



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas

João Alberto Cavaco Dias

Faro, 2013



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas

João Alberto Cavaco Dias

Dissertação orientada por

Professora Doutora Ana Margarida Grenha

Faro, 2013

Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright João Dias.

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos:

À minha orientadora Professora Doutora Ana Margarida Grenha pela sua disponibilidade, dedicação, apoio e paciência sempre demonstrados ao longo desta etapa de elaboração da dissertação.

À professora Isabel Ramalinho pela coordenação e orientação dos alunos, especialmente na época de estágios.

Às várias direções de curso, pelo profissionalismo e empenho dedicados no crescimento deste jovem curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve. A todos os docentes da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve e da Faculdade de Farmácia de Lisboa que contribuíram para a formação de futuros Farmacêuticos oriundos da Universidade do Algarve.

Aos meus pais e à minha irmã em especial, pela confiança, esforço e amor que demonstraram e tão importantes se afirmaram nos momentos mais difíceis ao longo destes anos.

A todos os meus amigos, especialmente ao João Francisco, Carina Carvalho, António Matias, André Lopes, Ricardo Santos e Luís Requetim pela força incondicional, entajuda, companheirismo e amizade que sempre me ofereceram desde o início do meu percurso académico.

A todos, o meu sincero e profundo agradecimento.

Resumo

O interesse da indústria farmacêutica na administração de biomoléculas não é recente, uma vez que desde que a insulina foi comercializada pela primeira vez em 1923, temos vindo a assistir ao aumento do número de trabalhos relacionados com as aplicações terapêuticas deste tipo de moléculas. No entanto, a aplicação terapêutica destas moléculas regista várias limitações devidas essencialmente à sua estrutura e propriedades físico-químicas, bem como à sua estabilidade.

Com o aparecimento e evolução da nanomedicina, tornou-se possível o desenvolvimento e funcionalização de nanopartículas transportadoras de biomoléculas, dotando este sistema de um enorme potencial para várias terapêuticas. As vantagens deste tipo de sistema de administração incluem a proteção das moléculas ativas encapsuladas, proporcionando um aumento da biodisponibilidade, e tornam também possível a administração das biomoléculas por vias menos invasivas.

Esta dissertação tem por objetivo explorar as potencialidades da via pulmonar para a administração de biomoléculas. Neste sentido, serão focadas os vários tipos de nanopartículas de polímeros naturais e sintéticos como sistema de administração com aplicação na administração por esta via.

Palavras-Chave: administração pulmonar; nanopartículas poliméricas; nanotransportadores; proteínas terapêuticas; vias de administração.

Abstract

The pharmaceutical industry's interest in the administration of biomolecules is not new. Since insulin was first marketed in 1923, there were an increased number of work-related studies about this type of molecules as therapeutic drugs. However, the therapeutic application of those molecules has various limitations due mainly to its structure and physicochemical properties, as well as its stability.

With the emergence and evolution of nanomedicine, it fostered the development and functionalization of nanoparticles carriers of biomolecules, making this system a huge potential for multiple therapies. The advantage of this type of administration system includes the protection of encapsulated active molecules providing an increased bioavailability and providing possibilities in the administration of biomolecules by a less invasive route.

The main aim of the thesis is to study and explore potentials of the pulmonary route for administration of biomolecules. Furthermore, the focus will be put on different types of nanoparticles either natural or synthetic polymers as proteins delivery systems through the pulmonary route.

Keywords: pulmonary administration; polymeric nanoparticles; nano drug carriers; therapeutic proteins; drug administration routes.

Índice

Índice de figuras	V
Índice de tabelas	VI
Lista de abreviaturas	VII
1. Introdução.....	1
2. Métodos.....	3
3. Proteínas Terapêuticas.....	4
4. Administração de péptidos e proteínas terapêuticas	6
5. Vias de administração de péptidos e proteínas terapêuticas	8
5.1. Via parenteral.....	8
5.2. Via oral	9
5.3. Via nasal	10
5.4. Via bucal	11
5.5. Via ocular.....	11
5.6. Via retal.....	12
5.7. Via transdérmica	13
5.8. Via pulmonar	14
5.8.1. Nota Histórica.....	14
5.8.2. Anatomia e fisiologia	14
5.8.3. Vantagens e desvantagens	15
6. Transportadores para administração pulmonar	18
6.1. Lipossomas	19
6.2. Microesferas.....	20
6.3. Nanopartículas	21
6.3.1. Nanopartículas constituídas por materiais hidrofóbicos sintéticos	23
6.3.2. Nanopartículas constituídas por materiais hidrofílicos naturais.....	27
Conclusão	31
Bibliografia.....	33

Índice de figuras

Figura 1 - Representação esquemática das vias de absorção de moléculas ¹	7
Figura 2 - Perfil de deposição de partículas no trato respiratório ¹	17
Figura 3 - Representação esquemática do lipossoma ¹	20
Figura 4 - Esquema de encapsulamento de proteínas em PLGA por duas etapas de nanoprecipitação ⁷⁸	24
Figura 5 - Representação esquemática da insulina ¹²	26
Figura 6 - Efeito hipoglicemiante após administração intratraqueal de: a) (▲) nanopartículas com dosagem de 10 UI/kg de insulina, (■) solução com dosagem de 10 UI/kg de insulina; b) (■) nanopartículas com dosagem de 20 UI/kg de insulina, (▲) solução com dosagem de 20 UI/kg de insulina; (◆) solução tampão de fosfato como controlo ⁵⁶	26
Figura 7 - Estrutura química do quitosano, sub-unidades N-acetil-D-glucosamina (direita) e D-glucosamina (esquerda) ⁸⁰	28
Figura 8 - Efeito do quitosano na absorção de fármacos pela via paracelular. (a) Epitélio normal. (b) Interrupção transitória das junções intercelulares por ação do CS 1: Fármaco 2: Junção intercelular 3: CS ⁸⁰	29

Índice de tabelas

Tabela 1 - Exemplos de Proteínas/Péptidos para inalação ¹⁶	4
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens da administração pulmonar de fármacos ⁵⁶	16

Lista de abreviaturas

AVC	Acidente Vascular Cerebral
CS	Quitosano
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
HSA	Albumina do Soro Humano
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
MDI	Inalador Pressurizado com válvula doseadora
PACA	Poli-alquicianocrilato
PBCA	Polibutilcianoacrilato
PEG	Polietilenoglicol
PHCA	Poli-hexilcianoacrilato
PLA	Ácido Poliláctico
PLGA	Ácido Poliláctico-glicólico
SC	Subcutânea
TGA	Ácido Tioglicólico
TPP	Tripolifosfato

1. Introdução

Os péptidos e proteínas terapêuticas, classificadas como produtos biofarmacêuticos, surgiram como fármacos úteis e promissores no tratamento de várias doenças. Através do desenvolvimento da biotecnologia, bioengenharia e ADN recombinante, que tornou possível a sua produção a escala industrial, e da evolução da biologia molecular na compreensão do papel das proteínas nos processos fisiopatológicos, estes fármacos destacaram-se pelo seu forte crescimento a nível do mercado farmacêutico global na última década concorrendo juntamente com outras terapias estabelecidas¹⁻³. A indústria farmacêutica tem vindo ao longo do tempo a mostrar interesse na administração de biomoléculas, mais concretamente de péptidos e proteínas terapêuticas. Exemplo disso, foi a comercialização da insulina no ano de 1923 e desde então assistimos ao aumento do número de trabalhos relacionados com as aplicações terapêuticas deste tipo de moléculas⁴. Em 2010, o número de proteínas terapêuticas naturais e modificadas aprovadas para uso clínico na União Europeia e nos Estados Unidos da América suplantava a casa das centenas, representando 108 mil milhões de dólares de vendas apenas nos EUA⁵⁻⁷.

O fabrico destes produtos farmacêuticos envolve, geralmente, organismos vivos ou os seus compostos ativos e cada vez são mais utilizados no controlo e tratamento de patologias várias, nomeadamente do foro metabólico e oncológico². As características intrínsecas deste tipo de moléculas, tais como a semelhança com as moléculas biológicas, comparativamente à de moléculas de fármacos sintéticos, e a sua seletividade, proporcionam uma ação mais eficaz e potente, causando menos efeitos secundários, permitindo uma melhor abordagem no tratamento de doenças metabólicas e oncológicas^{2,8}.

As proteínas terapêuticas são utilizadas, por exemplo, em casos de acidentes vasculares cerebrais, ataques cardíacos, fibrose cística (enzimas e fatores de crescimento), anemia (eritropoietina), hemofilia (fatores de coagulação do sangue), diabetes (insulina) e cancro (anticorpos monoclonais e interferões). Os péptidos por sua vez estão a ser utilizados com o objetivo de aumentar a absorção celular, como alvos de fármacos e vacinação^{3,8}.

Na administração sistémica de péptidos e proteínas, a administração parenteral é atualmente considerada a via mais eficaz e também o método de administração de escolha na terapêutica de diversas patologias⁹.

Além disso, a administração parenteral está associada com a redução na adesão do doente à terapêutica, especialmente em patologias crónicas. Por conseguinte, existe um forte investimento na procura de alternativas a este tipo de administração¹⁰.

Os sistemas de transporte de fármacos podem diminuir a toxicidade das proteínas terapêuticas, melhorar a sua biodisponibilidade e permitir a sua administração por vias menos invasivas, como por exemplo a via pulmonar. Assim, o desenvolvimento de sistemas de transporte de proteínas à base de nanopartículas é considerado um desafio científico importante e ao mesmo tempo um enorme potencial ao nível do negócio da indústria farmacêutica¹¹.

O exponente interesse em sistemas de nanotransportadores voltou as atenções para o desenvolvimento de medicamentos para administração por via pulmonar. Embora existam várias vias de administração no âmbito da administração de proteínas terapêuticas, esta dissertação focar-se-á no estudo da via pulmonar. Esta via apresenta-se como um forte potencial na administração deste tipo de moléculas, sendo também a mais estudada para este efeito. O pulmão é um órgão atrativo para a administração de fármacos, pelo facto de ser uma via não invasiva, por evitar o efeito de primeira passagem, devido à grande área de superfície da região alveolar disponível para absorção, e por ser uma via onde simultaneamente é possível a obtenção de efeitos locais e sistémicos¹².

2. Métodos

A metodologia utilizada na elaboração da presente dissertação foi a recolha de informação subordinada ao tema nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas. A pesquisa foi realizada em artigos mediante palavras-chaves (como por exemplo “pulmonary drug delivery”, “inhaled nanoparticles”, “polymeric nanoparticles”, “nanocarriers”, “protein drug delivery”, “nanomedicine”) essencialmente no pubmed para obtenção de artigos científicos.

Seguidamente, foi feita uma leitura que permitiu a contextualização do tema e retenção de algumas ideias para estruturar a dissertação. A leitura efetuada foi diversificada e com recurso a referências mencionadas em artigos pesquisados para se estudar um pouco mais a temática tratada.

Para elaboração bibliográfica, recorreu-se ao programa Mendeley que conjuntamente com a funcionalidade “referências” e “insert citation”, permitiram a organização automática da bibliografia, ordenando os artigos que iam sendo referenciados ao longo do texto.

3. Proteínas Terapêuticas

As proteínas e os péptidos têm como unidade básica os aminoácidos, sendo que estes são compostos pelo menos por um grupo amina (-NH₂) e por um grupo carboxilo (-COOH). Os péptidos contêm menos de vinte aminoácidos, tendo um peso molecular inferior a 5000 Da, enquanto as proteínas possuem cinquenta ou mais aminoácidos e o seu peso molecular é superior ao dos péptidos⁹. As proteínas existentes no corpo humano são construídas utilizando vinte aminoácidos diferentes. O tipo e número de aminoácidos numa determinada proteína, juntamente com a sequência ou ordem pela qual eles se unem uns aos outros, determinam a estrutura e função da proteína. Na grande maioria de todos os processos biológicos, as proteínas desempenham um papel fundamental, sendo exemplos de proteínas as enzimas, catalisadoras das reações bioquímicas. As proteínas participam também numa grande variedade de funções, tais como o transporte e armazenamento de substâncias vitais ao organismo, a coordenação de movimentos, o suporte mecânico e proteção. Por último, é de destacar a importância das proteínas na terapêutica para várias patologias, como por exemplo, a insulina para a diabetes, a eritropoietina para a anemia, e a ciclosporina para o transplante de pulmão^{5,13-15}.

Tabela 1 - Exemplos de Proteínas/Péptidos para inalação¹⁶

Patologia	Péptido/Proteína
Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto	Proteínas surfatantes
Fibrose cística	DNase
Enfisema	Alfa-1-antitripsina
Transplante de pulmão	Ciclosporina A
Pneumocistose	Interferão- γ Interleucina-2
Asma	Interleucina-1R Anti-IgE Mab
Osteoporose	Calcitonina Hormona paratiróide
Deficiência da homana de crescimento	Hormona do crescimento humano
Diabetes	Insulina
Cancro	Hormona libertadora da gonadotrofina e análogos
Anemia	Eritropoietina

As cadeias de aminoácidos constituintes das proteínas de uso terapêutico são consideradas estruturas primárias. Para que sejam farmacologicamente ativas, a sequência de aminoácidos tem de formar uma estrutura tridimensional bem definida^{13,15}. A estrutura secundária envolve as hélices α ou folhas β que são estruturas localmente definidas e identificáveis, enquanto a estrutura global da proteína é a estrutura terciária que é estabelecida por um posicionamento adequado das diferentes subunidades relativas umas às outras. Por vezes, as moléculas individuais de proteínas interagem e estabelecem uma estrutura maior bem definida, denominando-se assim como estrutura quaternária^{13,17}.

A formação das estruturas secundária, terciária e quaternária baseiam-se em interações físicas relativamente fracas (por exemplo, interações eletrostáticas, ligações por pontes de hidrogénio, forças de *Van der Waals* e interações hidrofóbicas) e não em ligações químicas covalentes^{13,15,18}. Devido a estas interações fracas, as proteínas podem facilmente sofrer alterações conformacionais. As conformações das proteínas no seu estado nativo têm uma reduzida margem de estabilidade (5-20 kcal/mol), pelo que a sua estrutura terciária é muito lábil e pode ser facilmente quebrada^{15,19}.

A formulação de proteínas para fins terapêuticos irá, assim, depender da estabilidade física e química destas moléculas, que através da perda da sua conformação nativa pode conduzir a uma redução da sua atividade biológica ou mesmo à perda das suas propriedades farmacológicas.

4. Administração de péptidos e proteínas terapêuticas

Os péptidos e as proteínas terapêuticas, podem ser administrados por meio de várias formas farmacêuticas e vias de administração. As vias de administração podem ser divididas consoante o seu local de aplicação, sendo que a mais comum na administração de proteínas é a via parenteral. No entanto, existem alternativas, sendo a via pulmonar considerada como um enorme potencial na administração deste tipo de moléculas. Por outro lado, também a via oral, a via bucal, a via transdérmica, a via ocular e a via retal apresentam-se como alternativas²⁰. Nesta dissertação, a via pulmonar será abordada com maior detalhe.

Efeitos locais são obtidos por meio da aplicação direta do medicamento no local de ação desejado, como superfície ocular, cavidade nasal ou superfície cutânea. Efeitos sistêmicos resultam da entrada do fármaco na circulação sistémica e do transporte para o local onde ocorrerá a ação. Para exercer efeitos sistêmicos, um fármaco pode ser colocado diretamente na corrente sanguínea por injeção intravenosa (IV) ou absorvido para a circulação venosa, após a administração oral ou por outras vias, nomeadamente a via pulmonar^{20,21}.

Os péptidos e proteínas têm várias propriedades que fazem a sua administração sistémica difícil. A biodisponibilidade, geralmente baixa, das biomacromoléculas é causada principalmente pelo seu elevado peso molecular e solubilidade variável. O tamanho e peso molecular influenciam a sua difusão através da camada epitelial e sabe-se que a biodisponibilidade decresce acentuadamente quando aumenta a sua massa molecular para além de 700 Da. Deste modo, as proteínas terapêuticas enfrentam uma série de barreiras lipofílicas e hidrofílicas e estão dependentes de vários fatores físico-químicos que vão influenciar a sua absorção. A permeabilidade das moléculas através das membranas biológicas é um fenómeno complexo, sendo que várias vias podem estar envolvidas, tais como a via transcelular e a via paracelular¹.

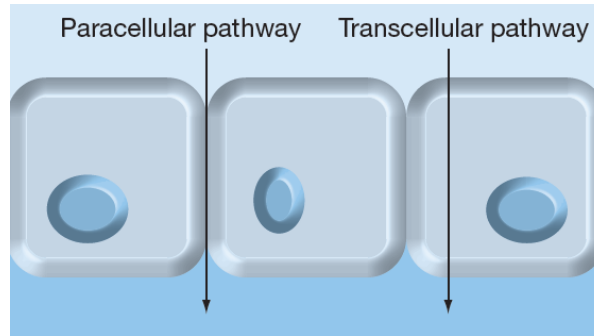


Figura 1 - Representação esquemática das vias de absorção de moléculas¹

O perfil hidrofóbico das proteínas também afeta a sua permeabilidade e absorção transcelular por difusão passiva, devendo as proteínas ter capacidade lipofílica elevada, a menos que o transporte seja pela via paracelular, pois o transporte por difusão passiva é restrito a moléculas relativamente pequenas (<200 Da). No entanto, a maior parte dos péptidos e proteínas terapêuticas tem massa molecular superior a 700 Da e também tem características hidrofílicas^{3,22,23}.

Outra desvantagem dos biofármacos é a sua estabilidade química limitada ou semi-vida nas células. Na maioria dos casos, as proteínas e péptidos terapêuticos desenvolvem resposta imunológica, sendo rapidamente degradados por proteases e rapidamente eliminados da corrente sanguínea^{3,22}. Por conseguinte, são necessárias doses repetidas para manter os níveis terapêuticos. Além disso, e a acrescentar à sua vulnerabilidade intrínseca das proteínas e péptidos, as proteases e as peptidases, especialmente no trato gastrointestinal, mas também no pulmão, pele e outros órgãos e tecidos, fazem estes produtos serem ainda mais vulneráveis à clivagem proteolítica. Por último, os péptidos e proteínas terapêuticas também tendem a sofrer agregação, adsorção e desnaturação, o que limita ainda mais a sua biodisponibilidade^{3,9,17,24}.

5. Vias de administração de péptidos e proteínas terapêuticas

Uma consideração fundamental na escolha da via de administração prende-se com o tipo de efeito que se pretende que o fármaco exerça, ou seja, local ou sistémico, e também através da análise das vantagens e desvantagens das diferentes vias de administração^{20,21,25}.

5.1. Via parenteral

Atualmente, devido à instabilidade das proteínas terapêuticas e permeabilidade reduzida através das biomembranas, a via parenteral é a via mais utilizada para a administração de tais fármacos¹.

Administração parenteral significa, literalmente, a introdução de substâncias dentro do organismo por outros meios que não o trato gastrointestinal, mas praticamente, o termo é aplicado à injeção de substâncias por três grandes vias: intravenosa (IV), intramuscular (IM) e subcutânea (SC). Entre elas, a administração IV é, atualmente, o método de escolha para a administração sistémica de péptidos e proteínas⁹.

As grandes vantagens apresentadas por este tipo de administração são as seguintes: rápido início de ação; biodisponibilidade previsível e quase completa; evita a possibilidade de degradação no trato gastrointestinal; evita o efeito de primeira passagem da degradação do medicamento no fígado e permite a administração do fármaco em pacientes muito doentes ou em estado de coma, que não são capazes de ingerir por via oral²⁶.

Este tipo de administrações envolvem a perfuração da pele e as formas farmacêuticas são, em geral, emulsões, ou suspensões, e em todas elas é necessário garantir a sua esterilização²⁷.

No entanto, esta é uma via invasiva e dolorosa, o que pode levar a uma diminuição na aceitação por parte do paciente e, conseqüentemente, ao aumento dos custos da terapia, bem como a necessidade de pessoal especializado para a sua administração e especialmente quando é necessário um tratamento prolongado ou

estamos na presença de uma patologia crônica. Além disso, e como referido anteriormente, existe uma necessidade de esterilização e armazenamento a frio (2-8 ° C) das várias formulações constituídas por proteínas¹.

A fim de ultrapassar os problemas associados com a administração parenteral, a indústria farmacêutica tem canalizado os seus esforços no desenvolvimento de sistemas de administração de produtos biofarmacêuticos sem recorrer a injeções. Entre as diferentes vias de administração não-invasivas destacam-se a via oral, nasal, bucal, ocular, retal, transdérmica e pulmonar^{1,3,9}.

5.2. Via oral

A administração por via oral continua a ser o método preferencial de administração de fármacos. Mais de 60% dos medicamentos de pequenas moléculas disponíveis no mercado, são administrados por via oral. No entanto, estes valores não se aplicam às proteínas e péptidos terapêuticos^{28,29}.

A via de administração oral apresenta várias vantagens, que incluem: a adesão do paciente, facilidade de administração e razoável baixo custo de produção. No entanto, a sua reduzida biodisponibilidade oral, resultante principalmente da degradação enzimática pré-sistémica e fraca penetração através da membrana intestinal, impede que esta seja a via preferencial das proteínas terapêuticas^{28,30,31}.

O desenvolvimento de sistemas viáveis de administração por via oral de proteínas e péptidos requer uma cuidadosa consideração das suas propriedades físico-químicas (peso molecular, estabilidade ao pH, tamanho molecular, e ionização constante) e das barreiras biológicas (proteólise no estômago, pH variável, a pobre permeabilidade e membrana de efluxo). Os principais problemas envolvidos com a administração oral de proteínas prendem-se com a sua degradação e desnaturação devido ao baixo pH gástrico, à reduzida absorção no intestino delgado, devido à sua estrutura macromolecular e à presença de enzimas que restringem a absorção no trato gastrointestinal^{28,32}.

A comunidade científica bem como a indústria farmacêutica têm intensificado as suas pesquisas para administração oral destes bioprodutos, durante as últimas

décadas^{28,33}. Para tal, diversas metodologias têm sido desenvolvidas com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade oral destas proteínas, como o uso de potenciadores da absorção, inibidores das proteases, revestimentos entéricos e formulações de microesferas e nanopartículas. No entanto, até agora, nenhuma das várias abordagens apresenta resultados clínicos satisfatórios^{34,35}.

5.3. Via nasal

A administração nasal de fármacos também tem sido estudada e utilizada como uma via alternativa para a administração de proteínas e péptidos, essencialmente como efeito local no tratamento de doenças respiratórias e cada vez mais apresenta ser uma opção viável para a administração de proteínas por via sistêmica⁹.

A auto-medicação encontra-se facilitada através desta via devido ao fácil acesso à cavidade nasal, o que melhora a adesão do paciente à medicação comparativamente com a via parenteral³⁵. Por não ser necessária administração através de agulhas, esta via torna-se indolor e não invasiva, não exigindo deste modo preparações estéreis³⁶.

O nível de absorção por unidade de área é relativamente elevado através desta via. Apesar do volume da cavidade nasal ser pequeno, entre 15 a 20 cm³, a sua área de absorção é relativamente larga, 150 cm², porque a camada epitelial é coberta com numerosas microvilosidades. Além disso, a camada subepitelial é altamente vascularizada, o que permite que sejam atingidos níveis terapêuticos mais rapidamente, um início de ação mais rápido e que o sangue venoso do nariz passe diretamente para a circulação sistêmica evitando-se assim o efeito de primeira passagem^{9,35,36}.

Apesar das diversas vantagens, existem algumas barreiras para a absorção nasal, principalmente através de um mecanismo de transporte mucociliar ativo que não permite um contato prolongado do fármaco com a mucosa e a presença de enzimas proteolíticas na cavidade nasal. As propriedades físico-químicas do medicamento também vão influenciar a sua absorção e consequente biodisponibilidade, também como a sua dosagem, frequência de administração, volume e concentração, bem como a presença ou ausência de potenciadores de absorção³⁵.

Para conseguir uma administração por via nasal estável, segura e eficaz de péptidos e proteínas, tais limitações devem ser superadas. A possibilidade de incorporação de excipientes na sua formulação e o desenho de novos sistemas de dosagem nasais são abordagens interessantes, mas estas áreas ainda carecem de maior exploração para refletirem um benefício clínico e comercial³⁶⁻³⁸.

5.4. Via bucal

A via bucal tem recebido uma maior atenção na última década como uma alternativa promissora para a administração sistémica de medicamentos por via oral ineficientes, pois oferece uma excelente acessibilidade e evita a degradação de proteínas e péptidos que ocorre como resultado da administração oral, evitando a degradação no trato gastrointestinal e o metabolismo hepático de primeira passagem. Esta via de administração tem como locais de absorção o revestimento da bochecha, zona sublingual, língua inferior e mucosa gengival, sendo que a absorção dá-se por difusão passiva^{3,9}.

No entanto, existem limitações nesta via de administração, pois somente os fármacos absorvidos por difusão passiva podem ser administrados através desta via, pequenas doses de fármacos e, também, existe a possibilidade do paciente poder engolir o medicamento³⁹.

5.5. Via ocular

A administração de proteínas e péptidos por via ocular apresenta-se como uma abordagem interessante, mas, também, delicada para a tecnologia farmacêutica. Como em todos os tipos de administração, é necessário um bom estudo e entendimento dos parâmetros fisiológicos da superfície ocular antes da aplicação e produção de um medicamento ocular^{40,41}.

Embora os sistemas de administração de medicamentos convencionais, tais como soluções, suspensões, geles e pomadas tenham sido investigados para administração ocular controlada, estes enfrentam e apresentam vários problemas, tais como a fraca drenagem de soluções instiladas, o volume de lágrima, pobre

permeabilidade da córnea, a drenagem lacrimal, a fraca absorção sistêmica e visão desfocada⁴².

Os sistemas avançados de administração ocular têm sido desenvolvidos e mostrado resultados promissores. Estes têm como objetivo otimizar e controlar a aplicação local, quer aumentando a sua penetração através da mucosa ou prolongando o tempo de contato com a superfície ocular⁴⁰.

Até à data, a maioria das proteínas e péptidos são investigados com o intuito de serem administrados para o tratamento de distúrbios oculares locais. Embora a via ocular não seja a via preferida para a administração sistêmica de proteínas, devido a diversas limitações, tais como a fraca permeabilidade de moléculas de grande dimensão e hidrofílicas, ao metabolismo através da degradação enzimática e à baixa capacidade de transporte, importantes esforços têm sido feitos nesta área. Estes incluem a administração ocular de insulina e também ao uso de vários nanotransportadores para a administração controlada e localizada^{43,44}.

5.6. Via retal

A utilização da via retal para a administração sistêmica de fármacos à base de proteínas e péptidos é relativamente recente^{33,35}.

As vantagens associadas a este tipo de administração prendem-se com a vasta vascularização, a possibilidade de evitar o efeito de primeira passagem, a elevada dose de fármaco que pode ser administrado e por último é uma via apropriada para aqueles medicamentos que causam náuseas, vômitos e irritação na mucosa gastro intestinal através da administração oral³³.

A vasopressina e os seus análogos, pentagastrina e gastrina, análogos de calcitonina, e albumina humana têm sido investigados para favorecer a administração retal de produtos farmacêuticos baseados em proteínas e péptidos³³.

No entanto, esta via encontrou diversos problemas de absorção através da mucosa, devido à sua muito baixa biodisponibilidade. Apesar de várias classes de potenciadores de absorção terem sido testadas, estas apresentaram indução de reações

locais severas. Além disso, a via retal é sujeita à variabilidade relacionada com o trânsito intestinal⁴⁵.

5.7. Via transdérmica

A administração por via transdérmica oferece uma alternativa com algum potencial, superando algumas desvantagens associadas com a administração por via oral, bem como formulações injetáveis. Embora o transporte passivo de proteínas através da pele até à data tenha sido impraticável, devido à sua natureza hidrofílica e do tamanho destas moléculas, o que limita o seu transporte através da barreira da pele lipofílica, diversas técnicas de melhoria foram investigadas para ajudar na administração destas moléculas através da pele. Entre estes, a utilização de promotores de absorção químicos, iontoforese e fonoforese, que têm demonstrado ser uma promessa considerável^{45,46}.

Outro método para alcançar níveis terapêuticos razoáveis é pela facilitação na penetração da proteína ou péptido através da pele, por exemplo, por ligação covalente de um componente lipofílico de grupos funcionais disponíveis na proteína, tais como aminas primárias e secundárias, amidas, imidas e hidroxilos³.

Em todas as vias de administração epiteliais (nasal, bucal, oral, retal, pulmonar e transdérmica), as atividades enzimáticas estão presentes, mas diferem fortemente entre os vários órgãos e tecidos. A pele, embora contenha aminopeptidases, exhibe uma atividade enzimática consideravelmente reduzida, o que leva a um aumento da biodisponibilidade do péptido ou proteína aplicada³.

Além disso, a via transdérmica evita a possibilidade de degradação no trato gastrointestinal e também o efeito de primeira passagem da degradação do medicamento no fígado, o que é muitas vezes uma problemática na administração oral^{3,46}. Outras das vantagens é a libertação do fármaco controladamente, quer seja por ação sistémica ou localmente, ao longo de um período de tempo prolongado³.

No entanto, o problema principal associado com a administração transdérmica é que a pele, como todos os epitélios, é uma barreira excelente para grandes moléculas,

compostos polares e hidrófilos, o que impõe limitações para certos tipos de biomoléculas^{3,46}.

Em conclusão, a via transdérmica oferece várias vantagens, mas não é atualmente possível a administração de macromoléculas hidrófilas, como alguns péptidos e proteínas^{45,46}.

5.8. Via pulmonar

5.8.1. Nota Histórica

Os pulmões são, talvez, a via de administração de fármacos mais antiga conhecida na História. A origem de terapias inalatórias remonta desde quatro mil anos atrás na Índia, onde as pessoas fumavam as folhas da planta *Atropa belladonna* para suprimir a tosse. No século XIX e inícios do século XX, os asmáticos fumavam o pó de estramónio para tratar dos sintomas da sua doença. No entanto, a indústria farmacêutica só atribuiu real importância a esta via em meados dos anos de 1950 através do fabrico do primeiro inalador pressurizado com válvula doseadora (MDI). Este equipamento continha salbutamol para o tratamento da asma^{47,48}.

Atualmente, os investigadores têm feito grandes progressos no desenvolvimento de tecnologias de administração de medicamentos por via pulmonar, tanto em termos de *design* e funcionalização de inaladores, como em avanços na engenharia da própria formulação farmacêutica. Alguns dos avanços mais promissores têm surgido no campo da nanotecnologia, com base na engenharia de partículas, nomeadamente nanopartículas para administração pulmonar, tema este que será o foco desta dissertação⁴⁸.

5.8.2. Anatomia e fisiologia

As funções primárias do aparelho respiratório são permitir as trocas gasosas entre o sangue e o ar, controlar o pH do sangue, conferir proteção contra alguns microrganismos dificultando a sua entrada e expulsando-os da superfície das vias aéreas, fonação, produção de sons e da fala através do ar que atravessa as cordas vocais e olfato.

O aparelho respiratório é constituído principalmente pelas fossas nasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios e pulmões. Os brônquios por sua vez, ramificam-se em pequenos bronquíolos que estão subdivididos nos bronquíolos terminais. A porção respiratória ou vias aéreas respiratórias iniciam-se nos bronquíolos terminais e terminam em pequenas câmaras-de-ar onde se realizam as trocas gasosas entre o ar e o sangue, os sacos alveolares⁴⁹.

Os dois pulmões contêm cerca de trezentos milhões de alvéolos pulmonares, com uma área de superfície combinada superior a 100 m². Em média, um alvéolo tem um diâmetro de 250 µm, e paredes muito finas formadas por dois tipos de células: os pneumócitos tipo I e os pneumócitos tipo II. Os pneumócitos tipo I formam 90% da superfície alveolar e são células epiteliais de descamação. É através deles que ocorre a maior parte das trocas gasosas entre o ar alveolar e o sangue. Os pneumócitos tipo II são células secretoras cubóides ou redondas que produzem o surfatante pulmonar, essencial para a expansão alveolar durante a respiração. A superfície alveolar também é composta por macrófagos, que são responsáveis pela eliminação de partículas grandes^{48,49}.

5.8.3. Vantagens e desvantagens

A administração por via pulmonar tem várias vantagens sobre os outros métodos de administração, tais como a administração oral ou parenteral⁵⁰.

Esta via apresenta-se por ser promissora na administração de péptidos e proteínas terapêuticas, devido a não ser invasiva, à grande área de superfície do pulmão disponível para absorção (superior a 100 m²), vascularização extensiva e reduzida espessura do epitélio alveolar, o que vai permitir uma elevada taxa de absorção¹.

Os pulmões são adequados para administração de fármacos para ambos os tipos de ação, local e sistémica. Existem várias patologias localizadas nos pulmões, que são as principais candidatas para a terapia de inalação, tais como asma, enfisema pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), fibrose cística, hipertensão pulmonar primária e cancro de pulmão. O tratamento destas patologias a nível local é vantajoso, uma vez que o fármaco não sofre o metabolismo de primeira passagem e deposita-se diretamente no local da patologia. Este tipo de aplicação local do medicamento também elimina os potenciais efeitos colaterais provocados pelas elevadas concentrações

sistêmicas típicas da administração por métodos convencionais, e pode reduzir custos, devido às menores doses utilizadas⁴⁸. Além disso, os pulmões podem ser alvo para administração em células específicas, tais como os macrófagos alveolares, para o tratamento de determinadas doenças, como a tuberculose^{50,51}.

Alternativamente, o medicamento pode ser absorvido através da fina camada de células epiteliais existente na região alveolar e conseqüentemente atingir a circulação, obtendo-se deste modo uma ação sistêmica^{50,52,53}. Este é o método indicado caso seja necessário um início rápido de ação e, bem assim, nos casos de administração de proteínas terapêuticas, visto que evita o efeito de primeira passagem e a forte degradação enzimática, desvantagens que são características da administração por via oral⁵⁰.

Por outro lado, os pulmões conferem também funções de defesa, exercendo proteção estrutural e imunológica contra agentes externos. Estes mecanismos de defesa naturais podem opor-se, inadvertidamente, à administração de proteínas terapêuticas⁵⁴. Portanto, o grande desafio dos investigadores centra-se no desenvolvimento de sistemas de inalação através de formulações de sistemas de administração com propriedades adequadas para evitar os sucessivos mecanismos de defesa do pulmão, providenciando a proteção do fármaco durante o seu trajeto e permitindo a sua entrega no local de absorção^{16,55}.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens da administração pulmonar de fármacos⁵⁶

Vantagens	Desvantagens
Via não invasiva	Vias respiratórias atuam como filtro
Grande área de superfície alveolar	Depuração mucociliar
Extensa vascularização	Existência de macrófagos alveolares
Baixa espessura da barreira epitelial	As partículas podem ser exaladas
Baixa atividade proteolítica	Absorção afetada por condições patológicas
Prevenção do efeito de primeira passagem e da degradação gastrointestinal	Necessário design de formulações adequadas para administração
Rápida absorção e início de ação	Requer dispositivos complexos e partículas com propriedades aerodinâmicas específicas
Reduzidos efeitos adversos sistêmicos	Dificuldades associadas com o manuseamento dos dispositivos de inalação
Possibilidade de administração de doses baixas	Vários fatores que afetam a reprodutibilidade

Para qualquer fármaco ser administrado por inalação, este tem que ser formulado como um aerossol. Preparações de aerossóis são dispersões estáveis ou suspensões de materiais sólidos e gotículas num meio gasoso. Os fármacos administrados através de aerossóis podem ser alvo de diferentes mecanismos de deposição: impacto, sedimentação e difusão¹⁵. Os mecanismos de deposição vão depender essencialmente do diâmetro aerodinâmico das partículas constituintes do aerossol. O diâmetro aerodinâmico é definido como o diâmetro de uma partícula esférica de densidade unitária (1g/cm^3), que tem um comportamento aerodinâmico idêntico à partícula em questão, ou seja, partículas com o mesmo diâmetro aerodinâmico podem ter diferentes dimensões e formas⁵⁷. Partículas com diâmetro aerodinâmico superior a $6\ \mu\text{m}$ e que circulam a alta velocidade são depositadas por impacto. A sedimentação ocorre principalmente nas pequenas vias aéreas e na região alveolar, e é mais significativa para partículas com aproximadamente $4\text{--}6\ \mu\text{m}$. A deposição por difusão ocorre principalmente na região alveolar, e é devida aos movimentos brownianos, sendo mais significativa para partículas menores que $0,5\ \mu\text{m}$. Desta forma, tem sido descrito que o tamanho de partícula ideal para administração de fármacos por via pulmonar de modo a atingir um efeito sistémico deve ser aproximadamente $1\text{--}5\ \mu\text{m}$, com um máximo efeito obtido para partículas entre $2\text{--}3\ \mu\text{m}$ ^{16,56–58}.

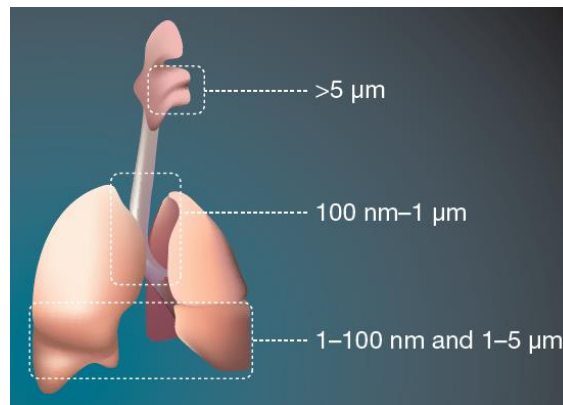


Figura 2 - Perfil de deposição de partículas no trato respiratório¹

De modo a aumentar a absorção, e por conseguinte a biodisponibilidade das proteínas, o pré-requisito fundamental para a deposição eficiente na região alveolar é conseguido através da utilização de sistemas de transportadores, que se detalham na secção abaixo.

6. Transportadores para administração pulmonar

A via parenteral figura-se como a via mais utilizada na administração de proteínas terapêuticas devido à instabilidade e à dificuldade de absorção deste tipo de fármacos. No entanto, e como referido anteriormente, esta via apresenta diversas desvantagens e, analisando as vantagens do sistema respiratório, a via pulmonar tem sido foco especial de atenção na administração de proteínas terapêuticas⁶⁰. Contudo, a baixa biodisponibilidade e o aparecimento de efeitos secundários são limitações apresentadas pelas formulações inaláveis convencionais. Desta forma, a alternativa para ultrapassar os problemas das formulações convencionais surge na aposta no desenvolvimento de transportadores de fármacos, uma vez que auxiliam na proteção contra a degradação da proteína, melhoram o transporte transepitelial e reduzem a resposta imunitária da proteína em si¹.

Os transportadores são utilizados para encapsulação de fármacos possibilitando também a sua proteção contra a degradação, com o intuito de alcançar os tecidos e órgãos alvo e reduzir os possíveis efeitos secundários. No caso de formulações proteicas, o uso de transportadores apresenta várias vantagens. Entre estas destacam-se o aumento da estabilidade das proteínas e o transporte transepitelial dos sistemas encapsulados, o melhoramento da deposição pulmonar e a quantidade de fármaco que atinge o local de ação. Como resultado, o aumento da eficiência terapêutica do fármaco e diminuição dos efeitos adversos causados pela libertação do fármaco em tecidos não-alvo; a obtenção de formulações de libertação modificada, evitar o sistema imunitário e, como consequência, aumentar o tempo de semi-vida^{1,16,56}.

Os transportadores de proteínas pretendem manter as moléculas estáveis no seu ambiente biológico específico e, de preferência, atravessar a barreira da mucosa de modo a alcançar o seu local de ação. Para além disso, os materiais e tecnologias utilizadas para a preparação destes transportadores também parecem ser questões relevantes, sendo a sua seleção dependente do objetivo final da administração^{16,56}.

Diversos materiais têm sido utilizados na produção de transportadores, tais como polissacáridos, derivados de poliéster, acrilatos e lípidos, entre outros. Uma das estratégias mais promissoras é a utilização de polímeros que prolongam a permanência

dos transportadores de fármacos nos locais de absorção, facilitando assim uma maior absorção do fármaco. Este tipo de abordagem inclui o uso de polímeros com propriedades mucoadesivas, tais como os derivados de celulose ou polissacáridos como o quitosano (CS), quer isoladamente, quer em combinação com um transportador de partículas pré-formado, ou incorporado na estrutura do próprio transportador^{16,56}.

Os transportadores mais representativos são classificados de acordo com o tamanho de partícula e com a natureza dos materiais utilizados para os obter. Neste sentido, podemos classificar os transportadores como lipossomas e sistemas nano e microparticulados^{16,56}.

Devido aos rápidos avanços na nanotecnologia e biotecnologia, as nanopartículas têm sido consideradas como uma ferramenta eficaz na administração de fármacos e têm sido extensivamente estudadas para administrar a nova geração de agentes terapêuticos proteicos, uma vez que muitos dos componentes das células vivas são desenhados ao nível nano, tais como ribossomas, transportadores de membranas, recetores e sistemas de sinalização celular^{61,62}.

6.1. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas que variam o seu tamanho entre a escala dos nanómetros até alguns micrómetros. Estes transportadores são constituídos por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos, colesterol e outros lípidos de natureza hidrofóbica e encerram uma cavidade interna aquosa. Devido à sua estrutura os lipossomas permitem a incorporação de fármacos hidrófilos no núcleo aquoso e fármacos lipofílicos dentro da bicamada lipídica^{1,55}. Considerados como um dos transportadores mais estudados para a entrega de fármacos no pulmão, os lipossomas podem ser preparados a partir de compostos endógenos, como os que compõem o surfatante pulmonar, o que tem demonstrado levar a uma maior absorção dos fármacos incorporados, embora o mecanismo subjacente não seja ainda claro^{1,12}. Também devido à sua semelhança estrutural, os lipossomas depositados nos alvéolos pulmonares interagem com os fosfolípidos endógenos, facilitando a absorção das proteínas terapêuticas. Os lipossomas apresentam diversas vantagens no ponto de vista da administração pulmonar, sendo que estes permitem a libertação prolongada de fármaco, previnem a irritação local, têm

baixa toxicidade e conferem uma elevada possibilidade de manipulação da libertação e direcionamento do fármaco^{16,63}.

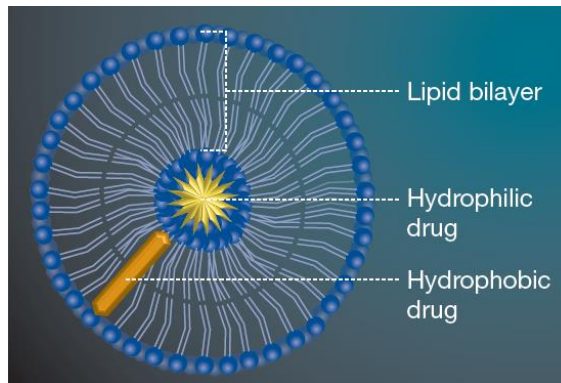


Figura 3 - Representação esquemática do lipossoma¹

6.2. Microesferas

As microesferas são utilizadas para produzir sistemas de partículas no intervalo de tamanho de 1 μm a 999 μm e podem ser originadas através de uma grande variedade de polímeros sintéticos e de materiais naturais. Estas formulações têm sido propostas como veículos para administração pulmonar, no entanto, este intervalo de tamanho das microesferas não é considerado razoável para formulações pulmonares, visto que para atingir um efeito sistémico este intervalo tem de situar-se idealmente entre 1 μm a 5 μm . A produção de microesferas utiliza uma grande variedade de materiais de polímeros naturais ou sintéticos, pois eles podem oferecer uma dispensa de fármaco eficiente e controlada, bem como conferir proteção das moléculas encapsuladas. O destino das microesferas nos pulmões é dependente do tamanho das microesferas, do material do polímero escolhido, da técnica de preparação e do dispositivo de administração^{16,56}.

Até meados da década de 1990, as partículas com um diâmetro geométrico de 1 a 3 μm e densidade de cerca de 1 g/cm^3 , foram consideradas como as mais adequadas para a administração pulmonar, porque a perda significativa devido ao impacto (partículas grandes) e exalação (partículas pequenas) seriam evitadas^{16,56}. No entanto esta gama de tamanho e densidade era responsável pela agregação rápida e fagocitose por parte dos macrófagos alveolares. Numa tentativa de ultrapassar estes inconvenientes, Edwards et al.⁶⁴ introduziu um novo e promissor conceito baseado no desenho de grandes partículas porosas. Estas partículas são mais leves e maiores do que

as típicas partículas de pó seco, com uma densidade de massa de cerca de $0,1 \text{ g/cm}^3$ e o diâmetro geométrico superior a $5 \text{ }\mu\text{m}$. Em virtude das suas características ocas e porosas, estas dão origem a um diâmetro aerodinâmico menor do que o seu diâmetro geométrico. Deste modo, as partículas podem ter um processo de aerossolização mais eficiente (menor agregação) do que as partículas não porosas mais pequenas, resultando em formulações com frações respiráveis mais elevadas, ou seja, a subfração do total de partículas inaladas que penetram no interior da região alveolar do pulmão. Além disso, elas podem evitar a fagocitose alveolar. Desde a introdução deste novo conceito, uma quantidade significativa de trabalhos tem abordado o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de sistemas similares, obtendo resultados promissores^{56,65}.

6.3. Nanopartículas

O desenvolvimento de nanopartículas para a administração de fármacos remonta à década de 1960^{50,66}. As nanopartículas, geralmente, referem-se a partículas coloidais sólidas feitas de material macromolecular que variam entre 1 a 1000 nm de tamanho, ainda que, dependendo do contexto, o termo por vezes, identifica as partículas no intervalo de 1 a 200 nm⁵⁰.

O interesse no desenvolvimento de nanopartículas ocorreu principalmente porque foi demonstrado que o tamanho de partícula desempenha um papel fundamental na sua capacidade para atravessar o epitélio, papel em que as nanopartículas parecem ter uma ação mais favorável do que as micropartículas^{50,56}.

Dentro dos diversos sistemas de administração de fármacos consideradas através da via pulmonar, as nanopartículas demonstram diversas vantagens para o tratamento de doenças respiratórias, como a libertação prolongada do fármaco, a entrega específica do fármaco nas células alvo e a degradação dentro de um período de tempo aceitável⁶⁷.

Além disso, é ainda documentado que o transporte é mais favorável para alguns polímeros de natureza hidrofílica. Estes transportadores coloidais foram recentemente propostos como veículo para o transporte de fármacos para o epitélio do pulmão utilizando uma vasta gama de materiais, tais como os poliésteres, polissacáridos, e poliácridatos^{16,68}. Estes tipos de transportadores apresentam ainda várias vantagens importantes, nomeadamente, a melhoria da estabilidade do fármaco, e, em alguns casos,

a capacidade para controlar o perfil de libertação do fármaco. Numa experiência com partículas de látex revelou-se que, devido ao seu pequeno tamanho, estas são capazes de evitar a eliminação mucociliar e atividade fagocitária⁵⁶, enquanto nanopartículas feitas de outros diversos polímeros foram eficientemente absorvidas pelas células epiteliais alveolares^{56,69}. No entanto, não há consenso sobre o intervalo de tamanho ideal para evitar ou retardar a fagocitose mediada por macrófagos. Por sua vez, foi relatado que esta atividade fagocítica é máxima para partículas entre 100-200 nm, decrescendo nas partículas fora deste intervalo, sejam elas de tamanho superior ou inferior^{56,70}.

As nanopartículas podem ser utilizadas como transportadores de fármacos, quer por dissolução, encapsulação, adsorção ou fixação da substância ativa. As nanopartículas poliméricas são compostas por materiais biodegradáveis, por exemplo, polímeros sintéticos tais como o PLGA, que se degrada em produtos biocompatíveis no organismo e são reabsorvíveis por vias naturais⁵⁰.

Ao manipular a degradação destes polímeros, a taxa de libertação do fármaco pode ser controlada⁷¹. Uma variedade de métodos têm sido utilizados para produzir nanopartículas poliméricas, sendo que esses métodos incluem a evaporação de solvente, a nanoprecipitação e as múltiplas emulsões^{50,72}.

As nanopartículas têm sido investigadas como transportadores de fármacos para doenças que vão desde o cancro à tuberculose^{73,74}. A modificação da superfície e do tamanho de partícula tem sido utilizada para evitar a eliminação das partículas e aumentar o seu tempo de circulação, para o transporte através das barreiras físicas, ou para prolongar o tempo de permanência no local de absorção. As nanopartículas podem também ser manipuladas para direcionar a sua ação às células tumorais na terapia do cancro e aos macrófagos^{75,76}. A tecnologia de nanopartículas só recentemente provou ser viável a escala comercial, quando o primeiro produto usando nanopartículas tornou-se disponível em 2005, o Abraxane®, uma suspensão injetável de nanopartículas de albumina com paclitaxel para o tratamento do cancro da mama⁵⁰.

As nanopartículas podem ser formuladas e administradas tanto numa formulação em pó seco, como numa formulação aquosa, tendo sido exploradas tanto para aplicação sistémica como para aplicação local^{50,56}.

6.3.1. Nanopartículas constituídas por materiais hidrofóbicos sintéticos

6.3.1.1. Derivados de poliéster

Os derivados biodegradáveis e biocompatíveis do ácido lático, PLA e PLGA têm sido fortemente investigados para o desenvolvimento de nanopartículas na encapsulação de fármacos em aplicações de libertação controlada por via pulmonar, devido, essencialmente, à sua segurança e biocompatibilidade já documentada⁷⁷. A preparação deste tipo de nanopartículas à base de derivados de poliéster tem sido realizada utilizando técnicas, tais como, a emulsão da evaporação do solvente e o deslocamento de solvente^{56,77}.

Na técnica de emulsão da evaporação de solvente a fase orgânica que contém o fármaco e o polímero é geralmente incorporada numa fase aquosa que contém um agente tensoativo por meio de ultra-sons ou homogeneização. O solvente difunde-se para a fase externa e evapora-se a partir da superfície, levando à precipitação do polímero da qual resulta a formação das nanopartículas. O deslocamento de solvente, também chamado nanoprecipitação envolve a utilização de uma fase orgânica completamente solúvel na fase aquosa externa. A fase orgânica difunde-se instantaneamente na fase aquosa externa provocando a precipitação imediata do polímero. Após a formação das nanopartículas o solvente é eliminado e a suspensão é concentrada sob pressão reduzida⁵⁶.

Num estudo foi desenvolvido um outro método, baseado no deslocamento de solvente, com o objetivo de aumentar o encapsulamento de proteínas em nanopartículas poliméricas. O método baseava-se na nanoprecipitação em duas etapas, isto porque, na nanoprecipitação em uma única etapa verifica-se uma grande dificuldade no encapsulamento das proteínas devido à sua limitação intrínseca de solubilidade em solventes orgânicos. Para ultrapassar esta limitação, foi desenvolvido, como já referido, um método de duas etapas de nanoprecipitação⁷⁸.

Neste método é usado um passo de nanoprecipitação da proteína, seguido por um segundo passo de nanoprecipitação do polímero. Foram utilizadas duas enzimas modelo, a lisozima e a α -quimotripsina, com o objetivo de otimizar o método, o citocromo c (Cyt-c) como proteína e o polímero PLGA. Nos resultados, foram obtidas eficiências de encapsulação superiores a 70%, uma quantidade de agregados de

proteínas insolúveis em tampão inferiores a 2% e os tamanhos das nanopartículas com Cyt-c e o polímero PLGA a variar entre 300-400 nm⁷⁸.

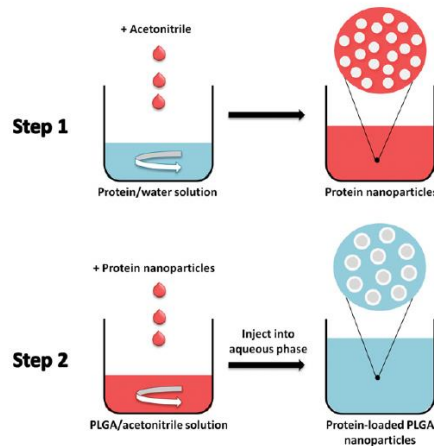


Figura 4 - Esquema de encapsulamento de proteínas em PLGA por duas etapas de nanoprecipitação⁷⁸.

Estes resultados indicam o potencial deste sistema de libertação, utilizando PLGA e o duplo método de nanoprecipitação no deslocamento de solvente, como transportadores de proteínas.

6.3.1.2. Derivados de polímeros acrílicos

Os derivados de acrilato são considerados não tóxicos e de elevada biocompatibilidade, sendo que, atualmente, estão envolvidos na formulação de transportadores de fármacos em várias vias de administração, nomeadamente a via pulmonar^{50,56}. Os primeiros sistemas de nanopartículas formulados com derivados de acrilatos foram relatados na década de 1970. As nanopartículas biodegradáveis de poli-alquicianocrilato (PACA) têm sido objeto de intensa investigação na área dos transportadores poliméricos de fármacos, sendo preparadas através de uma reação de polimerização em emulsão⁵⁶.

A técnica da polimerização em emulsão consiste na emulsão de gotículas de monómeros insolúveis em água numa fase aquosa externa e ácida que contém um

estabilizador, sob agitação magnética. Os monómeros polimerizam relativamente rápido por um mecanismo de polimerização aniônica com uma taxa de polimerização dependente do pH do meio⁵⁶.

No estudo de Brzoska et al, os investigadores produziram nanopartículas compostas por polibutilcianoacrilato (PBCA) ou polihexilcianoacrilato (PHCA) utilizando a técnica da polimerização por emulsão. As nanopartículas obtidas apresentaram tamanhos entre 110 e 240 nm. No entanto, estas nanopartículas mostraram ser tóxicas para a cultura primária de células epiteliais das vias aéreas, bem como para a linha de células 16HBE14o-^{56,79}. Esta observação indica-nos que deve ser tomada especial atenção ao utilizar estes polímeros por via pulmonar.

Utilizando a técnica por polimerização em emulsão, nanopartículas de PBCA carregadas com insulina foram produzidas atingindo um tamanho médio de cerca de 250nm. A insulina foi associada com uma eficiência de 80%, e, após a administração intratraqueal de nanopartículas a morganhos com uma dosagem de insulina de 10 e 20 UI/kg, alcançou-se uma redução nos níveis de glucose no soro comparável à obtida com uma solução com a mesma quantidade de insulina, no entanto, com a administração de nanopartículas de PBCA carregadas com insulina observou-se um efeito hipoglicemiante mais prolongado.

Como pode ser observado na figura 6a, com a dose de 10 UI/kg, a formulação de nanopartículas de PBCA carregadas com insulina atingiu 30% do nível inicial de glucose em quatro horas, enquanto que a solução apenas com insulina atingiu 20% do nível inicial de glucose no mesmo intervalo de tempo. No entanto, o efeito hipoglicemiante verificou-se num intervalo de tempo maior para as nanopartículas com insulina comparativamente às de insulina em solução. Deste modo, 80% do nível inicial de glucose no sangue foi atingido após oito horas para a solução e de dezasseis horas com a formulação de nanopartículas.

Através da análise da figura 6b, quando se utilizou a dose 20 UI/kg, o nível de glucose no sangue atingiu os valores mínimos de 14% em oito horas para as nanopartículas com insulina e 4% em seis horas para que a respetiva solução de insulina. Mais uma vez, a recuperação para níveis normais de glucose foi mais rápida quando administrada a solução de insulina, 80% em doze horas, do que para a

formulação de nanopartículas em insulina, o mesmo nível normal de glucose em vinte horas.

Este estudo indica-nos a possibilidade de administração de nanopartículas, que podem atingir semelhante, se não melhor, na redução dos níveis de glicose no sangue aos da administração da solução com a mesma quantidade de insulina. Conclui-se assim que através da administração de nanopartículas resulta um efeito hipoglicemiante mais prolongado, indicando, assim, a libertação controlada de insulina a partir das nanopartículas^{50,56}.

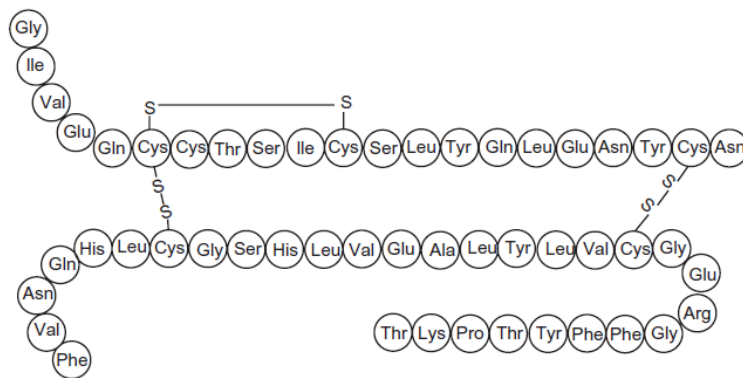


Figura 5 - Representação esquemática da insulina¹²

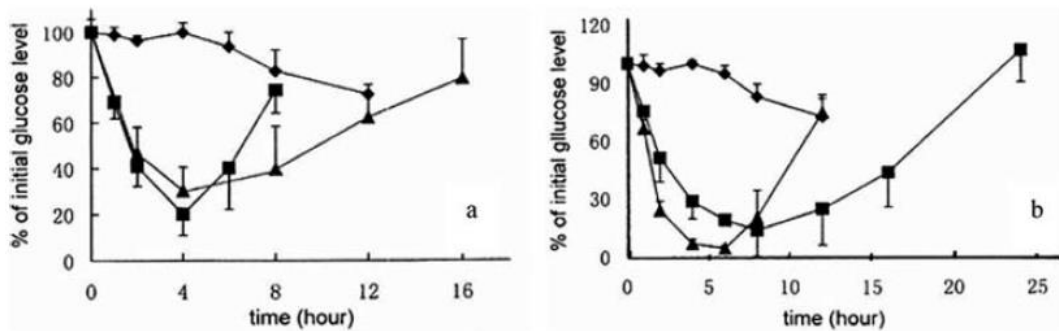


Figura 6 - Efeito hipoglicemiante após administração intratraqueal de: a) (▲) nanopartículas com dosagem de 10 UI/kg de insulina, (■) solução com dosagem de 10 UI/kg de insulina; b) (■) nanopartículas com dosagem de 20 UI/kg de insulina, (▲) solução com dosagem de 20 UI/kg de insulina; (◆) solução tampão de fosfato como controlo⁵⁶

6.3.2. Nanopartículas constituídas por materiais hidrofílicos naturais

6.3.2.1. Proteínas

As proteínas, tais como gelatina e albumina, são polímeros hidrofílicos naturais, com vantagens evidentes na manipulação (evitam os solventes orgânicos) e do ponto de vista do transporte de fármacos. As principais desvantagens destes materiais são a sua fácil degradação e o potencial de antigenicidade quando administrados por via parenteral. No entanto, existe pouca informação sobre a sua antigenicidade aquando da administração por via pulmonar, portanto, serão necessários mais estudos de toxicidade *in vivo* para avaliar a segurança destes transportadores⁵⁶.

A incorporação de albumina em formulações para inalação a partir de inaladores de pó seco é efetuada com a finalidade de prolongar a libertação de partículas nos alvéolos e, assim, aumentar a absorção da substância ativa¹¹.

As nanopartículas baseadas em albumina e gelatina são geralmente preparadas por uma técnica de dessolvatação. Este método consiste em dissolver a proteína em água, posteriormente dessolvatar com um solvente com maior afinidade por água como o álcool ou a acetona. Por fim, em certos casos, a reticulação com glutaraldeído tem lugar, levando à formação de partículas coloidais⁵⁶.

Brzoska et al. produziram nanopartículas com base em gelatina e albumina do soro humano (HSA), utilizando a técnica de dessolvatação descrita acima. Nos seus resultados obtiveram partículas de tamanhos de cerca de 240-280 nm, onde foram posteriormente testadas utilizando uma cultura primária de células epiteliais das vias aéreas e a linha de células 16HBE14o- com nenhuma toxicidade observada. A análise por microscopia confocal mostrou que as nanopartículas de gelatina e as nanopartículas de HSA foram incorporadas em células do epitélio das vias respiratórias, dependentes da sua concentração e temperatura. À temperatura de 4° C não houve absorção, em contraste com o que acontece a 37 ° C, o que indica que a penetração de nanopartículas é um processo de endocitose ativo. Tomando em consideração estas características, as nanopartículas de gelatina e HSA são consideradas como enorme potencial no transporte de fármacos através da via pulmonar^{56,79}.

6.3.2.2. Polissacáridos

Dentro do grupo de nanopartículas de polissacáridos destacam-se o CS, o alginato e o ácido hialurônico (HA). Estes polímeros naturais desfrutam de uma forte popularidade na produção de sistemas de transportadores de fármacos porque são materiais naturais, biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos e são compostos hidrofílicos que possuem um baixo custo de produção e existem em abundância na natureza^{1,56}. Entre os diferentes materiais utilizados para a produção de nanopartículas de polissacáridos, o CS é aquele que apresenta maiores vantagens, sendo este também o mais investigado⁸⁰.

O CS é um polissacarídeo com características estruturais semelhantes às glucosaminas e obtido pela desacetilação alcalina da quitina e é derivado do exoesqueleto de crustáceos. A segurança e a tolerância ao CS são características de sinergia em relação à sua aplicação na administração de fármacos pela via pulmonar. Apesar das propriedades naturais, algumas desvantagens estão associadas, tais como a fraca solubilidade a pH fisiológico e o efeito passivo no direcionamento de fármacos. Assim, aliada à presença de grupos amina reativos na estrutura química do CS, as modificações químicas através da conjugação de diversos grupos funcionais permitem o controlo da hidrofiliicidade e a solubilidade a pH neutro e básico e abrem novas oportunidades para expandir a aplicação deste polímero natural⁸⁰.

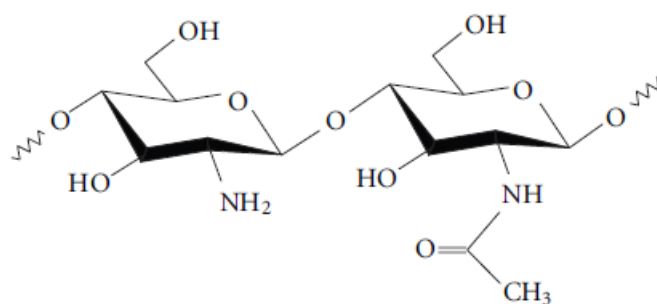


Figura 7 - Estrutura química do quitosano, sub-unidades N-acetil-D-glucosamina (direita) e D-glucosamina (esquerda)⁸⁰

Outra das vantagens do CS é a capacidade de aumentar a absorção de fármacos pela via paracelular, em particular macromoléculas, devido à disrupção transitória das junções das células^{80,81}. Yamamoto et al. realizou ensaios *in vivo*, com o objetivo de confirmar esta capacidade de aumento de absorção de fármacos através desta via, em

porquinhos-da-índia pela comparação da absorção pulmonar de vários modelos de fármacos com a presença e ausência de CS. Os resultados mostraram um aumento significativo para todos os fármacos testados na presença de CS, tal como avaliados pelos níveis de concentração de fármaco no sangue⁸².

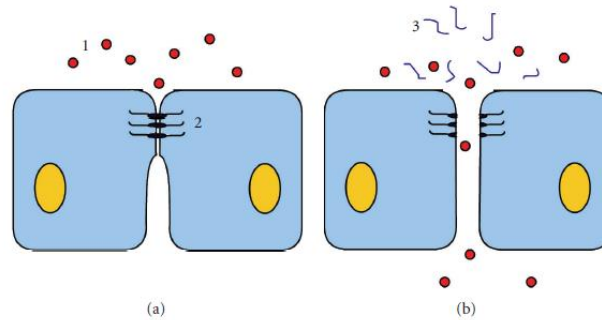


Figura 8 - Efeito do quitosano na absorção de fármacos pela via paracelular. (a) Epitélio normal. (b) Interrupção transitória das junções intercelulares por ação do CS 1: Fármaco 2: Junção intercelular 3: CS⁸⁰

Existem vários estudos onde são apresentados as mais recentes e promissoras modificações realizadas na molécula de CS a fim de melhorar as suas características.

A capacidade de estabelecer ligações iónicas, de pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas com cadeias de mucina carregadas negativamente⁸³, o componente estrutural do muco nos pulmões, evidencia o seu potencial para aumentar a retenção de nanopartículas transportadoras de fármacos no pulmão⁸⁴. Em um estudo recente, Makhlof et al. relataram sobre o aumento da mucoadesão de nanopartículas modificadas quimicamente através da adição de compostos de grupos tiol. Neste estudo foi reportado o aumento da capacidade de mucoadesão de nanopartículas com CS modificadas com ácido tioglicólico (TGA) comparativamente às nanopartículas de CS sem modificação química através de administração intratraqueal em morganhos. Mais importante ainda, observou-se que o aumento na mucoadesão pulmonar estava correlacionada com a maior biodisponibilidade da calcitonina quando este péptido estava associado com nanopartículas⁸⁵.

A adição de polímeros hidrófilos ao CS, tais como o polietilenoglicol (PEG), é uma estratégia conhecida para melhorar a solubilidade e biocompatibilidade do CS, bem como para alcançar um nível baixo de reconhecimento pelo sistema imunitário do hospedeiro e aumentar o tempo de circulação no sangue. Estas cadeias de PEG criam

uma camada de proteção para evitar a adesão das opsoninas presentes no sangue, de modo a que as partículas não possam ser detetadas tão facilmente pelas células fagocitárias^{80,86}.

Devido às vantagens que o PEG confere ao CS, o polímero de CS-G-PEG foi preparado e utilizado para desenvolver vários tipos de nanopartículas para administração de fármacos por via pulmonar. As nanopartículas deste polímero foram preparadas por gelificação ionotrópica com tripolifosfato (TPP). Este sistema apresentou uma elevada eficácia de associação, superiores a 78,6%, levando a valores de encapsulamento de insulina de cerca de 38,6%⁸⁷.

Conclusão

A evolução na biotecnologia permitiu o desenvolvimento e promoção dos péptidos e proteínas como importantes agentes terapêuticos. Apesar do interesse nestes biofármacos, a indústria farmacêutica depara-se com um enorme desafio na investigação e produção dos mesmos. Embora as características intrínsecas deste tipo de moléculas confirmem vantagens em relação às moléculas de fármacos sintéticos, estas apresentam algumas limitações, tais como a biodisponibilidade e a instabilidade física e química. Deste modo, a via parenteral é, até ao momento, a via de administração tradicional de tais moléculas. No entanto, urge investir em vias alternativas de administração para ultrapassar as limitações que são características da via parenteral.

A via pulmonar é considerada uma via atrativa na administração das proteínas terapêuticas. Associada à fisiologia dos pulmões, a inalação é apresentada como uma alternativa promissora e não invasiva relativamente à via parenteral. A utilização da via pulmonar poderá assim levar a um melhor cumprimento da terapêutica, aceitação e satisfação por parte dos doentes.

De forma a tornar possível este tipo de administração, é necessário recorrer ao desenvolvimento e utilização de transportadores de fármacos devido às limitações das proteínas já referidas ao longo do documento. Os transportadores de fármacos vão conferir proteção contra a degradação destas proteínas e permitir que estas se depositem a nível pulmonar e atinjam o local de ação na quantidade necessária. Por conseguinte, houve a necessidade de investir no desenvolvimento de transportadores de fármacos para administração pulmonar, através de estruturas como lipossomas, sistemas nano e microparticulados especificamente direcionados para a administração de proteínas a nível pulmonar.

As nanopartículas poliméricas são sistemas transportadores com enorme potencial devido às várias vantagens que apresentam, como a libertação prolongada do fármaco, a entrega específica do fármaco nas células alvo e a degradação dentro de um período de tempo aceitável. No entanto, cada tipo de proteína e polímero apresenta um comportamento específico que deve ser tido em conta aquando da sua formulação.

Deste modo, a formulação de nanopartículas poliméricas na administração pulmonar de proteínas terá de ter em conta diversos factores, tais como a estabilidade da

proteína, a penetração nos tecidos alvo, a técnica de preparação, a compatibilidade com os polímeros utilizados, aspetos toxicológicos, o custo associado e a obtenção de formulações que escapem ao sistema imunitário, aumentando assim o tempo de semi-vida.

Bibliografia

1. Andrade F, Videira M, Ferreira D, Sarmiento B. Nanocarriers for pulmonary administration of peptides and therapeutic proteins. *Nanomedicine (London, England)*. 2011;6(1):123–41.
2. Fonte P, Andrade JC, Seabra V, Sarmiento B. Chitosan-based nanoparticles as delivery systems of therapeutic proteins. Voynov V, Caravella JA, eds. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2012;899:471–87.
3. Antosova Z, Mackova M, Kral V, Macek T. Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever? *Trends in biotechnology*. 2009;27(11):628–35.
4. Grenha A. The era of nanomedicine. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2011;3(2):181.
5. Dimitrov DS. Therapeutic proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2012;899:1–26.
6. Tauzin B. Biotechnology research continues to bolster arsenal against disease with 633 medicines in development. *Medicines in Development, Biotechnology*. 2008.
7. Kaspar AA, Reichert JM. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug discovery today*. 2013.
8. Lien S, Lowman HB. Therapeutic peptides. *Trends in biotechnology*. 2003;21(12):556–62.
9. Ratnaparkhi MP, Chaudhari SP, Pandya VA. Peptides and Proteins in Pharmaceuticals. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2011;3(2).
10. Jorgensen L, Moeller EH, van de Weert M, Nielsen HM, Frokjaer S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2006;29(3-4):174–82.
11. Salama R, Traini D, Chan H-K, Young PM. Recent advances in controlled release pulmonary therapy. *Current drug delivery*. 2009;6(4):404–14.
12. Mansour HM, Rhee Y-S, Wu X. Nanomedicine in pulmonary delivery. *International journal of nanomedicine*. 2009;4:299–319.
13. Crommelin D, Winden E, Mekking A. Liberação de proteínas farmacêuticas. In: Aulton M, ed. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2nd ed. ARTMED Editora; 2005:546–555.

14. Chang R, Goldsby K. Natural and Synthetic Organic Polymers. In: *Chemistry*. 11th ed. McGraw-Hill Higher Education; 2012:1014–1039.
15. Shoyele SA, Slowey A. Prospects of formulating proteins/peptides as aerosols for pulmonary drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2006;314(1):1–8.
16. Cryan S-A. Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. *The AAPS journal*. 2005;7(1):E20–41.
17. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharmaceutical research*. 2010;27(4):544–75.
18. Voet D, Voet J. Three-Dimensional Structures of Proteins. In: *Biochemistry*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2003:219–275.
19. Quinn EA, Forbes RT, Williams AC, Oliver MJ, McKenzie L, Purewal TS. Protein conformational stability in the hydrofluoroalkane propellants tetrafluoroethane and heptafluoropropane analysed by Fourier transform Raman spectroscopy. *International journal of pharmaceutics*. 1999;186(1):31–41.
20. Allen L, Popovich N, Ansel H. Delineamento de Formas Farmacêuticas: Considerações Biofarmacêuticas e Farmacocinéticas. In: *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8th ed. ARTMED Editora; 2007:159–203.
21. York P. Delineamento de formas farmacêuticas. In: Aulton M, ed. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2nd ed. ARTMED Editora; 2005:17–28.
22. Semalty A, Semalty M, Singh R, Saraf S, Saraf S. Properties and formulation of oral drug delivery systems of protein and peptides. *Indian Journal of ...*. 2007;69(6):741–747.
23. Singh R, Singh S, Lillard JW. Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2008;97(7):2497–523.
24. Van der Walle C, Olejnik O. An Overview of the Field of Peptide and Protein Delivery. In: *Peptide and Protein Delivery*. 1st Editio. Academic Press; 2011:1–22.
25. Buxton I. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Action, and Elimination. In: Brunton L, Lazo J, Parker K, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. McGraw-Hill; 2006:1–40.
26. Jain K. Drug Delivery Systems – An Overview. In: *Drug Delivery Systems*. Humana Press; 2008:1–50.
27. Berrill A, Biddlecombe J, Bracewell D. Product Quality During Manufacture and Supply. In: *Peptide and Protein Delivery*. 1st ed. Academic Press; 2011:313–339.

28. Renukuntla J, Vadlapudi AD, Patel A, Boddu SHS, Mitra AK. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International journal of pharmaceutics*. 2013;447(1-2):75–93.
29. DeVane C. Principles of pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: *The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology*. 3rd ed. Washington DC: American Psychiatric Pub; 2009:181–200.
30. Morishita M, Peppas NA. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug discovery today*. 2006;11(19-20):905–10.
31. Hamman JH, Enslin GM, Kotzé AF. Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2005;19(3):165–77.
32. Mahato RI, Narang AS, Thoma L, Miller DD. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2003;20(2-3):153–214.
33. Shaji J, Patole V. Protein and Peptide drug delivery: oral approaches. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2008;70(3):269–77.
34. Yadav N, Morris G, Harding S, Ang S, Adams G. Various Non-Injectable Delivery Systems for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 2009;9(1):1–13.
35. Shah D, Agarawal V, Parikh R. Non invasive insulin delivery system: a review. *International Journal of Applied ...*. 2010;2(1):35–40.
36. Ritthidej G. Nasal Delivery of Peptides and Proteins with Chitosan and Related Mucoadhesive Polymers. In: *Peptide and Protein Delivery*. 1st ed. Academic Press; 2011:47–68.
37. Illum L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug discovery today*. 2002;7(23):1184–9.
38. Illum L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2003;87(1-3):187–98.
39. Gupta S, Singhvi I, Shirsat M, Karwani G, Agarwal A. Buccal Adhesive Drug Delivery System: A Review. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*. 2011;1(2):105–114.
40. Wadhwa S, Paliwal R, Paliwal SR, Vyas SP. Nanocarriers in ocular drug delivery: an update review. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(23):2724–50.
41. Diebold Y, Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in retinal and eye research*. 2010;29(6):596–609.

42. Vyas S, Paliwal R, Paliwal S. Ocular Delivery of Peptides and Proteins. In: *Peptide and Protein Delivery*. 1st ed. Academic Press; 2011:87–103.
43. Vandervoort J, Ludwig A. Ocular drug delivery: nanomedicine applications. *Nanomedicine (London, England)*. 2007;2(1):11–21.
44. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug discovery today*. 2008;13(3-4):144–51.
45. Lassmann-Vague V, Raccach D. Alternatives routes of insulin delivery. *Diabetes & metabolism*. 2006;32(5 Pt 2):513–22.
46. Herwadkar A, Banga A. Transdermal Delivery of Peptides and Proteins. In: *Peptide and Protein Delivery*. 1st ed. Academic Press; 2011:69–86.
47. Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2003;56(6):600–612.
48. Bailey MM, Berkland CJ. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. *Medicinal research reviews*. 2009;29(1):196–212.
49. Seeley R, Stephens T, Tate P. Aparelho Respiratório. In: *Anatomia e Fisiologia*. 6th ed. McGraw-Hill Higher Education; 2003:825–871.
50. Sung JC, Pulliam BL, Edwards DA. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends in biotechnology*. 2007;25(12):563–70.
51. Chellat F, Merhi Y, Moreau A, Yahia L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials*. 2005;26(35):7260–75.
52. Patton JS, Byron PR. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nature reviews. Drug discovery*. 2007;6(1):67–74.
53. Patton JS, Fishburn CS, Weers JG. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2004;1(4):338–44.
54. Kwok P, Chan H-K. Clinical Applications of Pulmonary Protein Delivery. In: *Peptide and Protein Delivery*. 1st ed. Academic Press; 2011:23–46.
55. Siekmeier R, Scheuch G. Systemic treatment by inhalation of macromolecules--principles, problems, and examples. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2008;59 Suppl 6:53–79.
56. Grenha A, Carrión-Recio D, Teijeiro-Osorio D, Seijo B, Remuñán-López C. Nano- and micro-particulate carriers for pulmonary drug delivery. In: Kumar MNVR, ed. *Handbook of Particulate Drug Delivery*. American Scientific Publishers; 2008:1–28.
57. Andrade F, Videira M, Ferreira D, Sarmiento B. Micelle-based Systems for Pulmonary Drug Delivery and Targeting. *Drug Delivery Letters*. 2011;1(2):171–185.

58. Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respiratory research*. 2001;2(4):198–209.
59. Grenha A, Seijo B, Remuñán-López C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2005;25(4-5):427–37.
60. Mandal TK. Inhaled insulin for diabetes mellitus. *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2005;62(13):1359–64.
61. Labhasetwar V. Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery. *Current opinion in biotechnology*. 2005;16(6):674–80.
62. Yang W, Peters JI, Williams RO. Inhaled nanoparticles--a current review. *International journal of pharmaceutics*. 2008;356(1-2):239–47.
63. Siekmeier R, Scheuch G. Inhaled insulin--does it become reality? *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2008;59 Suppl 6:81–113.
64. Edwards DA, Hanes J, Caponetti G, et al. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science (New York, N.Y.)*. 1997;276(5320):1868–71.
65. Dunbar C, Scheuch G, Sommerer K, DeLong M, Verma A, Batycky R. In vitro and in vivo dose delivery characteristics of large porous particles for inhalation. *International journal of pharmaceutics*. 2002;245(1-2):179–89.
66. Kreuter J. Nanoparticles--a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*. 2007;331(1):1–10.
67. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2010;392(1-2):1–19.
68. Courrier HM, Butz N, Vandamme TF. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2002;19(4-5):425–98.
69. Mo Y, Lim L-Y. Mechanistic study of the uptake of wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles by A549 cells. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2004;93(1):20–8.
70. Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, Torres Suarez AI. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2002;79(1-3):29–40.

71. Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, et al. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2003;92(1-2):173–87.
72. Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*. 2006;17(3):247–89.
73. Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(12):1487–90.
74. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2004;56(11):1649–59.
75. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*. 2003;55(3):329–47.
76. Hans M, Lowman A. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials* 2002;6(4):319–327.
77. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2008;125(3):193–209.
78. Morales-Cruz M, Flores-Fernández GM, Morales-Cruz M, et al. Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres. *Results in pharma sciences*. 2012;2:79–85.
79. Brzoska M, Langer K, Coester C, Loitsch S, Wagner TOF, Mallinckrodt C v. Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells-in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;318(2):562–70.
80. Andrade F, Goycoolea F, Chiappetta DA, das Neves J, Sosnik A, Sarmiento B. Chitosan-Grafted Copolymers and Chitosan-Ligand Conjugates as Matrices for Pulmonary Drug Delivery. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2011;2011:1–14.
81. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;50 Suppl 1:S91–101.
82. Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, Takeuchi H, Kawashima Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2005;102(2):373–81.
83. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy V V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*. 2008;9(7):1837–42.

84. Leitner VM, Walker GF, Bernkop-Schnürch A. Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2003;56(2):207–14.
85. Makhlof A, Werle M, Tozuka Y, Takeuchi H. Nanoparticles of glycol chitosan and its thiolated derivative significantly improved the pulmonary delivery of calcitonin. *International journal of pharmaceutics.* 2010;397(1-2):92–5.
86. Dal Pozzo A, Vanini L, Fagnoni M, Guerrini M, De Benedittis A, Muzzarelli RAA. Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-crosslinked reacylated chitosans. *Carbohydrate Polymers.* 2000;42(2):201–206.
87. Zhang X, Zhang H, Wu Z, Wang Z, Niu H, Li C. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2008;68(3):526–34.