utilizaram a insulina como fármaco modelo, incluem: carboximetilcelulose (CMC)-BBI, CMC-elastatinal e quitosana-antipaína.

O conjugado quitosana-antipaína mostrou ter um efeito inibitório significativo contra a degradação causada pela tripsina tendo revelado ainda elevadas propriedades mucoadesivas. As propriedades promotoras da absorção do quitosana não foram influenciadas. O conjugado foi utilizado na fórmula de comprimidos, contendo a insulina em matriz polimérica. No interior da matriz, a proteólise foi completamente inibida na presença do conjugado, enquanto que na sua ausência, foram degradadas 11,3 \pm 9,5% da insulina. Nas partes laterais da matriz, o efeito protetor foi superior para a fórmula com 5% de conjugado, tendo permitido liberação controlada do fármaco por um período de 6 horas (Bernkop-Schnurch, Valenta, 1997).

O BBI e o elastatinal, responsáveis pela inibição da tripsina e a-quimotripsina e elastase, respectivamente, as principais enzimas responsáveis pela degradação de insulina, foram ligados covalentemente à CMC sódica. Num fluido intestinal artificial contendo tripsina, quimotripsina e elastase, na ausência de um inibidor enzimático, a insulina foi degradada em 4 horas em cerca de 99,9 \pm 0,03%, enquanto que na presença de mistura dos conjugados de CMC-BBI e CMC-elastatinal apenas 66,5 \pm 3,2% da insulina foram metabolizados (Marschutz, Bernkop-Schnurch, 2000).

Com base nestes resultados, desenvolveu-se um sistema de liberação da insulina composto pelos 2 conjugados CMC-BBI e CMC-elastatinal e pelo polímero mucoadesivo *polycarboxiphil*-cisteína (PCP-Cys), na forma de comprimidos revestidos entericamente com polimetacrilato. O PCP-Cys exibe atividade inibitória contra a quimotripsina e carboxipeptidases. A degradação da insulina na forma farmacêutica sem conjugados atingiu

91,6±7,4%, após 3 horas de incubação em fluido intestinal artificial. Na presença dos conjugados, esse valor foi de aproximadamente 50%. O polímero PCP-Cys presente na fórmula aumenta a coesividade, prolongando a liberação da insulina por um período de 10 horas. Para avaliar a eficácia biológica da forma farmacêutica, realizaram-se estudos *in vivo* com ratos diabéticos. Os níveis de glicemia basais foram reduzidos entre 20 a 40%, após administração da fórmula contendo 200 mg de insulina. O efeito surgiu 4 horas após a administração e manteve-se aproximadamente por 80 horas (Marschutz, Caliceti, Bernkop-Schnurch, 2000).

Sistema bioadesivo + Promotor da absorção

A hidroxipropilcelulose (HPC) pode ser usada em formas farmacêuticas destinadas a aumentar a biodisponibilidade oral da insulina, por aumento do tempo de contato com o local de absorção. Avaliou-se o efeito hipoglicêmico de preparações com diferentes viscosidades de HPC (elevada, média e baixa) e contendo um promotor da absorção (sistema ácido graxo-Brij® ou o sistema salicilato-celulose), em coelhos (5 UI/kg de insulina). No sistema ácido graxo-Brij®, a incorporação de HPC não favoreceu o efeito hipoglicêmico. No caso do sistema salicilato-celulose, a velocidade e extensão da absorção oral foram influenciadas pelo grau de viscosidade de HPC. A glicemia só diminuiu significativamente (43% nas duas horas do ensaio) com a HPC de média viscosidade. No caso da HPC de elevada viscosidade, a insulina foi liberada lentamente através do filme viscoso, enquanto que no caso da HPC de baixa viscosidade, a elevada taxa de difusão aumentou o *clearance* e diminuiu a absorção (Mesiha, Sidhom, 1995).

Revestimento entérico + Inibidores das proteases e/ou Promotores da absorção

Ziv e colaboradores (1994) conseguiram reduzir a glicemia de cães tornados diabéticos por pancreatetomia, pela administração oral de micropartículas contendo insulina (100 UI), colato e inibidor tripsínico de soja e revestidos entericamente com Eudragit L. O revestimento entérico retardou a liberação de insulina e reduziu a glicemia em 30%, nos cães diabéticos e parcialmente diabéticos, e em 40%, nos cães diabéticos, em comparação com a redução de 25% obtida com a fórmula não revestida

Num trabalho de Hosny e colaboradores, as cápsulas contendo 4,6 UI de insulina e revestidas com Eudragit®, foram adicionados 20 mg de salicilato de sódio. As fórmulas revestidas com Eudragit L e Eudragit S conduziram a biodisponibilidades, relativamente a uma injeção intraperitoneal de 10 UI, de 13,26% e 14,15%, respectiva-

mente (Hosny, Khan Ghilzai, Al Dhawalie, 1995). Posteriormente, foi preparada uma nova fórmula de cápsulas, com insulina (20 ou 40 UI), salicilato de sódio (50 mg) e com ou sem colato de sódio (50 mg), revestidas com Eudragit S. Os resultados dos ensaios *in vivo*, realizados em coelhos diabéticos revelaram que a hipoglicemia relativa obtida foi de 27-30% (Hosny *et al.*, 1998).

Liberação no cólon + Inibidores das proteases e/ou Promotores da absorção

Cápsulas de insulina (50-150 UI/dose) contendo também 5-metoxisaalilato, como promotor da absorção, e revestidas com um azopolímero foram administradas oralmente, em cães porque, tal como os humanos, eles possuem um cólon mais largo do que os ratos e a mesma dose de insulina é diluída num volume maior. A insulina foi absorvida pelo intestino, mas a diminuição da glicemia foi reduzida e pouco duradoura (Saffran *et al.*, 1997).

Foram obtidas maiores biodisponibilidades orais por incorporação de inibidores das proteases e/ou promotores da absorção nas fórmulas de liberação no cólon. A incorporação de mesilato de camostato nos *pellets* de insulina (12,5 UI) revestidos com um azopolímero aumentou a biodisponibilidade de 0,89% para 3,38% e diminuiu a glicemia de 4,92% para 18,2% (Tozaki *et al.*, 2001). Quando um promotor da absorção, como o glicocolato de sódio ou o oleato de sódio, é incluído nas cápsulas de quitosano contendo a insulina (20 UI), aumenta a absorção de insulina e o efeito hipoglicemiante. O *n*-dodecil- β -D-maltopiranosídeo não reduziu a glicemia (Tozaki *et al.*, 1997). A co-administração de diversos inibidores das proteases, como a bacitracina, aprotinina e inibidor tripsínico de soja, permitiu aumentar os efeitos hipoglicêmicos em relação à insulina sozinha. A biodisponibilidade das cápsulas de quitosana contendo insulina aumentou de 1,6% para 3,49% na presença de glicocolato sódico (Tozaki *et al.*, 1997).

Com o intuito de avaliar dois métodos de preparação foram obtidos comprimidos de insulina, colato de sódio, inibidor tripsínico de soja e pectinato de cálcio, na forma de matriz e por revestimento por compressão. Os comprimidos matriciais não revestidos não evitaram a difusão de insulina e liberaram imediatamente o seu conteúdo, após a administração a cães. Os comprimidos revestidos causaram um pico elevado 5-8 horas após a administração oral a cães, acompanhado de uma redução nos níveis de glicemia. O atraso na absorção de insulina é devido à degradação do veículo do fármaco apenas no intestino grosso. Esta técnica de compressão apresenta, à semelhança de outros métodos de liberação no cólon, algumas limitações, especialmente, dificuldade em centrar o núcleo do compri-

mido para alcançar uma camada de revestimento de espessura uniforme (Rubinstein, Radai, 1995).

CONCLUSÃO

A investigação de estratégias capazes de superar as barreiras física e enzimática à administração oral da insulina, tem sido muito intensa. Os resultados obtidos são encorajadores, embora as doses necessárias para induzir as respostas desejadas sejam elevadas e a biodisponibilidade oral continue insuficiente. Os valores de biodisponibilidade foram inferiores a 2% na maioria dos casos, embora algumas estratégias tenham alcançado resultados superiores, como a co-administração de ZOT, a encapsulação em microsferas de P(MAA- γ -EG) e a incorporação em lipossomas revestidos com quitosana. A combinação de duas ou mais estratégias, atuando conjuntamente para circunscrever as barreiras à absorção, poderá ser vantajosa, como se verificou pela incorporação de inibidores das proteases e/ou promotores da absorção em diferentes fórmulas. A microencapsulação é inerentemente uma combinação de estratégias, mostrando-se uma alternativa válida pelo fato de as micropartículas protegerem o fármaco da degradação proteolítica e poderem também promover a absorção de peptídeos e proteínas. A combinação da microencapsulação com outras estratégias, não só é possível, como também permite aumentar a biodisponibilidade oral da insulina. As técnicas de microencapsulação que recorrem a polímeros naturais são particularmente vantajosas, por um lado porque não são agressivas, logo não interferem com a estabilidade do fármaco peptídico durante a preparação e, por outro, pela biodegradabilidade e potencial biocompatibilidade dos polímeros utilizados, porém os resultados em termos de eficiência de encapsulação, perfil de liberação e aumento de biodisponibilidade oral são ainda insatisfatórios.

ABSTRACT

Oral delivery systems for peptides and proteins: III. Application to insulin

Insulin is an important therapeutic protein, generally administered subcutaneously due to the obstacles of oral delivery. A number of different methods have been explored to improve the low oral bioavailability of insulin, particularly in the last decade, namely protease inhibitors, absorption enhancers, chemical modification and the formulation approach which includes particulate systems, emulsions, targeting delivery systems and bioadhesive systems. Although an effective formulation for oral insulin delivery remains to be achieved, the results are

encouraging. Microencapsulation has proven to be a promising method of choice, especially when using natural polymers.

UNITERMS: Absorption enhancer. Microencapsulation. Natural polymers. Oral insulin. Protease inhibitors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUBAKAR, M.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P.; DEYME, M.; VAUTHIER, C. Study of the mechanism of insulin encapsulation in poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v. 47, p. 568-576, 1999.
- 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. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 225, p. 31-39, 2001.
- AIEDEH, K.; GIANASI, E.; ORIENTI, I.; ZECCHI, V. Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin. *J. Microencapsul.*, London, v. 14, p. 567-576, 1997.
- AL ACHI, A.; GREENWOOD, R. Human insulin binding to erythrocyte-membrane. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 19, p. 673-684, 1993a.
- AL ACHI, A.; GREENWOOD, R. Intraduodenal administration of biocarrier-insulin systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 19, p. 1303-1315, 1993b.
- AL ACHI, A.; GREENWOOD, R. Erythrocytes as oral delivery systems for human insulin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 24, p. 67-72, 1998.
- ASADA, H. *et al.* Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine: relative importance of insulin association characteristics in aqueous solution. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 11, p. 1115-1120, 1994.
- ASADA, H. *et al.* Absorption characteristics of chemically modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 84, p. 682-687, 1995.
- BAI, J. P.; CHANG, L. L. Transepithelial transport of insulin: I. Insulin degradation by insulin-degrading enzyme in small intestinal epithelium. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 12, p. 1171-1175, 1995.

- BAI, J. P.; CHANG, L. L. Effects of enzyme inhibitors and insulin concentration on transepithelial transport of insulin in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 48, p. 1078-1082, 1996.
- BAI, J. P.; HONG, H. J.; ROTHENBERGER, D. A.; WONG, W. D.; BULS, J. G. The presence of insulin-degrading enzyme in human ileal and colonic mucosal cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 48, p. 1180-1184, 1996.
- BERNKOP-SCHNURCH, A. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 52, p. 1-16, 1998.
- BERNKOP-SCHNURCH, A.; VALENTA, I. B. C. Development and in vitro evaluation of a drug delivery system protecting from trypsinic degradation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 157, p. 17-25, 1997.
- BUDD, G. C.; PANSKY, B.; SAFFRAN, M. Insulin gene expression in the rat stomach and colon. *FASEB J.*, v. 7, p. A1115, 1993.
- CARINO, G. P.; JACOB, J. S.; MATHIOWITZ, E. Nanosphere based oral insulin delivery. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 65, p. 261-269, 2000.
- CARINO, G. P.; MATHIOWITZ, E. Oral insulin delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Amsterdam, v. 35, p. 249-257, 1999.
- CHANG, L. L.; STOUT, L. E.; WONG, W. D.; BULS, J. G.; ROTHENBERGER, D. A.; SHIER, W. T.; SORENSON, R. L.; BAI, J. P. Immunohistochemical localization of insulin-degrading enzyme along the rat intestine, in the human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2), and in human ileum. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 86, p. 116-119, 1997.
- CHIEN, Y. W. Human insulin: Basic sciences to therapeutic uses. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 22, p. 753-789, 1996.
- DAMGE, C.; MICHEL, C.; APRAHAMIAN, M.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P. Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 13, p. 233-239, 1990.
- FASANO, A.; UZZAU, S. Modulation of intestinal tight junctions by Zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 99, p. 1158-1164, 1997.
- FUJII, S.; YOKOYAMA, T.; IKEGAYA, K.; SATO, F.; YOKOO, N. Promoting effect of the new chymotrypsin inhibitor FK-448 on the intestinal absorption of insulin in rats and dogs. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 37, p. 545-549, 1985.
- GEARY, R. S.; SCHLAMEUS, H. W. Vancomycin and insulin used as models for oral delivery of peptides. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 23, p. 65-74, 1993.
- HASHIMOTO, T.; NOMOTO, M.; KOMATSU, K.; HAGA, M.; HAYASHI, M. Improvement of intestinal absorption of peptides: adsorption of B1-Phe monoglucosylated insulin to rat intestinal brush-border membrane vesicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Stuttgart, v. 50, p. 197-204, 2000.
- HASHIZUME, M *et al.* Improvement of large intestinal absorption of insulin by chemical modification with palmitic acid in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 44, p. 555-559, 1992.
- HO, H. O.; HSIAO, C. C.; SHEU, M. T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 85, p. 138-143, 1996.
- HOCHMAN, J.; ARTURSSON, P. Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 29, p. 253-267, 1994.
- HOSNY, E. A.; KHAN GHILZAI, N. M.; AL DHAWALIE, A. H. Effective intestinal absorption of insulin in diabetic rats using enteric coated capsules containing sodium salicylate. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 21, p. 1583-1589, 1995.
- HOSNY, E. A.; KHAN GHILZAI, N. M.; AL NAJAR, T. A.; ELMAZAR, M. M. Hypoglycemic effect of oral insulin in diabetic rabbits using pH-dependent coated capsules containing sodium salicylate without and with sodium cholate. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 24, p. 307-311, 1998.

- HOVGAARD, L.; MACK, E. J.; KIM, S. W. Insulin stabilization and GI absorption. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 19, p. 99-108, 1992.
- IWANAGA, K. *et al.* Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 88, p. 248-252, 1999.
- IWANAGA, K.; ONO, S.; NARIOKA, K.; MORIMOTO, K.; KAKEMI, M.; YAMASHITA, S.; NANGO, M.; OKU, N. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: improvement of stability of insulin in GI tract. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 157, p. 73-80, 1997.
- KIMURA, T.; SATO, K.; SUGIMOTO, K.; TAO, R.; MURAKAMI, T.; KUROSAKI, Y.; NAKAYAMA, T. Oral administration of insulin as poly(vinyl alcohol)-gel spheres in diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v. 19, p. 897-900, 1996.
- KISEL, M. A.; KULIK, L. N.; TSYBOVSKY, I. S.; VLASOV, A. P.; VOROB'YOV, M. S.; KHOLODOVA, E. A.; ZABAROVSKAYA, Z. V. Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 216, p. 105-114, 2001.
- LEHR, C.-M. Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 65, p. 19-29, 2000.
- LOWE, P. J.; TEMPLE, C. S. Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 46, p. 547-552, 1994.
- LOWMAN, A. M.; MORISHITA, M.; KAJITA, M.; NAGAI, T.; PEPPAS, N. A. Oral delivery of insulin using pH responsive complexation gels. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 88, p. 933-937, 1999.
- LUEBEN, H. L.; LEHR, C.-M.; RENTEL, C.-O.; NOACH, A. B. J.; DE BOER, A. G.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 29, p. 329-338, 1994.
- MA, X. Y.; PAN, G. M.; LU, Z.; HU, J. S.; BEI, J. Z.; JIA, J. H.; WANG, S. G. Preliminary study of oral polylactide microcapsulated insulin in vitro and in vivo. *Diabetes Obes. Metab.*, v. 2, p. 243-250, 2000.
- MANOSROI, A.; MANOSROI, J. Microencapsulation of human insulin DEAE-dextran complex and the complex in liposomes by the emulsion non-solvent addition method. *J. Microencapsul.*, London, v. 14, p. 761-768, 1997.
- MARSCHUTZ, M. K.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Oral peptide drug delivery: polymer-inhibitor conjugates protecting insulin from enzymatic degradation in vitro. *Biomaterials*, Amsterdam, v. 21, p. 1499-1507, 2000.
- MARSCHUTZ, M. K.; CALICETI, P.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Design and *in vivo* evaluation of an oral delivery system for insulin. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 17, p. 1468-1474, 2000.
- MATHIOWITZ, E.; JACOB, J. S.; JONG, Y. S.; CARINO, G. P.; CHICKERING, D. E.; CHATURVEDI, P.; SANTOS, C. A.; VIJAYARAGHAVAN, K.; MONTGOMERY, S.; BASSETT, M.; MORRELL, C. Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. *Nature*, London, v. 386, p. 410-414, 1997.
- MATSUZAWA, A.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Absorption of insulin using water-in-oil-in-water emulsion from an enteral loop in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v. 18, p. 1718-1723, 1995.
- MCPHILLIPS, A.; URAIZEE, S.; RITSCHER, W.; SAKR, A. Evaluation of fluid-bed applied acrylic polymers for the targeted peroral delivery of insulin. *STP Pharma Sci.*, Paris, v. 7, p. 476-482, 1997.
- MESIHA, M.; PLAKOGIANNIS, F.; VEJOSOTH, S. Enhanced oral absorption of insulin from desolvated fatty-acid sodium glycocholate emulsions. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 111, p. 213-216, 1994.
- MESIHA, M.; SIDHOM, M. Increased oral absorption enhancement of insulin by medium viscosity hydroxypropyl cellulose. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 114, p. 137-140, 1995.

- MICHEL, C.; APRAHAMIAN, M.; DEFONTAINE, L.; COUVREUR, P.; DAMGE, C. The effect of site of administration in the gastrointestinal tract on the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 43, p. 1-5, 1991.
- MORISHITA, I.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; MACHIDA, Y.; NAGAI, T. Hypoglycemic effect of novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor in normal and diabetic rats. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 78, p. 9-16, 1992a.
- MORISHITA, I.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; MACHIDA, Y.; NAGAI, T. Enteral insulin delivery by microspheres in 3 different formulations using Eudragit L-100 and S-100. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 91, p. 29-37, 1993a.
- MORISHITA, M.; KAJITA, M.; SUZUKI, A.; TAKAYAMA, K.; CHIBA, Y.; TOKIWA, S.; NAGAI, T. The dose-related hypoglycemic effects of insulin emulsions incorporating highly purified EPA and DHA. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 201, p. 175-185, 2000.
- MORISHITA, M.; MATSUZAWA, A.; TAKAYAMA, K.; ISOWA, K.; NAGAI, T. Improving insulin enteral absorption using water-in-oil-in-water emulsion. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 172, p. 189-198, 1998.
- MORISHITA, M.; MORISHITA, I.; TAKAYAMA, K.; MACHIDA, Y.; NAGAI, T. Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 78, p. 1-7, 1992b.
- MORISHITA, M.; MORISHITA, I.; TAKAYAMA, K.; MACHIDA, Y.; NAGAI, T. Site-dependent effect of aprotinin, sodium caprate, Na₂EDTA and sodium glycocholate on intestinal absorption of insulin. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v. 16, p. 68-72, 1993b.
- OPPENHEIM, R. C.; STEWART, N. F.; GORDON, L.; PATE, H. M. Production and evaluation of orally administered insulin nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 8, p. 531-546, 1982.
- PATEL, H. M.; RYMAN, B. E. Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes. *FEBS Lett.*, v. 62, p. 60-63, 1976.
- RADWAN, M. A. Enhancement of absorption of insulin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 27, p. 981-989, 2001.
- RAMDAS, M.; PAUL, W.; DILEEP, K. J.; ANITHA, Y.; SHARMA, C. P. Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats. *J. Microencapsul.*, London, v. 17, p. 405-411, 2000.
- RAMKISSOON-GANORKAR, C.; LIU, F.; BAUDYS, M.; KIM, S. W. Modulating insulin-release profile from pH/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 59, p. 287-298, 1999.
- RUBINSTEIN, A.; RADAI, R. In vitro and in vivo analysis of colon specificity of calcium pectinate formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Stuttgart, v. 41, p. 291-295, 1995.
- SAFFRAN, M.; KUMAR, G. S.; SAVARIAR, S.; BURNHAM, J. C.; WILLIAM, F.; NECKERS, D. C. A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. *Science*, Washington, v. 233, p. 1081-1084, 1986.
- SAFFRAN, M.; PANSKY, B.; BUDD, G. C.; WILLIAMS, F. E. Insulin and the gastrointestinal tract. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 46, p. 89-98, 1997.
- SCHILLING, R. J.; MITRA, A. K. Intestinal mucosal transport of insulin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 62, p. 53-64, 1990.
- SCHILLING, R. J.; MITRA, A. K. Degradation of insulin by trypsin and alpha-chymotrypsin. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 8, p. 721-727, 1991.
- SCOTT MONCRIEFF, J. C.; SHAO, Z.; MITRA, A. K. Enhancement of intestinal insulin absorption by bile salt-fatty acid mixed micelles in dogs. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 83, p. 1465-1469, 1994.
- SHAH, D.; SHEN, W. C. Transcellular delivery of an insulin-transferrin conjugate in enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 85, p. 1306-1311, 1996.

- SHAO, Z.; LI, Y.; CHERMAK, T.; MITRA, A. K. Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. Part 2. Effects of beta-cyclodextrin derivatives on alpha-chymotryptic degradation and enteral absorption of insulin in rats. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 11, p. 1174-1179, 1994.
- SHAO, Z.; LI, Y.; KRISHNAMOORTHY, R.; CHERMAK, T.; MITRA, A. K. Differential effects of anionic, cationic, nonionic, and physiologic surfactants on the dissociation, alpha-chymotryptic degradation, and enteral absorption of insulin hexamers. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 10, p. 243-251, 1993.
- SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, v. 38, p. 125-140, 2002a.
- SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídios e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.
- SINKO, P. J.; LEESMAN, G. D.; AMIDON, G. L. Mass balance approaches for estimating the intestinal absorption and metabolism of peptides and analogues: Theoretical development and applications. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 10, p. 271-275, 1993.
- SUZUKI, A.; MORISHITA, M.; KAJITA, M.; TAKAYAMA, K.; ISOWA, K.; CHIBA, Y.; TOKIWA, S.; NAGAI, T. Enhanced colonic and rectal absorption of insulin using a multiple emulsion containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 87, p. 1196-1202, 1998.
- TAKEUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; NIWA, T.; HINO, T.; KAWASHIMA, Y. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 13, p. 896-901, 1996.
- TOUITOU, E.; ALHAIQUE, F.; FISHER, P.; MEMOLI, A.; RICCIERI, F. M.; SANTUCCI, E. Prevention of molecular self-association by sodium salicylate: Effect on insulin and 6-carboxyfluorescein. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 76, p. 791-793, 1987.
- TOUITOU, E.; RUBINSTEIN, A. Targeted enteral delivery of insulin to rats. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 30, p. 95-99, 1986.
- TOZAKI, H.; KOMOIKE, J.; TADA, C.; MARUYAMA, T.; TERABE, A.; SUZUKI, T.; YAMAMOTO, A.; MURANISHI, S. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 86, p. 1016-1021, 1997.
- TOZAKI, H.; NISHIOKA, J.; KOMOIKE, J.; OKADA, N.; FUJITA, T.; MURANISHI, S.; KIM, S. I.; TERASHIMA, H.; YAMAMOTO, A. Enhanced absorption of insulin and (Asu(1,7))eel-calcitonin using novel azopolymer-coated pellets for colon-specific drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 90, p. 89-97, 2001.
- TREHAN, A.; ALI, A. Recent approaches in insulin delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 24, p. 589-597, 1998.
- TRENKTROG, T.; MULLER, B. W.; SPECHT, F. M.; SEIFERT, J. Enteric coated insulin pellets: development, drug release and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 4, p. 323-329, 1996.
- UCHIYAMA, T.; SUGIYAMA, T.; QUAN, Y. S.; KOTANI, A.; OKADA, N.; FUJITA, T.; MURANISHI, S.; YAMAMOTO, A. Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-lauryl-beta-D-maltopyranoside. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 51, p. 1241-1250, 1999.
- XIA, C. Q.; WANG, J.; SHEN, W. C. Hypoglycemic effect of insulin-transferrin conjugate in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 295, p. 594-600, 2000.
- YAMAMOTO, A. *et al.* Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 11, p. 1496-1500, 1994.
- ZHOU, X. H. Overcoming enzymatic and absorption barriers to nonparenterally administered protein and peptide drugs. *J. Control Release*, Amsterdam, v. 29, p. 239-252, 1994.
- ZIV, E. *et al.* Oral administration of insulin in solid form to nondiabetic and diabetic dogs. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 83, p. 792-794, 1994.