

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS SOBRE FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE
NANOPARTÍCULAS POR COMPLEXAÇÃO ORGANOMETÁLICA PARA
ENTREGA DE FÁRMACOS POR VIA PULMONAR E VIA ORAL**

JOÃO GUILHERME BARRETO DE MARCHI

Porto Alegre, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS SOBRE FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE
NANOPARTÍCULAS POR COMPLEXAÇÃO ORGANOMETÁLICA PARA
ENTREGA DE FÁRMACOS POR VIA PULMONAR E VIA ORAL**

Tese apresentada por **João Guilherme Barreto De
Marchi** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientador (a): Profa. Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, 2019

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado/Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em dia/mês/ano, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Valquíria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Tanira Alessandra Silveira Aguirre

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

De Marchi, João Guilherme Barreto
ESTUDOS SOBRE FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE
NANOPARTÍCULAS POR COMPLEXAÇÃO ORGANOMETÁLICA PARA
ENTREGA DE FÁRMACOS POR VIA PULMONAR E VIA ORAL / João
Guilherme Barreto De Marchi. -- 2019.
113 f.
Orientadora: Silvia Stanisçuaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2019.

1. Vetorização ativa. 2. Nanopartículas. 3. Câncer
de pulmão. 4. Diabetes. I. Guterres, Silvia
Stanisçuaski, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Cosmetologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Farmácia, no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Departamento de Bioquímica. Parte dele também foi realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal, sob a coordenação e orientação do professor António José Ribeiro. O autor recebeu bolsa de estudos da Capes.

Dedicatória

Dedico essa tese aos meus pais (Oswaldo Alberto De Marchi e Maria Betânia Barreto De Marchi), fonte de inspiração para o meu esforço e dedicação. Dedico também essa tese à minha esposa Maíra Kerpel dos Santos por ter sido minha companheira e incentivadora nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sílvia Guterres, pela oportunidade, confiança, pelos ensinamentos, apoio e incentivo durante todos estes anos de convivência.

Ao professor António José Ribeiro, da Universidade de Coimbra, pela oportunidade, amizade e pelo imenso aprendizado.

Aos professores Adriana Pohlmann, Fábio Klamt, Vladimir Lavayen e Karina Paese, pela colaboração nos estudos realizados.

À CAPES pela bolsa de doutorado no Brasil e de doutorado sanduíche no exterior, e ao PPGCF pela oportunidade de poder realizar este trabalho.

Ao Rodrigo Cé, pela grande amizade, apoio e sorvetes proporcionados nesta caminhada, um exemplo de pesquisador e amigo.

À Afra Torge, pelas ajudas e incentivos com o projeto e amizade.

Aos colegas de laboratório do lab 405 pelos adoráveis anos de convívio.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra-PT, especialmente à Margarida e Ilária.

Às minhas irmãs, Rafaela e Juliana pelo incentivo e carinho.

À Maíra Kerpel dos Santos, meu amor, pela amizade, companheirismo, incentivo, apoio, e por compartilhar comigo dos mesmos sonhos, trazendo paz e conforto, tornando mais fácil a finalização desta etapa.

Aos meus pais Maria Betânia e Osvaldo Alberto, pelo exemplo, amor imenso, incentivo, carinho e por sempre acreditar e apoiar os meus sonhos, tornando possível a sua realização. Sem vocês nada seria possível, muito obrigado!

Epígrafe

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Os nanocarreadores funcionalizados são capazes de melhorar características farmacocinéticas, como biodisponibilidade, redução de dose, absorção ativa, aumento da eficácia e redução dos efeitos colaterais. Diferentemente da maioria das funcionalizações nanopartículas da literatura, que utilizam ligações covalentes, nesse estudo foi feita a funcionalização de nanopartículas revestidas com quitosana, através da interação organometálica. Foram utilizados dois sistemas nanométricos diferentes, um de administração por via pulmonar de pó redispersível para o tratamento de câncer de pulmão e outro para aumentar a proteção e absorção da insulina por via oral. No primeiro, a complexação foi realizada através da adição de ferro em suspensão de nanocápsulas de triclosan e α -bisabolol, que possuem atividade antitumoral, e o ligante foi o ácido ascórbico, que quando oxidado é reconhecido pela GLUT1, receptor da glicose superexpressado por células tumorais. A funcionalização, comprovada por medidas de potenciometria, potencial zeta e análises de infravermelho (FTIR), provou não causar instabilidades no sistema, o pó de microaglomerados de nanocápsulas funcionalizadas ou não, mostrou ser redispersível e atingiu as regiões mais profundas do pulmão em concentrações de triclosan citotóxicas efetivas para o tratamento de células tumorais *in vitro*, mesmo sem atingir a dose tóxica pulmonar reportada na literatura. No segundo sistema desenvolvido, a complexação organometálica foi promovida através da adição de zinco em suspensão de nanopartículas de alginato/dextrana complexadas com quitosana carregando insulina, como ligante foi utilizado imunoglobulina G, que tem o seu fragmento cristalizável (Fc) reconhecido pelo receptor neonatal de Fc. Após a funcionalização as nanopartículas demonstraram uma redução de sua polidispersividade, tamanho e aumento da estabilidade. A funcionalização foi comprovada pela técnica de FTIR e calorimetria diferencial exploratória, e as nanopartículas funcionalizadas mostraram potencial para aplicação por via oral. Através dos resultados obtidos foi possível verificar que a funcionalização em ambos os casos foi efetiva e não provocou instabilidades no sistema, tendo até mesmo melhorado a estabilidade e o perfil granulométrico das nanopartículas de alginato.

Palavras chave:

Vetorização ativa; Nanopartículas; Câncer de pulmão; Diabetes.

ABSTRACT

Functionalized nanocarriers are able to improve pharmacokinetics characteristics, as bioavailability, reducing dose, promoting active absorption, increasing efficacy and reducing collateral effects. Differently from the majority of functionalized nanoparticles described in the literature, which use covalent bonds, the nanoparticles functionalization was promoted by organometallic interaction. As proof of concept two different models were utilized, the first was an inhalable redispersible powder to be administered into the lungs to treat lung cancer, and the second one a system to protect and increase the absorption of insulin by oral route. In the first, the complexation was promoted by iron addition into a triclosan and α -bisabolol nanocapsule suspension, which has antitumoral activity, and the ligand was ascorbic acid, that when oxidized can be recognized by GLUT1, a glucose receptor overexpressed by tumor cells. The functionalization, proved by potentiometry, potential zeta and infra-red (FTIR) measurements, did not alter system's stability, the obtained powder of non and functionalized nanocapsules, showed to be redispersible and reached the deepest parts of lung in *in vitro* triclosan and α -bisabolol effective antitumoral concentrations, despite not being toxic concentration in both drugs for lung health cells according with literature. In the second developed system, the organometallic complexation was promoted by zinc addition onto alginate/dextran nanoparticles complexed with chitosan carrying insulin, using immunoglobulin G, as ligand, which has its fragment crystallizable (Fc) recognized by neonatal Fc receptor (FcRn). After functionalization the nanoparticles showed a reduction in polydispersity, size and increase in stability. The functionalization was proved by FTIR and differential scanning calorimetry, and the functionalized nanoparticles showed potential to be administered by oral route. Through the obtained results it is possible to verify that functionalization was effective in both cases and it did not cause instabilities, even improving granulometric profile and stability of alginate nanoparticles. The two platforms are potentially adequate to administer other similar drugs by pulmonary and oral route.

Keywords:

Active targeting; Nanoparticles; Lung cancer; Diabetes.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	19
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais	28
3. CAPÍTULO I	29
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS I	31
4.1 Objetivos Específicos	32
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA I	33
5.1 Câncer de pulmão	34
5.2 Triclosan	35
5.3 Enzima de síntese de ácido graxo (FAS)	36
5.4 α -bisabolol	37
5.5 Nanopartículas como sistemas carreadores	38
5.6 Desenvolvimento de pó inalável por spray-dryer	43
6. MANUSCRITO I	47
7. CAPÍTULO II	63
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS II	65
8.1 Objetivos Específicos	66
9. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA II	67
9.1 Diabetes	68
9.2 Via oral e insulina	69
9.3 Nanopartículas contendo insulina	70
9.4 Funcionalização de nanopartículas	71
10. MANUSCRITO II	75
11. DISCUSSÃO GERAL	89
12. CONCLUSÕES	97
13. PERSPECTIVAS FUTURAS	99
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, para a melhor organização e discussão dos resultados obtidos em cada etapa. Assim, este trabalho encontra-se dividido da seguinte forma:

1. Introdução, contendo a caracterização e justificativa do estudo proposto;
2. Objetivos gerais
3. Capítulo 1;
 - 3.1 Objetivos específicos
 - 3.2 Revisão Bibliográfica;
 - 3.3 Manuscrito:
“Triclosan and alfa-bisabolol-loaded nanocapsule functionalized with ascorbic”, publicado no periódico Journal of Drug Delivery Science and Technology.
4. Capítulo 2;
 - 4.1 Obejtivos específicos;
 - 4.2 Revisão Bibliográfica;
 - 4.3 Manuscrito II:
“IgG functionalized polymeric nanoparticles for oral insulin administration”, publicado no periódico International Journal of Pharmaceutics.
4. Discussão geral, visando um entendimento global de todas as etapas realizadas no trabalho;
5. Conclusões;
6. Referências bibliográficas.

A nanotecnologia se apresenta como uma ferramenta útil para melhora de fatores chave para o adequado perfil farmacocinético como solubilidade aparente, liberação controlada, redução da degradação e entrega do fármaco no local de ação, possibilitando a redução da dose e dos efeitos colaterais (ALLAKER; REN, 2008; CASTER et al., 2017).

Muitas das características das nanopartículas podem ser controladas permitindo um veículo de entrega de fármaco com as propriedades físicas desejadas. Os nanocarreadores também podem ser utilizados para melhorar a entrega de um fármaco em um determinado sitio de ação, seja por características inerentes dos nanomateriais ou intencional, como pela adição de um ligante de superfície (CASTER et al., 2017). A segunda estratégia já foi utilizada para melhorar o desempenho de nanopartículas carreando diversos tipos de fármacos, incluindo antitumorais (OLIVEIRA et al., 2017, 2018; POURJAVADI; TEHRANI; MOGHANAKI, 2015) e insulina (LIU et al., 2018).

Para manter um ligante fixado à superfície da nanopartícula, geralmente, são necessárias reações que envolvem ligações covalentes (BETANCOURT et al., 2009; LIU et al., 2018; SHAN et al., 2015). Diferentemente, a técnica desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa permite fazer a funcionalização de nanopartículas que possuem quitosana, através da adição de metais quelantes, como o ferro e o zinco (BENDER et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). Esse método consiste em uma interação organometálica do metal com par de elétrons livres da amina, presente na quitosana (KLEPKA et al., 2008; REYNAUD et al., 2011; ZIMMERMANN et al., 2010), e com o ligante que se pretende funcionalizar a partícula (ANTONOW et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2018). Essa metodologia é versátil e capaz de promover a interação de diferentes tipos de ligantes, como peptídeos (MAYER et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017) ou moléculas pequenas (OLIVEIRA et al., 2018).

As nanopartículas funcionalizadas podem ser utilizadas para diferentes finalidades. Entre elas está a aplicação por via pulmonar, permitindo uma liberação controlada, aumento da estabilidade e da eficácia da formulação (MURALIDHARAN et al., 2015). Para ter acesso por essa via, geralmente, se faz a administração de um pó redispersível com nanopartículas, que ao se depositar no trato respiratório, libera os carreadores nanoestruturados (ANGELO et al., 2015). Com isso é possível fazer uma entrega do fármaco diretamente no local de ação, reduzindo a dose, efeitos

colaterais e aumentando a seletividade da mesma para tratamento de doenças pulmonares.

O nosso grupo desenvolveu uma metodologia de obtenção de microaglomerados redispersíveis de nanocápsulas (MÜLLER et al., 2000; POHLMANN et al., 2002), sendo empregada para aumentar a estabilidade (HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2012), viabilizar administração por via oral (ANDRADE et al., 2018; BECK et al., 2005) ou por via pulmonar (D'ALMEIDA et al., 2017). Também foi patenteada uma técnica para a produção de pó de nanopartículas sem a necessidade da rota-*evaporação*, permitindo um ganho metodológico (GUTERRES et al., 2015).

Hoje a principal doença pulmonar, de acordo com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), é o câncer de pulmão, o qual foi estimado em 2018, ser o tipo de câncer mais frequente, sendo a maior causa de mortes, responsável por 1 a cada 5 casos (1,8 milhões de mortes, 18,4% do total) e exibindo uma alta mortalidade, com uma razão total de 0,87 mortes por incidência (BRAY et al., 2018).

O seu tratamento é baseado em antitubulinas, antimetabólitos e sais de platina (NAWAZ; WEBSTER, 2016); no entanto, os fortes efeitos colaterais têm levado ao desenvolvimento de novas terapias, que apresentam um alto custo, surgimento de resistência tumoral e são específicos só para alguns tipos de tumores (CHOI et al., 2010; CHONG; JÄNNE, 2013). Desta forma, o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento tem elevada necessidade e relevância.

Compostos conhecidos como o triclosan, α -bisabolol e ácido ascórbico demonstraram possuir atividade antitumoral (SADOWSKI et al., 2014; WU et al., 2018; YUN et al., 2015). Os dois primeiros possuem alta lipofilicidade sendo bons candidatos a nanoencapsulação, já o terceiro é hidrofílico e reconhecido por um receptor superexpressado por células tumorais, podendo ser utilizado com um ligante de superfície e vetorização ativa. Uma vez estabelecido os parâmetros de funcionalização, a formulação de nanocápsulas pode ser seca, obtendo-se um pó redispersível a ser administrado pela via pulmonar, reduzindo a dose, efeitos colaterais e aumentando a eficácia do tratamento.

Uma segunda forma de potencial utilização das nanopartículas funcionalizadas é para melhorar o tratamento de algumas doenças específicas por via oral, principalmente para o transporte de moléculas e peptídeos de baixa

absorção, promovendo a internalização das partículas por receptores específicos e desta forma, favorecendo a melhora no desempenho da terapia medicamentosa (LIU et al., 2018; SHI et al., 2018). Um exemplo de molécula que possui grandes impedimentos para o tratamento por via oral é a insulina. A administração da mesma por via oral, para o tratamento da *diabetes mellitus*, consiste em um grande desafio, já que possui baixa biodisponibilidade por via oral, sendo o foco de pesquisa de várias indústrias farmacêuticas (DERENNE et al., 2016; MO et al., 2014).

A insulina possui pouca permeabilidade através do epitélio intestinal e degradação no trato gastrointestinal (GI), resultando em menos de 0,5% da dose administrada por via oral atingindo a circulação sistêmica o que acarreta em sua baixa biodisponibilidade (CARINO; MATHIOWITZ, 1999; DAMGE et al., 2010). A vetorização ativa pode ser usada para promover uma maior internalização das partículas e da insulina pelo epitélio intestinal. Muitos ligantes de superfície já foram estudados para aumentar a absorção da mesma, entre eles o folato, os peptídeos de penetração celular ou CPP, vitamina B12, valina e transferrina (CHALASANI et al., 2007; JAIN; JAIN, 2015; JAIN et al., 2012; LIU et al., 2018; SHAN et al., 2015; ZHU et al., 2016). No entanto, um alvo que tem chamado atenção é o receptor neonatal de Fc, o qual promove a transcitose e reciclagem de anticorpos. Uma formulação de nanopartículas carreando insulina e decorada com fragmento cristalizável (Fc) de imunoglobulina G foi capaz de reduzir 30-45% o nível de glicose no sangue, o dobro quando comparada a uma nanopartículas não funcionalizada (PRIDGEN et al., 2013).

As nanopartículas hidrofílicas de alginato/dextrana complexadas com quitosana apresentam resultados interessantes por serem capazes de proteger a insulina da degradação em pH estomacal e enzimática, e promovem a sua liberação no intestino (LOPES et al., 2016; WOITISKI et al., 2009a), no entanto, essas formulações ainda dependem da absorção passiva. Essas nanopartículas podem ser funcionalizadas com IgG, que contem o Fc, através da interação organometálica, com zinco (OLIVEIRA et al., 2017, 2018) ou ferro (BENDER et al., 2014), utilizando o mesmo princípio descrito anteriormente para as nanocápsulas de triclosan e α -bisabolol. Com isso, pode ser obtida uma nanopartícula que protege a insulina da degradação no trato GI e promovem a internalização ativa da mesma, criando uma plataforma versátil para a administração de peptídeos de baixa absorção por via oral.

Desta forma, esse trabalho objetivou realizar o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipofílicas e hidrofílicas funcionalizadas, através de interação organometálica para administração por via pulmonar e por via oral, tendo em vista o tratamento de câncer pulmão e a diabetes, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Estudar a funcionalização de nanopartículas lipofílicas e hidrofílicas por meio de interação organometálica para administração por via oral e por via pulmonar, de nanocápsulas poliméricas e nanopartículas de alginato/dextrana.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS I

4.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar as formulações de nanocápsulas lipofílicas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) carregadas com triclosan e α -bisabolol, funcionalizadas com ácido ascórbico, através de parâmetros de distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, presença de cristais ou agregados, potencial zeta, eficiência de encapsulação, eficiência de adsorção e teor de triclosan;
- Caracterizar as ligações formadas na superfície das nanocápsulas pela funcionalização, através de espectrometria de infravermelho;
- Caracterizar os efeitos citotóxicos da suspensão de nanocápsula de poli(ϵ -caprolactona) contendo de α -bisabolol e triclosan revestidas com quitosana e funcionalizadas com ácido ascórbico em ensaios *in vitro* frente linhagem celular de câncer pulmonar (ATCC-A549);
- Desenvolver e caracterizar uma formulação pulverulenta da suspensão de nanocápsulas, a fim de verificar a sua viabilidade para aplicação por via pulmonar.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA I

5.1 Câncer de pulmão

Em 2012 houve 14 milhões de novos casos, com 8 milhões de mortes relacionadas ao câncer, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo. Para cada 100.000 habitantes, 182 terão a doença e 102 morrerão da mesma. Entre os homens, a maior incidência é de câncer de pulmão, equivalendo a 16,7% dos casos reportados, e 34,2 casos para cada 100.000 habitantes. Entre as mulheres, o câncer de pulmão é o terceiro mais frequente, representando 8,7% dos casos (STEWART; WILD, 2014).

De acordo com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), foi estimado que em 2018 18,1 milhões de novos casos de câncer ocorreram ao redor do mundo, resultando em 9,6 milhões de mortes. Entre eles, o câncer de pulmão continua sendo a maior causa de mortes em 2018 (Figura 1), responsável por aproximadamente 1 em cada 5 casos (1,76 milhões de mortes, 18,4% do total). Este exibe uma alta mortalidade com uma razão total de 0,84 mortes por incidência (BRAY et al., 2018).

Por razões clínico-patológicas, o câncer de pulmão é geralmente categorizado em câncer de pulmão de células pequenas e não pequenas. O segundo tipo representa grande maioria dos casos e é subdividido em três tipos, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinomas de células grandes (MÜLLER et al., 2015; SUN; SCHILLER; GAZDAR, 2007).

O fato de as células cancerígenas possuírem um metabolismo acelerado, faz com que o microambiente tumoral seja pobre em nutrientes, hipóxico e hipoglicêmico, o que induz anormalidades genéticas (GILLIES; ROBEY; GATENBY, 2008; KIM; GAO; DANG, 2007). Uma das mutações mais comuns são nos genes *KRAS* e *BRAF*, os quais são os proto-oncogenes mais ativados em todos os tipos de tumores humanos (~50%) (KRANENBURG, 2005; RAJAGOPALAN et al., 2002).

As mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* promovem uma maior expressão da GLUT1, receptor da glicose, permitindo maior aporte energético as células portadoras da mutação, em resposta ao ambiente pobre em nutrientes, fazendo com que essas células se tornem mais aptas a sobreviver e se replicar no ambiente tumoral (YUN et al., 2009). A superexpressão da GLUT1 foi observada em aproximadamente 50% casos de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas no Hospital Universitário da Cidade de Nagoya e os portadores da

mutação tiveram um elevado decréscimo na taxa de sobrevivência (SASAKI et al., 2012), o qual também é observado em estudos com grupos maiores de pessoas (MASCAUX et al., 2005).

Os tratamentos de câncer de pulmão têm sido tradicionalmente baseados em inibidores de tubulinas, antimetabólitos e derivados de platina (NAWAZ; WEBSTER, 2016). Os fortes efeitos colaterais, provocados pelas terapias convencionais, têm fomentado o desenvolvimento de novas terapias mais específicas, como inibição de receptores da angiogênese, fator de crescimento epidérmico e quinase de linfoma anaplástico. Entretanto, a alta especificidade e o elevado custo dessas terapias, aliada ao fato de que já tem sido reportada a resistência aos tratamentos (CHOI et al., 2010; CHONG; JÄNNE, 2013), tornam o desenvolvimento de novas terapias indispensáveis.

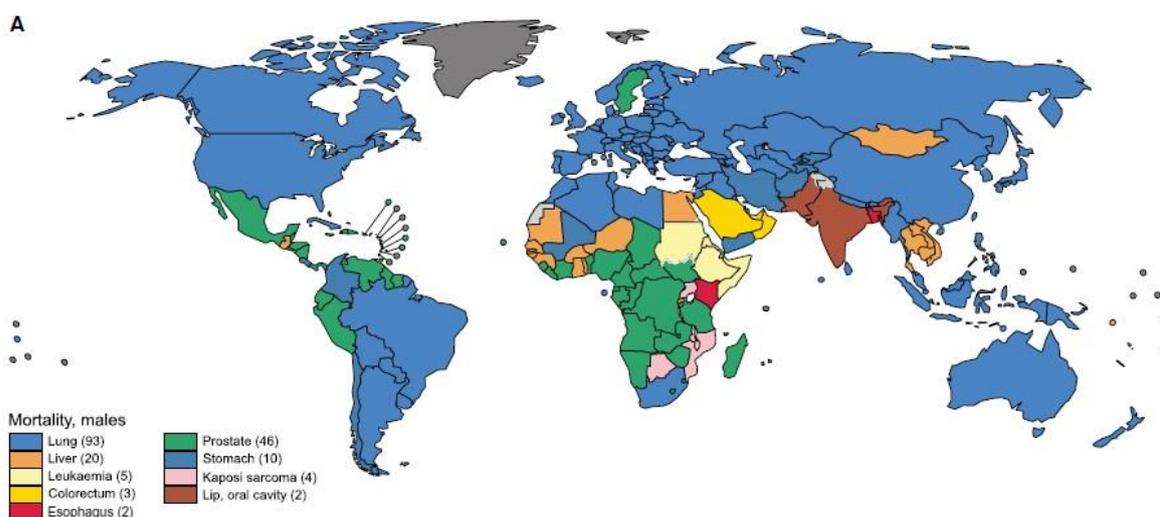


Figura 1: Estimativa da mortalidade por câncer para homens ao redor do mundo em 2018, dentre eles se destaca o de pulmão sendo o de maior mortalidade em 93 países (BRAY et al., 2018).

5.2 Triclosan

O triclosan (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter), é um agente antimicrobiano não-iônico da classe dos bisfenóis, com um amplo espectro de ação. Este vem sendo usado por mais de 40 anos em uma série de cosméticos e produtos de

higiene pessoal. Dentre eles, podemos citar produtos do dia-a-dia, aparatos médicos, sabonetes, produtos de limpeza facial, higiene oral, e mais recentemente, em desodorantes aerossóis (RODRICKS et al., 2010; SCHWEIZER, 2001; UENO et al., 2013).

A sua eficácia contra bactérias gram-negativas, gram-positivas, alguns tipos de fungos e micobactérias, se dá através do bloqueio do sítio ativo da enoil-(proteína transportadora de acila) redutase, a qual é uma enzima com função essencial na síntese de ácido graxos (FAS) em fungos e bactérias (HEATH; WHITE; ROCK, 2001; MCMURRY; OETHINGER; LEVY, 1998; PARIKH; XIAO; TONGE, 2000). Como o triclosan possui uma baixa toxicidade aguda, ele é tido como seguro e sua utilização tem sido bem tolerada (SCHWEIZER, 2001; YANG et al., 2015), chegando ao uso anual estimado de mais de 650 toneladas nos Estados Unidos e Europa (HALDEN; PAULL, 2005).

O mecanismo de ação do triclosan está relacionado à inibição da enzima ácido graxo sintase (FAS, do inglês *fatty acid synthase*), mais especificamente ao domínio enoil-(proteína transportadora de acila) redutase (NAD), em bactérias gram-negativas, gram-positivas e micobactérias. Esta inibição promove um desarranjo na membrana plasmática, causando a morte celular (MCMURRY; OETHINGER; LEVY, 1998; SCHWEIZER, 2001). Especificamente, foi comprovada a capacidade do triclosan de inibir a FAS humana no domínio enzimático NAD do tipo I (LIU et al., 2002).

5.3 Enzima de síntese de ácido graxo (FAS)

A FAS humana, que é formada por seis domínios enzimáticos e um transportador, é pouco expressa nas células humanas normais, com exceção das do fígado, tecido adiposo, e glândulas mamárias de lactantes. Sua função é promover a síntese de ácido graxo endógeno. Como a maior parte do ácido graxo presente no corpo provém da alimentação, em indivíduos adultos a FAS é pouco expressa. Sendo assim, em células normais, a sua inibição não tem impacto significativo na viabilidade celular (LUPU; MENENDEZ, 2006).

Esta multi-enzima tem recebido crescente atenção em estudos voltados ao combate ao câncer, uma vez que é amplamente expressa por células tumorais em

diversas linhagens de cânceres, como câncer de próstata, de mama, cérebro, pulmão, ovário, endométrio, colón, tireoide, bexiga, rim, fígado, pâncreas, estômago, esôfago, olho, mesotélio e pele (SADOWSKI et al., 2014). Por ter um importante papel na replicação celular, estar relacionada à síntese de fosfolipídios (FLAVIN et al., 2010), e ter pouca expressão em células normais, a FAS tem sido proposta como um potencial alvo para a terapia contra o câncer (KUHAJDA et al., 2000; LUPU; MENENDEZ, 2006; SADOWSKI et al., 2014).

5.4 α -bisabolol

O α -bisabolol é um álcool sesquiterpênico monocíclico natural, assim como o triclosan, possui um elevado caráter lipofílico, com um Log D = 5,07 em pH = 7. Foi inicialmente isolado da planta *Matricaria chamomilla*, pertencente à família Asteraceae. Sua forma mais encontrada na natureza e mais ativa é o α -(-)-bisabolol, também conhecido como levomentol (DARRA et al., 2008).

Devido suas propriedades α -bisabolol tem sido aplicado em cosméticos como pós-barba, loção corporal, desodorante, batom, protetor solar, produtos para bebês e etc. A camomila, que possui um elevado percentual de α -bisabolol, teve sua atividade cicatrizante e anti-inflamatória testada, *in vitro* e *in vivo*, apresentando resultados melhores que os com corticoides, tradicionalmente utilizados na clínica (VILLEGAS et al., 2001).

Além disso, α -bisabolol também tem mostrado um forte potencial em bloquear nervos periféricos, tendo ação similar à da lidocaína, reduzindo a excitabilidade e aumentando o limiar da dor, mas sem ser por uma via uso-dependente (ALVES et al., 2010). Essa propriedade é particularmente interessante para o tratamento de doenças como o câncer.

Em estudos *in vitro* comprovou-se a capacidade do α -bisabolol inibir o crescimento de linhagens células tumorais pancreáticas (DARRA et al., 2008; SEKI et al., 2011; UNO et al., 2016), prostáticas, cervicais, esofágicas, hepáticas (CHEN et al., 2010), gliomas (CAVALIERI et al., 2004) e pulmonares (WU et al., 2018), com valores inibitórios variando de 2 - 50 μ M, também mostrou atividade *ex-vivo* em células de leucemia linfocítica crônica B com IC₅₀ de 42 \pm 15 μ M (RIGO et al., 2018). Em ensaios *in vivo* com camundongos nude foi verificada uma redução significativa

da massa tumoral após administração de α -bisabolol (1000 mg/Kg) uma vez por semana por 3 semanas (SEKI et al., 2011). Quando avaliados modelos *ex-vivo* de células de glioma recém extraídas de pacientes, o α -bisabolol foi capaz de matar células malignas na concentração de 42 μ M, enquanto células saudáveis só foram inibidas na concentração de 68 μ M (RIGO et al., 2018).

5.5 Nanopartículas como sistemas carreadores

As nanopartículas são ótimos carreadores de fármacos, pois são úteis para resolver problemas como toxicidade, posologia e efeitos colaterais, pois melhoram características farmacocinéticas como a solubilidade aparente e proporcionam liberação controlada e entrega do fármaco no sítio de ação (ALLAKER; REN, 2008; PATEL et al., 2013). Nas últimas três décadas, as nanoformulações têm sido estudadas como alternativa para melhorar a entrega de fármaco no local do tumor, aumentando a eficácia do antitumoral e reduzindo os efeitos indesejados no tecido normal. Muitas dessas nanoformulações mostraram resultados com um aumento significativo na resposta ao tratamento (KOTHAMASU et al., 2012; PATEL et al., 2013; ZHAO et al., 2013).

Desde a publicação por Gref e colaboradores (1994) de uma plataforma tecnológica capaz de evitar as defesas naturais do corpo e manter as nanopartículas em circulação por longos períodos de tempo, o interesse na potencial aplicação das mesmas para carreamento de fármaco vem ganhando cada vez mais atenção, tanto das indústrias farmacêuticas como de grupos de pesquisa. Só nos Estados Unidos, entre os anos de 2005 e 2008, houve um aumento de 74% no número de novas companhias que trabalhavam com “*drug delivery*”, os quais, que desenvolvem plataformas nanocarreadoras de fármacos, passando de 19 para 33 empresas na área (MAINE; THOMAS, 2017).

Nanocápsulas (NC) poliméricas são exemplo de sistemas carreadores nanoparticulados caracterizadas por possuírem uma concha polimérica, sendo especialmente apropriadas para serem carregadas com agentes lipofílicos, como o triclosan. Através da nanoencapsulação em NC, a solubilidade aparente de fármacos e conseqüentemente a sua biodisponibilidade podem ser significativamente aumentadas. Além do mais, a dose e frequência de aplicação podem ser reduzidas

devido à liberação controlada e a entrega do fármaco no local de ação, reduzindo a ocorrência de efeitos colaterais (MAYER et al., 2014).

Uma das principais áreas de estudo das NCs é relacionada ao tratamento de câncer, pois a maioria dos antitumorais possui uma alta lipofilicidade, alta citotoxicidade e uma série de efeitos colaterais (LIU; MIYOSHI; NAKAMURA, 2007; THOMAS, M. B. et al., 2013). As nanocápsulas também são capazes de se aproveitarem das características fisiopatológicas da vasculatura tumoral, a qual está em alta densidade e dilatada, aumentando o efeito de permeabilidade e retenção das mesmas (HERVELLA et al., 2008; KOTHAMASU et al., 2012; LIU; MIYOSHI; NAKAMURA, 2007).

Nosso grupo recentemente desenvolveu um sistema de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) contendo um núcleo de α -bisabolol carreando triclosan com quitosana revestindo a superfície (DE MARCHI et al., 2017). Estas nanocápsulas desenvolvidas foram capazes de reduzir significativamente a concentração inibitória mínima (até 146x) em três cepas bacterianas padrão (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e uma cepa padrão fúngica (*Candida albicans*), quando comparados aos dados reportados para os fármacos livres.

O sucesso obtido com a nanoencapsulação poderia acarretar no aumento da eficácia do mesmo sistema nanoestruturado, em ensaios com células de câncer pulmonar, quando comparados ao fármaco livre. No entanto, para melhorar a formulação e reduzir qualquer possível efeito adverso, se fez necessária a funcionalização superfície das nanocápsulas, a qual já se mostrou eficaz em estudos com células cancerígenas (POURJAVADI; TEHRANI; MOGHANAKI, 2015).

5.5.1 Modificação de superfície para vetorização ativa

A vetorização ativa de nanopartículas visa, através da modificação da superfície, promover um reconhecimento ativo de um ligante, por um receptor, ou o ligante reconhecer ativamente uma determinada estrutura, em um sitio específico. Essa estratégia gera um aumento da efetividade e, conseqüentemente, redução da dose e da toxicidade do fármaco carregado (CHENG et al., 2012; TSENG et al., 2007; TSENG et al., 2009).

A funcionalização de superfície por complexação metálica, com a quitosana, é uma estratégia interessante, pois promove a interação de ligantes com a superfície das nanopartículas, sem o surgimento de ligações covalentes, mantendo as características originais das moléculas. A complexação metálica já foi realizada com sucesso, utilizando-se zinco e ferro (BENDER, E. A. *et al.*, 2014; MAYER *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Esta técnica requer um metal que se ligue através de uma interação organometálica à quitosana para ancorar o ligante de superfície, o qual irá interagir com o alvo.

Compostos como o ferro e o ácido ascórbico também poderiam ser utilizados para a funcionalização. O ferro é importante para a vida e possui papel relevante em vários mecanismos celulares, como geração de energia, transporte de oxigênio, síntese de DNA e proliferação celular (revisado em HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2005; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2005). Células tumorais possuem uma maior demanda por ferro, quando comparadas a células normais, devido à alta taxa de replicação. Assim, estas possuem uma elevada expressão de receptores de transferrina, transportador de ferro, resultando em uma alta taxa de internalização do ferro (KALINOWSKI; RICHARDSON, 2005; LE; RICHARDSON, 2002).

O controle dos níveis de ferro intracelular é crítico para o crescimento tumoral, pois quando em baixa concentração, possui atividade indutora do gene 1 (Ndr_g1), o qual é um dos genes responsáveis pela supressão do crescimento e metástase do câncer em várias linhagens de células cancerígenas (LE; RICHARDSON, 2004). Sua depleção também promove a interrupção do ciclo em G1/S, levando a apoptose celular (LE; RICHARDSON, 2002). No entanto, quando em elevada concentração intracelular, o ferro promove estresse oxidativo, e como as células tumorais já possuem concentrações superiores deste metal em relação as demais, estas são mais susceptíveis ao estresse oxidativo quando mais ferro é adicionado ao sistema (TARANGELO; DIXON, 2016; TORTI; TORTI, 2013). Este foi escolhido com o metal para promover a ligação cruzada entre a quitosana e o ligante, pois possui elevada capacidade quelante, já tendo a ligação com a quitosana sido caracterizada (KLEPKA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2005; ZIMMERMANN *et al.*, 2010), e demonstrou potencial uso na funcionalização de nanopartículas biodegradáveis contendo revestimento de quitosana (BENDER *et al.*, 2014; MAYER *et al.*, 2014).

O ácido ascórbico (enodiol), vitamina C, é um potente antioxidante presente em diversos alimentos. Do ponto de vista estrutural é completamente dissociado em

pH neutro ($pK_a = 4.2$), possui duas duplas ligações conjugadas que conferem ressonância e reatividade a molécula (LINSTER; VAN SCHAFTINGEN, 2007). Devido à reatividade, possui a capacidade de agir como antioxidante se oxidando ao doar um elétron e estabilizando radicais livres. Essa molécula também interage com metais oxidados, como o Fe^{3+} , presentes em enzimas e reduz o metal a forma ativa, recuperando a atividade da mesma (ENGLARD; SEIFTER, 1986; LINSTER; VAN SCHAFTINGEN, 2007). Ao se oxidar forma o dehidroascorbato (DHA) que é reconhecido e internalizado pelo transportador da glicose GLUT1 (RECZEK; CHANDEL, 2015; YUN et al., 2015), o qual é largamente expresso em vários tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão (SASAKI et al., 2012; VUYYURI et al., 2013). Uma vez dentro da célula, a forma oxidada é reduzida de volta à estrutura da vitamina C, depletando os estoques de glutathione e promovendo estresse oxidativo (LINSTER; VAN SCHAFTINGEN, 2007; YUN et al., 2015), o que leva a apoptose e redução do tumor (VUYYURI et al., 2013; YUN et al., 2015) (Figura 2). Devido à abundância em células tumorais, a GLUT1 é um alvo propício para a vetorização ativa de nanopartículas, tanto que já foi utilizada com sucesso para promover a internalização de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com glicose em células tumorais (VENTURELLI et al., 2016). O ácido ascórbico foi escolhido como ligante para promover a interação da NC com o alvo, pois ao entrar em contato com o ferro (III) promove uma reação de oxirredução resultando em ferro (II) e DHA (LANE et al., 2010), o qual sabe-se ser ativamente reconhecido pela GLUT1.

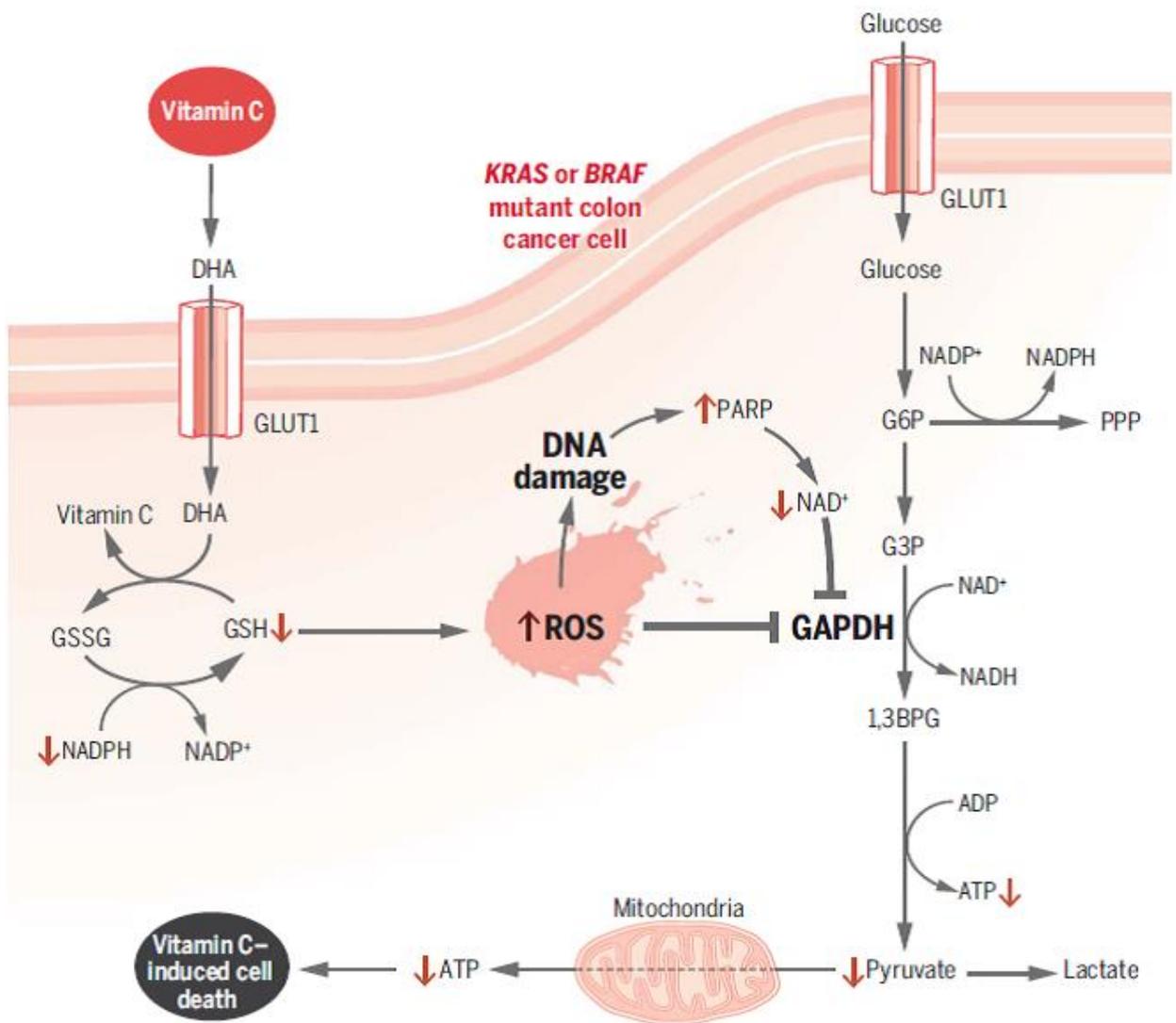


Figura 2: Mecanismo de ação do ácido ascórbico após ser reconhecido e internalizado pela *GLUT1* (Reczek & Chandel, 2015).

As nanocápsulas após a funcionalização (NC_{FINAL}) carregariam diferentes componentes ativos (ácido ascórbico, ferro, quitosana, triclosan e α -bisabolol) (Figura 3), atacando diferentes sítios e aumentando a especificidade para células cancerígenas. O fato de diferentes componentes possuírem atividade citotóxica em células cancerígenas, mas pouca toxicidade em células normais, potencializa, em tese, a desejada citotoxicidade seletiva para células tumorais.

- ▲ - Ácido Ascórbico
- - Ferro
- - Quitosana
- - PCL
- ✦ - Triclosan
- - α -bisabolol

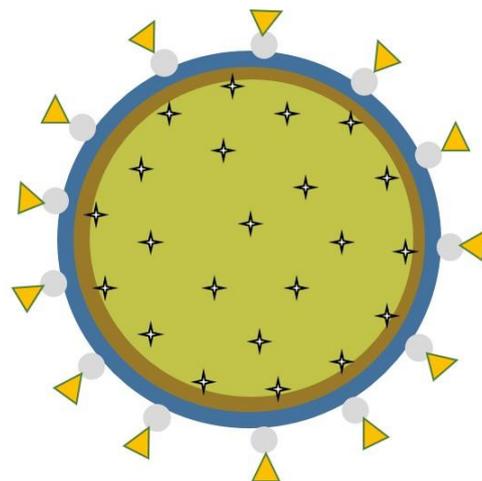


Figura 3: Esquema proposto para nanocápsula após a funcionalização com todos os seus componentes.

5.6 Desenvolvimento de pó inalável por *spray-dryer*

Como este projeto foca no tratamento de uma doença pulmonar, uma formulação contendo um pó inalável está entre as melhores opções, já que esta mostra algumas vantagens quando comparada com às formulações líquidas. Estas têm tendência a sofrer instabilidade físico-química como sedimentação e formação de cristais (AL-HALLAK et al., 2011) ou crescimento de micro-organismos, além de não serem adequadas para administração pulmonar por serem líquidas. Para a obtenção de um pó inalável que se deposite no pulmão, as partículas a serem aplicadas requerem um diâmetro aerodinâmico entre 1-5 μm . Partículas maiores que estas, são depositadas na região orofaríngea, enquanto partículas menores permanecem suspensas no ar e são exaladas durante a expiração (MEHANNA; MOHYELDIN; ELGINDY, 2014) (Figura 4). Os pós inaláveis já foram estudados com sucesso para o tratamento câncer pulmonar (ANGELO et al., 2015; AZARMI et al., 2006; SUNG et al., 2009).

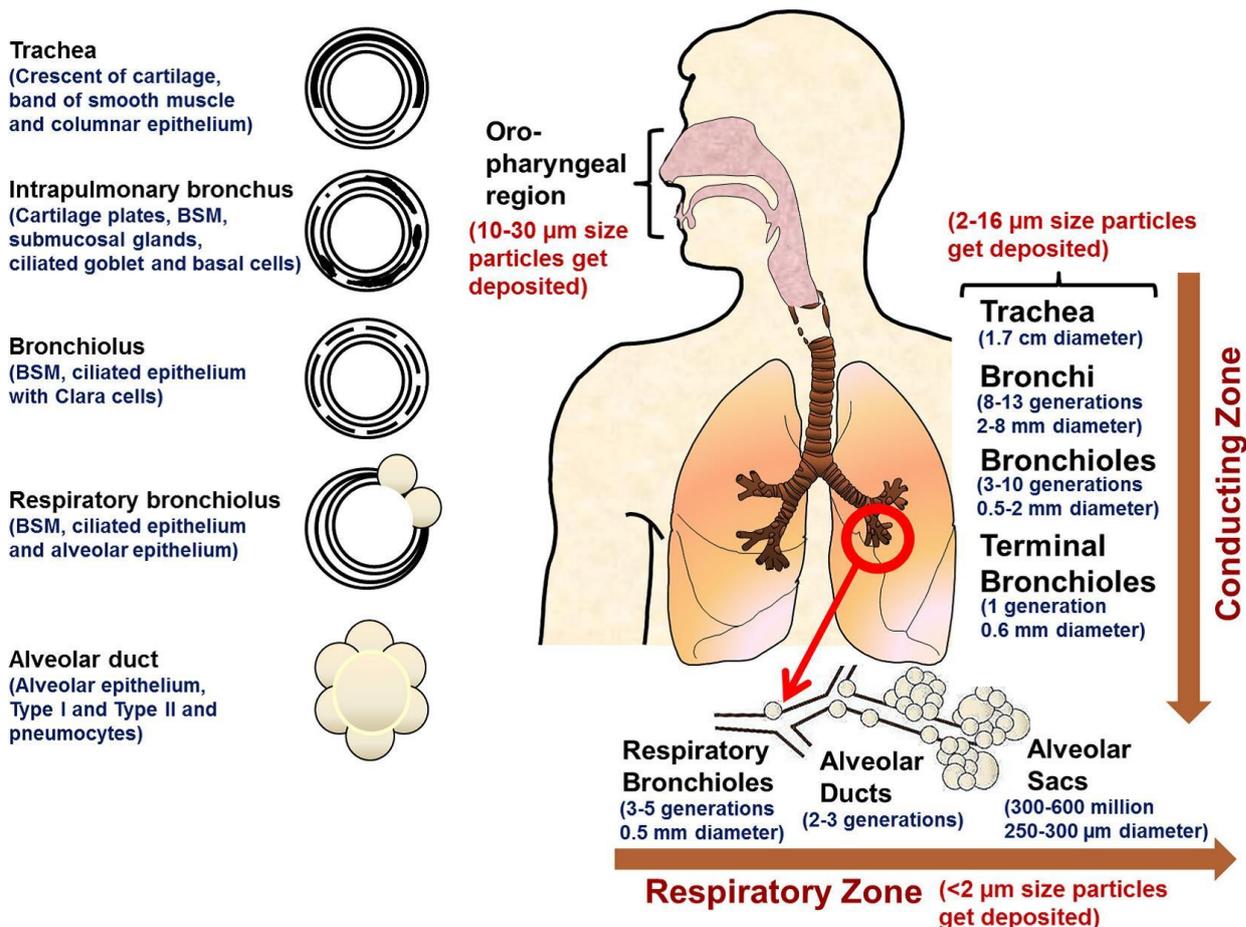


Figura 4: Deposição das partículas de acordo com o tamanho. Figura retirada de (NAHAR et al., 2013).

Para a produção de microaglomerados de nanopartículas em forma de pó para a aplicação pulmonar, a técnica de *spray drying* já foi empregada. Esta técnica consiste em evaporar o solvente da suspensão de nanopartículas resultando um pó seco. A possibilidade de transposição de escala desta técnica é muito importante para o futuro comercial da formulação (WEERS; MILLER, 2015). De acordo com Angelo e colaboradores (2015), dois tipos de nanopartículas secas por *spray-dryer* para o “delivery” pulmonar podem ser obtidas: as micropartículas nano-aderidas e as partículas porosas de agregados de nanopartículas, ambas são obtidas pelo processo de *spray-drying* e são diferenciadas pelo tempo de secagem da gotícula, no primeiro caso há uma secagem longa que permite a redistribuição das nanopartículas por difusão no interior do excipiente, o segundo tipo é obtido por uma secagem rápida, ficando as nanopartículas confinadas a superfície das micropartículas. Quando aspiradas, as micropartículas se depositam em diferentes

partes do trato respiratório e ao em contato com o líquido extrapulmonar, os dois tipos de partículas são capazes de se desintegrarem, redispersando os nanocarreadores, como pode ser observado na Figura 5.

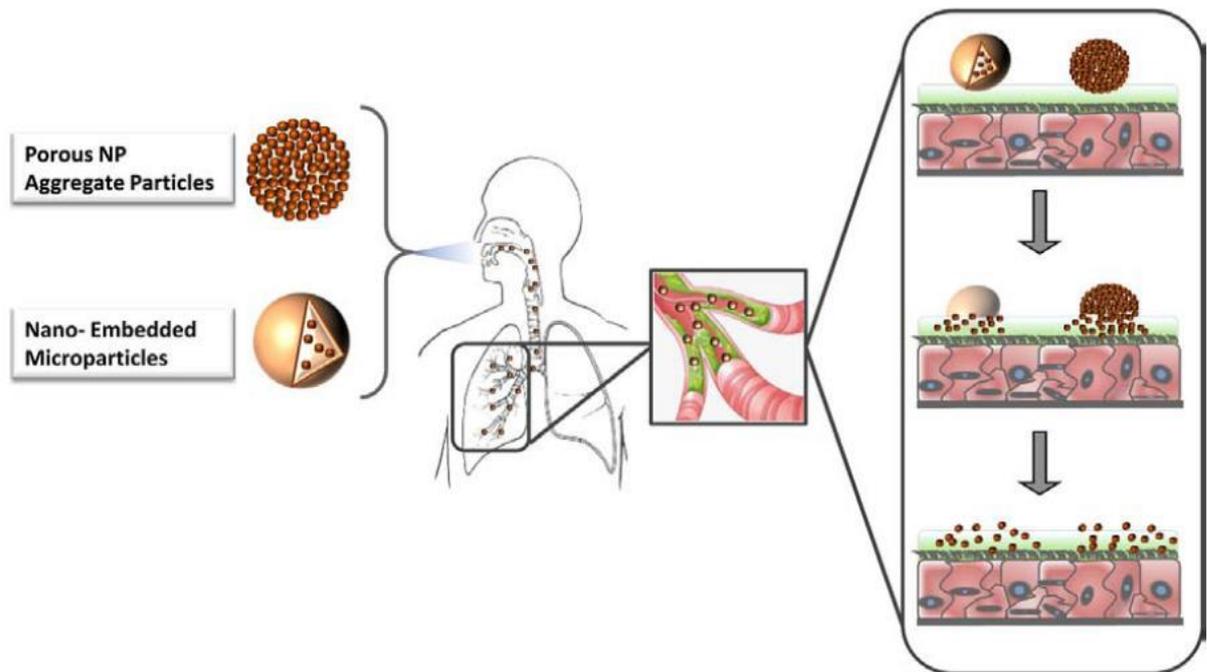


Figura 5: Micropartículas nano-aderidas (*Nano-Embedded Microparticles*) e Partículas Porosas de Agregados de Nanopartículas (*Porous Nanoparticles Aggregate Particles*), quando em contato com líquido pulmonar, redispersam. Adaptado de ANGELO *et al.*, (2015).

Através da técnica de *spray drying* é possível obter micropartículas com propriedades aerodinâmicas adequadas. Essas nanopartículas são secas, com excipientes solúveis em água, os quais se redispersam ao serem depositados no pulmão e entrarem em contato com fluido pulmonar. Sendo assim, é possível o desenvolvimento de uma formulação que faça a entrega do fármaco diretamente no local da doença.

O manuscrito 1 trata do desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas funcionalizadas e subsequente secagem em um pó redispersível para administração por via pulmonar. O manuscrito original foi intitulado: “*Triclosan and alfa-bisabolol-loaded nanocapsule functionalized with ascorbic acid as a dry powder formulation against A549 lung cancer cells*” e foi publicado no periódico “*Journal of Drug Delivery Science and Technology*” conforme referência abaixo.

BARRETO DE MARCHI, JOÃO GUILHERME; CÉ, RODRIGO ; RIBEIRO DOS SANTOS BRUSCHI, LIA FRANCIE ; KERPEL DOS SANTOS, MAÍRA ; PAESE, KARINA ; LAVAYEN, VLADIMIR ; KLAMT, FABIO ; RAFFIN POHLMANN, ADRIANA ; STANISÇUASKI GUTERRES, SILVIA . Triclosan and --bisabolol-loaded nanocapsule functionalized with ascorbic acid as a dry powder formulation against A549 lung cancer cells. JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 74, p. 103463, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103463>

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS II

8.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar as formulações de nanopartículas de alginato/dextrana complexadas com quitosana, através de parâmetros de distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, presença de agregados, potencial zeta, eficiência de encapsulação, eficiência de adsorção e teor de insulina;
- Caracterizar as ligações formadas na superfície das nanopartículas pela funcionalização, através de espectrometria de infravermelho;
- Verificar a influência da concentração de zinco no perfil de liberação da insulina no fluido gastrointestinal simulado.

9. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA II

9.1 Diabetes

O número de pessoas com *diabetes mellitus* quadruplicou nas últimas três décadas se tornando a nona maior causa de morte no mundo. Um em cada 11 adultos no mundo tem essa doença (ZHENG; LEY; HU, 2017). Atualmente os países com o maior número total de pessoas acometidas são a China, a Índia, e Estados Unidos, com o Brasil estando entre os mais afetados (Fig. 6).

Dentre os tipos de *diabetes mellitus* a de tipo 1 é a mais grave, provocado pela disfunção das células β no pâncreas, reduzindo a quantidade de insulina liberada e levando ao aumento excessivo de glicose no sangue circulante. A persistência de elevadas concentrações de glicose no sangue causa danos vasculares generalizados afetando o coração, olhos e nervos, resultando em várias complicações (CHO et al., 2018).

A injeção subcutânea de insulina tem sido tradicionalmente utilizada desde a sua descoberta em 1921, como o principal tratamento para pacientes com a diabetes de tipo 1. Desde a sua introdução como terapia, pacientes com complicações de saúde devido à diabetes tem tido a sua expectativa de vida aumentada em vários anos (WONG; MARTINEZ; DASS, 2016).

No entanto, injeções diárias são dolorosas, inconvenientes e podem levar a interrupção do tratamento. Além disso, também deve ser levado em consideração que essa via de administração não é um caminho fisiológico natural, levando a passagem pelo fígado de apenas 25% do total da insulina administrada, onde é o seu local de ação principal. Com isso a via de administração oral se torna ainda mais favorável, uma vez que a maioria da insulina seria absorvida devido à passagem pelo fígado, imitando o caminho e a secreção natural (GORDON STILL, 2002; QUELLHORST, 2002).

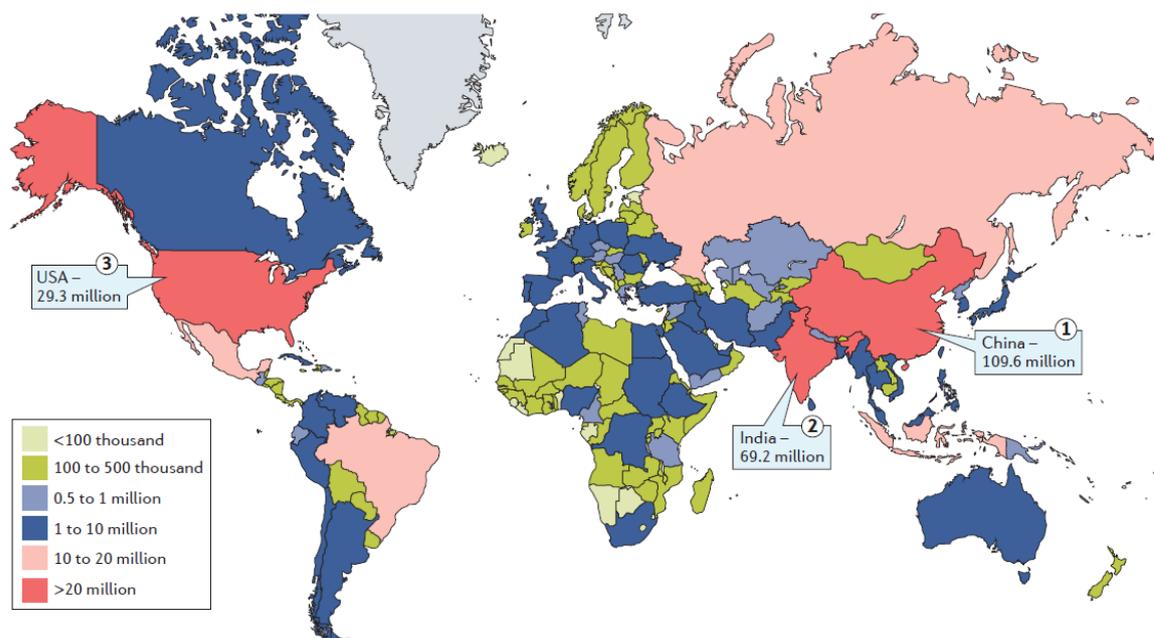


Figura 6: Número estimado de adultos (20–79 anos) vivendo com diabetes mellitus em 2015. É estimado que em 2015, 415 milhões de adultos entre 20–79 anos com diabetes mellitus no mundo. Figura adaptada da literatura (ZHENG; LEY; HU, 2017).

9.2 Via oral e insulina

A via oral é a maneira mais conveniente e segura de se administrar um medicamento, pois é a via natural de absorção de substâncias pelo corpo, possui defesas naturais contra possíveis contaminantes e não necessita de agulhas ou causa dor. No entanto o sistema digestivo ainda consiste de um grande desafio para alguns fármacos e peptídeos (MO et al., 2014).

As principais dificuldades recaem sobre a promoção de absorção destes fármacos, levando à transposição das barreiras impostas pelo epitélio intestinal, até atingirem a circulação sistêmica, sem permitir a degradação por enzimas ou variações no pH (ZHANG et al., 2012). Para peptídeos, como a insulina, o desafio consiste em evitar a degradação no estômago, através da quebra das ligações dissulfeto e consequente desnaturação da proteína (WONG; AL-SALAMI; DASS, 2017); a inativação e digestão proteolítica no lúmen e a aumentar a permeabilidade através do epitélio intestinal, o qual é reduzido pelo alto peso molecular e baixa lipofilicidade (MAKHLOF; TOZUKA; TAKEUCHI, 2011; NUR; VASILJEVIC, 2017).

Isso resulta em uma absorção pela circulação sistêmica de menos que 0.5% da dose de insulina administrada por via oral (DAMGE et al., 2010).

Recentemente, várias companhias farmacêuticas, incluindo Oramed® e Novo Nordisk®, têm tentado desenvolver novas formulações orais de insulina à base de polímeros ou surfactantes (sem nanopartículas) para promover a sua absorção passiva (MO et al., 2014). Entretanto, os resultados obtidos mostraram que apenas pequenas quantidades de insulina são absorvidas, por isso estes medicamentos só têm utilidade como uma maneira de retardar o aparecimento de diabetes ou como um adjuvante para a insulina injetada.

Essas dificuldades são particularmente importantes quando levado em consideração que a diabetes é tradicionalmente tratada com injeções subcutâneas que causam dor, desconforto e risco de infecção.

9.3 Nanopartículas contendo insulina

A nanotecnologia pode ser uma alternativa para driblar os desafios impostos pela parte superior do trato gastrointestinal. Vários trabalhos têm sido desenvolvidos na área utilizando nano e micropartículas com polímeros naturais ou sintéticos, partículas de hidrogeis ou inorgânicas, ciclodextrinas, microcápsulas ou microesferas de insulina (WONG; AL-SALAMI; DASS, 2018). Apesar das décadas de esforços, até o presente momento, apenas pequenas frações da insulina administrada conseguiram atingir a circulação sistêmica (LOPES et al., 2014).

Uma alternativa interessante para a entrega oral da insulina é baseada na produção de nanopartículas ionotrópicas de alginato/dextrana complexadas com quitosana, capazes de manter a integridade e atividade da insulina até a sua liberação no intestino, tendo já comprovado a capacidade hipoglicemiante quando administradas por via oral (LOPES et al., 2016; WOITISKI et al., 2009b, 2009a).

As nanopartículas de alginato e sulfato de dextrana são formadas através da reticulação do alginato com íons metálicos formando um gel de estrutura compacta reticulada o modelo *Egg-box* (Figura 7). Esse sistema é ideal para manter dentro deste retículo hidrofílico formado moléculas hidrofílicas de cargas opostas, como a insulina em pH abaixo de 5. Uma vez em pH próximo a 7, a insulina inverte as suas

cargas passando a ser negativa e promovendo a desestruturação do sistema (WOITISKI et al., 2009a).

Apesar das nanopartículas obtidas por gelificação ionotrópicas serem promissoras, estas ainda possuem sérias limitações, como a sua desintegração no intestino, liberando a insulina e dependendo da sua internalização passiva. Para melhorar o processo de absorção pelo epitélio intestinal, uma possível saída seria a vetorização ativa e a promoção da internalização da partícula.

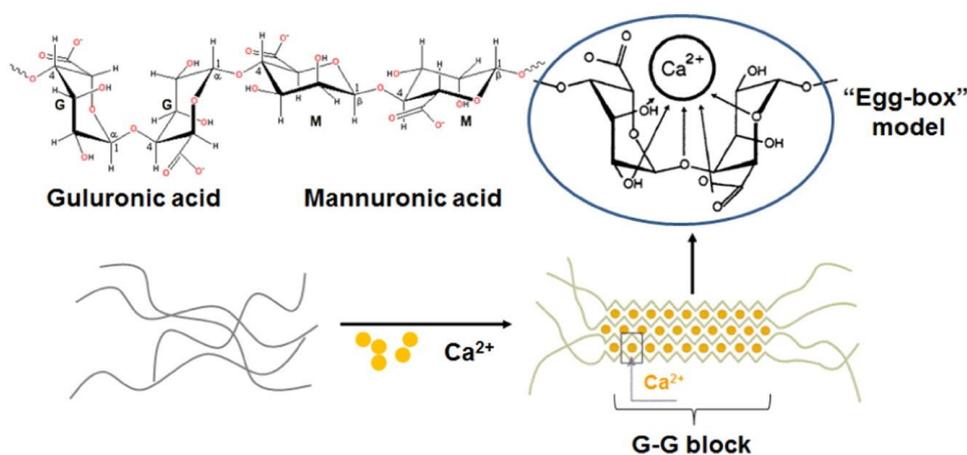


Figura 7: Processo de gelificação interna promovido pela complexação de íons Ca^{2+} com subunidades do alginato formando o modelo chamado de egg-box. Figura adaptada da literatura (RUVINOV; COHEN, 2016).

9.4 Funcionalização de nanopartículas

Uma maneira efetiva de promover a internalização de uma nanopartícula e a sua carga, é através da funcionalização de sua superfície, a qual já foi realizada para insulina (CHALASANI et al., 2007; LIU et al., 2018). Levando em consideração que as partículas do grupo são revestidas com quitosana, uma maneira de se promover a funcionalização é através da interação organometálica entre a quitosana da superfície da partícula e o ligante. O metal a ser utilizado com essa finalidade pode ser o ferro (BENDER et al., 2014; MAYER et al., 2014) ou o zinco (ANTONOW et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017). Com a utilização dessa técnica, se promove uma interação específica e segura entre os compostos (ANTONOW et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017), sem a necessidade de reações covalentes e resíduos dessa reação.

A técnica de complexação organometálica já foi utilizada para compostos químicos como o metotrexato e ácido arginilglicilaspártico (ANTONOW et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018), além de enzimas como a bromelina e lauronidase, ou fragmentos de anticorpo (BENDER et al., 2014; MAYER et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). Essa versatilidade se deve ao fato do metal quelante (zinco ou ferro) interagir com pares de bases livres de átomos como oxigênio e nitrogênio (OLIVEIRA et al., 2017; REYNAUD et al., 2011).

Para promover a internalização da insulina no intestino diferentes ligantes foram tentados como ligantes ao receptor da transferrina (HAIYPRH), vitamina B12, folato, peptídeo de penetração celular e L-valina (CHALASANI et al., 2007; JAIN; JAIN, 2015; JAIN et al., 2012; KAMEI et al., 2008; LIU et al., 2018). No entanto, uma possível via de transporte de peptídeos pelo epitélio intestinal é através do receptor neonatal (FcRn) e já foi tentada com nanopartículas carreando insulina (PRIDGEN et al., 2013).

O receptor neonatal de Fc (FcRn) é responsável por reconhecer o fragmento cristalizável de anticorpos, desempenhando papel fundamental na aquisição na imunidade humoral materna em fetos e recém-nascidos de diferentes espécies (GUO et al., 2016). Dentre os humanos, este receptor continua a ser expresso durante toda a vida, mesmo após a interrupção da amamentação e vida adulta (YOSHIDA et al., 2004), estando envolvido em vários processos importantes, como a reciclagem e transcitose de IgGs (Fig. 8), ajudando a escapar da degradação lisossomal (KENNEDY et al., 2018). Este receptor já foi alvo de investigações para aumentar a absorção de diferentes substâncias por via oral como hormônio folículo-estimulante, nanopartículas com exatánatide e com insulina (LOW et al., 2005; PRIDGEN et al., 2013; SHI et al., 2018)

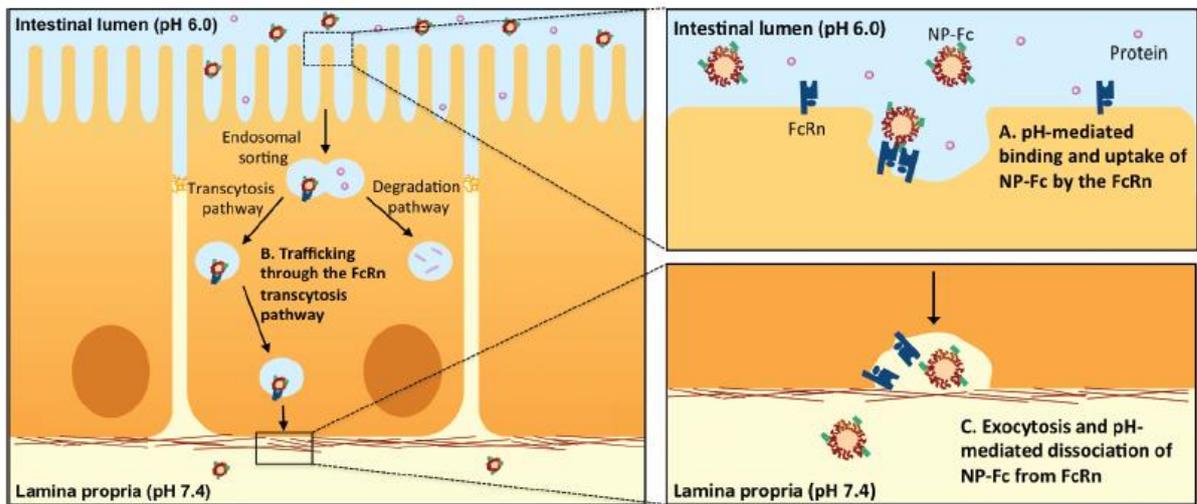


Figura 8: Esquema mostrando o transporte de nanopartículas ligadas com Fc e sendo reconhecidas pelo FcRn no lúmen intestinal e transportadas para a lamina própria, onde são liberadas da ligação com o receptor, ficando livres para difundir para a circulação sistêmica. Figura retirada e adaptada da literatura (PRIDGEN et al., 2013).

Tendo em vista o exposto, o desenvolvimento de nanopartículas ionotrópicas de alginato/dextrana revestidas com quitosana e funcionalizadas com IgG através de interação organometálica para administração por via oral, parece ser uma plataforma promissora para resolver os problemas de administração de insulina por via oral (Fig. 9).

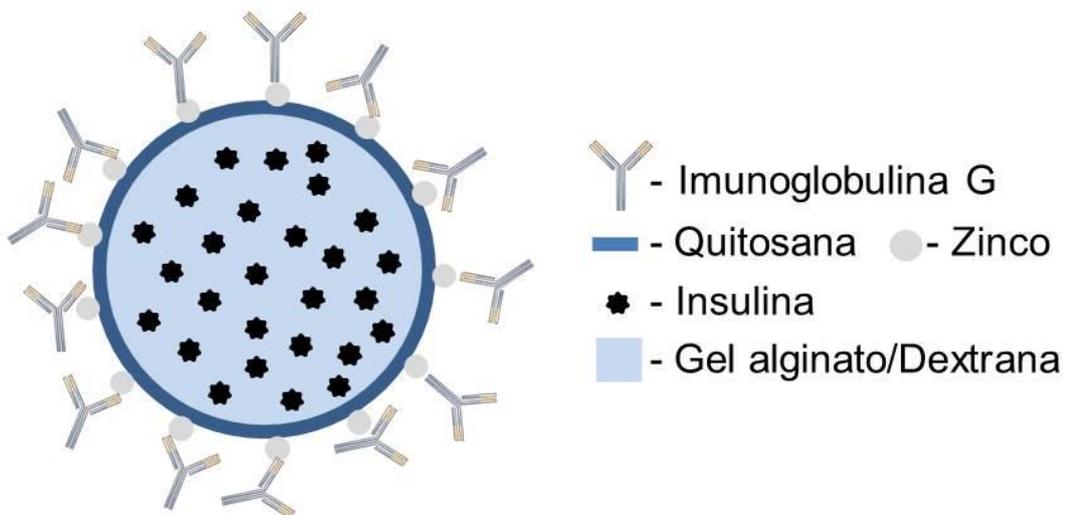


Figura 9: Esquema representativo da disposição dos componentes na nanopartículas de alginato/dextrana com revestimento de quitosana e funcionalização com imunoglobulinas G.

O manuscrito 2 aborda o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de alginato/dextrana complexada com quitosana carregadas com insulina e funcionalizadas com imunoglobulina G para administração por via oral e foi intitulado "*IgG functionalized polymeric nanoparticles for oral insulin administration*", publicado no periódico "*International Journal of Pharmaceutics*", conforme referência abaixo.

DE MARCHI, J.G.B.; CÉ, R. ; ONZI, G. ; ALVES, A.C.S. ; SANTARÉM, N. ; CORDEIRO DA SILVA, A. ; POHLMANN, A.R. ; GUTERRES, S.S. ; RIBEIRO, A.J. .
IgG functionalized polymeric nanoparticles for oral insulin administration.
INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, v. 622, p. 121829, 2022. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121829>.

A presente tese trouxe uma abordagem diversificada a respeito da funcionalização de superfície de nanopartículas pelo uso da interação organometálica. Para tanto, foram propostas formulações contendo ferro ou zinco, diferentes ligantes como moléculas pequenas (ácido ascórbico) ou grandes (anticorpos). Também apresentamos uma abordagem inovadora de promover a funcionalização de nanopartículas obtidas na forma de microaglomerados em pó.

O manuscrito I tratou do desenvolvimento e caracterização de uma formulação de nanocápsulas contendo triclosan, α -bisabolol e ácido ascórbico, planejada para o tratamento do câncer de pulmão. Os resultados da funcionalização de superfície das nanocápsulas mostrou não haver alterações substanciais no perfil granulométrico da formulação, sendo mantida a característica nanométrica e monomodal em todas as etapas de funcionalização. A formulação que apresentou os resultados mais interessantes, pois manteve o tamanho e polidispersividade, mesmo apresentando maior carga de ligantes de superfície, foi a formulação de nanocápsulas revestidas com quitosana, complexadas com ferro na concentração de 116 $\mu\text{g/mL}$ e funcionalizadas com ácido ascórbico na proporção de 1:3 (ferro:ácido ascórbico); essa formulação foi chamada de $\text{NC}_{\text{FINAL}116}$, e posteriormente renomeada para NC_{FINAL} .

Todas as formulações funcionalizadas mantiveram a carga positiva o que é importante para a internalização inespecífica, uma vez que a maioria dos componentes celulares é carregada negativamente (MA et al., 2013). No entanto, análises de potencial zeta e tamanho de partícula com as formulações catiônicas, NC_{AC} (nanocápsulas revestida com quitosana) e NC_{FINAL} mostraram que componentes do meio de cultura interagem com as partículas, formando uma corona ao redor das mesmas, tornando o potencial zeta negativo e aumentando o tamanho de partícula. Esse fenômeno é conhecido como efeito corona proteica, sendo provocado por interações entre as proteínas do meio e as cargas de superfície da partícula, podendo provocar a redução da atividade, mas também a redução da toxicidade das partículas (LUNDQVIST, 2013; LUNDQVIST et al., 2008).

Apesar da interação das proteínas do meio formarem aglomerados maiores na formulação NC_{AC} , essa interação aparentemente se dá de forma dinâmica, ocorrendo formação e ruptura das interações na corona (LYNCH; DAWSON, 2008). Por sua vez, com a formulação NC_{FINAL} , por ser revestida por um metal quelante, a interação se dá de forma mais duradoura, como visto em estudo anterior com

nanopartículas de óxido de ferro (CALATAYUD et al., 2014). Isso pode ser uma possível explicação para a menor atividade citotóxica em ensaio de citotoxicidade SRB da formulação NC_{FINAL}, quando comparada aos resultados obtidos para NC_{AC} e Tric_{DMSO} (triclosan solubilizado em DMSO), ou valores da literatura (SADOWSKI et al., 2014).

As formulações NC_{AC} e NC_{FINAL} serviram de base para o desenvolvimento de uma metodologia de obtenção direta, sem a necessidade de passar pela etapa de rota-evaporação à pressão reduzida, de microaglomerados de nanopartículas revestidas com quitosana e funcionalizadas, o que não era possível na metodologia original (GUTERRES et al., 2015). Os pós produzidos por *spray-drying* pelo método modificado de *One-pot* com o fluxo de 0,15 L/hora com revestimento de quitosana (SM₁₅NC_{AC}) e funcionalizado (SM₁₅NC_{FINAL}), apresentaram uma ótima capacidade de redispersão com quase a totalidade das partículas redispersas após 15 minutos em contato com água destilada. No entanto, a distribuição do pó da formulação SM₁₅NC_{FINAL} nos estágios 5-7 do impactador de cascata de *Andersen*, que representa as camadas mais profundas do pulmão, foi maior que a formulação SM₁₅NC_{AC} e do que o triclosan isolado.

Apesar de a formulação SM₁₅NC_{FINAL} ter atividade citotóxica inferior a SM₁₅NC_{AC}, estas praticamente se equivalem em relação à dose, pois a primeira atinge a região brônquio-alveolar em uma dose 2,5 vezes maior que a segunda, sendo essa a região de maior área superficial do pulmão e caracterizada por uma maior ocorrência de tumor (LINDELL et al., 2007). Apesar de maior, a quantidade de triclosan em ambas as formulações não atinge a dose tóxica reportada na literatura para o triclosan (YANG et al., 2015) ou para o α -bisabolol (SEKI et al., 2011), situando-se dentro da faixa de segurança de uso.

A efetividade da funcionalização foi comprovada através de análises de potenciometria, potencial zeta e infravermelho. Nas leituras de potenciometria pode-se observar alterações de pH após o revestimento com quitosana, a adição da solução de ferro e funcionalização com ácido ascórbico. A primeira alteração observada, de NC_{BC} (5,28) para NC_{AC} (3,81), foi devido à adição da solução de quitosana, a qual é solubilizada em ácido acético a 1%, sendo que essa redução de pH também foi verificada em estudos anteriores (BENDER et al., 2012; DE MARCHI et al., 2017). A segunda redução de pH para a formulação NC_{AC+Fe} (3,00) foi provocada pela adição da solução de FeCl₃, pois ao ser solubilizado, o Fe³⁺ pode

interagir com a H₂O e formar hidróxido de ferro III, liberando H⁺ no meio (GRUNDL; DELWICHE, 1993). Somado a isso, a interação do ferro livre com as aminas da quitosana, pode provocar a desprotonação das mesmas, liberando o H⁺ no meio. A última alteração de pH a ocorrer é após a adição de ácido ascórbico para a funcionalização da superfície, passando de pH 3 (NC_{AC+Fe}) para 3,24 (NC_{FINAL}), esse aumento pode ser provocado pela substituição da interação do ferro com o nitrogênio da amina, pelo oxigênio do ácido ascórbico, levando a redução no número de aminas interagindo com cada átomo de ferro, e conseqüentemente fazendo com que essas fiquem livres para receber os prótons do meio.

O efeito visto para o pH também pode ser corroborado pelas alterações no potencial zeta (PZ), que passa de -10 mV para +17,8 mV após a adição da solução de quitosana, para +13,3 mV após a adição do ferro e +15,9 mV com a adição do ácido ascórbico. A redução do potencial zeta após introdução do ferro corrobora com a segunda hipótese anteriormente levantada, de que o ferro interage com mais de uma amina da quitosana (ZIMMERMANN et al., 2010), deixando menos aminas livres para receber os prótons do meio, e conseqüentemente menos aminas protonadas.

As análises de infravermelho também auxiliaram a elucidar as interações ocorridas entre os componentes da nanocápsula, como a banda em 1620 cm⁻¹, referida como interação da quitosana com o ferro (WANG et al., 2005b), esta só pode ser observada nos espectros de formulações que contém o metal. Outro ponto do espectro que deve ser ressaltado é a banda em 1730 cm⁻¹, a qual não está presente no ácido ascórbico livre, e é quase imperceptível nas formulações NC_{AC}, NC_{AC + Fe}, mas se torna proeminente na formulação NC_{FINAL}. Essa banda evidencia que ao interagir com ferro, o ácido ascórbico se oxida a de-hidroascorbato, o qual possui carboxilas de cetona (LANE et al., 2010).

Por fim, a correlação do grau de desacetilação, calculado de acordo com a literatura (REYNAUD et al., 2011), mostra que a adição do metal quelante reduz o percentual de aminas livres de 76,4% para 34%, e volta a subir após a adição do ácido ascórbico para 45%. Isso se soma aos resultados de pH e PZ como um indício da ligação do metal com mais de uma amina. Os resultados mostraram que a funcionalização foi efetiva para a suspensão de nanocápsulas e para o pó de microaglomerado de nanopartículas, sendo essa a primeira vez que nanocápsulas

poliméricas funcionalizadas foram secas pela técnica de *spray-drying one-pot*, a qual permite um grande avanço tecnológico ao eliminar a etapa de rota-evaporação.

O manuscrito II tratou do desenvolvimento e caracterização de uma formulação de nanopartículas de alginato/dextrana complexadas com quitosana (NPC) e funcionalizadas com imunoglobulina G (IgG), carreando insulina para administração por via oral e tratamento da diabetes. Em contraste com os resultados obtidos no manuscrito I, a funcionalização das NPC teve um forte efeito no perfil granulométrico, reduzindo o tamanho e a polidispersão das partículas. Isso pode ser explicado por uma maior estabilização da superfície, uma vez que as nanopartículas de alginato/dextrana complexadas com quitosana, mas sem funcionalização tem tendência a aglomerar apresentando um alto índice de polidispersividade (WOITISKI et al., 2009b). Outra possível explicação é o reforço do metal quelante (zinco) nas interações com as bandas de alginato e dextrana (ASLANI; KENNEDY, 1996; TAHA et al., 2008).

A interação do zinco com os componentes da partícula é evidenciada por um aumento no tempo de retenção da insulina nos ensaios de liberação em fluido gastrointestinal simulado, assim como nas análises de DSC e infravermelho. Os ensaios de liberação mostraram não haver uma difusão imediata, como ocorre para a insulina livre (FI), e nem em pH 6,8, o qual propicia uma pronta dissolução do sistema como a formulação sem funcionalização (NPC). O que pôde ser observado foi uma correlação entre a concentração de zinco na formulação e uma maior retenção da insulina nas partículas mesmo em pH intestinal (6,8). Assim como o efeito sobre a distribuição de tamanho, isso também pode estar relacionado a uma interação do zinco com as bandas de alginato e dextrana no interior da partícula (TAHA et al., 2008), reforçando o modelo de *egg-box*.

Os ensaios de DSC mostraram haver interações entre os componentes presentes nas formulações através de deslocamentos ou desaparecimentos de picos endotérmicos. Foi possível observar que os dois picos referentes à fusão da fenilalanina (LU, 2012), não foram observados após a adição da mesma na formulação contendo nanopartículas com zinco a 100 µg/mL (NPC-Zn₁₀₀). Outro ponto importante foi o deslocamento do pico de volatilização do acetato (THANGAVEL et al., 2016), originalmente em 85,5°C para 57 e 49°C nas formulações NPC-Zn₁₀₀ e de nanopartículas com zinco a 100 µg/mL e fenilalanina

(NPC-Zn₁₀₀-Phe), respectivamente. Esse deslocamento pode ser resultado da redução da interação do zinco com o acetato, diminuindo o ponto de volatilização.

As análises de infravermelho mostraram, assim como no manuscrito I, que houve redução da absorvância em picos referentes ao oxigênio e nitrogênio, sendo o último evidenciado pela redução do grau de desacetilação (DDA). O DDA, que originalmente era de 74% para a quitosana livre, passou para 57% após a complexação com as nanopartículas, tendo uma nova redução para 55% após a adição do zinco. Essas reduções são devido às interações com as aminas livres da quitosana, fazendo com que as bandas referentes às mesmas sejam reduzidas (REYNAUD et al., 2011).

Com os resultados de tamanho, polidispersividade, grau de retenção do zinco e perfil de liberação da insulina, foi possível determinar a concentração ótima de zinco na formulação. Com essa concentração foram preparadas as nanopartículas funcionalizadas com imunoglobulina G em diferentes proporções. Novamente através de leituras de tamanho, PDI, PZ e estabilidade das formulações, foi determinada a concentração ideal de IgG, sendo a formulação contendo nanopartículas de alginato/dextrana complexadas com quitosana e funcionalizadas com zinco (100 µg/mL) e imunoglobulina G (200 µg/mL), chamada de NPC-Zn₁₀₀-Ab₂₀₀ a que apresentou os resultados melhores e mais estáveis ao longo de 14 dias. Essa mesma formulação mostrou não possuir contaminantes micrométricos pela técnica de análise por rastreamento de nanopartícula (NTA), corroborando os dados anteriormente obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Apesar das nanopartículas funcionalizadas apresentarem valor de potencial zeta menor que -30 mV, o que as torna capazes de provocar repulsão eletrostática (WOITISKI et al., 2009b), o aumento da estabilidade pode ter sido provocado por impedimento estérico (LI et al., 2016), já que entre as formulações funcionalizadas o potencial zeta pouco variou.

Considerando a funcionalização de nanopartículas como principal foco deste trabalho, a presente tese mostrou a viabilidade de promover a funcionalização de nanopartículas com quitosana na sua superfície, sejam nanocápsulas poliméricas de núcleo oleoso, ou nanopartículas gelatinosas complexadas com quitosana. Em ambos os casos a funcionalização não provocou instabilidades no sistema, pelo contrário, as nanopartículas gelatinosas mostraram uma redução de tamanho, polidispersividade e aumento da estabilidade. Assim, a funcionalização

organometálica mostrou ser eficiente e promissora para se obter vetorização ativa e desta forma, obter resultados mais eficazes para nanossistemas.

A partir das nanocápsulas funcionalizadas com interação organometálica, os resultados obtidos em ambos os manuscritos mostraram ser possível promover a funcionalização de nanopartículas com quitosana na sua superfície.

As análises de pH, potencial zeta e infravermelho das etapas de obtenção de nanopartículas de triclosan e α -bisabolol, funcionalizadas com ácido ascórbico levaram a conclusão de que a funcionalização foi efetiva. Os mesmos resultados de infravermelho obtidos para a suspensão funcionalizada, também foram observados para o seu respectivo pó, isso evidenciou que as mesmas interações ocorreram.

Os resultados de citotoxicidade mostraram que as nanocápsulas revestidas com quitosana (NC_{AC}) conseguiram reduzir a concentração de triclosan para promover a atividade antitumoral, quando comparado com o triclosan livre (Tric_{DMSO}). No entanto, quando comparado à concentração de α -bisabolol a atividade foi mais pronunciada para o fármaco livre (α -Bis_{EtOH}).

Os pós de nanopartículas funcionalizadas e sem funcionalização, produzidos com base nas nanocápsulas de triclosan e α -bisabolol, através de uma técnica inovadora que permite eliminar a rota-evaporação, mostraram-se adequados para administração pulmonar, com quase completa redispersão em 15 minutos. Ainda, as formulações foram capazes de atingir a região alveolar em concentração superior à dose necessária para matar células de tumor pulmonar (A549), no entanto, muito inferior à dose tóxica pulmonar determinada em ratos.

Já a funcionalização com fenilalanina da formulação de nanopartículas de alginato/dextrana complexada com quitosana para administração de insulina por via oral, mostrou reduzir o tamanho de partícula e a sua polidispersividade, quando comparado à partícula sem funcionalização.

A funcionalização também foi capaz de reter a insulina por um maior período de tempo em fluido intestinal simulado, o que é importante para aumentar a chance de interação das nanopartículas com os receptores nas células intestinais, isso é provavelmente devido ao zinco provocar um incremento na interação entre os componentes.

Por sua vez, as nanopartículas funcionalizadas com IgG mostraram ter estabilidade por ao menos 14 dias, sendo comprovada a ausência de contaminantes micrométricos pela técnica de NTA. Com isso, ambas as formulações foram inovadoras se mostraram promissoras plataformas para o tratamento do câncer de pulmão e administração de peptídeos de baixa absorção por via oral.

Esse projeto ainda prevê a realização de ensaios de internalização de nanopartículas de alginato/dextrana complexadas com quitosana ligada ao FITC e funcionalizadas com IgG (NPC-Zn₁₀₀-Ab₂₀₀), a ser realizado em células CaCo-2 e analisado em microscopia confocal de fluorescência, no centro de microscopia da UFRGS. Também está prevista a realização de ensaio de HET-CAM para verificar o potencial irritante das formulações revestidas com quitosana (NC_{AC} e SM₁₅NC_{AC}) e das formulações funcionalizadas com ferro e ácido ascórbico (NC_{FINAL} e SM₁₅NC_{FINAL}).

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HALLAK, M. K. et al. Pulmonary delivery of inhalable nanoparticles: dry powder inhalers. **Therapeutic Delivery**, v. 2, n. 10, p. 1313–1324, 2011.

ALLAKER, R. P.; REN, G. Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 1–2, 2008.

ALVES, A. D. M. H. et al. Evaluation of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. **Neuroscience Letters**, v. 472, n. 1, p. 11–15, 2010.

ANDRADE, D. F. DE et al. Redispersible spray-dried lipid-core nanocapsules intended for oral delivery: the influence of the particle number on redispersibility. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 4, p. 414–425, 2018.

ANGELO, I. et al. Pulmonary Drug Delivery: A Role for Polymeric Nanoparticles? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 386–400, 2015.

ANTONOW, M. B. et al. Arginylglycylaspartic Acid-Surface-Functionalized Doxorubicin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules as a Strategy to Target Alpha (V) Beta (3) Integrin Expressed on Tumor Cells. **nanomaterials**, v. 8, n. 2, p. 1–18, 2018.

ASLANI, P.; KENNEDY, R. A. Studies on diffusion in alginate gels . I . Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. **Journal of Controlled Release**, v. 42, n. 1996, p. 75–82, 1996.

AZARMI, S. et al. Formulation and cytotoxicity of doxorubicin nanoparticles carried by dry powder aerosol particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 319, n. 1–2, p. 155–161, 2006.

BECK, R. C. R. et al. Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: Preparation, morphological characterization, in vitro release and in vivo gastrointestinal tolerance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 A, p. 1233–1240, 2005.

BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1–2, p. 271–279, 15 abr. 2012.

BENDER, E. A. et al. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(-)-functionalized nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, n. 2014, p. 2975–2987, 2014.

BETANCOURT, T. et al. PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA

nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 91, n. 1, p. 263–276, 2009.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 0, p. 1–33, 2018.

CALATAYUD, M. P. et al. The effect of surface charge of functionalized Fe₃O₄ nanoparticles on protein adsorption and cell uptake. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6389–6399, 2014.

CARINO; MATHIOWITZ. Oral insulin delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 35, n. 2–3, p. 249–257, 1999.

CASTER, J. M. et al. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. **Wires: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2017.

CAVALIERI, E. et al. Alpha-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 3, p. 589–594, 2004.

CHALASANI, K. B. et al. A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 3, p. 421–429, 2007.

CHEN, W. et al. Alpha-Bisabolol induces dose- and time-dependent apoptosis in HepG2 cells via a Fas- and mitochondrial-related pathway, involves p53 and NFκB. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 247–254, 2010.

CHENG, D. et al. Multifunctional nanocarrier mediated co-delivery of doxorubicin and siRNA for synergistic enhancement of glioma apoptosis in rat. **Biomaterials**, v. 33, n. 4, p. 1170–1179, 2012.

CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271–281, 2018.

CHOI, Y. L. et al. EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 3, p. 1734–1739, 2010.

CHONG, C. R.; JÄNNE, P. A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1389–400, 2013.

D'ALMEIDA, A. P. L. et al. α-bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce

lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4479–4491, 2017.

DAMGE, C. et al. Poly(ϵ -Caprolactone)/Eudragit Nanoparticles for Oral Delivery of Aspart-Insulin in the Treatment of Diabetes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 879–889, 2010.

DARRA, E. et al. Insight into the apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 113–123, 2008.

DE MARCHI, J. G. B. et al. Triclosan resistance reversion by encapsulation in chitosan-coated-nanocapsule containing α -bisabolol as core : development of wound dressing. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 7855–7868, 2017.

DE OLIVEIRA, C. et al. Enhanced and Selective Antiproliferative Activity of Methotrexate-Functionalized-Nanocapsules to Human Breast Cancer Cells (MCF-7). **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 24, 2018.

DERENNE, A. et al. Impact of in vitro gastrointestinal passage of biopolymer-based nanoparticles on insulin absorption. **RSC Advances**, v. 6, n. 24, p. 20155–20165, 2016.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Sasha Englard and Sam Seifter. **Annual Review of Nutrition**, v. 6, p. 365–406, 1986.

FLAVIN, R. et al. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. **Future Oncology**, v. 6, n. 4, p. 551–562, 2010.

GILLIES, R. J.; ROBEY, I.; GATENBY, R. A. Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. Suppl_2, p. 24S–42S, 2008.

GORDON STILL, J. Development of oral insulin: Progress and current status. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 18, n. SUPPL. 1, p. 29–37, 2002.

GRAF, R. et al. Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres ILlauana Upon solvent evaporation , the. **Science**, v. 263, n. January, p. 1600–1603, 1994.

GRUNDL, T.; DELWICHE, J. Kinetics of ferric oxyhydroxide precipitation. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 14, p. 71–97, 1993.

GUO, J. et al. Neonatal Fc Receptor-Mediated IgG Transport Across Porcine Intestinal Epithelial Cells: Potentially Provide the Mucosal Protection. **DNA and Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 301–309, 2016.

GUTERRES, S. S. et al. **PROCESSO ONE POT DE SÍNTESE DE**

NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS, SUAS FORMAS SECAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS E SEUS USOS Brasil 10/11/2015, , 2015. Disponível em:

<<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/131151/000980991.pdf?sequence=1>>

HALDEN, R. U.; PAULL, D. H. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 1420–1426, 2005.

HEATH, R. J.; WHITE, S. W.; ROCK, C. O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 6, p. 467–497, 2001.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. **Cell**, v. 117, p. 285–297, 2004.

HERVELLA, P. et al. Nanomedicine: New challenges and opportunities in cancer therapy. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, n. 3, p. 276–292, 2008.

HOFFMEISTER, C. R. et al. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale research letters**, v. 7, n. 1, p. 251, 2012.

JAIN, A.; JAIN, S. K. L -Valine appended PLGA nanoparticles for oral insulin delivery. **Acta Diabetologica**, p. 663–676, 2015.

JAIN, S. et al. Folate-decorated PLGA nanoparticles as a rationally designed vehicle for the oral delivery of insulin. **Nanomedicine**, v. 7, n. 9, 2012.

KALINOWSKI, D.; RICHARDSON, D. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 547–583, 2005.

KAMEI, N. et al. Usefulness of cell-penetrating peptides to improve intestinal insulin absorption. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 1, p. 21–25, 2008.

KENNEDY, P. J. et al. Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 394–408, 2018.

KIM, J. W.; GAO, P.; DANG, C. V. Effects of hypoxia on tumor metabolism. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 2, p. 291–298, 2007.

KLEPKA, M. T. et al. Local Atomic Structure and Magnetic Ordering of Iron in Fe–Chitosan Complexes. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 6, p. 1586–1594, 2008.

KOTHAMASU, P. et al. Nanocapsules: The weapons for novel drug delivery systems. **BiolImpacts**, v. 2, n. 2, p. 71–81, 2012.

- KRANENBURG, O. The KRAS oncogene: Past, present, and future. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1756, n. 2, p. 81–82, 2005.
- KUHAJDA, F. P. et al. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3450–3454, 2000.
- LANE, D. J. R. et al. Two routes of iron accumulation in astrocytes: ascorbate-dependent ferrous iron uptake via the divalent metal transporter (DMT1) plus an independent route for ferric iron. **Biochemical Journal**, v. 432, n. 1, p. 123–132, 2010.
- LE, N. T. V; RICHARDSON, D. R. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1603, n. 1, p. 31–46, 2002.
- LE, N. T. V; RICHARDSON, D. R. Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: A link between iron metabolism and proliferation. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2967–2975, 2004.
- LI, X. et al. Size-controlled starch nanoparticles prepared by self-assembly with different green surfactant: The effect of electrostatic repulsion or steric hindrance. **Food Chemistry**, v. 199, p. 356–363, 2016.
- LINDELL, R. M. et al. Five-year lung cancer screening experience: CT appearance, growth rate, location, and histologic features of 61 lung cancers. **Radiology**, v. 242, n. 2, p. 555–562, 2007.
- LINSTER, C. L.; VAN SCHAFTINGEN, E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. **FEBS Journal**, v. 274, n. 1, p. 1–22, 2007.
- LIU, B. et al. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 49, n. 3, p. 187–193, 2002.
- LIU, M. et al. Iron-mimic peptide converts transferrin from foe to friend for orally targeting insulin delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 4, p. 593–601, 2018.
- LIU, Y.; MIYOSHI, H.; NAKAMURA, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 12, p. 2527–2537, 2007.
- LOPES, M. et al. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 232, p. 29–

41, 2016.

LOPES, M. A. et al. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 6, p. 1139–1151, 2014.

LOW, S. C. et al. Oral and pulmonary delivery of FSH – Fc fusion proteins via neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. **Human Reproduction**, v. 20, n. 7, p. 1805–1813, 2005.

LU, J. Characterization and pseudopolymorphism of L-phenylalanine anhydrous and monohydrate forms. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 269–277, 2012.

LUNDQVIST, M. et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 38, p. 14265–70, 2008.

LUNDQVIST, M. Nanoparticles: Tracking protein corona over time. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 10, p. 701–702, 2013.

LUPU, R.; MENENDEZ, J. A. Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 7, p. 483–493, 2006.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nano Today**, v. 3, n. 1–2, p. 40–47, 2008.

MA, N. et al. Influence of Nanoparticle Shape, Size, and Surface Functionalization on Cellular Uptake. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, n. 10, p. 6485–6498, 2013.

MAINE, E.; THOMAS, V. J. Raising financing through strategic timing. **Nature Nanotechnology**, v. 12, n. 2, p. 93–98, 2017.

MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. European Journal of Pharmaceutical Sciences Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 445–451, 2011.

MARCHIORI, M. C. L. et al. Spray-Dried Powders Containing Tretinoin-Loaded Engineered Lipid-Core Nanocapsules: Development and Photostability Study. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1–9, 2012.

MASCAUX, C. et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung

cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 1, p. 131–139, 2005.

MAYER, F. Q. et al. Laronidase-Functionalized Multiple-Wall Lipid-Core Nanocapsules: Promising Formulation for a More Effective Treatment of Mucopolysaccharidosis Type I. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 3, p. 941–954, 2014.

MCMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY, S. B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 394, n. 6693, p. 531–532, 1998.

MEHANNA, M. M.; MOHYELDIN, S. M.; ELGINDY, N. A. Respirable nanocarriers as a promising strategy for antitubercular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 183–197, 2014.

MO, R. et al. Emerging micro- and nanotechnology based synthetic approaches for insulin delivery. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 10, p. 3595–3629, 2014.

MÜLLER, C. B. et al. Potential crosstalk between cofilin-1 and EGFR pathways in cisplatin resistance of non-small-cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3531–9, 2015.

MÜLLER, C. R. et al. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 343–7, 2000.

MURALIDHARAN, P. et al. Inhalable nanoparticulate powders for respiratory delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1189–1199, 2015.

NAHAR, K. et al. In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particle deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 5, p. 805–818, 2013.

NAWAZ, K.; WEBSTER, R. M. The non-small-cell lung cancer drug market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 229–230, 2016.

NUR, M.; VASILJEVIC, T. International Journal of Biological Macromolecules Can natural polymers assist in delivering insulin orally? **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 889–901, 2017.

OLIVEIRA, C. P. et al. Bromelain-Functionalized Multiple-Wall Lipid-Core Nanocapsules: Formulation, Chemical Structure and Antiproliferative Effect Against Human Breast Cancer Cells (MCF-7). **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 2, p. 438–452, 2017.

OLIVEIRA, C. P. DE et al. Enhanced and Selective Antiproliferative Activity of Methotrexate-Functionalized-Nanocapsules to Human Breast Cancer Cells (MCF-7). **nanomaterials**, v. 8, n. 24, p. 1–19, 2018.

PARIKH, S. L.; XIAO, G.; TONGE, P. J. Inhibition of InhA , the Enoyl Reductase from Mycobacterium tuberculosis , by triclosan and isoniazid. **Biochemistry**, v. 39, n. 26, p. 7645–7650, 2000.

PATEL, N. R. et al. Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1748–1762, 2013.

POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: Development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 4–5, p. 305–312, 2002.

POURJAVADI, A.; TEHRANI, Z. M.; MOGHANAKI, A. A. Folate-Conjugated pH-Responsive Nanocarrier Designed for Active Tumor Targeting and Controlled Release of Gemcitabine. **Pharmaceutical Research**, n. 2016, p. 417–432, 2015.

PRIDGEN, E. M. et al. Transepithelial Transport of Fc-Targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 213, p. 213ra167-213ra167, 2013.

QUELLHORST, E. Insulin therapy during peritoneal dialysis: pros and cons of various forms of administration. **J Am Soc Nephrol**, v. 13 Suppl 1, p. S92–S96, 2002.

RAJAGOPALAN, H. et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 934–934, 2002.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. Revisiting vitamin C and cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 350, n. 6266, p. 1317–1318, 2015.

REYNAUD, F. et al. Spray-dried chitosan-metal microparticles for ciprofloxacin adsorption: Kinetic and equilibrium studies. **Soft Matter**, v. 7, n. 16, p. 7304–7312, 2011.

RIGO, A. et al. Efficient lysis of B-chronic lymphocytic leukemia cells by the plant-derived sesquiterpene alcohol α -bisabolol , a dual proapoptotic and antiautophagic agent. **Oncotarget**, v. 9, n. 40, p. 25877–25890, 2018.

RODRICKS, J. V et al. Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. **Critical reviews in toxicology**, v. 40, n. 5, p. 422–84, 2010.

RUVINOV, E.; COHEN, S. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial

infarction : Progress , translational strategies , and clinical outlook ☆ From ocean algae to patient bedside. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 96, p. 54–76, 2016.

SADOWSKI, M. C. et al. The fatty acid synthase inhibitor triclosan : repurposing an anti- microbial agent for targeting prostate cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 19, p. 9362–9381, 2014.

SASAKI, H. et al. Overexpression of GLUT1 correlates with Kras mutations in lung carcinomas. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 3, p. 599–602, 2012.

SCHWEIZER, H. P. Triclosan: A widely used biocide and its link to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 1, p. 1–7, 2001.

SEKI, T. et al. Antitumor effects of a -bisabolol against pancreatic cancer. **Cancer Science**, v. 102, n. 12, p. 2199–2205, 2011.

SHAN, W. et al. Overcoming the diffusion barrier of mucus and absorption barrier of epithelium by self-Assembled nanoparticles for oral delivery of insulin. **ACS Nano**, v. 9, n. 3, p. 2345–2356, 2015.

SHI, Y. et al. Fc-modified exenatide-loaded nanoparticles for oral delivery to improve hypoglycemic effects in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World cancer report 2014World Health Organization**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.videnza.org/wp-content/uploads/World-Cancer-Report-2014.pdf>>.

SUN, S.; SCHILLER, J. H.; GAZDAR, A. F. Lung cancer in never smokers — a different disease. **Nature**, v. 7, n. october, p. 778–790, 2007.

SUNG, J. C. et al. Formulation and pharmacokinetics of self-assembled rifampicin nanoparticle systems for pulmonary delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, p. 1847–1855, 2009.

TAHA, M. O. et al. Sodium lauryl sulfate impedes drug release from zinc-crosslinked alginate beads: Switching from enteric coating release into biphasic profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, n. 1–2, p. 291–300, 2008.

TARANGELO, A.; DIXON, S. J. Nanomedicine: An iron age for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 11, p. 921–922, 2016.

THANGAVEL, K. et al. Structural, morphological and optical properties of ZnO nano-fibers. **Superlattices and Microstructures**, v. 90, n. October, p. 45–52, 2016.

THOMAS, M. B. et al. Intracellular delivery of doxorubicin encapsulated in novel pH-responsive chitosan/heparin nanocapsules. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 267–273, 2013.

- TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Iron and cancer: more ore to be mined. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 5, p. 342–355, 2013.
- TSENG, C. L. et al. Development of gelatin nanoparticles with biotinylated EGF conjugation for lung cancer targeting. **Biomaterials**, v. 28, n. 27, p. 3996–4005, 2007.
- TSENG, C. L. et al. The use of biotinylated-EGF-modified gelatin nanoparticle carrier to enhance cisplatin accumulation in cancerous lungs via inhalation. **Biomaterials**, v. 30, n. 20, p. 3476–3485, 2009.
- UENO, M. et al. Triclosan-coated sutures reduce wound infections after spinal surgery: a retrospective, nonrandomized, clinical study. **Spine Journal**, 2013.
- UNO, M. et al. α -Bisabolol inhibits invasiveness and motility in pancreatic cancer through KISS1R. **Anticancer Research**, v. 36, n. 2, p. 583–590, 2016.
- VENTURELLI, L. et al. Glucose is a key driver for GLUT1-mediated nanoparticles internalization in breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–14, 2016.
- VILLEGAS, L. F. et al. (+)-epi- α -bisbolol is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: Investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1357–1359, 2001.
- VUYYURI, S. B. et al. Ascorbic Acid and a Cytostatic Inhibitor of Glycolysis Synergistically Induce Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- WANG, X. et al. Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study. **Polymer Bulletin**, v. 55, n. 1–2, p. 105–113, 2005a.
- WANG, X. et al. Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study. **Polymer Bulletin**, v. 55, p. 105–113, 2005b.
- WEERS, J. G.; MILLER, D. P. Formulation Design of Dry Powders for Inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 10, p. 3259–3288, 2015.
- WOITISKI, C. B. et al. Colloidal carrier integrating biomaterials for oral insulin delivery: Influence of component formulation on physicochemical and biological parameters. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2475–2484, 2009a.
- WOITISKI, C. B. et al. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 25–33, 2009b.

WONG, C. Y.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Potential of insulin nanoparticle formulations for oral delivery and diabetes treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 264, n. August, p. 247–275, 2017.

WONG, C. Y.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Microparticles , microcapsules and microspheres : A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, p. 223–244, 2018.

WONG, C. Y.; MARTINEZ, J.; DASS, C. R. Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1093–1108, 2016.

WU, S. et al. Anticancer effects of α -Bisabolol in human non-small cell lung carcinoma cells are mediated via apoptosis induction , cell cycle arrest , inhibition of cell migration and invasion and upregulation of P13K / AKT signalling pathway. **Official Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1407–1412, 2018.

YANG, Y.-S. et al. Evaluation of toxicity to triclosan in rats following 28days of exposure to aerosol inhalation. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 71, n. 2, p. 259–68, 2015.

YOSHIDA, M. et al. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. **Immunity**, v. 20, n. 6, p. 769–783, 2004.

YUN, J. et al. Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells. **Science**, v. 325, n. September, p. 1555–1559, 2009.

YUN, J. et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. **Science (New York, N.Y.)**, v. 350, n. 6266, p. 1391–1396, 2015.

ZHANG, L. et al. Improving intestinal insulin absorption efficiency through coadministration of cell-penetrating peptide and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1822–1827, 2012.

ZHAO, M. et al. Degradable polymeric nanocapsule for efficient intracellular delivery of a high molecular weight tumor-selective protein complex. **Nano Today**, v. 8, n. 1, p. 11–20, 2013.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88–98, 2017.

ZHU, X. et al. Polymeric Nanoparticles Amenable to Simultaneous Installation of

Exterior Targeting and Interior Therapeutic Proteins. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 55, n. 10, p. 3309–3312, 2016.

ZIMMERMANN, A. C. et al. Adsorption of Cr(VI) using Fe-crosslinked chitosan complex (Ch-Fe). **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 192–196, 2010.