

ANA RITA PIRES DE CARVALHO

**Estudo da libertação de lisozima usando implantes lipídicos como
sistemas de veiculação**

Orientador: Professora Doutora Marisa Helena Fonseca Nicolai

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Escola de Ciências e
Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2016

ANA RITA PIRES DE CARVALHO

Estudo da libertação de lisozima usando implantes lipídicos como sistemas de veiculação

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 22 de Novembro de 2016 perante o Júri com a seguinte composição:

Presidente:

Professora Doutora Dulce Várzea- ULHT

Arguente:

Professora Doutora Joana Portugal Mota-ULHT

Orientador:

Professora Doutora Marisa Helena Fonseca Nicolai-ULHT

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Escola de Ciências e
Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2016

Nome	Ana Rita Pires de Carvalho
Departamento	Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde
Orientador	Doutora Marisa Helena Fonseca Nicolai
Título da dissertação	Estudo da libertação de lisozima usando implantes lipídicos como sistemas de veiculação
Presidente júri	Dra. Dulce Várzea
Vogais	Dra. Ana Mirco Dra. Joana Portugal Mota

A mudança é a lei da vida. E aqueles que apenas olham para o passado ou para o presente irão com certeza perder o futuro.

John Kennedy

Agradecimentos

Em primeiro lugar, um agradecimento especial, à minha professora orientadora, a Professora Marisa Nicolai pelo apoio desde o início, atenção e ajuda na realização deste trabalho.

À Professora Joana Mota, pelo apoio e ajuda demonstrada em todas as etapas.

A todos os professores, colegas e amigos que estiveram presentes ao longo do meu percurso académico e que me ajudaram a tornar aquilo que sou.

A todos os Farmacêuticos, Técnicos, Auxiliares e Directora Técnica do Hospital de Vila Franca de Xira que desde o início se mostraram incansáveis e que me ensinaram tudo o que sei sobre Farmácia Hospitalar.

A todos os Farmacêuticos, Técnicos, Auxiliares e Directora Técnica da Farmácia Madragoa que me transmitiram conhecimentos fundamentais para o trabalho em Farmácia Comunitária.

À minha colega e amiga Joana Moreira, pelo apoio e ajuda em todos os momentos, pelas horas de estudo mas acima de tudo pelos risos e alegrias!

À minha colega e amiga Sofia Silva, pelo apoio desde o primeiro dia de faculdade, mas acima de tudo por me mostrar que por vezes basta acreditar!

À minha colega e amiga Cláudia Silva, pelo carinho, apoio e pelas palavras sempre positivas.

À minha amiga Cátia Sequeira pelas palavras sinceras que sempre me incentivaram a continuar e a acreditar!

À minha família, que me apoiou desde o dia em que escolhi ser Farmacêutica.

Ao meu pai e à mãe, que aceitaram a minha escolha e que todos os dias me incentivam a fazer mais e melhor.

À minha melhor amiga, à melhor irmã que sendo uma excelente profissional se tornou um exemplo que sigo todos os dias.

A todos aqueles que podem não estar aqui referidos, mas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste projecto

A todos o meu muito obrigado.

Índice

Índice de figuras	IX
Índice de tabelas	X
Índice de gráficos	XI
Resumo	XII
Abstract	XIII
Lista de abreviaturas	XIV
1. Introdução.....	1
1.1 A administração oral de péptidos e proteínas	1
1.2 Sistemas implantáveis	9
1.2.1 Vantagens dos sistemas terapêuticos implantáveis	11
1.2.2 Desvantagens dos sistemas terapêuticos implantáveis	12
1.3 Proteínas	14
1.3.1 Lisozima	16
1.4 Lípidos.....	18
1.5 <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	19
1.6 Métodos de Produção.....	21
2. Procedimento experimental	23
2.1 Justificação dos componentes usados.....	23
2.2 <i>Design</i> de implantes	23
2.3 Extracção Inicial	24
2.4 Ensaio de libertação	24
2.5 Avaliação da actividade biológica	25
2.6 Doseamento proteico.....	25
2.7 Electroforese em gel de poliacrilamida	26
3. Apresentação e tratamento de resultados.....	29
3.1 <i>Design</i> de Implantes	29
3.2 Extracção inicial.....	29

3.3	Ensaio de libertação	30
3.4	Avaliação da actividade biológica	31
3.5	Doseamento proteico.....	31
3.6	Electroforese em gel de poliacrilamida	33
	Conclusão.....	34
	Referências Bibliográficas	36

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura da pele.....	3
Figura 2 - Diferentes tipos de administração e doses administradas.....	5
Figura 3 - Libertação controlada <i>versus</i> libertação convencional.	6
Figura 4 - Diferentes tipos de transportadores à base de lípidos.....	7
Figura 5 - Exemplo do mercado global de bioengenharia (fármacos proteicos) entre 2012 e 2019.....	15
Figura 6 - Estrutura espacial da lisozima.....	17
Figura 7 - <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	19
Figura 8 - Montagem para a produção de implantes.	23
Figura 9 - Método do BCA.....	26
Figura 10 - Montagem para a electroforese	28
Figura 11 - Ensaios de libertação.....	31
Figura 12 - Resultados após incubação.	33
Figura 13 – Gel de poliacrilamida obtido.	33

Índice de tabelas

Tabela 1 - Diferenças entre os tipos de Dynasan.	18
Tabela 2 - Composição dos lotes de implantes preparados.....	24
Tabela 3 - Composição do gel resolvente e concentrador.	27
Tabela 4 - Concentrações dos padrões e respectivas absorvâncias.	31

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Quantidade inicial de proteína nos implantes produzidos.	29
Gráfico 2 - Actividade inicial dos implantes.	30
Gráfico 3 - Actividade cumulativa da lisozima (U/mg) ao longo de 14 dias.....	31
Gráfico 4 - Curva de Calibração.....	32
Gráfico 5 - Concentração Média da Lisozima ao longo dos 14 dias de libertação.	32

Resumo

O sector da biotecnologia tem apresentado um avanço considerável conduzindo a um aumento do número de fármacos peptídicos e proteicos, encontrando-se muito em franco desenvolvimento.

A administração oral pode ser problemática para alguns fármacos, de tal modo que, é necessário considerar outras alternativas eficazes e a pele é um candidato promissor. Consequentemente, a administração transdérmica de fármacos tem sido alvo de pesquisas e desenvolvimentos.

Os implantes lipídicos são sistemas promissores para o tratamento de diversas patologias, uma vez que, permitem uma libertação controlada do fármaco ao longo do tempo e são vantajosos em relação a outras vias de administração, de modo que, em muitos casos não necessitam de administrações constantes. Por conseguinte, os implantes lipídicos foram usados com o objectivo de estudar a libertação de uma proteína – a lisozima.

Palavras-chave: Sistemas de libertação, Implantes lipídicos, Proteínas, Lisozima

Abstract

The biotechnology sector has shown considerable progress leading to an increase in the number of peptide and protein drugs, lying very rapidly developing.

Oral administration can be problematic for some drugs, so that it is necessary to consider other effective alternatives and skin is a promising candidate. Consequently, transdermal drug delivery has been the subject of research and development.

The lipid implants are a promising systems for the treatment of various disorders since they allow a controlled release of the drug over time and are advantageous over other routes of administration, so that in many cases does not require constant administration. Therefore, lipid implants were used in order to study the release of a protein - lysozyme.

Keywords: Delivery systems, lipidic implants, protein, lysozyme

Lista de abreviaturas

° C – Graus Celsius

α – Alfa

β – Beta

BCA – Método do ácido bicinconínico, do inglês Bicinchoninic acid method

Cu^{2+} – Cobre

et al. – E colaboradores

Da – Dalton

DDS – Sistemas de distribuição de fármacos, do inglês Drug delivery systems

g – Grama

I&D – Investigação e Desenvolvimento

m – Massa

mg – Miligrama

L – Litros

mm – Milímetros

μL – Microlitros

nm – Nanómetros

PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida, do inglês Polyacrylamide gel electrophoresis

pH – Potencial de hidrogénio

pKa – Constante de dissociação de um ácido

PSA – Persulfato de Amónio

rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SLN – Nanopartículas de lípidos sólidos, do inglês Solid lipid nanoparticles

spp – Espécies

TEMED – N,N,N',N' - tetrametilenodiamina

TGI – Tracto Gastrointestinal

UV/VIS – Radiação Ultravioleta/Visível

VIH – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

1. Introdução

1.1 A administração oral de péptidos e proteínas

Nos últimos anos, tem sido constante a aprovação de variados produtos farmacêuticos, gerando receitas de mais de 56 biliões de dólares. O avanço do sector biotecnológico contribuiu para o aumento do desenvolvimento de fármacos proteicos e peptídicos apropriados para o tratamento de diversas patologias, nomeadamente, cancro, diabetes e osteoporose (Morishita & Peppas, 2006). Os fármacos proteicos e peptídicos têm sido usados para o tratamento de inúmeras doenças devido à sua selectividade, eficácia e por possuírem reduzidos efeitos secundários. Este tipo de fármacos é, normalmente, administrado por injeção, sendo contudo, a via oral, a primeira escolha dos doentes, pela sua comodidade comparativamente à via injectável. Esta preferência pela via oral, por parte dos pacientes, é de igual modo, verificada pela indústria farmacêutica, não só pelo reduzido custo de produção, mas também pela toma de uma dosagem mais correcta (Li *et al.*, 2012).

A administração de péptidos e proteínas é habitualmente realizada através da alimentação. O estômago é o local onde se inicia a digestão de proteínas, pois a presença de um ambiente ácido propicia a desnaturação proteica (Berg *et al.*, 2002). O valor nutricional das proteínas é elevado pois são estas macromoléculas que fornecem azoto para as várias etapas metabólicas (Tsutsumi & Tsutsumi, 2014).

Ao longo dos tempos, devido ao progresso da tecnologia e da ciência, vários péptidos bioactivos e proteínas foram descobertos (Martins *et al.*, 2007). A utilização de péptidos e proteínas tem aumentado, consideravelmente, desde que se comprovou a sua eficácia como agentes terapêuticos como por exemplo vacinas, hormonas e anticorpos monoclonais (Reis *et al.*, 2013). Estas classes de agentes terapêuticos apresentam um papel importante no controlo de várias funções metabólicas se administradas no local, tempo e quantidades correctas (Rawat *et al.*, 2008).

Actualmente, a via de administração mais aceite para a administração de péptidos e/ou proteínas é a via de administração parentérica devido à susceptibilidade dos fármacos à degradação enzimática (Vilar *et al.*, 2012). Os fármacos veiculados pela via parentérica (quer seja pela via intramuscular ou pela via intravenosa) são capazes de atingir a circulação sistémica dada a rápida absorção (Feridooni *et al.*, 2016). Esta via de administração é facilmente acatada pela indústria farmacêutica e, como resultado, a mais rápida para a comercialização no mercado. Para além da via parentérica, o mercado apresenta outras alternativas que não são viáveis para a

administração de péptidos/proteínas (Li *et al.*, 2012; Feridooni *et al.*, 2016), que seguidamente serão mencionados.

Via nasal: Ao contrário da via oral, esta via não é afectada pelo efeito de primeira passagem, no entanto, factores como dose, volume, viscosidade, osmolaridade da solução na qual o fármaco é absorvido, potencial de hidrogénio (pH), excipientes usados, forma da dosagem, aparelhos usados para administrar o fármaco e técnicas de administração podem afectar a absorção do fármaco dentro da cavidade nasal. Por outro lado, factores como a rápida taxa de absorção, a elevada permeabilidade do epitélio, a elevada circulação sanguínea, a acessibilidade e o facto desta via não ser afectada pelo efeito de primeira passagem são vantagens da utilização deste tipo de via de administração (Feridooni *et al.*, 2016).

Via pulmonar: A superfície pulmonar caracterizada pela sua larga área e vascularização permite um acesso directo do fármaco à circulação sistémica e evita o metabolismo de primeira passagem o que, conseqüentemente diminui a degradação no tracto gastrointestinal (TGI) sendo esta uma via não invasiva. Estudos em animais demonstraram que a biodisponibilidade de medicamentos entregues pela via pulmonar é de 10% a 50% (dependendo do tipo de proteína), no entanto, aquando da sua administração em humanos, o mesmo não se verifica. O tamanho das partículas pode, de igual modo, ser considerado uma desvantagem, dado que quanto maior for o seu tamanho, maior dificuldade terão em alcançar tecidos mais profundos, afectando assim a biodisponibilidade. Outro inconveniente da utilização desta via é o rápido aumento dos níveis de fármacos proteicos e peptídicos no soro (Feridooni *et al.*, 2016).

Via oral: Os fármacos administrados pela via oral apresentam como desvantagem a degradação proteolítica ao longo do TGI, caracterizado por uma maior incidência no estômago e no duodeno, parte do intestino delgado e com menor incidência na boca, faringe, esófago, íleo e cólon, por ordem descendente. Outras desvantagens são a instabilidade física e química, a rápida eliminação e a biodisponibilidade do fármaco que está dependente da massa molecular e solubilidade. A biodisponibilidade é afectada quando a massa molecular do fármaco é superior a 700 Dalton (Da) (Feridooni *et al.*, 2016).

A administração oral de péptidos e proteínas tem sido cada vez mais estudada e desenvolvida. Assim, e dado as desvantagens anteriormente apresentadas, é necessário considerar uma alternativa viável que permita a administração do fármaco

e, também, a adesão do doente. Uma alternativa a considerar é a pele devido à sua grande área superficial e facilidade de acesso. A camada superficial apresenta o estrato córneo constituído por queratina e células anucleadas. Os fármacos lipofílicos podem atravessar esta camada, dependendo da sua lipofilicidade e dimensão molecular (Feridooni *et al.*, 2016).

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano. O sistema tegumentar é formado pela pele, mas também pelas suas estruturas e derivados (Nicol, 2005). Apresenta como funções: a defesa, a termorregulação, sensorial, excreção, metabólica e de reabsorção (Darleniski *et al.*, 2011). Sendo uma das funções a protecção, este órgão controla e limita a passagem de substâncias como a água, electrólitos, microrganismos, e agentes tóxicos e também a radiação ultravioleta (Zaidi & Lanigan, 2010).

A pele é um órgão estruturalmente dinâmico, o que significa, que há substituição das células superficiais por células provenientes de camadas mais internas (Zaidi & Lanigan, 2010). De destacar que apenas quando a pele se apresenta saudável é que possui a capacidade de fornecimento de mecanismos de defesa contra factores físicos, (como radiação ou traumas), contra factores químicos (como alérgenos, xenobióticos e substâncias activas) e contra factores biológicos (como bactérias e vírus) (Darleniski *et al.*, 2011).

Revista a importância e as funções da pele, é necessário realçar a necessidade de uma estrutura consolidada contra as agressões provenientes do meio ambiente.

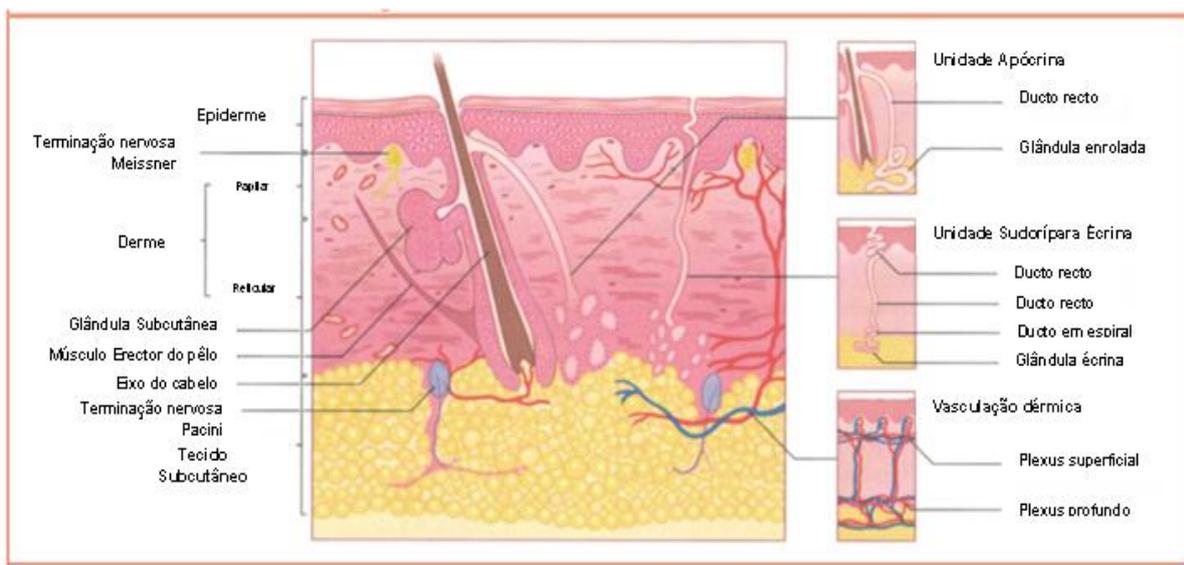


Figura 1 – Estrutura da pele (Nicol, 2005).

Assim, a pele apresenta na sua estrutura três camadas principais, por ordem de decrescente de profundidade: a *epiderme*, a *derme* e a *hipoderme*, como observado na figura 1. A primeira e, por isso, a mais exterior é aquela que se encontra em contacto com o meio ambiente funcionando como uma barreira física e química entre os ambientes externo e interno. A derme, camada intermédia, fornece suporte estrutural que se situa sobre a hipoderme, local igualmente importante pelo depósito de lípidos (Zaidi & Lanigan, 2010). Histologicamente, a epiderme é constituída por epitélio pavimentoso estratificado, por células dendríticas e queratinócitos, cuja função é a produção de queratina. Para além destas células, esta camada é ainda constituída por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. De acordo com a morfologia dos queratinócitos, esta camada divide-se em cinco estratos: *estrato basal* (constituído por uma camada de células cúbicas ou cilíndricas); *estrato espinhoso* (constituído por 8 a 10 camadas de células multifacetadas); *estrato granuloso* (constituído por 2 a 5 camadas de células achatadas) *estrato translúcido* (constituído por várias camadas distintas); e *estrato córneo* (constituído por 25 ou mais camadas de células mortas) (Nicol, 2005; Valdés –rodríguez *et al.*, 2012).

A derme é constituída por duas camadas: a camada papilar e a camada reticular sendo a reticular a mais profunda constituída por tecido denso e irregular enquanto que a camada papilar é constituída por prolongamentos que podem atingir a derme (Seeley *et al.*, 2008).

A hipoderme é constituída por tecido conjuntivo laxo e fibras de elastina e colagénio. A pele, por ser o maior órgão do corpo humano apresenta uma grande área para exploração científica (Seeley *et al.*, 2008).

Neste sentido, e pela larga área de exploração científica que a pele proporciona, a terapia individualizada surge nos dias de hoje como uma expansão do exame clínico de rotina que é realizado a cada doente. Este exame tem como etapas a avaliação do doente, o diagnóstico e o tratamento da patologia. A medicina tradicional é sustentada por métodos baseados na observação, análise de sintomas do doente e apresentação da patologia (Sakamoto *et al.*, 2010).

A farmacoterapia convencional pressupõe a utilização de fármacos onde a absorção e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade dependem de inúmeros factores entre os quais se destacam a massa molecular, constante de dissociação do composto (pKa), número de ligações por átomos de hidrogénio da molécula, solubilidade e estabilidade química. A massa molecular tem uma grande relevância em relação aos outros factores uma vez que, a apresentação de uma baixa massa molecular por parte de um

fármaco permite, mais facilmente, a passagem por vários compartimentos do organismo e atingir todo o tipo de células. Todos estes factores influenciam, negativamente, uma resposta terapêutica considerada aceitável (Vilar *et al.*, 2012).

A libertação controlada de fármacos é uma das áreas mais importantes e que tem apresentado um rápido avanço científico em prol da saúde humana. Os sistemas de libertação controlada oferecem vantagens em comparação com os sistemas convencionais, pela apresentação de uma maior efectividade, conveniência, reduzida toxicidade e uma maior adesão por parte dos doentes (Uhlich *et al.*, 1999). Além disso, permitem um aumento da actividade terapêutica, reduzindo os efeitos secundários e o número de doses necessárias para o tratamento (Vilar *et al.*, 2012). Estes sistemas têm como objectivo a melhoria do sucesso da eficácia do fármaco e, para tal, vários parâmetros podem sofrer alterações, tais como o perfil de libertação, estabilidade, a capacidade de atravessar veículos biológicos e distribuição. De outro modo, estes sistemas podem conduzir a alterações na farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco (Vilar *et al.*, 2012). Além disso, a libertação controlada permite uma libertação do fármaco a um nível comparável com a libertação subjacente a diversas vias de administração como demonstrado na figura 2 (Lambert, 2007).

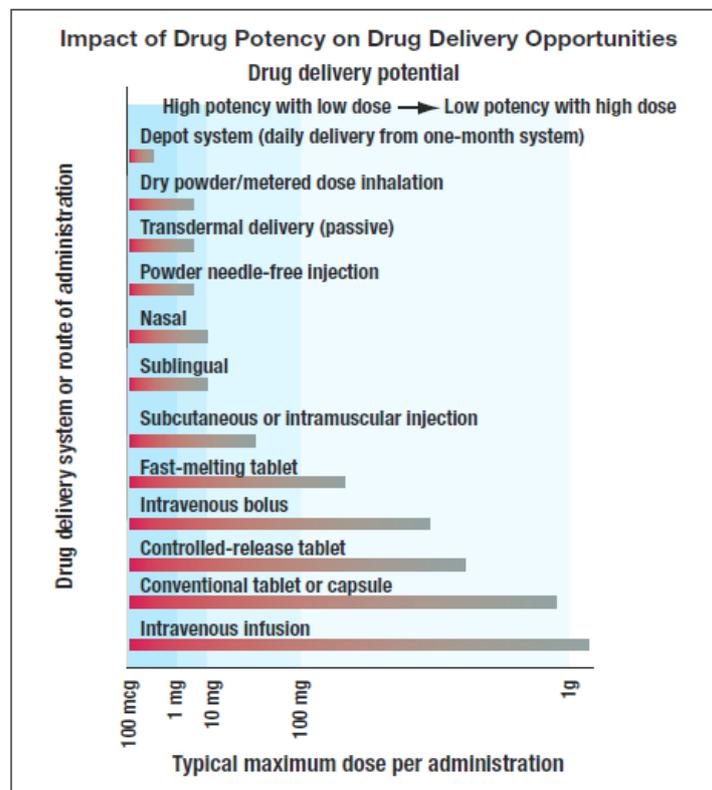


Figura 2 - Diferentes tipos de administração e doses administradas (Lambert, 2007).

A libertação controlada de fármacos é benéfica em duas situações: Primeiramente, quando a distribuição do fármaco provoca maiores efeitos secundários aquando da interacção com outros tecidos ou, em segundo lugar, quando a distribuição do fármaco não permite atingir o local de acção (devido à degradação a que o fármaco está sujeito) (Vilar *et al.*, 2012).

A administração de um fármaco através de um comprimido com intervalos de tempo (por exemplo de 4 em 4 horas) pode levar a alteração das concentrações sistémicas do fármaco com períodos de ineficácia e a toxicidade. Os sistemas de libertação controlada permitem a manutenção das concentrações terapêuticas e velocidade durante um período de tempo estabelecido (Farrell *et al.*, 2003). Assim, a libertação controlada é importante, por exemplo, para fármacos que possam ser metabolizados e, conseqüentemente eliminados, o que não conduz benefício terapêutico (Uhirch *et al.*, 1999).

A libertação controlada, como é possível observar pela figura 3 e a libertação direccionada (*Drug targeting*) são fundamentais para as terapias individualizadas. Enquanto a entrega direccionada se respeita à administração de fármacos num local específico, por outro lado, a libertação controlada diz respeito à administração de fármacos no momento exacto (Sakamoto *et al.*, 2010).

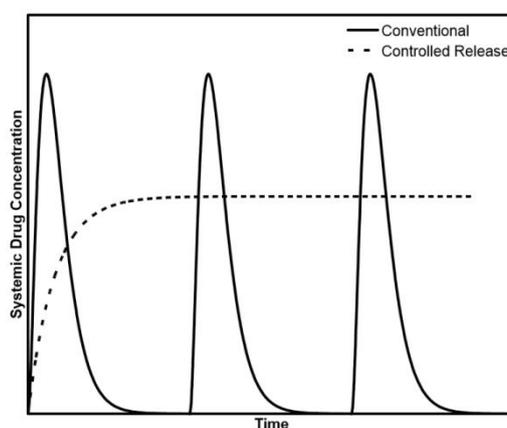


Figura 3 - Libertação controlada versus libertação convencional (Farrell *et al.*, 2003).

A grande maioria das terapias é baseada na administração sistémica de fármacos. A veiculação de fármacos pode ser realizada por diversas vias de administração e estas estão associadas a uma rápida libertação do fármaco o que conduz ao aumento da sua concentração no plasma. Assim, a utilização de sistemas de libertação controlada é benéfica, de tal modo que, permitem uma libertação do fármaco ao longo do tempo. A libertação controlada pode ser (Sakamoto *et al.*, 2010):

Libertação constante: Esta libertação tem sido investigada para o tratamento de diversas patologias, incluindo cancro e hepatite. A concentração do fármaco no plasma é constante durante um determinado período de tempo sendo alcançado através de uma cinética de ordem zero (verifica-se quando o gradiente de concentração do fármaco ao longo do dispositivo atinge o equilíbrio) (Sakamoto *et al.*, 2010).

Libertação Modulável: Surge quando as terapias múltiplas dependem da capacidade da libertação do fármaco de acordo com os ciclos circadianos. Tem sido demonstrado que a eficácia dos tratamentos está relacionada com a administração do fármaco de acordo com ritmos biológicos. Deste modo, a cronoterapia está a ser utilizada, por exemplo, para o tratamento do cancro (Sakamoto *et al.*, 2010).

Actualmente, continua em estudo, o *Drug targeting* e libertação controlada pelas vantagens que oferecem no tratamento de diversas patologias. A conjugação da libertação controlada/*Drug targeting* aliada ao desenvolvimento de estratégias inovadoras permite acesso a uma terapia individualizada por parte dos doentes (Sakamoto *et al.*, 2010).

Lipossomas, suspensões oleosas, microbolhas de lípidos, emulsões lipídicas, solid lipid nanoparticules (SLN), implantes lipídicos, microtúbulos lipídicos e microcilindros, e microesferas lipídicas (liposferas) são considerados sistemas à base de lípidos para péptidos e proteínas como demonstrado na figura 4 (Rawat *et al.*, 2008).

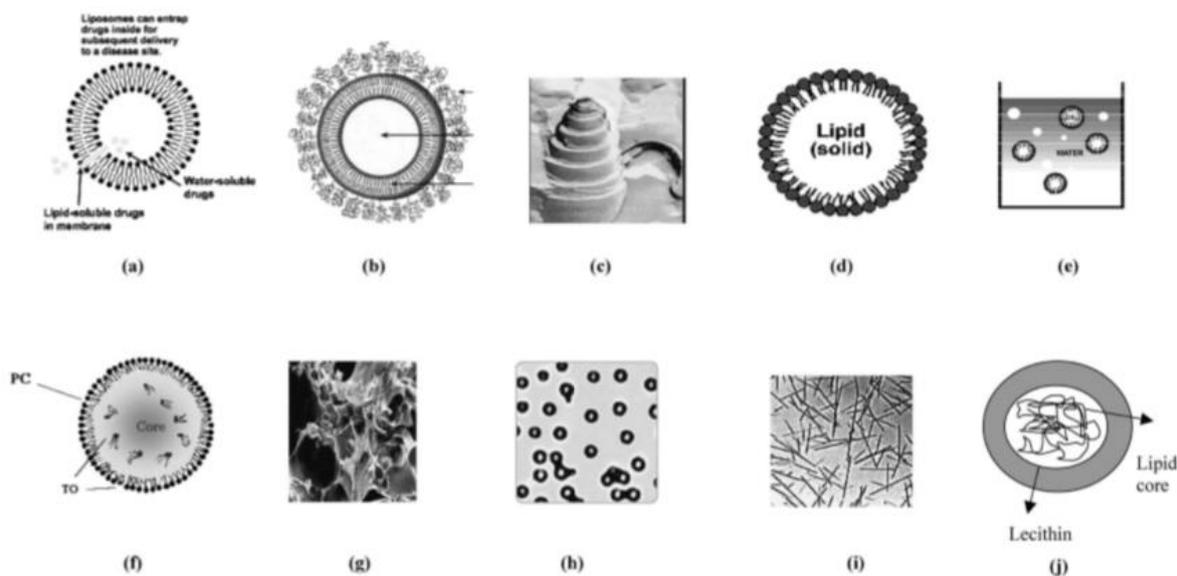


Figura 4 - Diferentes tipos de transportadores à base de lípidos. (a) Lipossomas (b) Lipossomas inócuos (c) Lipossomas cocleares (d) Solid lipid nanoparticules (e) Suspensões oleosas (f) Emulsões lipídicas (g) Implantes lipídicos (h) Microbolhas (i) Microtúbulos (j) Liposferas (Rawat *et al.*, 2008).

Assim sendo, os sistemas à base de lípidos para péptidos e proteínas são:

Lipossomas: São vesículas de bicamada concêntrica composta por fosfolípidos naturais ou sintéticos (Rawat *et al.*, 2008).

Solid lipid nanoparticules: São partículas de lípidos sólidos coloidais submicrométricas (50-1000 nm). São compostas por um núcleo hidrófobo sólido envolvido num revestimento em monocamada de fosfolípidos (Rawat *et al.*, 2008).

Suspensões oleosas: São dispersões de péptidos e proteínas em óleos para libertação sustentada (Rawat *et al.*, 2008).

Microemulsões: Foram descritas, em 1987, por Rosano e Clausse como sendo “microemulsão” como um qualquer fluido multicomponente (óleo) e um ou vários agentes tensoactivos que resulta em sistemas estáveis, transparentes e de baixa viscosidade. Também designadas de “emulsão transparente”, “emulsão micelar inchada” ou “emulsão micelar” (Rawat *et al.*, 2008).

Sistemas de entrega de fármaco auto-emulsionante (SEEDS): São soluções anidras de fármaco em óleo contendo um tensoactivo e um co-tensoactivo que, espontaneamente emulsiona quando é adicionado um excesso de água (Rawat *et al.*, 2008).

Microbolhas de lípidos: São microtúbulos revestidos de lípidos e representam uma nova classe de agentes usados no diagnóstico e terapêutica (Rawat *et al.*, 2008).

Microtúbulos lipídicos/ Microcilindros: São sistemas em que os surfactantes cristalizam em bicamada (Rawat *et al.*, 2008).

Lipoesferas: São novos sistemas de encapsulação desenvolvidos para entrega parentérica. Foram, inicialmente, descritas por Domb com um tamanho de partículas de 0,2 a 100 μm e compostas por um núcleo hidrófobo sólido (Rawat *et al.*, 2008).

Implantes: São estruturas que apresentam um enorme potencial devido à capacidade de libertação de acordo com os ritmos biológicos, o que representa um avanço para a terapia individualizada (Sakamoto *et al.*, 2010). Além de apresentarem uma elevada compatibilidade, são uma alternativa aos polímeros não lipídicos sendo por isso uma mais-valia no estudo da libertação controlada de fármacos (Kreye *et al.*, 2011).

1.2 Sistemas implantáveis

No final da terceira década do passado século, um comprimido com partículas em pó contendo estradiol foi implantado por via subcutânea em animais. Comparativamente aos animais que não tinham sido implantados com este comprimido, os animais implantados adquiriram mais peso e de uma forma mais rápida. Foram ainda fabricados outros implantes contendo hormonas esteróides como por exemplo a testosterona e a progesterona. A utilização deste tipo de sistemas é regulada pela dissolução do fármaco nos fluidos corporais (sem controlo externo) e reprodutibilidade (na taxa de libertação do fármaco) (Henriques, 2014). Tendo em consideração estes factores, várias tentativas têm sido executadas no sentido de optimização da terapêutica (Kreye *et al.*, 2008).

Em 1960, foi descrito que compostos de baixa massa molecular e hidrofóbicos, foram permeados a uma taxa relativamente baixa através de uma cápsula de borracha de silicone. No entanto, quando implantados em animais, a taxa de libertação foi moderadamente constante e pouca inflamação se verificou no local de administração (Henriques, 2014).

Muitas pesquisas e trabalhos têm sido realizados, no sentido de melhor entender o comportamento dos implantes. Kent e colegas (Kent, *et al.*, 1982) estudaram, pela primeira vez, matrizes de implantes constituídas por colesterol. Em 1987, Wang *et al.*, estudaram a dispersão de insulina num *pellet* preparado por compressão de uma mistura de colesterol. A colocação dos *pellets* em ratos ajudou a reduzir os níveis de glicose, em 24 dias. Mais tarde, o ácido palmítico foi considerado como um excipiente para a libertação prolongada de insulina. Steber *et al.*, (1989) prepararam implantes à base de triglicéridos, que permitiam a veiculação de proteínas e polipéptidos como a somatotropina. Trabalhos mais recentes têm demonstrado que a gelatina pode funcionar como modificador da libertação (Rawat *et al.*, 2008). Koennings *et al.* (2006), estudaram os implantes lipídicos com interleucina-18. O procedimento de preparação não teve qualquer efeito na estabilidade da proteína. As partículas de proteína foram co-liofilizadas com polietileno glicol, seguido de uma compressão da mistura do pó através de uma ferramenta de compactação. Todos estes trabalhos demonstraram que os implantes lipídicos podem ser usados para a libertação controlada de péptidos e proteínas sem que ocorra a sua degradação (Rawat *et al.*, 2008).

Deste modo, define-se como implante um sistema de veiculação de fármacos que permite a libertação do fármaco a uma taxa desejada e ao longo de um período de tempo prolongado. Estes sistemas podem ser usados para administração parentérica, incluindo administração ocular ou subcutânea. Estes sistemas podem desempenhar um papel fundamental na veiculação de fármacos (em especial proteínas), devido a: (Lambert, 2007)

1. alguns fármacos apresentarem uma baixa disponibilidade oral. Visto que, a administração parentérica está bem sustentada historicamente, ao contrário de outras vias de administração, como a via pulmonar, que ainda está em evolução.
2. a via de administração injectável pressupor a entrega do fármaco no seu local de acção (frequentemente o local de anestesia).
3. maior parte dos sistemas de veiculação de fármacos serem apresentados na forma injectável.
4. administração oral estar dependente da passagem pelo TGI (limitado a 24 horas de trânsito normal do TGI). Uma vez que, as formulações de libertação controlada são fundamentais para a libertação do fármaco ao longo do tempo (dias, semanas ou meses).
5. via de administração injectável ser a única via prática na saúde animal.
6. Existência de algumas situações em que a via oral não é recomendada, como por exemplo em doentes como náuseas.

Os implantes estão disponíveis em variadas formas, como *polímeros* (que podem ser biodegradáveis ou não biodegradáveis e que podem apresentar formas de haste, cilindro, anel ou película e *mini-bombas* (através de mecanismos mecânicos ou osmóticos). As gorduras e as ceras são consideradas bons candidatos para a preparação de implantes, uma vez que, apresentam uma elevada compressibilidade quando comparados com sistemas poliméricos (Rawat *et al.*, 2008).

Os implantes lipídicos são vantajosos em relação aos implantes poliméricos, uma vez que não existe a criação de ambientes acídicos (como se verifica com os implantes poliméricos) durante a libertação do fármaco. Dada a sensibilidade das proteínas e péptidos, qualquer alteração no valor de pH pode conduzir à sua inactivação (Kreye *et.al.*, 2011).

O desenvolvimento deste tipo de sistemas permite o tratamento local e sistémico de um grande número de patologias. Estes sistemas podem permitir a administração controlada de fármacos ao longo de semanas ou meses, de acordo com o doente e

patologia associada. Caso se trate de uma terapia a longo prazo, é necessário a existência de dispositivos como os sistemas implantáveis, capazes de suportar a entrega do fármaco ao longo de um período de tempo relativamente longo e, também, capazes de ultrapassar a necessidade de administrações constantes do fármaco realizada, na maioria das vezes, por via intravenosa ou oral. Todos estes factores contribuem para a adesão do doente ao tratamento, dado que pode reduzir o número de idas a clínicas e/ou hospitais e automedicação (Sakamoto *et al.*, 2010).

Os implantes lipídicos apresentam vantagens como sistemas de libertação controlada de fármacos, nomeadamente, para medicamentos à base de proteínas (Kreye *et al.*, 2008).

1.2.1 Vantagens dos sistemas terapêuticos implantáveis

Os sistemas terapêuticos implantáveis são sistemas de veiculação promissores para a libertação de diversas moléculas. As vantagens dos sistemas terapêuticos implantáveis são:

- **Conveniência:** Por vezes, de modo a verificar as concentrações eficazes do fármaco na corrente sanguínea e para a manutenção destas concentrações por longos períodos de tempo na corrente sanguínea, os doentes são obrigados a permanecer no hospital durante a administração do medicamento. Por outro lado, os implantes permitem que os doentes tenham acesso à terapêutica, com o mínimo de vigilância médica (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).
- **Adesão:** Depois da sua inserção, não existe a possibilidade de incumprimento das tomas por parte do doente (como acontece, por exemplo, na via oral), o que aumenta, substancialmente, a adesão do doente (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).
- **Potencial para libertação controlada:** Possibilitam a veiculação de fármacos através de uma cinética de libertação de ordem zero. Esta cinética oferece vantagens, uma vez que, evita picos plasmáticos que podem conduzir a toxicidade e doses subterapêuticas que podem originar ineficácia. Além destas vantagens, também permite a redução da frequência de administração (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).
- **Potencial para libertação intermitente:** Podem ser usadas bombas programáveis. Estas bombas programáveis foram desenvolvidas em 1980 permitindo que doentes e médicos consigam controlar a velocidade de infusão

de um determinado fármaco. Este tipo de libertação é importante para a libertação do fármaco em função de ritmos circadianos, necessidades metabólicas e libertação de péptidos e proteínas (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).

- **Potencial para libertação bio sensível:** Área que se encontra em investigação (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).
- **Melhora a entrega de fármacos:** O implante permite a veiculação do fármaco e a sua administração local ou sistemicamente, sem interferências de possíveis barreiras anatómicas. São um exemplo desta vantagem os fármacos que são mal absorvidos ou inactivados no TGI e/ou no fígado (Henriques, 2014; Sakamoto *et al.*, 2010)
- **Flexibilidade:** Através da escolha de materiais, métodos de fabrico, taxa de libertação e dosagem do fármaco, é um sistema que apresenta uma considerável flexibilidade (Henriques, 2014; Rawat *et al.*, 2008)
- **Comercial:** Quando um fármaco é incorporado num implante, poderá ser considerado como um novo medicamento estando protegido por cinco anos. Se, por outro lado, se tratar de um fármaco já existente, o mesmo estará protegido por três anos (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).

1.2.2 Desvantagens dos sistemas terapêuticos implantáveis

Como já mencionado os implantes apresentam algumas vantagens, no entanto, também possuem algumas desvantagens, entre as quais:

- **Sistema invasivo:** Mesmo que seja considerado como uma pequena cirurgia, é necessário um procedimento cirúrgico para iniciar o tratamento implantável e, também, pessoal especializado para a realização da mesma. Pode ainda ser demorado, traumático, causar a formação de cicatrizes e, num pequeno número de doentes, causar problemas relacionados com a cirurgia. Por fim, o doente pode sentir algum desconforto depois da colocação do dispositivo (Henriques, 2014; Li *et al.*, 2012)
- **Término do tratamento:** Apesar de alguns implantes biodegradáveis não necessitarem de remoção cirúrgica, por vezes, é necessário esta mesma cirurgia porque a biodegradação pode tornar difícil o término da entrega de fármacos. Contudo, os implantes não biodegradáveis e as bombas osmóticas necessitam de remoção cirúrgica (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).

- **Falha do dispositivo:** Devido a longos períodos de tratamento, o dispositivo pode falhar e requer uma intervenção cirúrgica para a sua remoção (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).
- **Fármacos potentes:** Para minimizar algum desconforto que os doentes possam sentir, os implantes apresentam um tamanho reduzido. Consequentemente, ficam condicionados em termos de capacidade, por isso, são muitas vezes, utilizados para fármacos potentes como hormonas (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).
- **Reacções adversas:** No local de administração do implante, encontra-se uma elevada concentração do fármaco; esta elevada concentração pode provocar reacções adversas (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).
- **Biocompatibilidade:** Uma vez que o implante é um material estranho ao organismo, a biocompatibilidade é uma questão importante (Henriques, 2014; Kreye *et al.*, 2011).
- **Comercial:** Para o desenvolvimento de um implante é necessário uma componente de investigação e outra de desenvolvimento (I&D). Se se tratar de um novo material, a segurança e biocompatibilidade devem ser avaliadas para que o produto seja aprovado. Se os parâmetros de segurança e biocompatibilidade não cumprirem os requisitos necessários, podem surgir um conjunto de problemas e originar atrasos no desenvolvimento e comercialização desse produto (Henriques, 2014; Hillery *et al.*, 2001).

1.3 Proteínas

Apenas 20 aminoácidos são necessários para construir uma proteína. A maior diferença entre proteínas baseia-se na estrutura e, conseqüentemente, na função, uma vez que a sequência de aminoácidos varia entre si. As proteínas podem apresentar quatro tipos de estruturas. A *estrutura primária* é determinada pela sequência linear de aminoácidos ao longo de uma cadeia, unidos através de ligações peptídicas. A *estrutura secundária* é determinada pelas interações entre os aminoácidos na sequência primária, essencialmente por pontes de hidrogénio, que levam a que a proteína se enrole formando estruturas de α -hélices e folhas β . Os domínios da estrutura secundária e as interações não covalentes resultam na *estrutura terciária* das proteínas. Por fim, a *estrutura quaternária* é caracterizada pelas interações não covalentes das cadeias proteicas diferentes que conduzem à formação de uma única proteína (Seeley, *et al.*, 2008).

As proteínas são muito sensíveis a pequenas alterações devido, principalmente, à sua complexidade química e estrutural (Mohl, 2006).

As proteínas e péptidos são polímeros de aminoácidos que apenas diferem no tamanho da cadeia. São macromoléculas biológicas com uma estrutura tridimensional única. Esta estrutura é responsável pelos mecanismos de transporte, solubilidade, *feedback* em soluções fisiológicas e pelas reacções bioquímicas. Devido à capacidade de se ligarem a homólogos biológicos, as proteínas apresentam uma enorme diversidade de funções, tais como fornecimento de energia e estrutura, regulação de processos orgânicos, acção como sistemas de transporte e auxílio na protecção e contracção muscular (Mohl, 2006).

Em 2010, cerca de 20 produtos de anticorpos e 150 produtos à base de proteínas foram aprovados no mercado dos Estados Unidos da América. Foi ainda relatado que mais de 100 fármacos proteicos aprovados se encontravam em uso e, aproximadamente, 800 se encontravam em desenvolvimento para o tratamento de variadas patologias como, por exemplo, Alzheimer, Parkinson e cancro. Estes fármacos representaram vendas na ordem dos 700 biliões de dólares mundialmente. Na verdade e, de acordo com um novo relatório apresentado em 2014 estima-se que a classe de fármacos proteicos, em hipotéticas regiões, tenha levado a um enorme crescimento económico com valores na ordem de 1,5 biliões de dólares, em 2013 e, com expectativas de atingir os 222,7 biliões de dólares em 2019 (Figura 5). A evolução

e o desenvolvimento de terapias para diversas patologias têm permitido um elevado crescimento desta indústria (Feridooni *et al.*, 2016).

FIGURA EXEMPLO
MERCADO GLOBAL DE BIOENGENHARIA DE FÁRMACOS PROTEICOS POR REGIÃO, 2012-2019
(\$ MILHÕES)

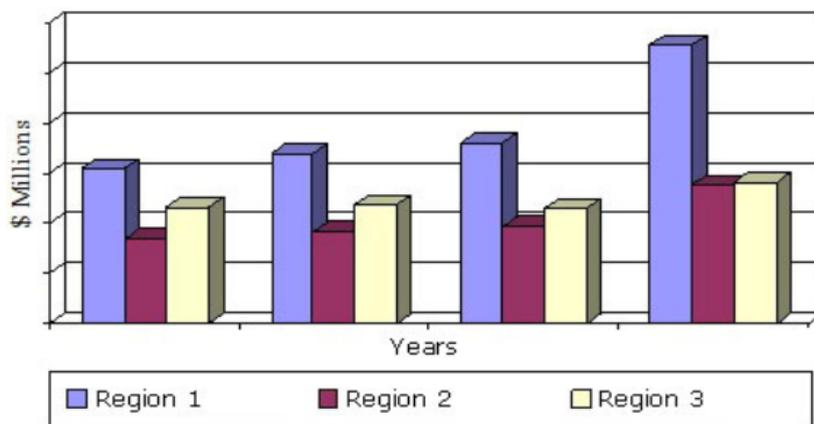


Figura 5 - Exemplo do mercado global de bioengenharia (fármacos proteicos) entre 2012 e 2019 (BCC Research, 2014).

Apesar das suas propriedades atractivas os péptidos e proteínas, apresentam desvantagens que condicionam a sua utilização por parte de doentes e profissionais de saúde. Os avanços da genómica e proteómica permitiram um aumento do número de fármacos proteicos sintéticos, no entanto, alguns não são biologicamente activos *in vivo*. Factores como a imunogenicidade, a toxicidade e baixa estabilidade conduzem a uma baixa actividade biológica, sendo esta uma das maiores dificuldades para a formulação (Feridooni *et al.*, 2016).

As maiores dificuldades na entrega de fármacos proteicos e peptídicos encontram-se na baixa biodisponibilidade (degradação enzimática no TGI), na instabilidade física e química, na rápida eliminação na circulação e na fraca permeabilidade através da mucosa do tracto gastrointestinal (Feridooni *et al.*, 2016).

Os fármacos proteicos e peptídicos são, de um modo geral, formulados no estado sólido podendo sofrer reacções de degradação. Por um lado, a degradação física diz respeito a modificações estruturais através da desnaturação, precipitação e agregação não covalente. Por outro lado, a agregação química diz respeito a modificações covalentes da estrutura primária na qual ocorre a clivagem ou a formação de ligações (Feridooni *et al.*, 2016).

Algumas cadeias de aminoácidos são quimicamente inertes, enquanto outras, são reactivas. Relativamente à estabilidade química, os aminoácidos são sensíveis a modificações através da formação ou quebra de ligações através de reacções não enzimáticas como a desamidação, a oxidação, a hidrólise, a β -eliminação, a racemização e a troca de dissulfureto (Mohl, 2006).

A agregação de proteínas refere-se a uma associação de pelo menos duas proteínas desnaturadas e este é o principal problema de instabilidade física e dificuldade durante o desenvolvimento de fármacos proteicos. A agregação não covalente de proteínas é causada pela interacção dos resíduos hidrofóbicos que se encontram expostos; ocorre a formação de agregados solúveis e, com o aumento do número de moléculas, a solubilidade diminui, o que conduz à precipitação de proteínas. A agregação covalente de proteínas é devida a reacções químicas, como por exemplo a β -eliminação (Mohl, 2006).

A actividade das proteínas depende da estrutura conformacional que pode ser facilmente alterada devido a factores como o pH, impurezas e temperatura. A actividade proteica é outra dificuldade que daí advém, uma vez que, a detecção das alterações conformacionais é complexa, pelo que se torna, também, noutro desafio aquando da formulação de fármacos peptídicos e proteicos (Feridooni *et al.*, 2016).

1.3.1 Lisozima

A lisozima, ilustrada na figura 6, também conhecida como muramidase, foi acidentalmente descoberta por Alexandre Fleming em 1922, e possui a capacidade de clivar a ligação entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina em peptidoglicano (componente principal da parede celular bacteriana). A lisozima pode ser encontrada no soro, leite humano, leite de vaca, ovos e lágrimas (Callewaert & Michaels, 2010; Wu *et al.*, 2015).

Inicialmente, a lisozima não foi considerada útil no tratamento contra inúmeras doenças humanas e, assim sendo, não foi atribuído interesse à sua actividade antibacteriana. Mais tarde, nos anos 80, começou a ser utilizada como modelo em diferentes áreas como a química, cristalografia, enzimologia e biologia molecular. No entanto, também se verificou que a lisozima apresenta eficácia terapêutica contra várias patologias humanas, sem produzir imunogenicidade, nem efeitos secundários. Apresenta actividade bacteriostática e bacteriolítica e é caracterizada pela sua capacidade de protecção contra infecções por bactérias, fungos e vírus, podendo

também ser usada pela indústria alimentar como conservante (Callewaert & Michaels., 2015; Wu *et al.*, 2015).

A lisozima pode ser classificada em três tipos, de acordo com as diferenças nas sequências de aminoácidos e estruturas terciárias de proteínas: tipo C, tipo T4 ou tipo G. A lisozima presente nos ovos de galinha e a lisozima humana pertencem ao grupo C. A lisozima do ovo é facilmente obtida da clara do ovo em comparação com a lisozima humana, no entanto, esta apresenta uma maior actividade antibacteriana e maior estabilidade térmica, uma vez que, existem diferenças nos resíduos catiónicos e estrutura tridimensional (Wu *et al.*, 2015).

A lisozima é uma enzima hidrolítica, apresenta uma massa molecular entre 14 kilodalton (kDa) a 15 kDa e o seu ponto isoeléctrico é 11 (Wu *et al.*, 2015).

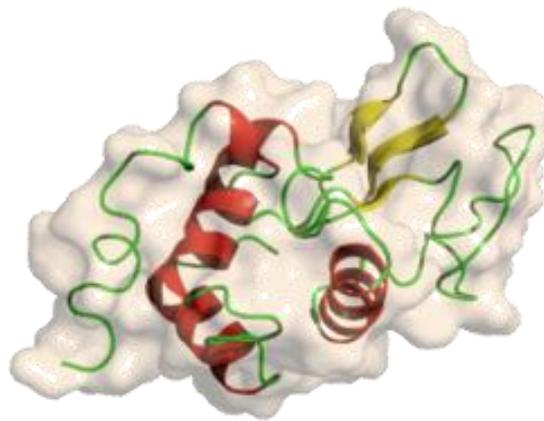


Figura 6 - Estrutura espacial da lisozima (Lysozyme Dimer, s.d.).

1.4 Lípidos

Os lípidos são um grupo heterogêneo de compostos que podem variar desde triglicéridos a surfactantes hidrofílicos. Segundo Small (1968), os lípidos podem ser classificados em lípidos polares e lípidos não polares, de acordo com a sua interação física com a água. *Drug delivery systems* (DDS) à base de lípidos são constituídos por lípidos polares que são biocompatíveis e biodegradáveis, tais como, fosfolípidos, ácidos gordos e triglicéridos. Devido às suas características, são bons veículos de distribuição de fármacos (Li *et al.*, 2012; Siegel & Rathbone, 2012).

Regra geral, os lípidos que são usados na formulação de implantes lipídicos caracterizam-se pela sua baixa toxicidade, conduzindo a menos efeitos secundários (Kreye *et al.*, 2011).

O Dynasan, como demonstrado na tabela 1, é um grupo de triglicéridos com uma estrutura microcristalina; é um éster de glicerol saturado com ácidos gordos não ramificados, de origem vegetal, que não contém antioxidantes e outros estabilizadores. Apresenta uma baixa toxicidade e poucos efeitos secundários, no entanto, apresenta como desvantagem, a sua instabilidade, uma vez que, diferentes polimorfismos podem surgir conduzindo a diferentes estruturas cristalinas com propriedades diferentes. Estes polimorfismos surgem devido às alterações de temperatura inerentes à sua produção (Mendes, 2013).

Estes triglicéridos são usados por indústrias farmacêuticas e cosméticas, podendo ser usados como adjuvantes em diversas preparações como comprimidos (funcionando como um lubrificante), supositórios, óvulos vaginais e *sticks* cosméticos (melhora o processo de solidificação) e em unguentos, loções e cremes corporais (promove estrutura) (Cremer, s.d.).

Tabela 1 - Diferenças entre os tipos de Dynasan (Cremer, s.d.).

	Dynasan 114 (C₄₅H₈₆O₆)	Dynasan 116 (C₅₁H₉₈O₆)	Dynasan 118 (C₅₇H₁₁₀O₆)
Ponto de Fusão	55-58°C	61-65°C	70-73°C
Solubilidade	Ligeiramente solúvel em n-hexano e éter dietílico. Muito baixo em etanol.	Ligeiramente solúvel em n-hexano e em éter dietílico e etanol.	Ligeiramente solúvel em n-hexano e em éter dietílico e etanol.

1.5 *Micrococcus lysodeikticus*

O género *Micrococcus* foi descoberto em 1872, por Cohn, no entanto, desde a sua descoberta novos estudos e investigações tem sido realizados para o aprofundamento das suas características e propriedades (Stackebrant *et al.*, 1995; Wieser *et al.*, 2002), o que contribuiu para aumento do conhecimento sobre este género. No ano de 1922, Fleming classificou taxonomicamente a espécie *Micrococcus lysodeikticus* e descobriu que este organismo apresentava elevada susceptibilidade à acção lítica da lisozima (Kloos & Schultes, 1969). Em 1955, Evans, Bradford e Niven sugeriram a inclusão do *Micrococcus lysodeikticus*, como é possível observar pela figura 7 no género *Micrococcus*, separando-a assim, do género *estafilococos* (Mai *et al.*, 1969).

Foi descrito por Cohn, pela primeira vez, para coloração gram-positiva. São bactérias aeróbicas e com catalase positiva (apresenta uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogénio). A maior parte dos membros da família *Micrococcus* apresenta uma tonalidade amarela e crescem a um pH elevado (pH=10), ainda que a presença de uma condição não condicione a outra (Prakash *et al.*, 2014). As células deste género são esféricas e não formam esporos (Zhao *et al.*, 2009), pertencem à classe *Actinobacteria*, à família *Micrococcaceae* e à ordem *Actinomycetales* (Liebl *et al.*, 2002).

São frequentemente isoladas da pele de mamíferos (Kloos *et al.*, 1974), podendo também ser encontrada na água, no solo (Zhang *et al.*, 2010), no ar (Rieser *et al.*, 2013), em resíduos de lacticínios (Chittipurna *et al.*, 2011) e nos tecidos internos de plantas (Zhao *et al.*, 2009) (Prakash *et al.*, 2004).

É geralmente difícil identificar *Micrococcus* como causa de uma infecção, pela sua presença na pele de mamíferos. Pode ser considerado um organismo saprófito ou comensal, ou um organismo patogénico oportunista, especialmente em casos de hospedeiros imunocomprometidos, como por exemplo, hospedeiros com Vírus da Imunodeficiência Adquirida (VIH).

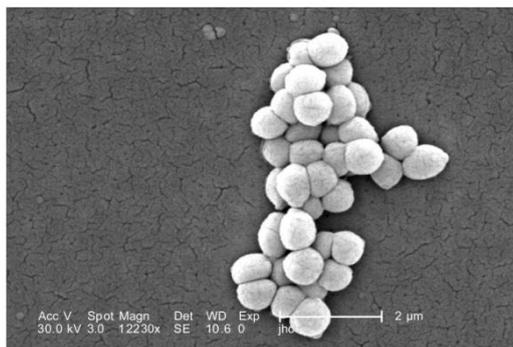


Figura 7 - *Micrococcus lysodeikticus* (CDC, 2005).

Em casos raros, podem ser registadas mortes de imunocomprometidos devido a infecções pulmonares causados por este organismo (Dada & Aruwa, 2014).

A transmissão é feita através do contacto com objectos ou superfícies contaminadas e através da inalação de partículas contaminadas. *Micrococcus spp.* são sensíveis a uma grande variedade de antibióticos como a penicilina, gentamicina, clindamicina e vancomicina, contudo, a probabilidade de infecção é baixa (Dada & Aruwa, 2014).

1.6 Métodos de produção de implantes

A produção dos implantes pode ser realizada por compressão, fusão ou extrusão (Kreye *et al.*, 2008). No **método de produção por compressão**, ocorre a compressão directa da mistura. É um processo de produção simples e favorável para os implantes lipídicos. Ainda assim, é necessário cautela em relação à distribuição da mistura lípido-proteína que deve ser uniforme. Esta uniformidade pode ser difícil de obter, devido às possíveis misturas de materiais e fracas propriedades de fluxo das misturas em pó, o que resulta em misturas não homogêneas. Esta técnica influencia a distribuição do fármaco no interior dos implantes e é um método desafiante no que diz respeito ao aumento de escala devido à fluidez da mistura. Se tal não se verificar, é necessário a adição de lubrificantes que podem modificar o padrão de libertação do fármaco (Kreye *et al.*, 2008).

Um método alternativo é o **método de produção por fusão** onde ocorre a fusão da mistura em moldes e arrefecimento em condições controladas. Neste caso, é necessário cuidado com substâncias termossensíveis (como as proteínas), uma vez que, podem perder a sua actividade biológica depois do aquecimento. Diferentes morfologias de implantes podem ser obtidas por compressão em oposição à produção por fusão. No entanto, como demonstrado por Pongjanyakul *et al.*, superfícies mais suaves podem ser obtidas quando os implantes são produzidos por fusão. Ainda assim, a superfície dos implantes produzidos por fusão permanece não poroso, depois da libertação do fármaco *in vitro*, ao contrário dos implantes produzidos por compressão em que a superfície se torna porosa. É ainda necessário cuidado com o estado físico do lípido devido aos polimorfismos que podem surgir. É de extrema relevância o estado físico do lípido, uma vez que, se este estado se alterar durante o armazenamento, pode originar uma alteração das propriedades do implante, como por exemplo, alteração da cinética de libertação do fármaco. Os triglicéridos, por exemplo, podem formar polimorfismos α ou β , dependendo, de vários factores como a velocidade de arrefecimento, temperatura inicial e final, presença de impurezas e pressão (Kreye *et al.*, 2008).

No **método de produção por extrusão**, a mistura atravessa uma agulha. Este método é vantajoso em relação aos anteriormente descritos devido à facilidade de aumento de escala. No entanto, é necessário precaução em relação às condições de extrusão, uma vez que, pode condicionar a porosidade e, tanto, a morfologia interior e como a exterior dos implantes. Ao contrário do método de produção por fusão, não se

verifica a fusão dos materiais mas sim o seu amolecimento, o que conseqüentemente reduz a formação de polimorfismos. As elevadas temperaturas durante a extrusão podem conduzir a alteração do estado físico do lípido e degradação do fármaco. No caso das proteínas, as interacções fármaco-lípido podem conduzir numa diminuição da actividade do fármaco (Kreye *et al.*, 2008).

2. Procedimento experimental

2.1 Componentes de implantes

Para a produção dos implantes foram usados três componentes em diferentes composições, sendo a liozima o componente em estudo. O lípido escolhido foi o Dynasan 118 pela facilidade de manuseio em relação a outros lípidos também utilizados na fase de otimização do método de produção. Por fim, o composto Gelucire foi utilizado por permitir a degradação do implante e a liberação do fármaco. Além disso, foi possível observar diferenças entre implantes produzidos com Gelucire com implantes que não possuíam este composto.

2.2 Design de implantes

Para a preparação dos implantes foram usados três componentes: liozima, gelucire e Dynasan 118. Assim, e de acordo com a tabela 2, foram preparados implantes com diferentes composições. Os constituintes necessários foram pesados e colocados em banho de água até fusão. A liozima foi adicionada, previamente pulverizada e tamisada, quando se verificou a fusão completa da mistura, durante 1 minuto e com agitação, com ilustrado na Figura 8.

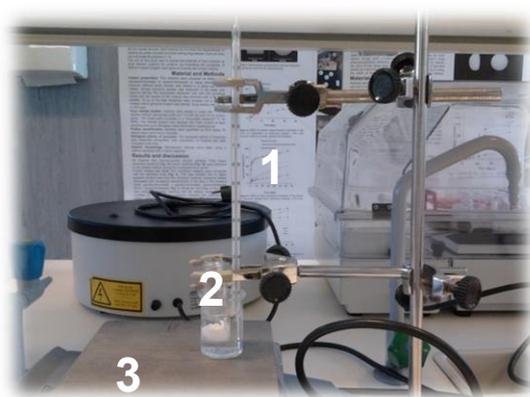


Figura 8 - Montagem para a produção de implantes. 1- Termómetro; 2 - Liozima + Gelucire + Dynasan + Agitador; 3 - Placa de aquecimento.

As condições de agitação e tempo foram, de igual modo, consideradas devido à sensibilidade da liozima, uma vez que, é necessário garantir a sua viabilidade aquando da preparação dos implantes. Os implantes foram moldados, depois de se

verificar a fusão completa da mistura, com uma pipeta de plástico. Assim que se verificou o arrefecimento dos implantes, estes foram cortados com o tamanho pretendido (2 mm). No final da preparação dos implantes, estes foram mantidos no exsiccador durante 1 dia para secagem.

Tabela 2- Composição dos lotes de implantes preparados.

	m(Lisozima)/mg	m(Gelucire)/mg	m(Dynasan 118)/mg
Lote I	300	200	1500
Lote II	300	-----	1700
Lote III	300	400	1300

2.3 Extração Inicial

Antes do início dos ensaios de libertação, foi realizada uma extração inicial com o intuito de se determinar a quantidade inicial de proteína presente nos implantes preparados. Deste modo, foram escolhidos 5 implantes de cada lote e, foi adicionado a cada um, 1 mL de éter dietílico e 1 mL de tampão fosfato (constituído por dihidrogenofosfato de sódio, cloreto de sódio, hidrogenofosfato disódico e azida de sódio). Para a realização da extração líquido-líquido, é essencial uma agitação adequada que condiciona a dissolução completa do implante lipídico e, conseqüentemente, a recolha de amostras para posterior análise.

Os implantes foram colocados em agitação durante 30 minutos e, quando se verificou a separação de fases, foram retirados 750 μ L da fase aquosa para um *ependorf* devidamente rotulado e identificado, para quantificação proteica e determinação da actividade biológica.

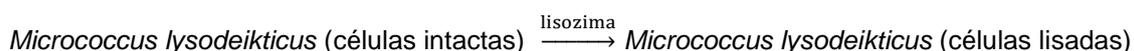
2.4 Ensaios de libertação

Para os ensaios de libertação, os implantes foram colocados em *ependorfs* de 2 mL, com 1 mL da solução de tampão fosfato pH 7,4. Os implantes foram colocados em agitação a 85 rpm e a 37°C (incubadora com agitação *Inkubation 1000* e *Unimax 1010 Heidolph*). A recolha de amostras para posterior análise e a respectiva substituição do meio com tampão fosfato pH 7,4 previamente aquecido a 37°C, foram realizados em dias previamente estabelecidos (recolhas às 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 7 dias e 14 dias). A análise das amostras (quantificação proteica e determinação da

actividade biológica) foi realizada uma semana após congelação. Nos ensaios de libertação, a azida de sódio é usada como conservante, evitando a possibilidade de contaminação microbiana.

2.5 Avaliação da actividade biológica

A determinação da cinética enzimática, utilizada para a determinação da actividade biológica da proteína lisozima, baseia-se na seguinte reacção:



Nos ensaios de actividade biológica, é utilizado uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*, preparada em tampão fosfato pH 7,4, com azida de sódio 0,01 % (m/v). A detecção desta actividade foi efectuada através da espectroscopia UV-Vis, visto que o *Micrococcus lysodeikticus* absorve a luz numa gama de comprimentos de onda nos valores compreendidos entre 350 e 475 nm.

As absorvâncias foram medidas com o auxílio de um espectrofotómetro (espectrofotómetro *ThermoScientific Evolution 300 UV-VIS*), a 450 nm, durante 4,5 minutos (com intervalos de 30 em 30 segundos). Nestes ensaios, 100 µL da amostra é ressuspendida em 900 µL da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*, preparada em tampão fosfato com azida de sódio. A quantificação da actividade da lisozima foi determinada usando a equação 1:

$$\text{Units/mg} = \frac{\Delta A_{450/\text{minute}} \times 1000}{\text{mg enzyme in reaction mixture}}$$

Equação 1 - Equação usada para a determinação da actividade da lisozima (Worthington Biochemical Corporation, 2016).

Sendo $\Delta A_{450/\text{minute}}$ a variação de absorvância a 450 nm por minuto e *mg enzyme in reaction mixture* a quantidade de enzima libertada e que se encontra na mistura reaccional.

2.6 Doseamento proteico

Para este ensaio, foi escolhido o método do ácido bicinconínico (BCA). Este é um método colorimétrico, baseado em duas reacções: primeiro, as ligações peptídicas na amostra reduzem os iões cobre numa reacção dependente da temperatura sendo que a quantidade de cobre (Cu^{2+}) reduzida é proporcional à quantidade presente na solução; segundo, duas moléculas de ácido bicinconínico complexam com cada ião, formando um produto roxo, como ilustrado na figura 9. Através da medição da absorvância a 595 nm, pode ser determinada a quantidade de proteína presente numa solução.

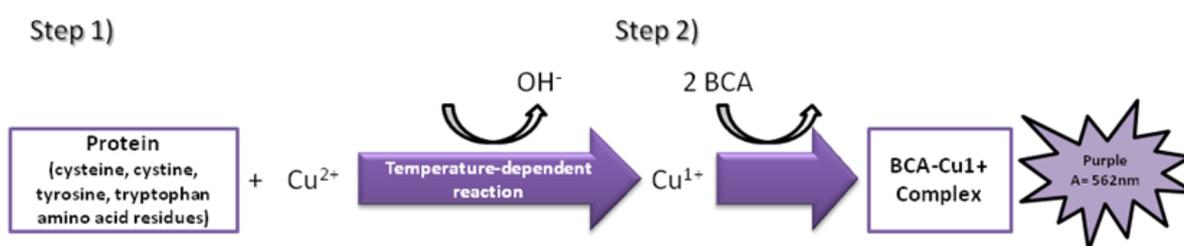


Figura 9 - Método do BCA Labome (The World of Laboratories, 2015).

Para proceder à realização do método BCA é necessário pipetar 25 μL de cada padrão e amostras para a microplaca e adicionar 200 μL de *working solution* para cada poço. A placa é colocada na estufa por 30 minutos e a absorvância medida a 595 nm (leitor de microplacas *ThermoScientific Multiskan FC*).

2.7 Electroforese em gel de poliacrilamida

A larga utilização da electroforese permite a separação de proteínas, através da separação de moléculas carregadas sobre a aplicação de um campo eléctrico. Factores como a forma molecular, a porosidade e a viscosidade da matriz usada na electroforese vão também influenciar o movimento das moléculas presentes numa amostra (Nomula, 2012).

Quando se submetem proteínas, a um campo eléctrico, e aquando da existência de um valor de pH diferente do seu ponto isoeléctrico, estas vão migrar de acordo com a carga; esta migração permitirá a separação de proteínas existentes numa amostra (Nicolai, 2008).

Assim, através da polimerização de monómeros de acrilamida é possível a obtenção de um gel de poliacrilamida (PAGE) sendo esta a matriz usada na realização da electroforese (Nicolai, 2008).

O gel de poliacrilamida caracteriza-se pela sua apresentação robusta sendo, desta forma, adequado para a separação de proteínas e ácidos nucleicos. Para a preparação deste gel é necessário adicionar uma pequena quantidade de acrilamida que permite a formação de um gel muito forte e inerte (Nomula, 2012). Para acelerar a velocidade de polimerização do gel é utilizado o N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED) enquanto que o persulfato de amónio (PSA) é usado para promover a polimerização da rede tridimensional (Nicolai, 2008).

Para a realização da electroforese é necessária a preparação de um gel resolvente e um gel concentrador, como descrito na tabela 3. Este último permite concentrar o volume das amostras, para que, se obtenha uma melhor resolução das bandas obtidas (Nicolai, 2008).

Para uma melhor e correcta visualização das bandas procede-se à coloração da amostra. Este passo, essencial, permite a visualização da posição das moléculas que foram separadas numa matriz de gel (Nomula, 2012).

Tabela 3 - Composição do gel resolvente e concentrador (Nicolai, 2008).

Gel Resolvente	Gel Concentrador
3,70 mL de acrilamida	0,65 mL de acrilamida
3,75 mL de Gel Resolvente	1,25 mL de Gel Concentrador
150 µL de SDS 10%	50 µL de SDS 10%
7,40 mL de água bidestilada	3,02 mL de água bidestilada
50 µL de PSA	25 µL de PSA
10 µL de TEMED	5 µL de TEMED

Para a preparação dos géis PAGE é necessária a montagem do dispositivo de electroforese como está ilustrado na figura 10. Com o auxílio de uma pipeta, o gel resolvente é introduzido, sendo de seguida, colocada uma ligeira camada de água saturada com a presença de n-butanol com o intuito de nivelar estes componentes. Concluído este processo, encontra-se também terminada a polimerização. De seguida, é retirada a camada de álcool com a sua posterior lavagem em água bidestilada. O gel concentrador e o molde são então colocados nos poços. Após a polimerização do gel

concentrador é introduzida numa tina previamente cheia de tampão de eléctrodo sendo, finalmente, colocadas as amostras e os padrões (Nicolai, 2008).



Figura 10 - Montagem para a electroforese.

3. Apresentação e tratamento de resultados

3.1 Design de Implantes

Com o objectivo de obter uma escala de produção aceitável, no início da preparação de implantes, procedeu-se à preparação preliminar de implantes sem conteúdo proteico. Algumas dificuldades surgiram aquando da preparação dos implantes devido à morosidade do processo de preparação e a necessidade de produção de vários lotes, uma vez que, se pretendia a obtenção de implantes com as melhores características possíveis. Depois da obtenção do melhor método de preparação de implantes, procedeu-se à colocação da lisozima com cautela, devido à sensibilidade da proteína.

Através do método de produção, foram obtidos implantes cilíndricos com diâmetro de 1 mm e com uma espessura de 2 mm. Os implantes apresentaram-se macroscopicamente sem fendas, poros ou irregularidades, uniformes e com uma massa média de 20 mg ($m=0,0192\pm 0,0009$ g). De cada lote de implantes preparados, 5 foram usados para a extracção inicial e os restantes foram usados nos ensaios de libertação.

3.2 Extracção inicial

A extracção inicial foi realizada com o objectivo de determinar a concentração inicial de proteína presente nos implantes. Para tal, foi realizada uma extracção líquido-líquido, tendo sido obtido duas fases: a fase orgânica e a fase aquosa. A fase orgânica é a fase menos densa que contém o éter dietílico e a fase aquosa, mais densa que contém o tampão fosfato pH 7,4 e a azida de sódio 0,01% (m/v) (Foram utilizados 750 μ L da fase aquosa para análise e quantificação).

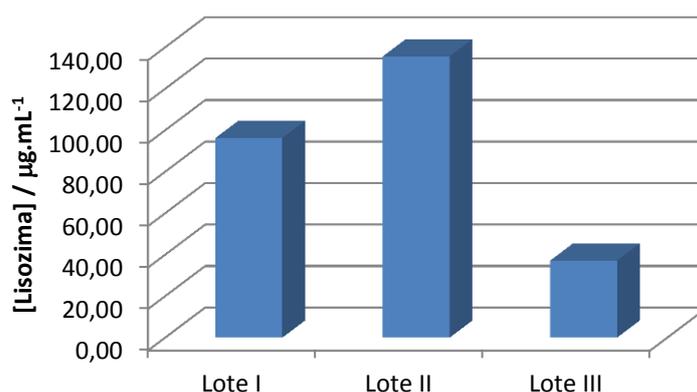


Gráfico 1 - Quantidade inicial de proteína nos implantes produzidos.

Depois da análise da actividade biológica e quantificação proteica, os resultados da extracção inicial mostram uma elevada actividade da lisozima no início do trabalho, como demonstrado no gráfico 2. A concentração inicial de proteína foi de 96,27; 135,61 e 37,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os lotes I, II e III, respectivamente, como expressos no gráfico 1.

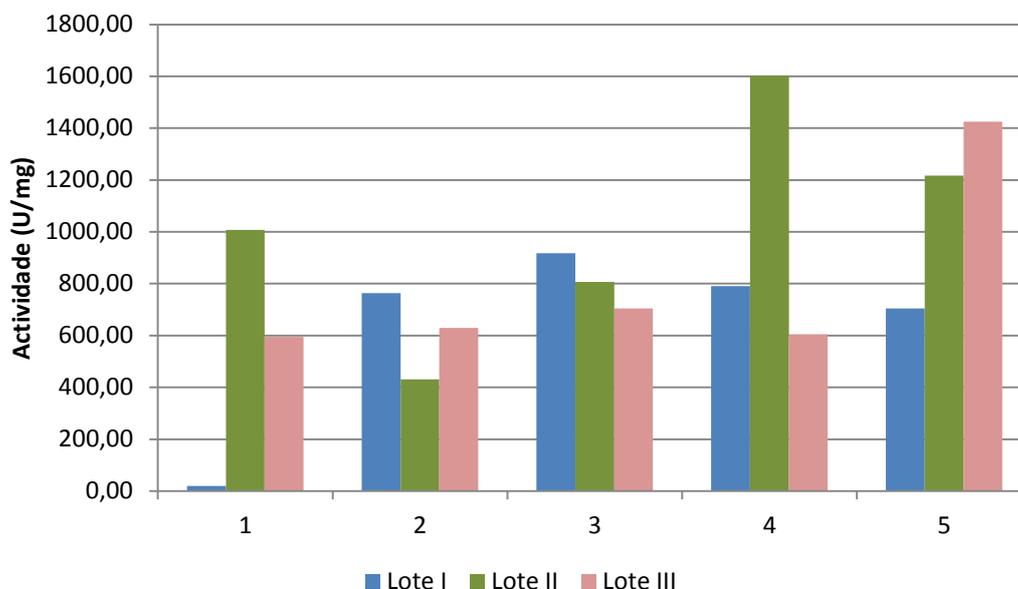


Gráfico 2 - Actividade inicial dos implantes.

3.3 Ensaio de libertação

Os ensaios de libertação foram realizados utilizando implantes com diferentes composições de lisozima e constituição lipídica. Ao longo de 14 dias foram recolhidas amostras sendo estas substituídas por tampão fosfato pH 7,4 e a azida de sódio 0,01% (m/v) previamente aquecido, como demonstrado pela figura 11. Todas as amostras foram posteriormente analisadas quanto à quantificação proteica e respectiva actividade biológica.

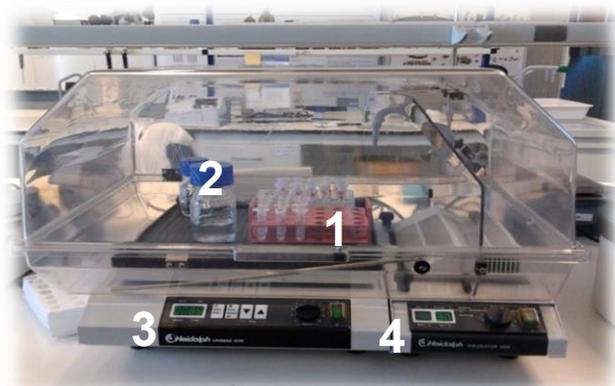


Figura 11 - Ensaio de libertação. 1 - Implantes em agitação; 2 - Tampão fosfato pH 7,4 (Pré-aquecido); 3 - Agitação; 4 - Aquecimento.

3.4 Avaliação da actividade biológica

O ensaio da actividade biológica foi realizado utilizando um método colorimétrico com a bactéria *Micrococcus lysodeikticus*, tendo os sobrenadantes provenientes dos implantes apresentado o mesmo perfil de libertação. Pela observação do gráfico 3, verifica-se um *burst* inicial que pode corresponder à saída rápida da lisozima localizada à superfície e adsorvida à superfície do implante. Verifica-se, após o *burst*, uma cinética de ordem zero que corresponde à libertação da lisozima. Por fim, verifica-se um patamar correspondente a manutenção da actividade da lisozima.

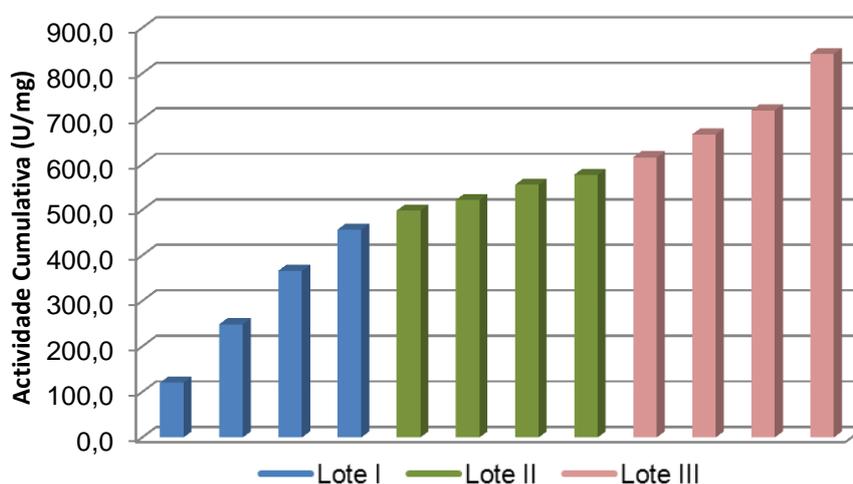


Gráfico 3 - Actividade cumulativa da lisozima (U/mg) ao longo de 14 dias.

3.5 Doseamento proteico

Para a quantificação proteica, foi utilizado o método do ácido bicinonínico sendo que a presença proteica é verificada pelo aparecimento de cor roxa, como observado na figura 12. A quantificação proteica foi realizada utilizando uma curva de calibração (ver gráfico 4) sendo as absorvâncias medidas a 595 nm. As medições foram realizadas em triplicado, sendo que as médias se encontram na tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações dos padrões e respectivas absorvâncias.

[Lisozima] / $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Absorvâncias (595 nm)
250,000	0,367
125,000	0,262
62,500	0,174
31,250	0,140

15,625	0,120
7,825	0,114
0,000	0,106

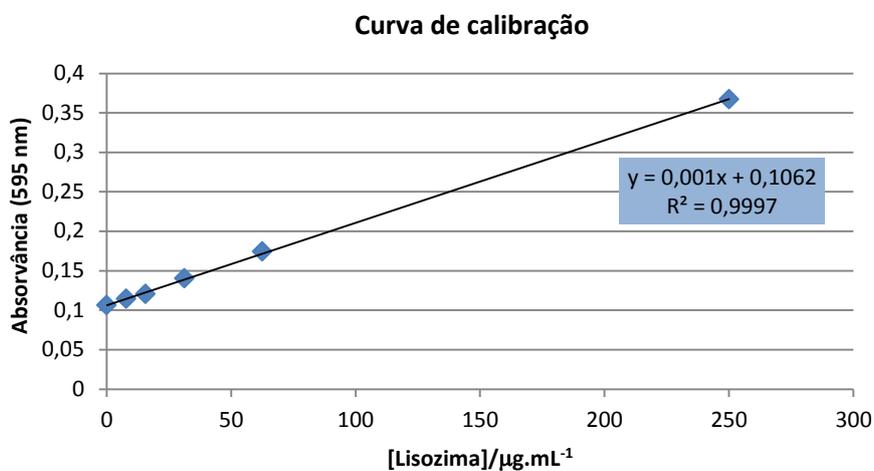


Gráfico 4 - Curva de Calibração.

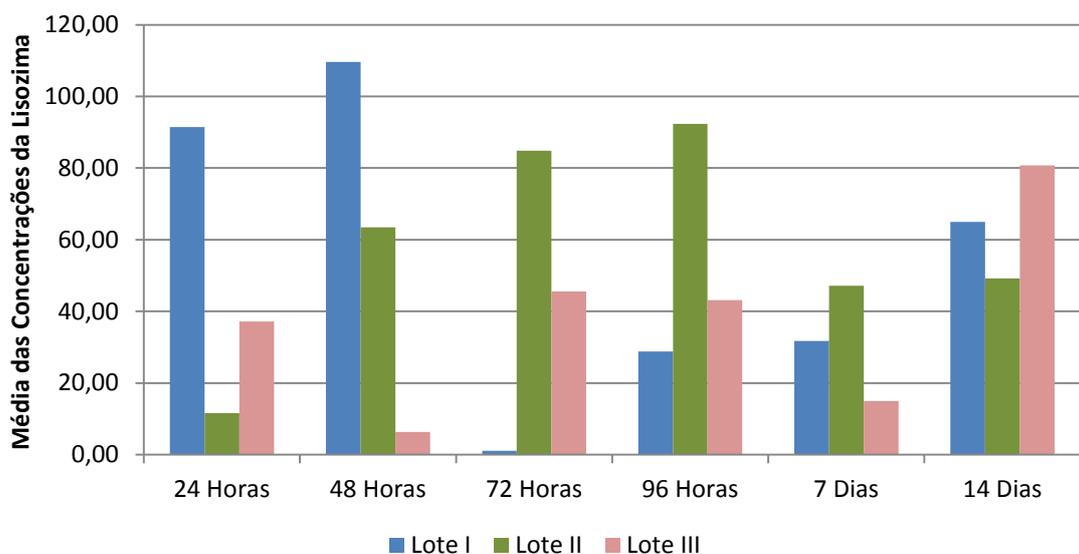


Gráfico 5 - Concentração Média da Lisozima ao longo dos 14 dias de libertação.

Os resultados mostram que o lote II, foi dos três lotes, aquele que apresentou uma maior uniformidade, ou seja, apresenta uma distribuição constante da concentração de lisozima ao longo dos 14 dias de libertação em comparação com o lote I e III. O lote I apresentou uma concentração ao final de 14 dias de $54,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o lote II apresentou uma concentração de $58,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o lote III de $38,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A

concentração de lisozima do Lote III aumentou ao final de 14 dias uma vez que se começou a verificar a degradação dos implantes, como é possível observar pelo gráfico 5.

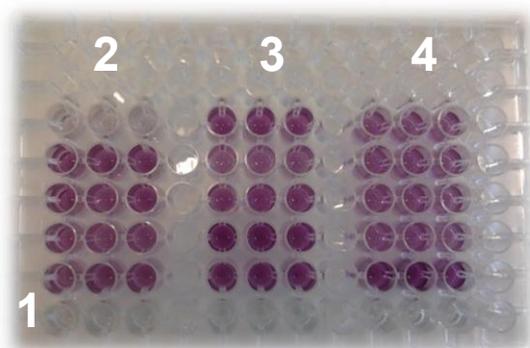


Figura 12 - Resultados após incubação. 1- Ensaio Branco; 2/3/4 - Resultados de diferentes lotes de implantes.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e sempre com um ensaio em branco. É necessário algum cuidado na realização deste ensaio, uma vez que ligeiras alterações na quantidade de solução (como maior ou menor quantidade) adicionada aos poços poderia afectar significativamente os resultados obtidos.

3.6 Electroforese em gel de poliacrilamida

Pela observação da figura 13, após a aplicação do método de coloração com o Azul de *Comassie*, é possível constatar que não foi possível a visualização correcta das bandas correspondentes à presença da lisozima. Este facto leva a concluir que possivelmente o método utilizado não é sensível para o enzima em questão.

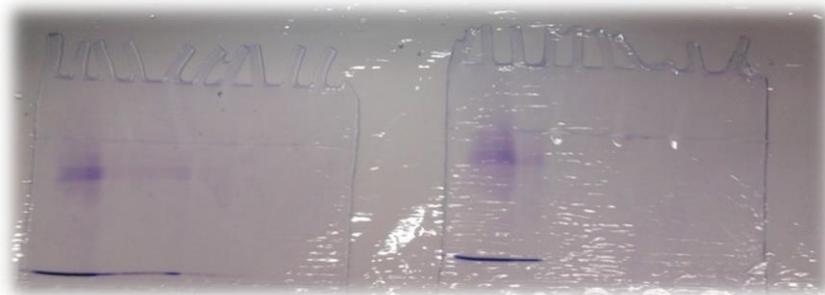


Figura 13 – Gel de poliacrilamida obtido.

Conclusão

Os implantes lipídicos são uma forma promissora para a veiculação de diversos produtos farmacêuticos, incluindo proteínas e péptidos. O objectivo deste trabalho foi estudar a incorporação de uma proteína utilizando implantes lipídicos como sistemas de veiculação. Assim, foram preparados vários lotes de implantes e, para tal, foram estudados a actividade biológica e o perfil de libertação da proteína lisozima.

A via oral, caracterizada pela sua comodidade relativamente a outras vias, apresenta algumas dificuldades aquando da administração de péptidos/proteínas, pela possibilidade de sofrerem degradação proteolítica ao longo do TGI e/ou uma rápida eliminação. A administração de péptidos e proteínas pode ser efectuada por diversas formas, como por exemplo, através da alimentação, no entanto, a descoberta de novas moléculas aumentou, consideravelmente o uso de péptidos/proteínas.

Uma vez que as proteínas são muito susceptíveis, podendo perder a actividade catalítica mediante pequenas alterações do meio que as envolve, o processo de produção dos implantes foi complexo e, por isso, foi necessária a preparação de vários lotes de implantes até à obtenção de uma escala considerável. No início do trabalho laboratorial foram preparados implantes sem proteína com intuito de testar e otimizar o método de produção. Durante a produção dos implantes, foi necessário precaução com controlo da temperatura e agitação do meio uma vez que, facilmente poderiam degradar a proteína. Por outro lado, esta agitação e temperatura controlada tiveram de ser adequadas para que a proteína se apresentasse uniformemente distribuída no implante e para que ocorresse a fusão de todos os constituintes necessários à produção do mesmo.

Durante a realização do trabalho laboratorial, foram preparados três lotes de implantes com diferentes composições. O composto gelucire tornou a produção mais difícil uma vez que apresenta características oleosas em comparação com os outros constituintes usados na produção dos implantes. Apesar disso, é necessário realçar a importância do composto gelucire, pois contribui para a degradação do implante, factor essencial para que não seja necessária a remoção cirúrgica, o que consequentemente contribui para a terapêutica do utente.

Antes do início da libertação, foi realizada uma extracção inicial que teve como objectivo adequar a quantidade de proteína inicial presente em cada lote de implantes, tendo sido verificado que o lote II apresentou uma concentração inicial de proteína mais elevada ($135.61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Destaca-se a complexidade deste ensaio uma vez que

foi necessário uma correcta e uniforme agitação do meio por todos os implantes para a obtenção de duas fases distintas (fase aquosa e fase orgânica). Esta separação de fases é essencial para a recolha de amostras para posterior análise.

Depois da produção dos implantes, estes mostraram-se sem fendas, falhas, irregularidades internas e uniformes.

Os resultados da actividade biológica mostram que todos os implantes apresentam o mesmo perfil e uma cinética de libertação de ordem zero. Foi verificado um *burst* inicial que corresponde à saída rápida de lisozima que se encontra à superfície do implante. De seguida, e pela observação do gráfico, a libertação de lisozima manteve-se constante ao longo dos 14 dias de libertação.

Os resultados do doseamento proteico revelaram uma maior uniformidade do lote II em comparação com os outros dois lotes preparados. Este resultado pode ser explicado pela composição dos implantes deste lote que apenas contém Dynasan 118 e lisozima, o que não se verifica nos lotes I e III, que apresentam diferentes quantidades de gelucire. Dos 3 lotes de implantes produzidos, o lote II foi aquele que apresentou uma maior concentração de proteína após 14 dias de libertação (58,11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O lote III apresentou uma concentração de lisozima superior no final do ensaio dado que se começou a observar a degradação dos implantes pela visualização de partículas provenientes do mesmo.

Após a realização da electroforese em gel de poliacrilamida não foi possível a visualização das bandas depois da coloração com o corante azul de *Comassie*. Para uma melhor visualização das proteínas seria necessário a utilização de outro método de coloração como, por exemplo, a coloração com nitrato de prata. Este tipo de coloração é altamente sensível, o que consequentemente detecta quantidades muito pequenas de proteína presentes numa determinada amostra. No entanto, não foi possível a realização desta nova coloração.

Todos estes resultados indicam que os implantes lipídicos são uma alternativa a considerar aquando da veiculação de péptidos/proteínas. No entanto, e, apesar dos bons resultados obtidos através deste trabalho, novos estudos e ensaios deverão ser realizados para corroborar e melhorar o conhecimento sobre os implantes lipídicos.

Referências Bibliográficas

- Bccresearch. (2014). Global Market for Bioengineered Protein Drugs to Reach \$222.7 Billion in 2019. Disponível em: [http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-for-bioengineered-protein-drugs-to-reach-\\$222.7-billion-in-2019](http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-for-bioengineered-protein-drugs-to-reach-$222.7-billion-in-2019)
- Berg JM., Tymoczko JL. & Stryer L. (2002). Biochemistry, New York: WH Freeman
- Callewaert L. & Michaels C. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. J. Biosei. 35, 127-160. doi: 10.1007/s12038-010-0015-5
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention. (2005). Public Health Image Library (PHIL). Disponível em: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=9756>
- Cremer: The world is our market. (s.d.). Dynasan ® 114 e 118. Disponível em: <http://www.petercremerna.com/products/540195879>
- Dada, E. O., & Aruwa, C. E. (2014). Microorganisms associated with urine contaminated soils around lecture theatres in Federal University of Technology, Akure, Nigeria. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research, 2, 79–85.
- Darlenski R., Kazandjieva J., & Tsankov N. (2011). Skin barrier function: morphological basis and regulatory mechanisms. Journal of Clinical Medicine, 4(1), 36–45
- Farrell, S., Hesketh, R. P., Savelski, M. J., & Slater, C. S. (2003). Fundamentals, Design and Applications of Drug Delivery Systems. American Society for Engineering Education
- Feridooni, T., Hotchkiss, A., & Agu, R. U. (2016). Noninvasive Strategies for Systemic Delivery of Therapeutic Proteins — Prospects and Challenges, Smart Drug Delivery System, 8, 197-218. doi: 10.5772/61266
- Henriques A. (2014). Sistemas Terapêuticas Implantáveis de Liberação Prolongada de Fármacos (Tese de Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Portugal
- Hillery, A., Lloyd, A., Swarbrick, J., (2001). Drug Delivery and Targeting For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists, New York. Taylor & Francis.73-102

- Kloos, W. E., & Schultes, L. M. (1969). Transformation in *Micrococcus lysodeikticus*. *Journal of General Microbiology*, 55(2), 307–317. <http://doi.org/10.1099/00221287-55-2-307>
- Kreye, F., Siepmann, F., & Siepmann, J. (2008). Lipid implants as drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, 291–307. doi: doi.org/10.1517/17425247.5.3.291
- Kreye, F., Siepmann, F., Zimmer, A., Willart, J.F., Descamps, M. & Siepmann J. (2011). Controlled release implants based on cast lipids blends. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43: (1-2): 78-83. doi: [10.1016/j.ejps.2011.03.013](http://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.03.013)
- Lambert, W. J. (2007). Drug delivery: What the future holds. *BioPharm International*, 20(8), 32–39
- Li, P., Nielsen, H. M., & Müllertz, A. (2012). Oral delivery of peptides and proteins using lipid-based drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 9(10), 1289–1304. doi: doi.org/10.1517/17425247.2012.717068
- Lysozyme Dimer (s.d). The spatial structure of a molecule of monomeric lysozyme. Disponível em: http://parsko.pl/Dimer_lyozymu.html?lang=2
- Lysozyme Assay. (2015). Worthington Biochemical Corporation. Disponível em <http://www.worthington-biochem.com/ly/assay.html>
- Liebl, W., Kloos, W. E., & Ludwig, W. (2002). Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus*. *Microbiology*, 148 (8), 2479–2487
- Mai, V., Lorenz, W. W., & Wiegel, J. (1969). Transformation of *Micrococcus lysodeikticus* by Various Members of the Family Micrococcaceae, *J. gen. Microbiol.* 59, 247-255
- Martins, S., Sarmiento, B., Ferreira, D. C., & Souto, E. B. (2007). Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery - Liposomes versus lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 595–607.
- Mendes, A. I. da S. (2013). *Preparação e Caracterização de Dispersões de Nanopartículas Lipídicas Contendo Miconazol (Tese de Mestrado)*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

- Mohl, S. (2006). The Development of a Sustained and Controlled Release Device for Pharmaceutical Proteins based on Lipid Implants (Tese de Doutorado). Universidade de Munique, Alemanha
- Nomula R. (2012). Gel – Electrophoresis and Its Applications. InTech. 14-32. doi: 10.5772/38479
- Morishita, M., & Peppas, N. A. (2006). Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery?. *Drug Discovery Today*, 11(19-20), 905–910. doi: doi.org/10.1016/j.drudis.2006.08.005
- Nicol, N. H. (2005). Anatomy and physiology of the skin. *Dermatology Nursing / Dermatology Nurses' Association*, 17(1), 62. doi: doi.org/10.1016/S0007-1226(78)90109-1
- Nicolai, M. (2008). Caracterização de Macromoléculas Biológicas de Organismos Marinhos (Tese de Doutorado). Universidade de Lisboa, Portugal
- Pinto Reis, C., Silva, C., Martinho, N., & Rosado, C. (2013). Drug carriers for oral delivery of peptides and proteins: accomplishments and future perspectives. *Therapeutic Delivery*, 4, 251–65. doi: doi.org/10.4155/tde.12.143
- Prakash, O., Nimonkar, Y., Munot, H., Sharma, A., Vemuluri, V. R., Chavadar, M. S., & Shouche, Y. S. (2014). Description of *Micrococcus aloeverae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Aloe vera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3427–33. doi:doi.org/10.1099/ijms.0.063339-0
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., & Saraf, S. (2008). Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 128(2), 269–80. doi: doi.org/10.1248/yakushi.128.269
- Quantificação de proteínas. (2015). Labome. The World of Laboratories. Disponível em: <http://www.labome.com.br/method/Protein-Quantitation.html>
- Sakamoto J., Ven A., Godin B., Blanco E., Serda R., Grattoni A., Ziemys A., Bouamrani A., Hu T., Ranganathan S., Rosa E., Martinez J., Smid C., Buchanan R., Lee S., Srinivasan S., Landry M., Meyn A., Tasciotti E., Liu X. & Ferrari M. (2010). Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacol Res*, 62(2): 57–89. doi:10.1016/j.phrs.2009.12.011.

- Seeley, R., Stephens, T., & Tate, P. (2008) *Anatomia e Fisiologia, Lusociência*
- Siegel, R.A. & Rathbone, M.J. (2012). Overview of controlled release mechanisms. In: J. Siepmann, R.S. Siegel & M.J. Rathbone (Eds), *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (pp.19–43). Estados Unidos da América: Springer US
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., & Schumann, P. (1995). Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 45(4), 682–692. <http://doi.org/10.1099/00207713-46-1-366>
- Tsutsumi R. & Tsutsumi Y. (2014). Peptides and Proteins in Whey and Their Benefits for Human Health. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*,1(1): 1002
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*, 99(June), 3181–98. doi: doi.org/10.1021/cr940351u
- Valdés-rodríguez, R., Torres-álvarez, B., González-Muro J. & Almeda-valdés, P. (2012). La piel y el sistema endocrinológico. *Gaceta Médica de México*, 8 –162
- Vilar, G., Tulla-Puche, J., & Albericio, F. (2012). Polymers and drug delivery systems. *Curr. Drug Deliv.*, 9(4), 367–394. doi: doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847
- Wieser, M., Denner, E. B. M., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Busse, H. J. (2002). Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 629–637. <http://doi.org/0.1099/ijs.0.01901-0>
- Wu, H., Cao, D., Liu, T., Zhao, J., Hu, X., & Li, N. (2015). Purification and characterization of recombinant human lysozyme from eggs of transgenic chickens. *PLoS ONE*, 10(12), 1–17 . doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0146032
- Zaidi, Z., & Lanigan, S. (2010). Skin: structure and function. *Dermatology in Clinical Practice*, 1–15. doi: doi.org/10.1097/IPC.0b013e3181660bf4

Zhao, G. Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y. Q., Zhu, W. Y., Jiang, C. L. & Li, W. J. (2009). *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2383–2387. doi: doi.org/10.1099/ijs.0.010256-0