



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUIZ HENRIQUE GUERREIRO ROSADO

NANO E MICROCONFINAMENTO DE HORMÔNIOS
PROTEICOS APLICADOS A TERAPÊUTICA EM DIABETES

RIO DE JANEIRO

2010

LUIZ HENRIQUE GUERREIRO ROSADO

**NANO E MICROCONFINAMENTO DE HORMÔNIOS
PROTEICOS APLICADOS A TERAPÊUTICA EM DIABETES**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Ricci Jr.

RIO DE JANEIRO

2010

R788n Rosado, Luiz Henrique Guerreiro.
Nano e microconfinamento de hormônios proteicos aplicados a terapêutica em diabetes/ Luiz Henrique Guerreiro Rosado; orientadores Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima, Eduardo Ricci Jr. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2010.
xvi, 96f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Amilina. 2. Insulina. 3. Diabetes Mellitus. 4. Nano e microencapsulação.
4. Biotecnologia farmacêutica. I. Lima, Luís Maurício Trambaioli da Rocha.
II. Ricci Júnior, Eduardo. III. Título.

CDD 615.7

**NANO E MICROCONFINAMENTO DE HORMÔNIOS PROTEICOS APLICADOS A
TERAPÊUTICA EM DIABETES**

LUIZ HENRIQUE GUERREIRO ROSADO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado por:

Orientadores:

Professor Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Professor Dr. Eduardo Ricci Jr.
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca examinadora:

Professor Dr. Mauro Sola-Penna
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Professora Dra. Priscilla Vanessa Finottelli
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof. Dr. Marcelo de Pádula
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Rio de Janeiro

Maio de 2010

*Dedico este trabalho à minha mãe,
a quem devo tudo que tenho
e o que sou.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de forma direta ou indireta ajudaram na elaboração deste trabalho: aos professores, alunos e amigos da Faculdade de Farmácia da UFRJ pelo apoio e valiosos conselhos que me foram dados nestes anos; a minha noiva Priscilla pela paciência, incentivo e compreensão; ao professores Luís Maurício e Eduardo por terem confiado a mim este trabalho; a Camile pela ajuda com muitos dos experimentos aqui apresentados; ao professor Alexandre Rossi do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas pela importante colaboração com a análise das partículas; ao professor Kildare R. Miranda e Dr. Wendell Girard-Dias do Instituto de Biofísica Carlo Chagas Filho pelas análises de microscopia eletrônica de varredura; ao Sr. Venício F. Veiga do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão; ao professor Mauro Sola-Penna e ao doutorando Daniel da Silva pela substancial colaboração com os ensaios farmacológicos e aos órgãos de fomento científico e Ministério da Educação por possibilitarem este e muitos outros trabalhos em nosso país.

RESUMO

Diabetes Mellitus é uma doença que segundo a Organização Mundial de Saúde é responsável por 5% das mortes em todo o mundo. Apesar de grande repertório de produtos para controle glicêmico voltados a diabetes, ainda há lacunas farmacológicas e farmacocinéticas a serem preenchidas. A presente proposta teve por objetivo o desenvolvimento de duas formulações de nano e micropartículas, com poli- ϵ -caprolactona como polímero, de dois biofármacos protéicos, hormonais, visando ação em diabetes, a saber insulina humana e amilina (IAPP). A formulação de insulina humana foi desenvolvida com base em micropartículas visando obter perfil misto, bifásico, de liberação controlada e sustentada. A formulação de micropartículas contendo insulina humana apresentam dimensão média de 10 micrometros, formato esférico, e um perfil de liberação *in vitro* bifásico, com constantes cinéticas de $k_1 = 0,76 \text{ h}^{-1}$ e $k_2 = 0,023 \text{ h}^{-1}$, cada um correspondendo a 50 % de liberação. A avaliação farmacológica *in vivo* em camundongos diabéticos mostram também efeito bifásico de liberação, com cinética de redução de glicemia de $k_1 = 2,258 \text{ h}^{-1}$ e segunda fase com $k_2 = 0,047 \text{ h}^{-1}$, contrastando com formulação insulina humana livre em solução que possui $k_1 = 0,259 \text{ h}^{-1}$ e $k_2 = 0,18 \text{ h}^{-1}$, demonstrando assim sua equivalência farmacológica com insulina humana solúvel para a primeira fase mas com controle glicêmico sustentado de até 48 h. O segundo trabalho consistiu em obter uma formulação de amilina humana selvagem, pobremente hidrossolúvel e altamente amiloidogênica. Obtivemos uma formulação nanoestruturada, de tamanho médio de 200 nm, capaz de realizar liberação controlada *in vitro* também com perfil bifásico por até 72 h, e com equivalência cinética para avaliação farmacológica sobre efeito glicêmico em camundongos normais, o que demonstra a capacidade de transpor o desafio tecnológico de uma formulação biocompatível de amilina humana, até hoje não disponível mundialmente. Em adição, este trabalho evidencia que os sistemas poliméricos micro e nanoestruturados contendo biofármacos peptídicos ou protéicos apresentam alto potencial tecnológico e promissor no ramo de pesquisa e desenvolvimento de novas formulações de liberação controlada e sustentada na área de biotecnologia farmacêutica.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a disease which according to World Health Organization is responsible for 5% of deaths worldwide. Although large repertoire of products aimed for glucose control diabetes, there are still gaps to be pharmacological and pharmacokinetic met. This proposal was aimed at the development of two formulations of nano and microparticles with poly- ϵ -caprolactone as polymer, two biopharmaceutical proteins, hormones, seeking action in diabetes, namely human insulin and amylin (IAPP). The formulation of human insulin was developed based on microparticles in order to obtain mixed profile, biphasic controlled-release and sustained. The formulation of microparticles containing human insulin has average size of 10 μm , spherical, and a release profile *in vitro* biphasic, with rate constants $k_1 = 0.76 \text{ h}^{-1}$ and $k_2 = 0.023 \text{ h}^{-1}$, each corresponding to a 50% release. The pharmacological evaluation *in vivo* in diabetic mice also shows a two-phase release, with kinetics of reduction of glucose $k_1 = 0.258 \text{ h}^{-1}$ and the second phase with $k_2 = 0.047 \text{ h}^{-1}$, compared with human insulin formulation free solution that has $k_1 = 0.259 \text{ h}^{-1}$ and $k_2 = 0.18 \text{ h}^{-1}$, showing their equivalence with pharmacological soluble human insulin for the first phase but with sustained glycemic control up to 48 h. The second study was to obtain a formulation of human amylin wild, poorly water soluble and highly amyloidogenic. We obtained a formulation nanostructured, with average size of 200 nm, capable of controlled release profile *in vitro* also bifásico for 72 h, and equivalent kinetics for evaluation pharmacological effect on blood glucose levels in normal mice, which demonstrated the ability to transpose technological challenge of a biocompatible formulação of human amylin, to date no available worldwide. In addition, this work shows that micro and nanostructured polymer systems containing protein and peptide biopharmaceuticals have a high technological potential and promising field of research and development of new formulations of controlled release and sustained in the area of pharmaceutical biotechnology.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Perfil de distribuição etária dos casos diagnosticados de DM de acordo com o desenvolvimento socioeconômico. Observa-se que nos países desenvolvidos, esquerda, há um menor número de casos de DM e estes são mais freqüentes na população idosa. Nos países em desenvolvimento, direita, vê-se uma maior incidência de casos de DM sendo que estes atingem principalmente a população com idades entre 45 e 64 anos (adaptado de WILD <i>et al.</i> , 2004).....	10
Figura 2 - Prevalência de casos de DM no mundo, em destaque os 10 países com maior incidência desta doença, sendo o Brasil o oitavo país nesta lista (adaptado de WILD <i>et al.</i> , 2004).....	11
Figura 3 - Distribuição etária de portadores de DM no Brasil, a esquerda o perfil etário e sexual dos portadores de DM (em %) e a direita os dados do gráfico a esquerda mas com valores referentes ao número de pacientes com DM (fonte MINISTÉRIO DA SAÚDE).....	12
Figura 4 - Perfis farmacocinéticos esquemáticos de insulina humana e análogos após administração subcutânea.....	16
Figura 5 - Exemplos de estruturas cristalográficas de insulinas humanas e análogos.....	18
Figura 6 - Histologia do pâncreas, a esquerda material de paciente saudável e a direita tecido pancreático de paciente com DM apresentando o material hialino (rosa) ao redor dos capilares (retirado de OPIE 1901).....	19
Figura 7 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de fibra amilóides de amilina, A aumento de 60.000x e B aumento de 150.000x (adaptado de Westermarck 1990).	22
Figura 8 - Seqüências de aminoácidos da amilina humana, amilina de rato e pramlintide.....	27
Figura 9 - Vendas globais de biofármacos.....	31
Figura 10 - Perfis hipotéticos de concentrações plasmáticas de fármacos. Medicamento convencional a esquerda e medicamento com sistema de liberação sustentada a direita.	32
Figura 11 - Liberação <i>in vivo</i> de preparações de insulina encapsulada em PCL derivatizado com PEG.....	34
Figura 12 - Liberação <i>in vivo</i> de preparações de insulina encapsulada em PLGA e PVA 5%.....	35
Figura 13 - Liberação <i>in vivo</i> de preparações de insulina encapsulada em PCL e Eudragit 1:1.....	35
Figura 14 - Esquema geral para produção de nanopartículas contendo biofármacos lipofílicos pelo método de emulsão com extração do solvente (adaptados das metodologias propostas por.....)	41
Figura 15 - Esquema geral para a produção de micropartículas contendo biofármacos hidrofílicos pelo método de dupla-emulsão com extração do solvente (adaptados das metodologias propostas por.....)	43
Figura 16 - Esquema para reação entre fluorescamina e aminas primárias de proteínas (N-terminal ou de cadeias laterais) gerando compostos fluorescentes. O excesso de fluorescamina é hidrolisado resultando em um produto não fluorescente (adaptado de UDENFRIEND <i>et al.</i> , 1972).....	44

Figura 17 - Espectros de fluorescência de nanopartículas de PCL vazias e amilina humana em diferentes concentrações.....	50
Figura 18 - Espectros de fluorescência da amilina humana em diferentes concentrações, a partir de amilina em solução de TFE. As medidas foram realizadas dissolvendo-se a quantidade desejada de amilina em tampão PBS contendo 0.1 % polisorbato-80 e medido conforme descrito em material e métodos.	51
Figura 19 - Dosagem de amilina por espectrofluorimetria usando emissão de tirosina a 303 nm.	51
Figura 20 - Dosagem de amilina humana por fluorimetria usando fluorescamina como derivatizante, indicando boa linearidade na faixa de concentração de 0,1 µg/mL a 50 µg/mL.....	52
Figura 21 - Espectros representativos de várias concentrações de amilina humana derivatizadas por fluorescamina, indicando que o aumento da concentração de amilina leva ao aumento na intensidade de fluorescência. Detalhes em Material e Métodos.	53
Figura 22 - Espectros de fluorescência de nanopartículas de PCL vazia e amilina humana.....	54
Figura 23 - Fotos de microtubos contendo suspensões de nanopartículas mostrando a sedimentação destas. indicando que mesmo após 28 dias a sedimentação não foi completa. O material foi armazenado a 37°C em PBS contendo 0.1% polisorbato, em repouso.....	55
Figura 24 - Imagens de nanopartículas de PCL (aumento de 40x). A – amostras lavadas com água, B – amostras lavadas com solução aquosa de 1,5% de PVA.....	56
Figura 25 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com Ultra-turrax® (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).	57
Figura 26 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com Ultra-turrax®, mostrando um perfil bimodal (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).....	58
Figura 27 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonicador (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).	59
Figura 28 - Distribuição de tamanho das nanopartículas contendo hIAPP produzidas com sonicador, mostrando um perfil bimodal (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).	61
Figura 29 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonicador, indicando um perfil monomodal (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).	62
Figura 30 - Distribuição de tamanho das nanopartículas contendo hIAPP produzidas com sonicador, mostrando um perfil monomodal.....	63
Figura 31 - Imagem das nanopartículas contendo amilina humana obtidas por MEV (aumento e barras de tamanho indicados no rodapé das microscopias).	66
Figura 32 - Imagens das nanopartículas contendo amilina humana obtidas por MET (aumento de 25.000x), indicando partículas de formas elípticas com tamanhos nanométricos (barra = 300nm).	67
Figura 33 - Perfil de liberação do sistema contendo amilina humana nanoencapsulada . <i>Inset</i> : escala log. Linhas sólidas representam ajuste com função exponencial simples com 3 ou quatro parâmetros (sendo o quarto a concentração inicial de amilina). Detalhes em Material e Métodos.	68
Figura 34 - Espectros de fluorescência de amostras coletados em diferentes tempos, indicando o aumento na intensidade de fluorescência com o passar do tempo.	70

Figura 35 - Perfil de liberação <i>in vivo</i> da preparação contendo amilina humana nanoencapsulada. Ensaios foram realizados com camundongos normais, não-diabéticos. Detalhes em Material e Métodos.....	71
Figura 36 - Dosagem de insulina usando o método de Bradford, indicando boa linearidade do método na faixa de concentração testada.....	73
Figura 37 - Fotos de microtubos contendo suspensões de micropartículas mostrando a sua sedimentação após armazenamento a temperatura de 37°C em repouso.....	74
Figura 38 - Distribuição de tamanhos das micropartículas contendo insulina (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).....	75
Figura 39 - Imagens de MO das micropartículas contendo insulina microencapsulada. Imagens a direita obtida usando objetiva de 40x e imagens à esquerda objetivas de 100x.....	76
Figura 40 - Imagens de MEV das micropartículas contendo insulina microencapsulada.	77
Figura 41 - Cinética de liberação <i>in vitro</i> (PBS pH 7,4 a 37°C) de insulina microencapsulada em partículas de poli-ε-caprolactona.....	79
Figura 42 - Efeito farmacológico das micropartículas contendo insulina em camundongos diabéticos (indução por streptozotocina, glicemia maior que 300 mg/dL).....	81
Figura 43 - Imagens de MEV de formulações de insulina microencapsulada em PLGA.....	85
Figura 44 - Imagens de MEV de micropartículas de PLGA contendo albumina de soro bovino preparadas pelo método de dupla-emulsão.....	88
Tabela 1. - Classificação do DM segundo a Associação Americana de Diabetes.....	4
Tabela 2. - Principais fatores de risco para o surgimento do DM.....	8
Tabela 3 - Medicamentos vendidos através do programa Farmácia Popular.....	12
Tabela 4 - Sequencias dos principais tipos de insulinas comercializadas (Adaptado de CROMMELIN, 2008).....	16
Tabela 5 - Regiões da seqüência da amilina com potencial amiloidogênico.	22
Tabela 6 - Efeitos da amilina (adaptado de YOUNG, 2005).	24
Tabela 7 - Estruturas em alta resolução de amilina inteira e análogos.....	28
Tabela 8 - Distribuição das firmas de biotecnologia.....	30
Tabela 9 - Números de firmas de biotecnologia nos principais países em desenvolvimento.....	30
Tabela 10 - Produtos comercializados contendo sistemas de liberação sustentada com base em fármacos aprisionados em matrizes poliméricas sólidas (adaptado de Mundargl et al.2008).	34
Tabela 11 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com Ultra-turrax® (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).	57
Tabela 12 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonicador (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).	60

Tabela 13 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de com hIAPP produzidas sonicator	61
Tabela 14 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonicator (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).....	62
Tabela 15 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonicator (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).....	64
Tabela 16 - Dados cinéticos de liberação <i>in vitro</i> de amilina humana a partir de nanopartículas de PCL.....	69
Tabela 17 - Dados cinéticos de liberação <i>in vitro</i> e efeitos farmacológicos <i>in vivo</i> de amilina humana a partir de nanopartículas de PCL.....	78

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

- a.C. - Antes de Cristo
- ACTH - Hormônio Adenocorticotrófico
- A β - Amyloid Beta Peptide (Peptídeo Beta Amilóide)
- anti-GAD-65 e 67 - Anticorpo contra ácido glutâmico descarboxilase-65 e -67
- anti-HSP-65 - Anticorpo contra proteína de choque térmico 65
- anti-insulina - Anticorpo contra insulina
- A/O - Emulsão Água em Óleo (emulsão simples)
- A/O/A - Emulsão Água em Óleo em Água (dupla-emulsão)
- AVC - Acidente Vascular Cerebral
- CBPF - Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
- CCS - Centro de Ciências de Saúde
- CGRPs - Calcitonin Gen-Related Peptides (Peptídeos Relacionadas com o Gene da Calcitonina)
- C_{máx} - Concentração Máxima
- DAP - Peptídeo Associado ao Diabetes
- DCM - Diclorometano
- DLS - Dynamic Light Scattering (Espalhamento de Luz Dinâmico)
- DM - Diabetes Mellitus
- DMTI - Diabetes Mellitus Tipo I
- DMTII - Diabetes Mellitus Tipo II
- DPC – Dodecylphosphocholine (Dodecilsfosfocolina)
- EGF - Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)
- F.A. - Fase Aquosa
- F.A.i. - Fase Aquosa interna
- F.A.ex. - Fase Aquosa externa
- F.O. - Fase Oleosa
- GLP1 - Glucagon-like Peptide-1 (Peptídeo Semelhante ao Glucagon Tipo 1)
- HbA1c - Hemoglobina A1c

- HFIP - Hexafluoroisopropanol
 - hIAPPwt - Amilina humana selvagem
 - IAP - Peptídeo Amilóide de Insulinoma
 - IAPP - Iset Amyloid Polypeptide (Polipeptídeo Amilóide das Ilhotas)
 - IDE - Insulin Degrating Enzyme (Enzima Degradadora de Insulina)
 - hIAPP - Polipeptídeo Amilóide das Ilhotas humano
 - MBP - Maltose Binding Protein
 - MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
 - MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
 - MFA - Microscopia de Força Atômica
 - MODY - Maturity Onset Diabetes of the Young
 - NP - Natriuretic Peptide (Peptídeo Natriurético)
 - WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde, OMS)
 - PC2 e PC3 - Proteína Cinase 2 e 3
 - PCL -Poli-ε-caprolactona
 - PEG - Polietilenoglicol
 - PF-127 - Pluronic F-127
 - PLGA - Ácido Poli (lático-glicólico)
 - POE - Poli Óxido de Etileno
 - POP - Poli Óxido de Propileno
 - PVA - Poli (vinil álcool)
 - rIAPP - Polipeptídeo Amilóide das Ilhotas de Rato = Amilina de Rato
 - RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
 - SDS - Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)
 - TFE - 2,2,2-trifluoroetanol
 - UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro
-

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico	1
1.2. Diabetes Mellitus.....	2
1.2.1. Diabetes Mellitus tipo I (DMTI)	6
1.2.2. Diabetes Mellitus tipo II (DMTII).....	7
1.2.3. DM, um problema de saúde pública.....	10
1.2.4. Métodos de tratamento	13
1.2.5. Hormônios protéicos pancreáticos no tratamento de Diabetes e outras condições fisiopatológicas	14
1.3. Insulina	15
1.4. IAP, DAP, Amilina ou IAPP?	19
1.4.1. Amilina, amiloidose e diabetes.....	21
1.4.2. Amilina e seus efeitos fisiológicos	23
1.4.3. Uso terapêutico da Amilina	25
1.4.4. Amilina: estruturas	28
1.5. Biotecnologia e o Mercado Biofarmacêutico	29
1.6. Sistemas Nano e Microencapsulados	32
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1. Material.....	39
3.2. Métodos	40
3.2.1. Preparação das nanopartículas contendo amilina	40
3.2.2. Preparação das micropartículas contendo insulina.....	42
3.2.3. Dosagem de amilina por espectrofluorimetria – Fluorescamina	43
3.2.4. Dosagem de insulina por espectrofotometria - Bradford.....	45
3.2.5. Determinação do tamanho por espalhamento de luz dinâmico	45
3.2.6. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
3.2.7. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	46
3.2.8. Análise morfológica por microscopia óptica (MO).....	47
3.2.9. Perfil de liberação das nanopartículas com amilina <i>in vitro</i>	47
3.2.10. Perfil de liberação das micropartículas com insulina <i>in vitro</i>	47
3.2.11. Perfil farmacológico das nanopartículas com amilina.....	48
3.2.12. Perfil farmacológico das micropartículas com insulina	49
4. RESULTADOS NANOPARTÍCULAS CONTENDO AMILINA.....	50
4.1. Dosagem de amilina por espectrofluorimetria.....	50
4.2. Eficiência, rendimento e sedimentação	55
4.3. Distribuições de tamanhos da nano e micropartículas.....	56
4.4. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	65
4.5. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	67
4.6. Perfil de liberação das nanopartículas com amilina <i>in vitro</i>	68
4.7. Perfil farmacológico das nanopartículas com amilina (<i>in vivo</i>).....	71
5. RESULTADOS MICROPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA	72
5.1. Dosagem de insulina pelo método de Bradford	72
5.2. Eficiência, rendimento e sedimentação	74

5.3. Distribuição de tamanhos das micropartículas	75
5.4. Análise morfológica por microscopia óptica (MO).....	75
5.5. Perfil de liberação das micropartículas com insulina in vitro	78
5.6. Perfil farmacológico das micropartículas com insulina (in vivo).....	80
6. DISCUSSÃO	82
6.1. Porque sistemas de liberação sustentada?	82
6.2. Avaliação da formulação contendo amilina nanoencapsulada.....	83
6.3. Avaliação da formulação contendo insulina microencapsulada.....	86
7. CONCLUSÃO.....	89
8. REFERÊNCIAS	90
9. ANEXO	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Relatos de pacientes com sintomas tipicamente associados ao Diabetes Mellitus foram encontrados em muitas civilizações antigas (Egito , China, Índia, etc.). Da Grécia antiga se tem a primeira descrição clínica do DM feita por Celsus no século I a.C. Ainda na Grécia antiga Areatus foi capaz de diferenciar Diabetes Mellitus de Diabetes Insipidus (BIRNBAUMER, 2002 *apud*. LOPES, 2004). Dentre os principais eventos envolvidos no estudo do DM destacam-se: a descrição histológica do pâncreas feita por Paul Langerhans em 1869; a indução de DM em cães feita por Minkowski e von Mering em 1889; o primeiro uso de extratos de pâncreas em humanos realizado por Gurg Zuelzer no início do século XX; os aperfeiçoamentos dos extratos de pâncreas desenvolvidos por Nicolas Paulesco, Frederick Banting e Charles Best no começo de século XX e o início da produção em larga escala de insulina recombinante humana pela Genentech em 1982 (PAVLOU 2005; GOODMAN e GILMAN, 2006).

Milênios se passaram desde as escritas egípcias e esse antigo mal não só permanece sem uma cura definitiva como também tem atingido um número cada vez maior de pessoas sendo o responsável por 5% dos óbitos em todo o mundo (site WORLD HEALTH ORGANIZATION). O conhecimento acerca dos mecanismos bioquímicos e fisiopatológicos do DM possibilitou a criação de diversos medicamentos que prolongam e melhoram a qualidade de vida dos pacientes com DM, contudo nenhum destes medicamentos é capaz de mimetizar parcialmente um órgão tão complexo quanto pâncreas. Assim, o desenvolvimento de medicamentos

visando este mimetismo (mesmo que parcialmente) exige tecnologias de ponta e um amplo conhecimento desta patologia.

1.2. Diabetes Mellitus

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) e a American Diabetes Association (ADA), o Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças crônicas que ocorrem quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando há uma resistência à ação deste hormônio, e em alguns casos são observados produção e ação deficientes da insulina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009c). A insulina é um hormônio peptídico secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas e tem efeitos sobre a regulação da concentração de glicose plasmática (glicemia), sua ausência ou ação deficiente incorrem no quadro clínico conhecido como hiperglicemia. Dentre os sintomas clínicos mais relevantes do DM destacam-se (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009c):

- Sede intensa;
- Poliúria (aumento do volume e frequência urinária);
- Glicosúria (presença de glicose na urina);
- Fadiga muscular sem causa aparente;
- Dificuldade de cicatrização periférica;
- Cetoacidose (que pode ocasionar confusão mental, coma e, em casos não tratados, a morte);

- Retinopatia diabética, causada pela lesão crônica dos capilares da retina. Sendo esta a causa mais comum de cegueira afetando 2% dos diabéticos.
- Nefropatia diabética (acometendo de 10 a 20% dos diabéticos), que pode levar a falência renal;
- Neuropatias com risco de úlceras nos pés, amputação, juntas de Charcot, e características de disfunções no sistema nervoso autônomo, incluindo disfunções sexuais.
- Risco aumentado para doenças cardiovasculares (50% dos pacientes com DM morrem devido a ataques cardíacos ou acidentes vasculares cerebrais), vasculares periféricas e cérebro-vasculares.

Infelizmente em muitos casos os pacientes só procuram ajuda médica quando há agravamento da doença, visto que os primeiros sintomas são muitas vezes imperceptíveis. Assim, freqüentemente o diagnóstico é realizado muito tempo após do início da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Segundo a American Diabetes Association (2009c) os casos de diabetes podem ser divididos em quatro grandes grupos e em dezenas de subgrupos (Tabela 1).

Tabela 1. - Classificação do DM segundo a Associação Americana de Diabetes

I. Diabetes tipo 1 (Destruição das células Beta, geralmente levando à deficiência absoluta de insulina)

A. imunomediada (observa-se a presença de anti-GAD, anti-TFAI2 e/ou anti-TFAI2 β , etc.)

B. Idiopática (os anticorpos supracitados não são encontrados)

II. Diabetes tipo 2 (pode variar de resistência à insulina com a deficiência de insulina a uma defeito predominantemente secretório, com resistência à insulina)

III. Outros tipos específicos

A. Defeitos genéticos na função das células Beta

- | | |
|---|--|
| 1. Cromossomo 12, HNF-1 α (MODY3) | 5. Cromossomo 17, HNF-1 α (MODY5) |
| 2. Cromossomo 7, glicoquinase (MODY2) | 6. Cromossomo 2, NeuroD1 (MODY6) |
| 3. Cromossomo 20, HNF-4 α (MODY1) | 7. DNA mitocondrial |
| 4. Cromossomo 13, o fator promotor da insulina-1 (IPF-1; MODY4) | 8. Outros |

B. Defeitos genéticos na ação da insulina

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1. Resistência à insulina do tipo A | 4. Diabetes Lipoatrófica |
| 2. Leprechaunismo | 5. Outros |
| 3. Síndrome Rabson-Mendenhall | |

C. Doenças do pâncreas exócrino

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------|
| 1. Pancreatite | 5. Hemocromatose |
| 2. Trauma / pancreatectomia | 6. Pancreatopatia Fibrocalculosa |
| 3. Neoplasia | 7. Outros |
| 4. Fibrose cística | |

D. Endocrinopatias

- | | |
|------------------------|---------------------|
| 1. Acromegalia | 5. Hipertireoidismo |
| 2. Síndrome de Cushing | 6. Somatostatina |
| 3. Glucagonoma | 7. Aldosteronoma |
| 4. Feocromocitoma | 8. Outros |

E. Químioinduzida

- | | |
|---------------------------|------------------------------------|
| 1. Vacor (raticida) | 7. Agonistas β -adrenérgicos |
| 2. Pentamidina | 8. Tiazídicos |
| 3. O ácido nicotínico | 9. Dilantin (fenitoína) |
| 4. Glicocorticóides | 10. α -Interferon |
| 5. Hormônios tireoidianos | 11. Outros |
| 6. Diazóxido | |

F. Infecções

1. Rubéola congênita
2. Citomegalovírus
3. Outros

G. Formas incomuns de diabetes imunomediada

1. Síndrome de "Stiff-man"
2. Anticorpos anti-receptor de insulina
3. Outros

H. Outras síndromes genéticas algumas vezes associadas com diabetes

- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| 1. Síndrome de Down | 7. Laurence-Moon-Biedl |
| 2. Síndrome de Klinefelter | 8. Distrofia miotônica |
| 3. Síndrome de Turner | 9. Porfiria |
| 4. Síndrome de Wolfram | 10. Síndrome de Prader-Willi |
| 5. Ataxia de Friedreich | 11. Outros |
| 6. Doença de Huntington | |

IV. Diabetes gestacional (ocorre durante a gravidez e pode ou não persistir ao término desta, sendo também um fator de risco para o desenvolvimento de DMTII).

Pelo exposto anteriormente conclui-se que o DM é um grupo de doenças multifatoriais, e, por conseguinte existem diversos componentes além da predisposição genética que podem levar ao surgimento desta doença. A combinação de certos fatores aumenta o risco de se desenvolver DM, dentre estes destacam-se: alguns tipos de infecções virais, dieta hiperglicídica, sedentarismo, obesidade, uso incorreto de medicamentos diabetogênicos (esteróides anabolizantes, glicocorticóide e estrogênios anticoncepcionais) e exposição a determinados agentes químicos como os citados anteriormente (ver classificação do DM). Todavia, vale ressaltar que, embora existam inúmeros subtipos de DM, os tipos I e II correspondem juntos a mais de 95% dos casos diagnosticados. Sendo a incidência do tipo II correspondente a 90-95% dos casos (GOODMAN e GILMAN, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009c; site WHO).

O medicamento que pretendemos desenvolver visa uma complementação no tratamento dos pacientes com diabetes mellitus tipo I (DMTI) e tipo II (DMTII). Sendo assim, estes dois grupos são descritos a seguir.

1.2.1. Diabetes Mellitus tipo I (DMTI)

Esta forma de diabetes ocorre devido a uma disfunção auto-imune que leva à destruição das células beta pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2009c). A denominação diabetes juvenil era usada porque a maioria dos pacientes diagnosticados apresentavam os sintomas na infância e adolescência, contudo tal denominação é imprecisa pois esta doença pode surgir em qualquer idade. Os principais sintomas usados para o diagnóstico inicial são: poliúria, sede intensa, perda de peso e cansaço. O diagnóstico laboratorial da DMTI imunomediada se dá por imunoenaios realizados para se verificar anticorpos que identifiquem um processo auto-imune contra as células β , estes anticorpos são: anti-insulina, anti-ácido glutâmico descarboxilase-65 e -67 (anti-GAD-65 e 67), anti-proteína de choque térmico 65 (anti-HSP-65), anti-tirosina fosfatase AI2 e anti-tirosina fosfatase AI2 β (GOODMAN e GILMAN, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009c; MOTTA, 2009). Esta resposta auto-imune culmina com a falência na produção de insulina e por isso os pacientes com DMTI têm, obrigatoriamente, que repor este hormônio através da administração de insulina exógena.

1.2.2. Diabetes Mellitos tipo II (DMTII)

Esta forma de diabetes, que corresponde a 90-95% dos casos diagnosticados (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2009c; MOTTA, 2009), era denominado diabetes não insulino-dependente e abrange os indivíduos que têm resistência à insulina e normalmente têm relativa (não absoluta) deficiência de insulina. É caracterizado pela resistência periférica e hepática à ação da insulina, sendo que, por vezes este, hormônio está presente em níveis normais sem que haja efeito hipoglicemiante. Outra importante característica do DMTII é o estado de tolerância à glicose, que corresponde a um aumento na secreção de insulina seguido pela falência das células β (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2009c). Portanto, no paciente com DMTII, podem ser observados níveis elevados de insulina juntamente com hiperglicemia.

Uma característica importante desta patologia reside no fato de que nem sempre a reposição hormonal é necessária. Em verdade, muitas vezes em seus estágios iniciais esta patologia pode ser tratada apenas pela reeducação alimentar em combinação com exercícios aeróbicos. Há, provavelmente, muitas causas diferentes desta forma de diabetes, embora a etiologia específica não seja conhecida, a destruição auto-imune de células β não está presente, e os pacientes não apresentam as outras causas de diabetes que os enquadrem nos demais grupos anteriormente citados. A maioria dos pacientes com esta forma de diabetes são obesos e já foi relatado que a obesidade em si provoca algum grau de resistência à insulina. Mesmo os pacientes que não são obesos por critérios tradicionais de peso (índice de massa corpórea < 27) podem apresentar

predisposição ao DMTII quando apresentarem gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009c). Quadros de cetoacidose raramente são observados neste tipo de diabetes, embora alguns fatores como estresse e infecções possam desencadeá-los. Esta forma de diabetes, freqüentemente, não é diagnosticada em seu estado inicial, porque a hiperglicemia se desenvolve gradualmente e, em fases anteriores, muitas vezes não é grave o suficiente para que o paciente apresente algum dos sintomas clássicos do diabetes. No entanto, esses pacientes têm um risco aumentado de desenvolver complicações micro e macrovasculares devido à hiperglicemia persistente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Os principais fatores de risco para o surgimento do DMTII são resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. - Principais fatores de risco para o surgimento do DM (adaptado de MOTTA 2009)

Idade \geq 45 anos
Histórico familiar de DM (pais, filhos e irmão)
Excesso de peso ($IMC \geq 27 \text{ kg/m}^2$) ou acúmulo de gordura visceral
Sedentarismo
HDL-C baixo ($< 35 \text{ mg/dL}$) e/ou triglicerídeos elevados ($> 250 \text{ mg/dL}$)
Hipertensão arterial ($> 140/90 \text{ mmHg}$)
Doença coronariana
DM gestacional prévio
Macrossomia ou histórico de abortos de repetição ou mortalidade perinatal

Apesar de sua grande importância na patogênese do DMTII, a insulina não é o único hormônio envolvido nesta doença. Neste aspecto, outros hormônios (glucagon, GLP1, amilina, etc.) têm sido associados a esta desordem. A amilina tem um papel de destaque na patogênese do DMTII, pois a maioria dos pacientes com esta patologia apresentam depósitos amilóides, constituídos majoritariamente por amilina, em seus pâncreas (EDELMAN, 2008). Pelo exposto fica evidente que o controle glicêmico é um processo altamente complexo e que a reposição com insulina exógena pode não ser suficiente para assegurar a saúde dos pacientes com DM uma vez que este não é o único hormônio alterado nesta patologia, além disso, os medicamentos atualmente comercializados não são capazes de repor os padrões fisiológicos de secreção de tais hormônios.

1.2.3. DM, um problema de saúde pública

Atualmente, o DM é responsável por 5% das mortes relatadas em todo o mundo, sendo que em 2005 1,1 milhões de pessoas morreram em decorrência das complicações desta doença (ROGLIC *et al.*, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). A Organização Mundial de Saúde considera que a incidência de casos de DM tenha atingido um nível tão elevado que estima uma pandemia até 2030, com um crescimento de 171 milhões de casos em 2000 para 366 milhões em 2030 (WILD *et al.*, 2004). A maior prevalência deste grupo de doenças reside nos países pobres e em desenvolvimento (80% dos casos). A distribuição etária também varia de acordo com o nível de desenvolvimento sendo que nos países pobres o grupo de maior risco é formado por adultos com idades entre 45 e 64 anos, enquanto que nos países ricos o grupo de maior prevalência corresponde aos idosos (Fig. 1).

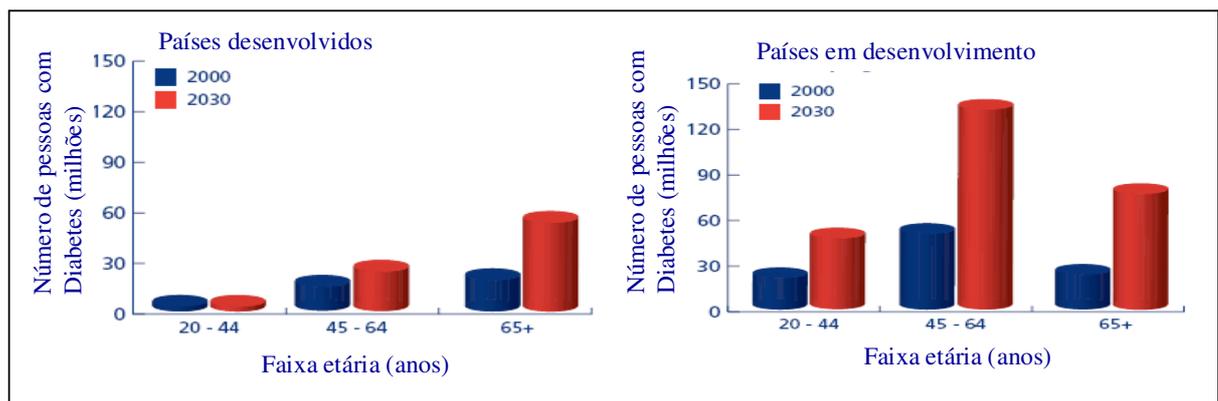


Figura 1 - Perfil de distribuição etária dos casos diagnosticados de DM de acordo com o desenvolvimento socioeconômico. Observa-se que nos países desenvolvidos, esquerda, há um menor número de casos de DM e estes são mais freqüentes na população idosa. Nos países em desenvolvimento, direita, vê-se uma maior incidência de casos de DM sendo que estes atingem principalmente a população com idades entre 45 e 64 anos (adaptado de WILD *et al.*, 2004).

Lamentavelmente, o Brasil ocupa uma posição de destaque neste cenário, sendo o oitavo país com maior número de casos de DM, esperando-se um aumento neste número de 4,6 milhões em 2000 para 11,3 milhões em 2030 (Fig. 2).

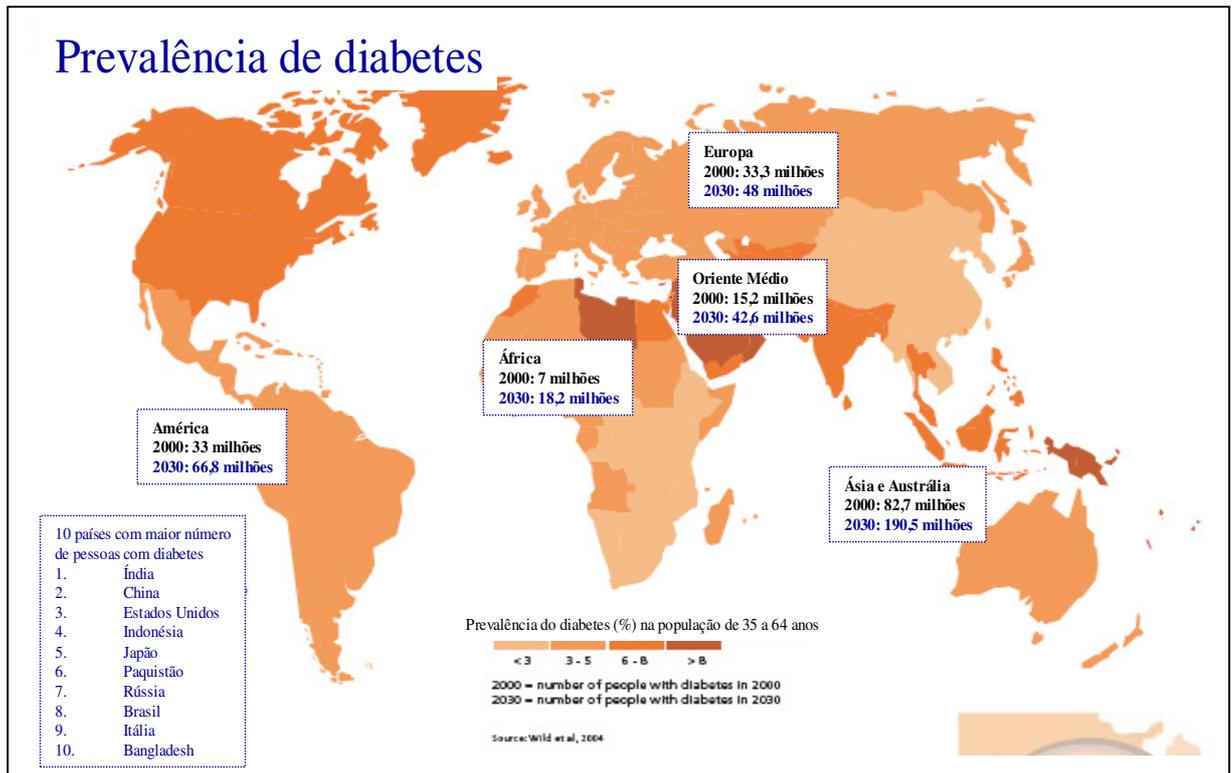


Figura 2 - Prevalência de casos de DM no mundo, em destaque os 10 países com maior incidência desta doença, sendo o Brasil o oitavo país nesta lista (adaptado de WILD *et al.*, 2004)

No Brasil há uma prevalência de 5,2% de portadores de DM na população adulta (Fig. 3), o que gera elevados gastos com a aquisição e distribuição de medicamentos pelo ministério da saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Alguns medicamentos para o tratamento do DM já fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Excenciais - RENAME (em 2008 foram adquiridas 960 mil ampolas de insulina regular e mais de 11 milhões de ampolas de insulina NPH), sendo o Ministério da Saúde Brasileiro o maior comprador mundial de insulina. Outros

medicamentos podem ser comprados pelos pacientes através do programa Farmácia Popular (Tabela 3).

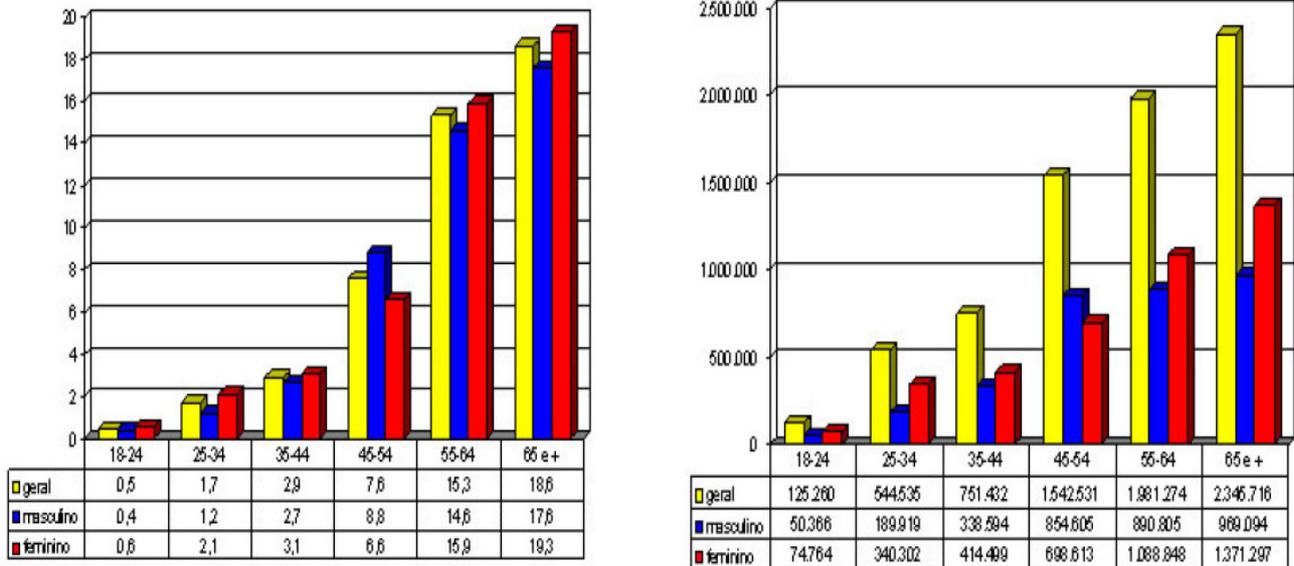


Figura 3 - Distribuição etária de portadores de DM no Brasil, a esquerda o perfil etário e sexual dos portadores de DM (em %) e a direita os dados do gráfico a esquerda mas com valores referentes ao número de pacientes com DM (fonte MINISTÉRIO DA SAÚDE)

Tabela 3 - Medicamentos vendidos através do programa Farmácia Popular (fonte MINISTÉRIO DA SAÚDE).

Quantitativo de Medicamentos Vendidos por comprimidos-FP

PRINCIPIO ATIVO	2006	2007	2008
CLORIDRATO DE METFORMINA	28.165.567	109.389.678	118.558.548
GLIBENCLAMIDA	6.884.703	31.302.050	38.281.493
INSULINA HUMANA (mL)	1.776.762	5.868.302	5.582.147
TOTAL	36.827.032	146.560.030	162.422.188

1.2.4. Métodos de tratamento

A World Health Organization (2006) preconiza a adoção de uma vida saudável (dieta balanceada e no mínimo 30 minutos de exercícios aeróbicos quatro vezes por semana) como medida profilática para DM e distúrbios cardiovasculares. O tratamento não farmacológico, a exemplo das medidas profiláticas, tem como base a dieta hipoglicídica e a atividade física. Todavia, em grande parte das vezes a intervenção farmacológica é necessária sendo que a reposição com insulina exógena para controle da glicemia é indispensável para todos os pacientes com DMTI e para a maior parte dos pacientes diabéticos tipo II (GOODMAN e GILMAN, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2009a, 2009b). Embora a reposição com insulina exógena consiga normalizar a glicemia e reduzir os risco de complicações em longo prazo, sua utilização está associada a um risco elevado de episódios de hipoglicemia, ganho de peso e lipodistrofia, que está diretamente ligado ao aumento dos níveis lipídêmicos e pressão sanguínea (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Existe uma grande variedade de substâncias cujo emprego farmacológico objetiva a redução da taxa glicêmica, sendo estes chamados de agentes hipoglicemiantes orais ou antidiabéticos orais. Estes agentes são especialmente importantes para o diabético tipo II e quando utilizados em conjunto com dietas hipocalóricas constituem a base medicamentosa para o tratamento desta doença em seu estágio inicial. Dentre os antidiabéticos orais destacam-se o cloridarato de metformina e a glibenclamida (GOODMAN e GILMAN, 2006; LÜLLMANN *et al.*, 2008). A metformina possui efeito hipoglicemiante através da redução da liberação de glicose hepática, mas apresenta efeitos adversos como anorexia, náuseas,

diarréia e acidose láctica. A glibenclamida, um derivado das sulfoniluréias, age inibindo os canais de potássio das células β causando a despolarização de suas membranas o que resulta em uma maior liberação de insulina. O principal efeito adverso observado em pacientes que fazem uso deste fármaco são episódios de hipoglicemia, outro problema, reside no fato que muitos pacientes não respondem à este fármaco e outros deixam de responder após usá-lo por algum tempo (GOODMAN e GILMAN, 2006; LÜLLMANN *et al.*, 2008).

A existência de antidiabéticos orais não exclui a necessidade do uso de insulina, pois tais medicamentos são ineficazes em pacientes com DMTI, em pacientes com DM gestacional (pois muitos deles são teratogênicos) e por vezes há necessidade do uso desses combinados com insulina em pacientes com DMTII. O tratamento convencional com insulina consiste na administração subcutânea de insulina exógena geralmente em diversas aplicações diárias. Dentre as alternativas terapêuticas atuais para a insulino terapia, somente os transplantes de pâncreas ou de ilhotas pancreáticas são capazes de recompor o padrão fisiológico de secreção de insulina e tornar o portador de DMTI independente das aplicações diárias, no entanto, tais métodos ainda não estão completamente estabelecidos e muitos pacientes apresentam rejeição ao tratamento (BERNEY, 2002; COOPER e CASU, 2009; PAPAS, SUSZYNSKI e COLTON, 2009; GRUESSNER e SUTHERLAND 2010).

1.2.5. Hormônios protéicos pancreáticos no tratamento de Diabetes e outras condições fisiopatológicas

Atualmente dois hormônios e análogos são empregados no tratamento de diabetes, a saber, insulina e amilina (YOUNG, 2005).

1.3. Insulina

Existem diversos produtos comerciais baseados em insulinas nativa (Fig. 5) (sem alterações químicas como derivatização ou mutações pontuais) alcançando uma variada faixa de ação farmacocinética (Fig. 4 e Tabela 4), como (GOODMAN e GILMAN, 2006; LÜLLMANN *et al.*, 2008):

- insulinas regulares – necessitam ser administradas 30 min antes da refeição
- insulinas rápidas – administradas no momento da refeição
- insulinas NPH – conjugada a protamina, funcionam com ação mais lenta
- insulinas de longa duração – para manutenção de níveis basais de hormônio

Atualmente os produtos com base em insulina são obtidos por via recombinante, em diversos organismos como *E coli*, *S cerevisiae*, *P pastori*, que expressam insulina humana nativa e análogas (mutantes) e posteriormente purificadas e processadas para obtenção das duas cadeias unidas pelas três pontes dissulfeto intercadeia. Esse processo foi iniciado em 1982, pela Eli Lilly, desenvolvido originalmente pela Genentec (que nunca comercializou insulinas, apenas desenvolveu) e foi o primeiro biofármaco recombinante, substituindo as obtidas a partir de pâncreas de outros animais (porcina, bovina), evitando assim problemas de imunogenicidade e ainda de encefalopatias espongiiformes transmissíveis.

Tabela 4 - Sequencias dos principais tipos de insulinas comercializadas (Adaptado de CROMMELIN, 2008)

Tipo de insulina	A ⁸	A ¹⁰	A ²¹	B ³	B ²⁸	B ³⁰	B ³¹	B ³²
Human (Humulin®, Novolin®)	Thr	Ile	Asn	Asn	Pro	Thr	-	-
Porcina	Thr	Ile	Asn	Asn	Pro	Ala	-	-
Bovina	Ala	Val	Asn	Asn	Pro	Ala	-	-
Lispro (Humalog®)	Thr	Ile	Asn	Asn	Lis	Thr	-	-
Aspart (NovoRapid®, NovoLog®)	Thr	Ile	Asn	Asn	Asp	Thr	-	-
Glulisina (Apidra™)	Thr	Ile	Asn	Lys	Pro	Thr	-	-
Glargina (Lantus®)	Thr	Ile	Gly	Asn	Pro	Thr	Arg	Arg
Detemir (Levemir®)	Thr	Ile	Asn	Asn	Lys-(N-tetradecanoil)			

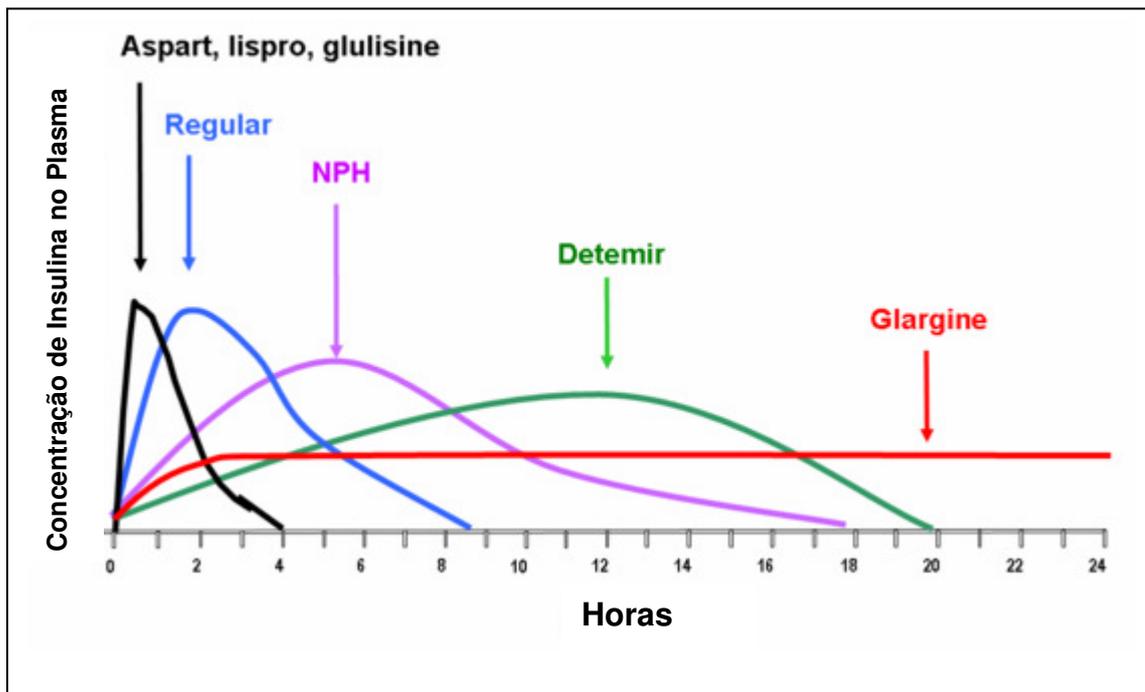


Figura 4 - Perfis farmacocinéticos esquemáticos de insulina humana e análogos após administração subcutânea.

Fonte: <http://www.endotext.org/diabetes/diabetes20/ch01s06.html>

Apesar da existência de uma grande diversidade de produtos, há ainda necessidade de desenvolvimentos tecnológicos para atender certas demandas terapêuticas, como:

a) formulações para uso em outras vias de administração – visa evitar o desconforto e problemas advindos da administração subcutânea repetida.

a1) Inalável: Foi desenvolvida a insulina inalável, mas a continuidade do produto que fora lançado (Exubera®) e o desenvolvimento de outros para via aérea foi desencorajado devido ao alto índice de câncer de pulmão constatado para essa formulação (GIEZEN *et al.*, 2008)

a2) Oral – em fase de desenvolvimento, com diversas formulações caracterizadas, a maior parte com base em nano e micropartículas de diversos polímeros, como lipossomas, quitosana, PLGA, PCL, alginatos, dentre outros.

a3) Implante – são insulinas de liberação lenta, mas ainda possuem o inconveniente de serem desconfortáveis quanto a seu uso.

b) insulinas de diferentes perfis farmacocinéticos (rápida / lenta), mas que não possuam alterações em sua seqüência de aminoácidos visando minimizar efeitos imunológicos. Para se ter idéia, a insulina bovina difere apenas em um aminoácido da humana, e é capaz de gerar reação imunogênica. A maior parte se baseia em sistemas nano e microparticulados, que permitam a liberação controlada e sustentada de insulina humana nativa, como por exemplo a que se trata o presente projeto de pesquisa aqui apresentado.

Neste trabalho, voltamos uma das partes do projeto ao desenvolvimento de uma formulação biocompatível, de baixo potencial imunogênico, de insulina humana nativa, carregada em micropartículas para liberação controlada com perfil bifásico misto, de ação curta e ação prolongada.

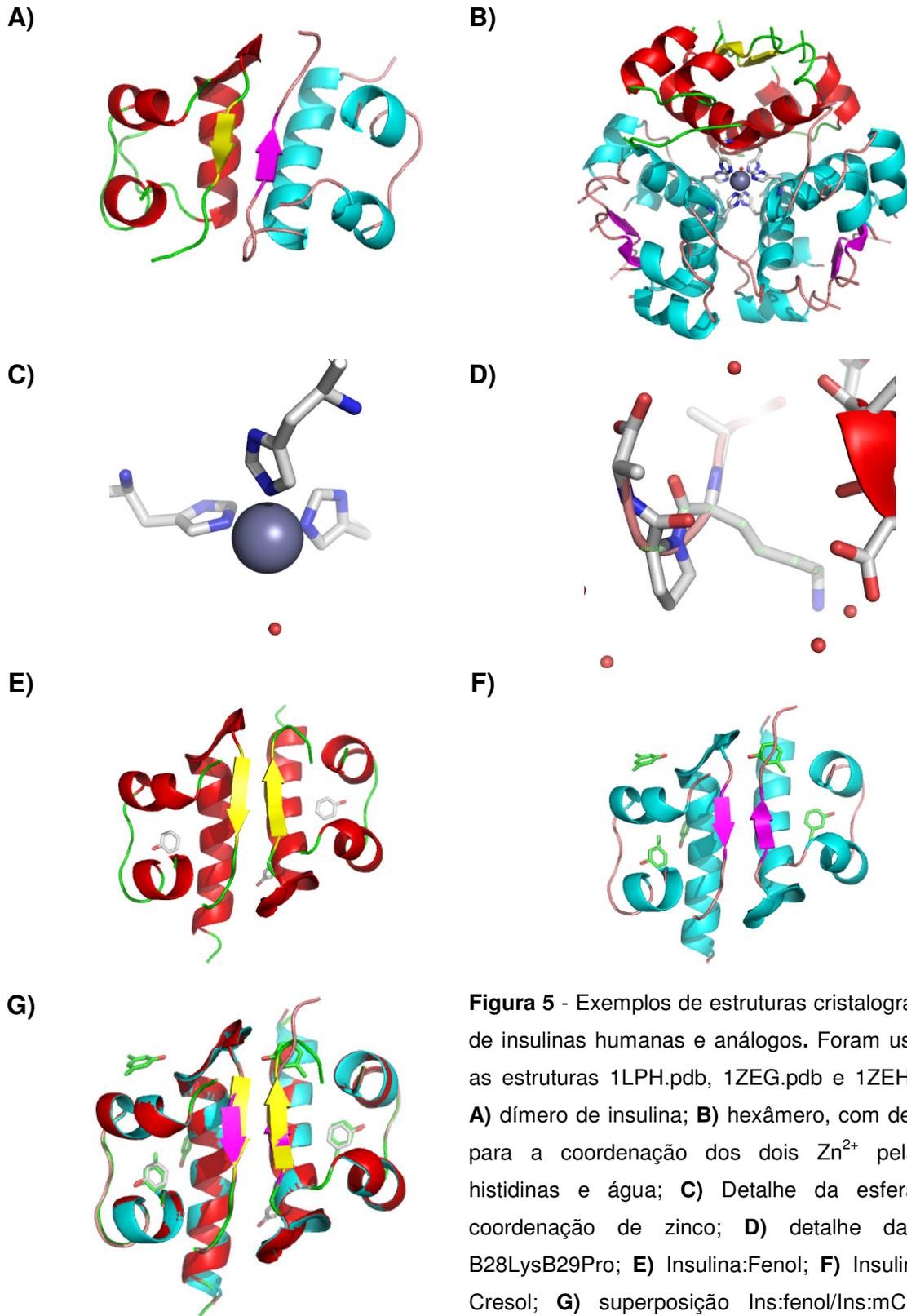


Figura 5 - Exemplos de estruturas cristalográficas de insulinas humanas e análogos. Foram usadas as estruturas 1LPH.pdb, 1ZEG.pdb e 1ZEH.pdb. **A)** dímero de insulina; **B)** hexâmero, com detalhe para a coordenação dos dois Zn^{2+} pelas 6 histidinas e água; **C)** Detalhe da esfera de coordenação de zinco; **D)** detalhe da Ins B28LysB29Pro; **E)** Insulina:Fenol; **F)** Insulina:m-Cresol; **G)** superposição Ins:fenol/Ins:mCresol. **Figuras geradas com PyMOL.**

1.4. IAP, DAP, Amilina ou IAPP?

Em 1901, Opie descreveu a histologia de pâncreas de pacientes com DM. Na ocasião, Opie verificou a presença de um material hialino (de aspecto cartilaginoso) ao redor dos capilares da amostra extraída do pâncreas de uma paciente com DM (Fig 6)(OPIE, 1901). Quase 90 anos se passaram até a identificação da amilina como sendo o principal constituinte do material descrito por Opie.

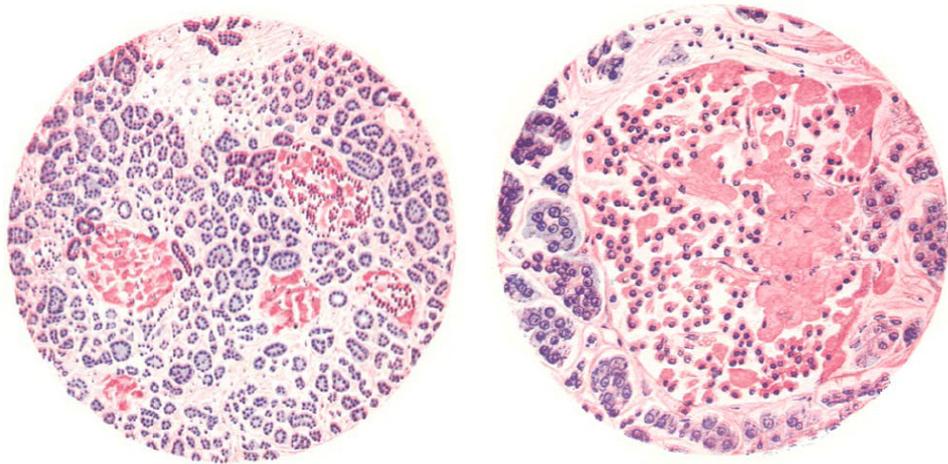


Figura 6 - Histologia do pâncreas, a esquerda material de paciente saudável e a direita tecido pancreático de paciente com DM apresentando o material hialino (rosa) ao redor dos capilares (retirado de OPIE 1901).

O sequenciamento completo da amilina foi realizado por dois grupos de pesquisa em paralelo. Primeiramente, Westermark *et al.*(1986), usando o material extraído de insulinomas humanos, relataram a seqüência parcial de um peptídeo que eles designaram peptídeo amilóide de insulinoma-IAP. A seguir, Cooper *et al.* relataram a seqüência completa de 37 aminoácidos deste peptídeo a partir do material amilóide extraído de homogeneizados de pâncreas de pacientes com diabetes tipo 2 (CLARK *et al.*, 1987; COOPER *et al.* 1987). Cooper *et al.* inicialmente chamaram sua descoberta de peptídeo associado ao diabetes-DAP,

mas em suas publicações posteriores eles passaram a adotar a nomenclatura de amilina (COPPER *et al.* 1988). Atualmente, os termos IAP e DAP estão em desuso enquanto que amilina e IAPP são usados como sinônimos. Todavia, a designação de amilina, que é o termo mais utilizado, refere-se à seqüência de 37 aminoácidos com a porção C-terminal amidada, uma ponte dissulfeto [Cys-2 - Cys-7] e dotada de atividade biológica (ROBERTS *et al.* 1989; YOUNG, 2005).

1.4.1. Amilina, amiloidose e diabetes

Aparentemente o gene da amilina está presente tanto em mamíferos quanto em aves, localizado no cromossomo 12 em humanos. Tal gene, na realidade, possui dois exons com a seqüência para o pré-pró-hormônio com 89 aminoácidos. Assim, a amilina propriamente dita é obtida após a clivagem pelas enzimas PC2 e PC3, sofrer amidação no C-terminal e ter suas cisteínas unidas em uma ponte dissulfeto. A amilina possui também uma grande homologia com os peptídeos relacionados com o gene da calcitonina (CGRPs), sendo que ambos possuem 37 aminoácidos, uma ponte dissulfeto nas mesmas regiões e são amidados no C-terminal (YOUNG, 2005).

Uma das características mais evidente da amilina reside na sua capacidade em formar fibras amilóides sob condições fisiológicas/fisiopatológica (Fig. 7) o que lhe confere um papel de destaque na patogênese do DMTII, pois mais de 90% dos pacientes com DMTII apresenta depósitos amilóides em seus pâncreas (CLARK et al. 1990 e 1996) e são relatados casos de DMTII em outras espécies de mamíferos que expressam amilinas com propensão à formação de estruturas amilóides (YOUNG, 2005). Assim, foi descrito que espécies de primatas (humanos, chimpanzés, etc.) e felídeos (gatos, leões, tigres, etc.) expressam amilinas que agregam, e nestes são relatados casos de DMTII (YOUNG, 2005), enquanto que em roedores e em canídeos não foram relatados depósitos amilóides de amilina e, portanto não são observados casos de DMTII. Diversos trabalhos têm demonstrado que fragmentos isolados da seqüência da amilina têm potencial amiloidogênico conforme a Tabela 5.

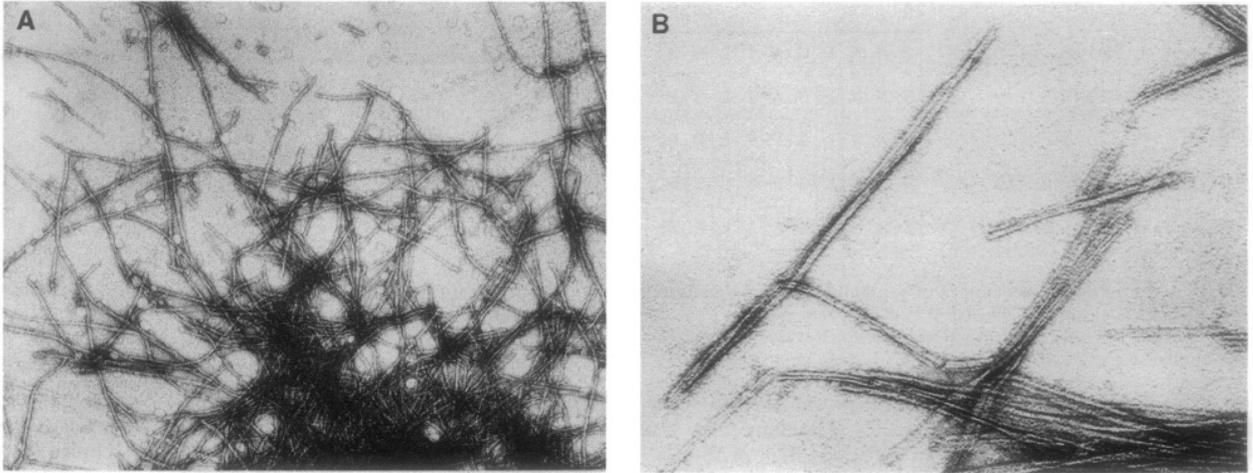


Figura 7 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de fibra amilóides de amilina, A aumento de 60.000x e B aumento de 150.000x (adaptado de Westermarck 1990).

Tabela 5 - Regiões da seqüência da amilina com potencial amiloidogênico.

Região amiloidogênica	Referência
8-20	JAIKARAN <i>et al.</i> , 2001
20-29	WESTERMARK <i>et al.</i> ,1990
22-27	TENIDIS <i>et al.</i> ,2000
22-29	AZRIEL E GAZIT, 2001
25-29	GLENNER <i>et al.</i> ,1988
30-37	NILSSON E RALEIGH, 1999

A comparação das seqüências de aminoácidos entre espécies e ensaios *in vitro* revelaram que a porção 20-29, e para alguns autores a porção 25-29, é crucial para a formação destas fibras amilóides no peptídeo inteiro. Interessantemente, cachorros e gatos apresentam as mesmas seqüências nas porções 20-37 e, no entanto, apenas gatos apresentam depósitos amilóides no pâncreas. Sendo assim,

fica evidente que outros fatores além da seqüência primária da amilina são importantes para que esta se agregue *in vivo*.

1.4.2. Amilina e seus efeitos fisiológicos

Há um grande número de trabalhos publicados descrevendo os efeitos da amilina e/ou pramlintide sendo muitos destes efeito sobre a glicemia e por isso a amilina é considerada o terceiro hormônio pancreático ativo na homeostase de glicose (LORENZO *et al.*,1994), a Tabela 6 apresenta alguns efeitos da amilina/pramlintide. Dado o grande número de ações atribuídas a amilina fica evidente que a mesma pode ser considerada como um hormônio neuroendócrino com um amplo espectro de atuação. Todavia, seu uso terapêutico no tratamento do DM tem por princípio seus efeitos diretos e indiretos sobre a glicemia, conforme será descrito mais adiante.

Tabela 6 - Efeitos da amilina (adaptado de YOUNG, 2005).

Efeito	Referência
Inibição da síntese de glicogênio muscular	Leighton e Cooper, 1988
Redução cálcio plasmático	Datta, 1989
Estimulação da produção endógena de glicose	Molina <i>et al.</i> , 1990
Estimulação de vasodilatação cutânea	Brain <i>et al.</i> , 1990
Inibição da captação de glicose periférica	Molina <i>et al.</i> , 1990
Ativação da glicogenólise muscular	Young <i>et al.</i> , 1991
Aumento da glicose no plasma	Young <i>et al.</i> , 1991
Aumento de lactato no plasma	Young <i>et al.</i> , 1991
Aumento no conteúdo de glicogênio hepático	Young <i>et al.</i> , 1991
Inibição periférica da ingestão de alimentos	Morley e Flood, 1991
Inibição, via SNC, da ingestão de alimentos	Chance <i>et al.</i> , 1991
Estimulação da secreção de gastrina	Funakoshi <i>et al.</i> , 1992
Estimulação do metabolismo exócrino do pâncreas	Iwamoto <i>et al.</i> , 1992
Estimulação do SNC tirosina e triptofano transporte	Chance <i>et al.</i> , 1992
Modulação da aprendizagem / memória	Flood e Morley, 1992
Apoptose em células nervosas em cultura	May <i>et al.</i> , 1993
Estimulação da liberação de glicose muscular	Young <i>et al.</i> , 1993
Estimulação dos osteoblastos	Romero <i>et al.</i> , 1993
Inibição da secreção de insulina	Dégano <i>et al.</i> , 1993
Inibição dos osteoclastos	Alam <i>et al.</i> , 1993
Redução da pressão arterial	Young <i>et al.</i> , 1993
Apoptose em culturas de células β	Lorenzo <i>et al.</i> , 1994
Estimulação da calciúria	Miles <i>et al.</i> , 1994
Estimulação da secreção de renina	Young <i>et al.</i> , 1994
Estimulação da secreção traqueal	Wagner <i>et al.</i> , 1995
Estimulação de vasodilatação pulmonar	Dewitt <i>et al.</i> , 1994
Inibição da secreção de ácido gástrico	Guidobono <i>et al.</i> , 1994
Relaxamento do músculo liso das vias aéreas	Bhogal <i>et al.</i> , 1994
Ação anti-inflamatória	Clementi <i>et al.</i> , 1995
Aumento da contratilidade em cardiócitos	Bell e McDermott, 1995

Estimulação da secreção de aldosterona	Nuttall <i>et al.</i> , 1995
Estimulação do crescimento de cardiócitos	Bell <i>et al.</i> , 1995
Inibição da liberação de hormônio de crescimento	Netti <i>et al.</i> , 1995
Inibição do esvaziamento gástrico	Young <i>et al.</i> , 1995
Redução da hiperglicemia pós-prandial	Kolterman <i>et al.</i> , 1995
Redução de frutossamina glicada	Thompson <i>et al.</i> , 1996
Redução de potássio plasmático	Young <i>et al.</i> , 1996
Aumento de receptores tiazídicos renal	Blakely <i>et al.</i> , 1997
Aumento na reabsorção de sódio tubular	Harris <i>et al.</i> , 1997
Inibição da gastrite induzida por etanol	Jodka <i>et al.</i> , 1997
Inibição da gastrite induzida por indometacina	Guidobono <i>et al.</i> , 1997
Inibição da secreção de glucagon estimulada por arginina	Gedulin <i>et al.</i> , 1997
Aumento da natriurese	Vine <i>et al.</i> , 1998
Aumento no volume de urina	Vine <i>et al.</i> , 1998
Fator de crescimento no rim	Wookey <i>et al.</i> , 1998
Inibição da liberação de dopamina hipotalâmica	Brunetti <i>et al.</i> , 2002
Inibição da secreção gástrica mediada por histamina	Zaki <i>et al.</i> , 2002
Escoamento do humor aquoso	Alajuuma <i>et al.</i> , 2003
Estimulação da contração atrial	Piao <i>et al.</i> , 2004
Inibição da secreção de peptídeo natriurético	Piao <i>et al.</i> , 2004
Inibidor seletivo da reabsorção óssea	Dacquin <i>et al.</i> , 2004
Redução de flutuações de glicose	Kovatchev <i>et al.</i> , 2004

1.4.3. Uso terapêutico da Amilina

Sendo a amilina um hormônio com ação sobre a glicemia o seu emprego com fins terapêuticos foi proposto juntamente com a sua descoberta. Todavia, o uso da amilina como biofármaco foi dificultado devido a sua baixa solubilidade e tendência a

formar agregados amilóides em meios aquosos. O amlintide, um análogo sintético da amilina, foi o primeiro protótipo a ser produzido. Contudo, o amlintide também formava agregados amilóides, assim como a amilina e por tanto era impróprio para aplicações terapêuticas (USAN council. List No.392, 1997; LOPES, 2004). Diversos análogos de amilina foram produzidos e testados até que se concluísse que as substituições por prolinas nas regiões 25, 28 e 29 são determinantes para a estabilidade de peptídeo (JANES *et al.* 1996).

O melhor entendimento acerca da estabilidade da amilina e seus análogos possibilitou que se chegasse à seqüência de aminoácidos que constitui o biofármaco pramlintide (Fig. 8) (KOLTERMAN *et al.*, 1995), o qual foi originalmente denominado por AC137. Os estudos clínicos mostraram que nos grupos de pacientes que fizeram uso do pramlintide (administrada juntamente com insulina) houve um melhor controle glicêmico (evidenciado pela redução nos níveis de hemoglobina A glicada - HbA1c) e estes pacientes também apresentaram menor ganho de peso, quando comparados com o grupo que recebeu apenas insulina (HAYDEN e TYAGI, 2001). Os testes clínicos também revelaram que o pramlintide, em combinação com insulina, foi capaz de reduzir a glicemia pós-prandial pela menor ingestão de alimentos (efeito anorexígeno via SNC), pela redução na taxa de esvaziamento gástrico e inibição da secreção de glucagon (KLEPPINGER e VIVIAN, 2003). Em resumo, os principais resultados encontrados foram: perda de peso e apetite, (HOLLANDER *et al.* 2004; ARONNE *et al.*, 2007) melhor controle glicêmico (HAYDEN e TYAGI, 2001), e diminuição das doses de insulina necessárias a manutenção adequada da glicemina (HOLLANDER *et al.* 2004; YOUNG, 2005)

Amilina humana:	KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAI LSSTNVGSNTY-(NH ₂)
Amilina de rato:	KCNTATCATQRLANFLV R SSNFG PVLPPT NVGSNTY-(NH ₂)
Pramlintide:	KCNTATCAT N RLANFLVHSSNFG PI LPPT NVGSNTY-(NH ₂)

Figura 8 - Seqüências de aminoácidos da amilina humana, amilina de rato e pramlintide.

A inexistência de formulações capazes de evitar a agregação da amilina criou a necessidade de se desenvolver um biofármaco mais estável (pramlintide). Todavia, o pramlintide é um análogo da amilina humana, com quatro aminoácidos diferentes, dos quais três são prolinas (aminoácidos que sabidamente induzem a formação de estruturas secundárias randômicas). Assim, é possível supor que o pramlintide pode apresentar significativas diferenças em respostas metabólicas e imunológicas comparado à amilina endógena e, portanto diversos efeitos adversos. Embora a literatura careça de informações quanto aos efeitos adversos em longo prazo (YOUNG, 2005; SINGH-FRANCO *et al.*, 2007) efeitos adversos como náusea, episódios de vômito e anorexia têm sido frequentemente associado, a terapia com pramlintide (HOLLANDER *et al.*, 2004; YOUNG, 2005; PULLMAN, DARSOW e FRIAS, 2006; SINGH-FRANCO *et al.*, 2007), que pode estar associada às mutações pontuais na seqüência nativa de amilina.

Outra questão a ser considerada quando avaliada a terapia com pramlintide é a taxa de liberação e biodisponibilidade do fármaco. A utilização de pramlintide tem sido associada ao elevado risco de hipoglicemia causada pela insulina, especialmente em pacientes diabéticos tipo I (WHITEHOUSE *et al.*, 2002; HOLLANDER *et al.*, 2004; EDELMAN, 2008). Sendo o pramlintide um peptídeo, sua administração através de injeções subcutâneas é necessária a fim de se evitar a

degradação no trato digestório. A biodisponibilidade das injeções subcutâneas de pramlintide é de 30 a 40% (comparada a biodisponibilidade de aplicações intravenosas) e as posologias usualmente empregadas são de 30 a 120 µg antes das refeições. A concentração plasmática máxima, $C_{m\acute{a}x}$, ocorre aproximadamente 20 minutos após a administração subcutânea (EDELMAN, 2008). A baixa disponibilidade aliada à alta incidência de eventos hipoglicêmicos oriundos da necessidade de uma administração cuidadosa para evitar variações na dosagem, apontam para a necessidade de desenvolvimento de novos sistemas de liberação, que retardem a liberação deste fármaco ou da amilina humana, além de permitir a utilização da seqüência nativa de amilina.

1.4.4. Amilina: estruturas

Atualmente, são conhecidas algumas estruturas em alta resolução de amilina inteira. Muitas outras já eram conhecidas, mas apenas de pequenos fragmentos. Elas foram obtidas recentemente por técnicas como ressonância magnética nuclear e cristalografia (Tabela 7).

Tabela 7 - Estruturas em alta resolução de amilina inteira e análogos.

Estrutura	Técnica	Característica da amostra	Perfil estrutural
hIAPP	RMN	Miscelas de SDS	Uma alfa hélice
hIAPP	Cristalografia	Fusionada a MBP	Uma alfa-helice, dobrada
rIAPP	RMN	Miscelas de DPC	Uma alfa-helice
Pramlintide	RMN	Solução com 6 % HFIP	Huma alfa-helice, dobrada

1.5. Biotecnologia e o Mercado Biofarmacêutico

Economicamente, o marco inicial da biotecnologia ocorreu com a criação da Genentech em 1976 a qual foi a primeira empresa a produzir e comercializar insulina recombinante humana em larga escala em 1982. Três décadas após sua criação este setor da economia ainda apresenta fortes índices de crescimento contando com mais de cinco mil empresas especializadas neste segmento em todo o mundo (NIOSI, 2007).

Este campo da economia tem como principais características a elevada demanda por inovações tecnológicas e necessidade de grandes montantes e pesquisa, desenvolvimento e qualificação profissional (WASH, 2006; NATURE GRUOP, 1994). Os dados de crescimento deste setor apontam para o fato de que embora este seja um investimento de risco moderado a elevado, o mesmo apresenta uma acentuada rentabilidade se comparado com setores mais conservadores da economia (WASH, 2006).

A análise da distribuição geográfica das empresas de biotecnologia revela que a maioria destas têm suas matrizes sediadas nos países desenvolvidos (Europa, Japão, EUA e Canadá) que também foram os pioneiros neste setor (Tabela 8). Contudo, tem-se observado um forte crescimento deste segmento nos países em desenvolvimento, neste contexto Brasil, China e Índia lideram este processo (Tabela 9) (NIOSI, 2007). Infelizmente o crescimento do Brasil neste setor não é maior porque os investimentos públicos em pesquisa e desenvolvimento são

voltados principalmente para pesquisas de base, o que gera um grande número de artigos publicados, mas poucas patentes. Outro diferencial brasileiro é o fato de que os professores das universidades públicas, que são os principais centros de pesquisa e desenvolvimentos (P&D), serem impedidos de ocuparem cargos em empresas privadas o que diminui drasticamente a cooperação entre estes (FERRER *et al.*, 2004 *apud*. NIOSI, 2007).

Tabela 8 - Distribuição das firmas de biotecnologia (adaptado de NIOSI, 2007).

País	N° de firmas (2002-03)	N° de firmas (1997-99)
EUA	1457	1273
Canadá	391	358
Japão	387	394
Alemanha	360	279
Reino Unido	331	275
França	239	380
Outros países do leste europeu	749	713
Total de firmas em países desenvolvidos	4268	3513
Países em desenvolvimento	> 1000	< 1000
Total	~5200	~4500

Tabela 9 - Números de firmas de biotecnologia nos principais países em desenvolvimento (adaptado de NIOSI, 2007).

País	N° de firmas
Brasil	150
China (incluindo Hong Kong)	136
Índia	96
Argentina	35
Chile	31
México	27

Uma das mais importantes fatias do mercado de biotecnológicos é a parte voltada para o setor biofarmacêutico, ou mercado biofarmacêutico, que vem ocupando cada vez mais destaque na economia mundial. Estima-se que a venda de biomedicamentos tenha sido de 33 bilhões de dólares em 2004 com perspectivas de crescimento para 77 bilhões em 2010 (Fig. 9) (PAVLOU e REICHERT 2005; PARMAR, 2006; WASH, 2006). De fato, os biomedicamentos têm-se mostrado *blockbusters*¹ da indústria farmacêutica sendo que mesmo a Insulina (primeiro biofármaco) ainda apresenta um faturamento esperado de U\$ 7,9 bilhões em 2007 (WASH, 2006). Conforme exposto anteriormente o Brasil é o maior comprador de insulina e também um grande mercado para os demais biomedicamentos, e, portanto, conclui-se que o desenvolvimento de novas tecnologias neste setor é de grande importância para se garantir a autonomia nacional no que se refere a biofármacos e biomedicamentos.

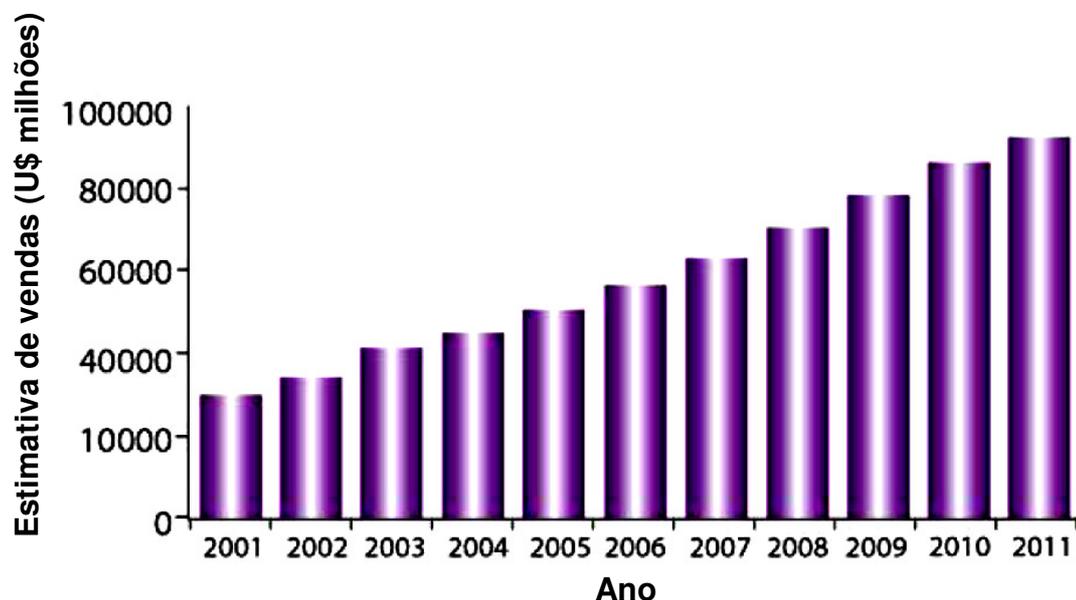


Figura 9 - Vendas globais de biofármacos (adaptado de Parmar, 2006).

¹ Medicamentos *Blockbusters* – são medicamentos que no seu primeiro ano de lançamento têm faturamento bruto maior que um bilhão de dólares

1.6. Sistemas Nano e Microencapsulados

A busca constante por melhorias na eficácia e segurança dos medicamentos é a força motriz das ciências farmacêuticas, sendo o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada uma das abordagens empregadas para este fim. Estes sistemas têm o objetivo de prolongarem o tempo de permanência dos fármacos, em suas faixas terapêuticas, no organismo. Estes sistemas aumentam a segurança dos medicamentos, pois o risco de superdosagens é reduzido, e melhoram a eficácia tanto por melhorar a adesão dos pacientes ao tratamento (que não têm que tomar múltiplas doses dos medicamentos) quanto por reduzir as chances de subdosagens (Fig. 10) (LINCE, MARCHISIO e BARRESI, 2008).

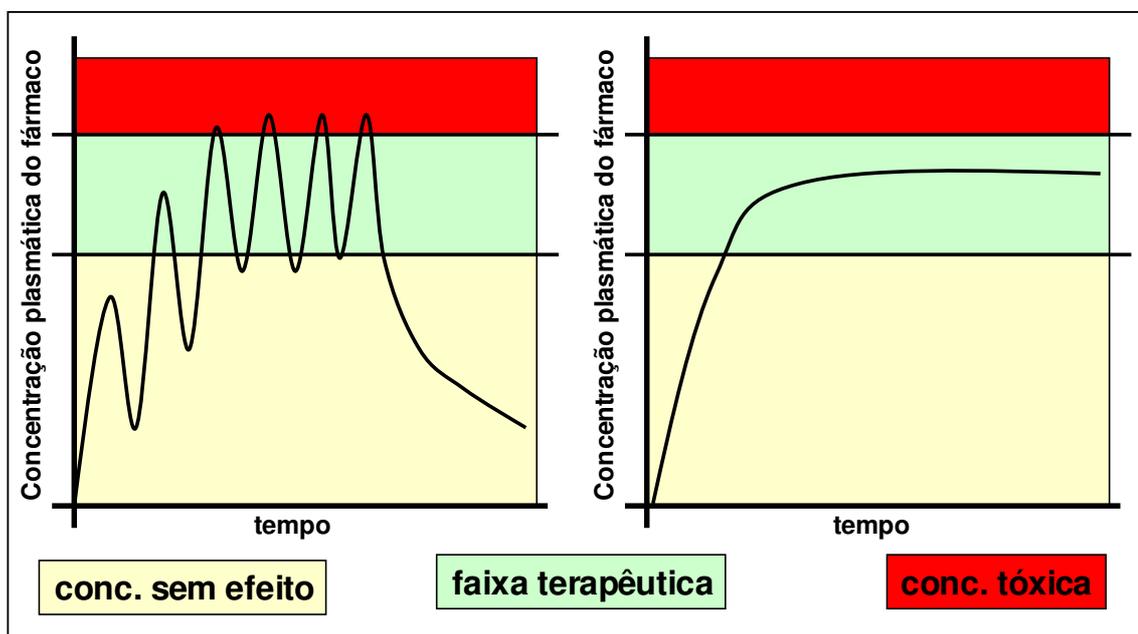


Figura 10 - Perfis hipotéticos de concentrações plasmáticas de fármacos. Medicamento convencional a esquerda e medicamento com sistema de liberação sustentada a direita.

Existe um grande número de procedimentos para o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada, contudo nem todos os métodos são aplicáveis aos biofármacos devido a sua grande labilidade. Dentre os principais métodos

empregados em biotecnologia farmacêutica destacam-se: a nano e microencapsulação em matrizes sólidas ou líquidas, a derivatização com polímeros como polietilenoglicol, o uso de géis biocompatíveis como Pluronic F27 ou a associação de duas ou mais destas técnicas (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA, AMINABHAVI, 2004; KOO, RUBINSTEIN, ONYUKSEL, 2005; . VERONESE 2000, FONTANA *et al.* 2008; MUNDARGI *et al.* 2008; ALMEIDA e SOUTO 2007)

Mesmo existindo um grande número de trabalhos publicados relatando sistemas de liberação sustentada contendo fármacos ou biofármacos aprisionadas em matrizes sólidas não são muitos os medicamentos comercializados contendo estes sistemas (Tabela 10). Este fato se deve a extrema complexidade que é o processo de desenvolvimento deste tipo de medicamento. Muitos são os fatores que podem inviabilizar esses produtos, dentre os principais fatores estão: toxicidade dos polímeros usados na matriz, baixa eficiência de encapsulação, baixo rendimento do processo, dificuldades de escalonamento, liberação errática do biofármaco, efeito *burst*, perda da estabilidade e/ou atividade do biofármaco, etc. A insulina tem sido foco de estudo de diversos trabalhos visando o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada para este biofármaco, todavia, a maioria destes sistemas apresenta discrepâncias entre os perfis de liberação *in vitro* (que levam dias a semanas para chegarem ao fim) e os efeitos farmacológicos (que geralmente são inferiores a 12h) (Figs. 11, 12 e 13).

Tabela 10 - Produtos comercializados contendo sistemas de liberação sustentada com base em fármacos aprisionados em matrizes poliméricas sólidas (adaptado de Mundargl et al.2008).

Nome do produto	Princípio ativo	Empresa	Aplicação
Lupron Depot®	Acetato de Leuprolida	TAP	Câncer de próstata
Nutropin Depot®	Hormônio do crescimento	Genetech	Deficiência infantil de GH
Suprecur® MP	Acetato de Buserelina	Aventis	Câncer de próstata
Decapeptyl®	Pamoato de Triptorelina	Ferring	Câncer de próstata
Sandostatin LAR® Depot	Acetato de Octreotida	Novartis	Acromegalia
Somatuline® LA	Lanreotida	Ipsen	Acromegalia
Trelstar™ Depot	Pamoato Triptorelina	Pfizer	Câncer de próstata
Arestin®	Minociclina	Orapharma	Doenças periodontais
Risperidal® Consta™	Risperidona	J. & Johnson	Antipsicótico

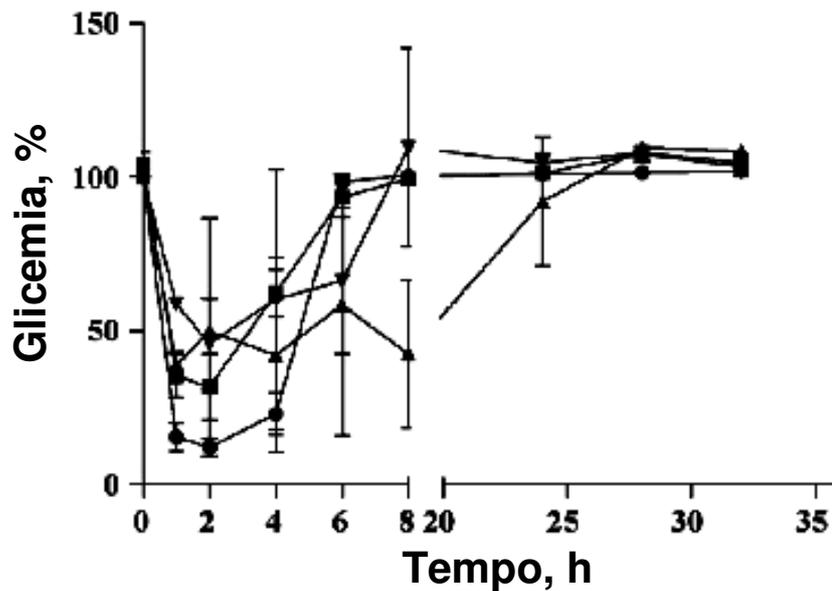


Figura 11 - Liberação *in vivo* de preparações de insulina encapsulada em PCL derivatizado com PEG (RASTOGI *et al.*, 2009). Efeito hipoglicemiante por até 8h.

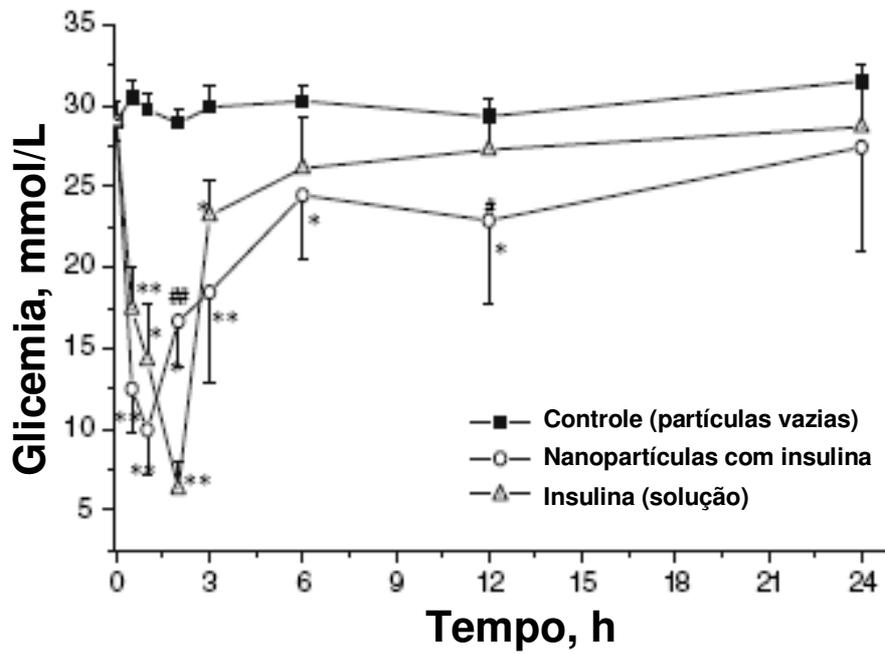


Figura 12 - Liberação in vivo de preparações de insulina encapsulada em PLGA e PVA 5% (LIU *et al.*, 2007). Efeito hipoglicemiante por até 12h.

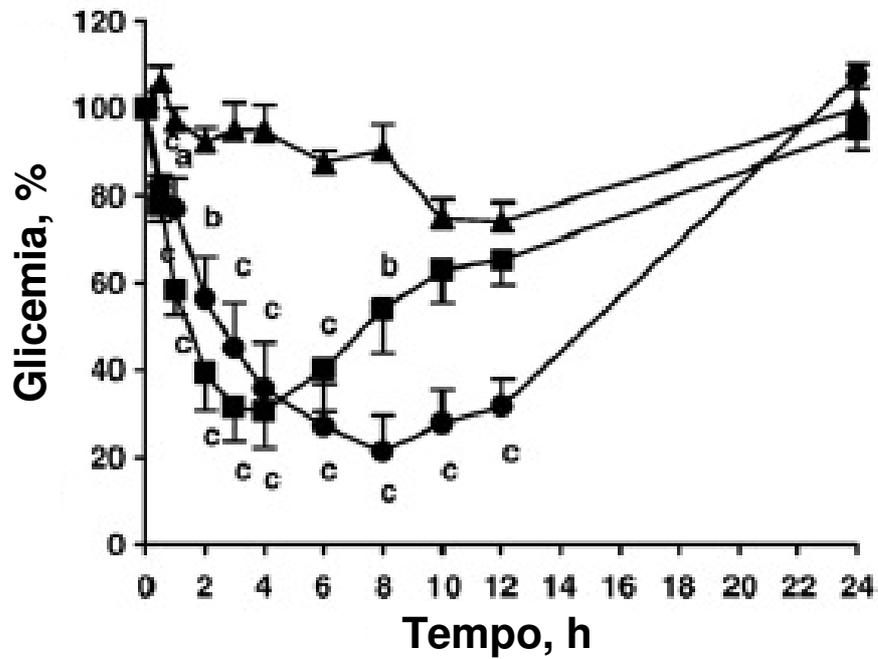


Figura 13 - Liberação in vivo de preparações de insulina encapsulada em PCL e Eudragit 1:1 (LIU DAMGE, MAINCENT, UBRICH, 2006). Triângulos tampão, quadrados insulina comercial e círculos preparação de insulina encapsulada. Efeito hipoglicemiante por até 12h.

Nesta dissertação foram desenvolvidas formulações nano e microencapsuladas usando poli- ϵ -caprolactona (PCL) como matriz para o aprisionamento dos biofármacos estudados. O PCL foi o polímero de escolha por ser um material de baixo custo, biocompatível, biodegradável e este tem sido usado em diversas formulações, tendo-se mostrado adequado para este tipo de sistema (SINHA et al., 2004; LAMPRECHT et al., 1999; BENOIT, BARAS e GILLARD 1999; WANG et al. 2007; ZHAO et al. 2007; DAMGÉ, MAINCENT e UBRICH 2007). Os métodos modificados de dupla emulsificação e emulsificação simples seguidas por extração dos solventes foram usados para a produção de micropartículas contendo insulina e nanopartículas contendo amilina respectivamente.

2. OBJETIVOS

O desenvolvimento de um biomedicamento é um processo altamente complexo que demanda a integração entre diversos campos do conhecimento. A nanotecnologia e a engenharia de materiais são ferramentas úteis no desenvolvimento de medicamentos com maior eficácia e segurança. O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento inicial de sistemas de liberação sustentada para dois biofármacos, insulina e amilina, usados no tratamento do Diabetes Mellitus.

A avaliação e caracterização dos sistemas desenvolvidos nesta dissertação constituem os objetivos específicos deste trabalho, dentre tais objetivos destacam-se:

- Desenvolvimento de metodologias analíticas para a análise quantitativa dos biofármacos para aplicação no presente trabalho;
- Desenvolvimento de formulações baseadas em sistemas de liberação controlada para os dois biofármacos;
- Avaliação do rendimento dos processos de produção das formulações particuladas;
- Avaliação da eficiência dos processos de encapsulação dos biofármacos nas partículas;
- Caracterização morfológica das preparações particuladas;
- Caracterização dos perfil de liberação *in vitro* dos biofármacos;

- Avaliação farmacológica *in vivo* dos efeitos dos biofármacos liberados empregando-se as formulações particuladas aqui desenvolvidas e caracterizadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

REAGENTES

- Álcool Polivinílico 87-89% hidrolizado (PVA): Fabricante Sigma-Aldrich, número de catálogo 363073-1KG, lote 13212DE, com massa molecular de aproximadamente 31a 50 KDa.
- Amilina humana selvagem: Fabricante GenScript, número de catálogo RP11278, lote 51317-2.
- Diclorometano (DCM): Fabricante TEDIA, número de catálogo DS1432-001, lote 806068.
- Humulin ®: Fabricante ELI LILLY Y COMPAÑÍA, lote A405936.
- Poli-ε-caprolactona (PCL): Fabricante Sigma-Aldrich, número de catálogo 181609-250G, lote 11108LE, com massa molecular de aproximadamente 65 kDa.
- Trifluoretanol (TFE): Fabricante Fluka Analytical, número de catálogo 91690-500mL, lote 40808269.

EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético: Fabricante IKA, modelo C-MAG HS 7.
- Analisadores de Partículas: 1 - Fabricante Shimadzu, modelo SALD-2201 (usado para analisar as micropartículas contendo insulina); 2 - Fabricante Brookhaven

Instruments Corporation, modelo ZetaPlus Zeta Potential Analyzer (usado para analisar as nanopartículas contendo insulina).

- Centrífuga: Fabricante Eppendorf, modelo 5804R, rotor F45-30-11.
- Espectrofotômetro: Fabricante Shimadzu, modelo UV-1601.
- Fluorímetros: Fabricante Jasco, modelo FP-6300.
- Glicosímetro: Fabricante Roche, modelo Accu-Chek Active.
- Liofilizador: Fabricante Liotop, modelo L101.
- Microscópio Eletrônico de Transmissão: Fabricante FEI, modelo Morgagni 268.
- Sonicador: Fabricante Hielscher, modelo UP100H, ponteira MS1.
- Ultraturrax: Fabricante IKA, modelo T10, ponteira S10N-5G.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação das nanopartículas contendo amilina

A metodologia empregada na produção destas nanopartículas trata-se de uma adaptação do método de emulsificação simples seguida por extração do solvente (BLANCO e ALONSO 1997; PÉREZ *et al.*, 2000). A fase orgânica (F.O.) da nanoemulsão foi obtida usando-se 200 µg de amilina humana dissolvida em 400 µL de Trifluoroetanol (TFE) e 20,0 mg de PCL dissolvidos em 600 µL de diclorometano (DCM). Todos estes componentes foram misturados em um mesmo microtubo de 1,5 mL, resultando em uma solução homogênea. A seguir, com o auxílio de um sonicador (Hielscher, modelo UP100H, ponteira MS1) foi feita a nanoemulsão contendo a F.O. (já descrita) e 5,0 mL de solução aquosa de PVA 1,5% (fase

aquosa – F.A.) por 5 minutos com o sonificador ajustado em 70% da potência e ciclo igual a 1 (durante todo o processo o sistema foi mantido sob resfriamento em banho de gelo). Os solventes orgânicos da nanoemulsão foram retirados do sistema empregando-se vácuo (aproximadamente 60 mmHg ou -700 mmHg em relação à pressão atmosférica) por 40 minutos sob resfriamento, o que levou à formação de uma nanosuspensão. A suspensão de nanopartículas foi centrifugada (4.000 g por 15 minutos), lavada três vezes com PVA 1,5% e liofilizada para conservação ou usada imediatamente nos ensaios de liberação. O rendimento do processo foi calculado com base na massa recuperada após a liofilização, e a eficiência de encapsulação foi obtida através da dosagem de amilina nos sobrenadantes após as lavagens. Um esquema geral para este tipo de formulação é apresentado na Fig. 14.

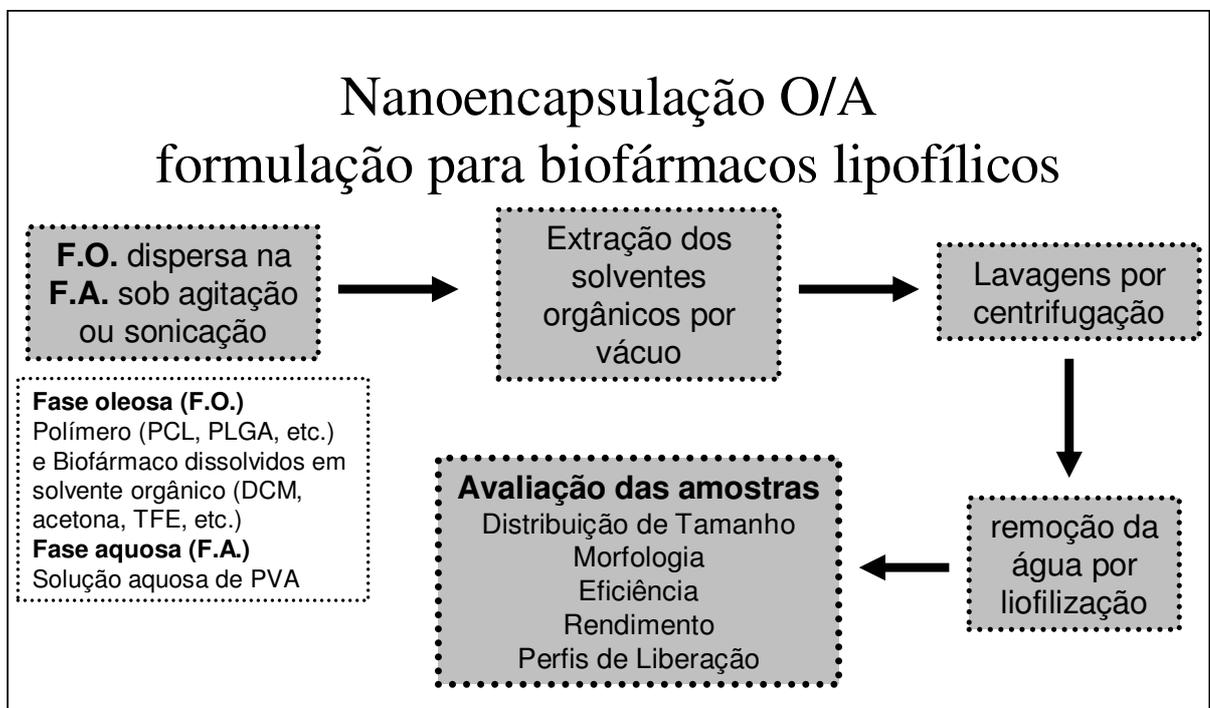


Figura 14 - Esquema geral para produção de nanopartículas contendo biofármacos lipofílicos pelo método de emulsão com extração do solvente (adaptados das metodologias propostas por BLANCO e ALONSO 1997; PÉREZ *et al.*, 2000).

3.2.2. Preparação das micropartículas contendo insulina

O ensaio escolhido foi modificado a partir do método de emulsificação e evaporação do solvente (LAMPRECHT *et al.* 1999; DAMGÉ, MAINCENT e UBRICH 2006; LUI *et al.* 2007). Primeiramente, 400 µL de Humulin e 100 µL de PVA 5% (fase aquosa interna – F.A.i.) foram homogeneizados com 100 mg de PCL dissolvidos em 5 mL de DCM (F.O.), usando um ultra-turrax T10 com ponteira S10N-5G a 20.500 rpm, formando a emulsão primária A/O. A seguir, esta emulsão A/O foi gotejada sobre 25 mL de PVA 1,5% sob agitação magnética formando a microemulsão A/O/A. Esta microemulsão foi então submetida a vácuo (aproximadamente 60 mmHg) para a extração do DCM. A suspensão de micropartículas foi centrifugada (4.000 g por 10 minutos a 4 °C), lavada três vezes com PVA 1,5 % e liofilizada para conservação, ou usada imediatamente nos ensaios de liberação. O rendimento de processo foi calculado com base na massa recuperada após a liofilização e a eficiência de encapsulação obtida através da dosagem de insulina nos sobrenadantes após as lavagens. Um esquema geral para este tipo de formulação é apresentados na Fig. 15.

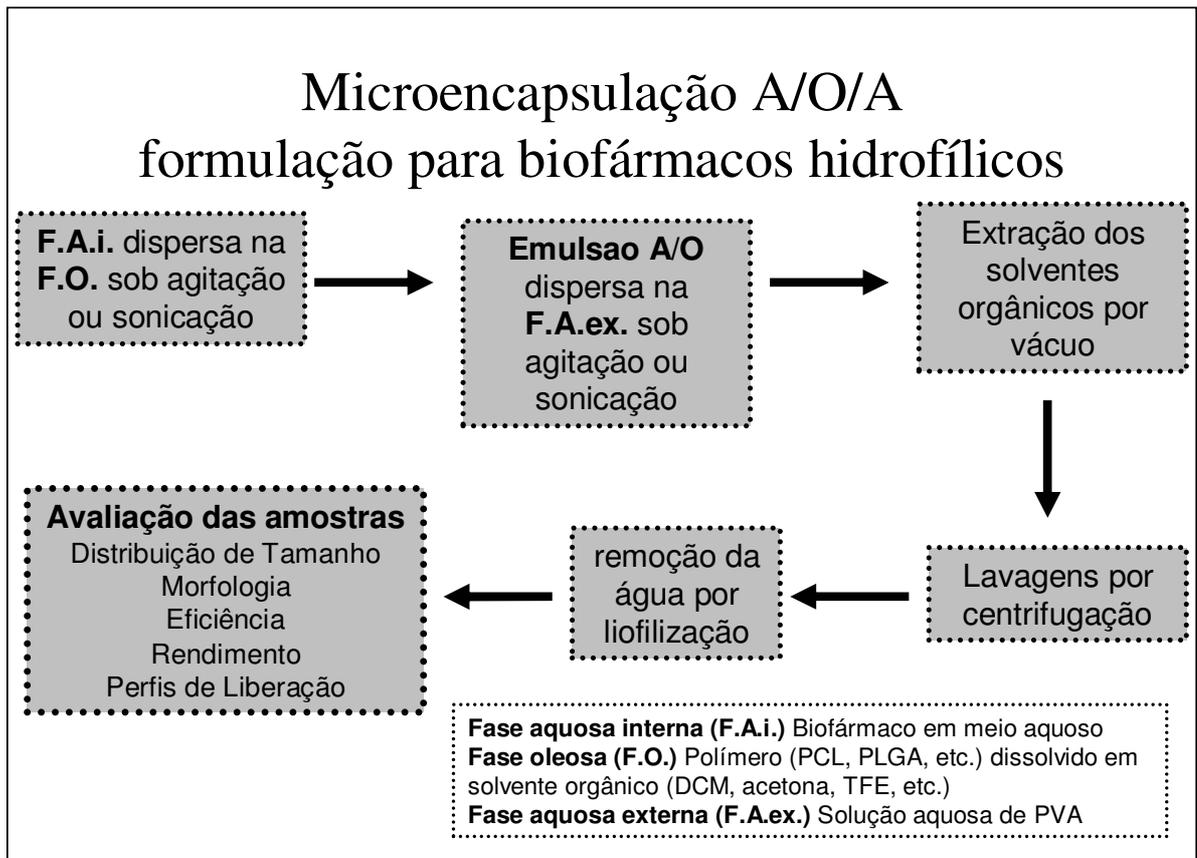


Figura 15 - Esquema geral para a produção de micropartículas contendo biofármacos hidrofílicos pelo método de dupla-emulsão com extração do solvente (adaptados das metodologias propostas por LAMPRECHT *et al.* 1999; DAMGÉ, MAINCENT e UBRICH 2006; LUI *et al.* 2007).

3.2.3. Dosagem de amilina por espectrofluorimetria – Fluorescamina

Foram testados dois métodos de quantificação para o peptídeo. Inicialmente o peptídeo foi dosado por fluorimetria usando a emissão da tirosina presente na cadeia deste, contudo tal método apresentou interferência com componentes da formulação, e por isso o método de quantificação adotado se baseia na derivatização das aminas primárias de peptídeos com fluorescamina (4'-fenilespiro[2-benzofuran-3,2'-furan]-1,3'-diona, CAS nº 38183-12-9) gerando um produto fluorescente (Fig. 16)(UDENFRIEND *et al.*, 1972). Resumidamente, 200 µL

da solução contendo amilina (a partir da amilina estoque em TFE ou do sobrenadante dos ensaios de liberação de nanopartículas) foram misturados com 200 μL do derivatizante (0,5 mg/ml de fluorescamina em DMSO) e após homogeneizar a amostra, usando um agitador, a mesma foi analisada em um fluorímetro (Jasco FP6300) com os seguintes parâmetro: modo espectro de emissão, fenda de excitação com 5 nm, fenda de emissão com 5 nm, resposta média, sensibilidade alta, velocidade e aquisição dos dados igual a 200 nm/min, resolução igual a 0,5 nm, excitação em 390 nm e emissão de 380 a 550 nm. A curva de calibração da amilina no tampão usado na liberação (PBS pH 7,4, azida 0,02 % e polissorbato-80 0,1 %) foi realizada para se verificar a adequação do método às concentrações esperadas durante os experimentos de liberação e para se obter a linearidade do método (equação originada da regressão linear e seu coeficiente de correlação linear). A especificidade desta metodologia foi verificada usando amostras contendo todos os componentes da formulação menos o peptídeo.

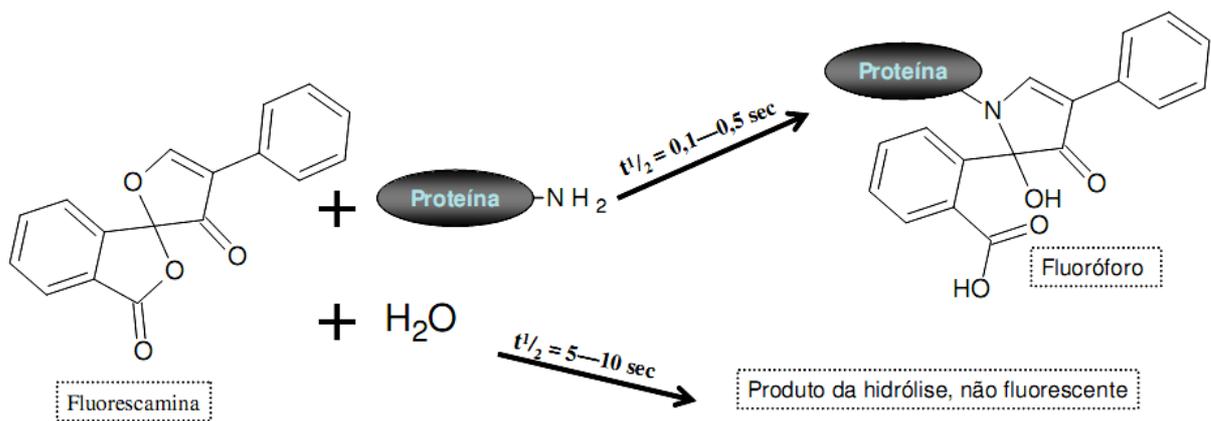


Figura 16 - Esquema para reação entre fluorescaminae aminas primárias de proteínas (N-terminal ou de cadeias laterais) gerando compostos fluorescentes. O excesso de fluorescaminaé hidrolisado resultando em um produto não fluorescente (adaptado de UDENFRIEND *et al.*, 1972).

3.2.4. Dosagem de insulina por espectrofotometria - Bradford

As amostras contendo insulina foram quantificadas pelo método de Bradford modificado (BRADFORD, 1976), o qual é largamente utilizado na quantificação de peptídeos e proteínas. Para a quantificação da insulina presente, 500 µL de cada amostra foi misturado com 500 µL do reagente de Bradford duas vezes concentrado (200 mg de Coomassie G-250, 100 mL de etanol 95 %, 200 mL de H₃PO₄ 85 % e água ultrapura q.s.p. 1 L) e após homogeneizar as amostras, usando um vórtex, as absorbâncias em 595 nm das mesmas foram aferidas em um espectrofotômetro. A curva de calibração da insulina no tampão usado na liberação (PBS pH 7,4, azida 0,02 % e polissorbatato-80 0,1 %) foi realizada para se verificar a adequação do método às concentrações esperadas durante os experimentos de liberação, e para se obter a linearidade do método. A especificidade desta metodologia foi verificada usando amostras contendo todos os componentes da formulação, a exceção da própria insulina.

3.2.5. Determinação do tamanho por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As suspensões de nanopartículas ou micropartículas foram diluídas em água e mantidas em cubetas de acrílico seladas. Os frascos foram colocados na câmara de análise do equipamento de espalhamento de luz de modo que o feixe de luz laser atravessasse a suspensão em toda sua extensão sem que houvesse efeito de filtro interno. O valor médio do diâmetro, e o índice de polidispersividade foram

fornecidos pelos equipamentos do CBPF (Shimadzu- SALD-2201 e Brookhaven Instruments Corporation - ZetaPlus Zeta Potential Analyzer).

3.2.6. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Usando uma micropipeta, a suspensão de nanopartículas foi espalhada sobre lâminas de vidro e resfriadas em nitrogênio líquido. Após a liofilização, as amostras receberam tratamento (cobertura de ouro) e foram observadas no microscópio eletrônico de varredura no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ.

3.2.7. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras usadas para esta técnica foram preparadas da seguinte forma: cada grade de MET recebeu 5 μL das suspensões de nanopartículas, transcorridos 30 segundos outros 5 μL de solução supersaturada de acetato de uranila (contrastante) foram acrescentados a cada grade e se aguardou mais 30 segundos até que o excesso de líquido pudesse ser retirado usando papel absorvente. As amostras ficaram então duas horas em um dessecador até que pudessem ser visualizadas no microscópio eletrônico de transmissão.

3.2.8. Análise morfológica por microscopia óptica (MO)

As preparações de micropartículas puderam ser visualizadas através de microscopia óptica sem a necessidade de contrastantes ou corantes usando objetivas de 40x e 100x.

3.2.9. Perfil de liberação das nanopartículas com amilina *in vitro*

Após as lavagens, as amostras foram, diluídas em 10 mL do tampão de liberação (PBS pH 7,4 com 0,02 % de NaN_3 e 0,1 % de polissorbato-80). Após a diluição, o material foi dividido entre dez microtubos de 1,5 mL, sendo que cada tubo recebeu 1 mL de amostra e todas foram transferidas para estufa e mantidas a 37°C durante o experimento. A cada intervalo de tempo um microtubo foi retirado da estufa e centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 12°C. A amilina presente nos sobrenadantes foi dosada por espectrofluorimetria conforme mencionado acima no item 3.2.3.

3.2.10. Perfil de liberação das micropartículas com insulina *in vitro*

Após as lavagens, as amostras foram diluídas em 15 mL do tampão de liberação (PBS pH 7,4 e 0,02 % azida). Após a diluição o material foi dividido entre quinze microtubos de 1,5 mL, sendo que cada tubo recebeu 1 mL de amostra, que foram então transferidos para estufa e mantidas a 37°C durante o experimento. A

cada intervalo de tempo um microtubo foi retirado da estufa e centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 12° C. A insulina presente nos sobrenadantes foi dosada pelo método de Bradford previamente descrito.

3.2.11. Perfil farmacológico das nanopartículas com amilina

Camundongos suíços machos com 8 semanas, foram divididos em dois grandes grupos: Controle (n = 6) e Np-hIAPPwt (n = 6). Os animais foram alojados em uma sala de temperatura controlada, com ciclo luz-escuro de 12 h e tiveram livre acesso à água e ração, a qual foi suspensa 12 h antes do início do experimento e que foi disponibilizada novamente após o fim deste. O primeiro grupo (grupo Controle, n=6) recebeu 100 µL da formulação sem amilina (veículo), o segundo grupo (grupo Np-hIAPPwt, n = 6) foi tratado com 100 µL da formulação com amilina nanoencapsulada. A glicemia dos animais foi determinada no tempo zero, através de um glicosímetro (Accu-Chek Active® - Roche), e 100 µL de cada amostra foi injetado por via subcutânea em cada animal. Todos os camundongos estavam em jejum durante o experimento. Depois disso, a concentração de glicose no sangue foi monitorada nos tempos: 6 h, 10 h e 32 h. Este protocolo foi aprovado pela comissão de bioética em experimentação animal do CCS.

3.2.12. Perfil farmacológico das micropartículas com insulina

Camundongos suíços machos com 8 semanas, foram divididos em dois grandes grupos: Controle (n = 4) e Diabético (n = 13). Os animais foram alojados em uma sala de temperatura controlada, com ciclo luz-escuro de 12 h e tiveram livre acesso à água e ração. O Diabetes Tipo 1 foi induzido através de uma injeção intraperitoneal (ip.) de estreptozotocina (STZ, 200 mg/kg) dissolvido em tampão citrato fresco (100 mM, pH 4,5). O grupo Controle recebeu apenas o veículo (0,1 ml). Cinco dias após a administração de STZ, foi coletado o sangue da cauda dos camundongos, e os níveis de glicose foram medidos através de um glicosímetro (Accu-Chek Active - Roche). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 300 mg/dl. Em seguida, o grupo Diabético foi subdividido em três novos grupos. O primeiro grupo (grupo Controle, n=3) recebeu 100 µL da formulação sem insulina, o segundo grupo (grupo Humulin, n = 5) foi tratado com 5 U/kg de insulina comercial e o terceiro grupo (grupo Teste, n = 5) recebeu 100 µL da formulação com insulina microencapsulada. No sexto dia, a glicemia dos animais foi determinada no tempo zero, e 100 µL de cada amostra foi injetado por via subcutânea em cada animal. Todos os camundongos estavam em estado alimentado. A partir de então, a concentração de glicose no sangue foi monitorada nos tempos: 15, 30, 60, 120, 360, 1440 e 2880 minutos. Este protocolo foi aprovado pela comissão de bioética em experimentação animal do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - UFRJ.

4. RESULTADOS NANOPARTÍCULAS CONTENDO AMILINA

4.1. Dosagem de amilina por espectrofluorimetria

O primeiro método empregado para a quantificação de IAPP neste trabalho foi a espectrofluorimetria usando a emissão de fluorescência da tirosina presente na cadeia deste peptídeo. Este método apresentou boa sensibilidade e linearidade (Figs. 18 e 19), contudo mostrou-se pouco seletivo, havendo forte interferência dos componentes da formulação (Fig. 17), por tal, motivo o método usando derivatização com fluorescamina passou a ser usado.

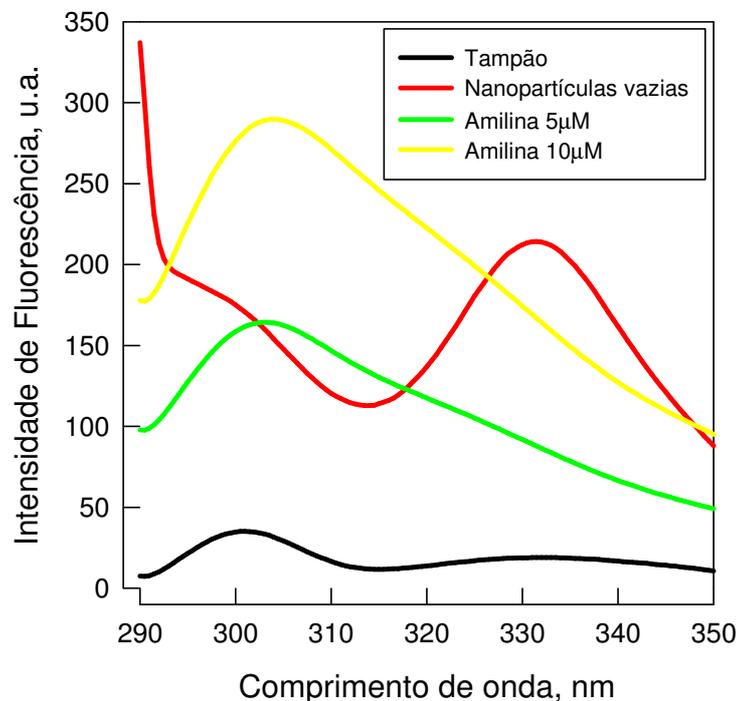


Figura 17 - Espectros de fluorescência de nanopartículas de PCL vazias e amilina humana em diferentes concentrações.

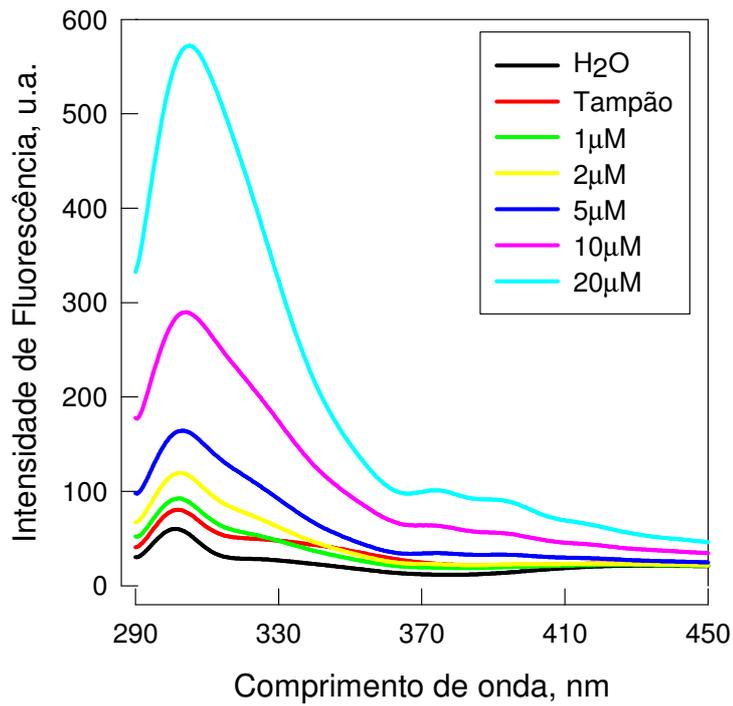


Figura 18 - Espectros de fluorescência da amilina humana em diferentes concentrações, a partir de amilina em solução de TFE. As medidas foram realizadas dissolvendo-se a quantidade desejada de amilina em tampão PBS contendo 0.1 % polisorbato-80 e medido conforme descrito em material e métodos.

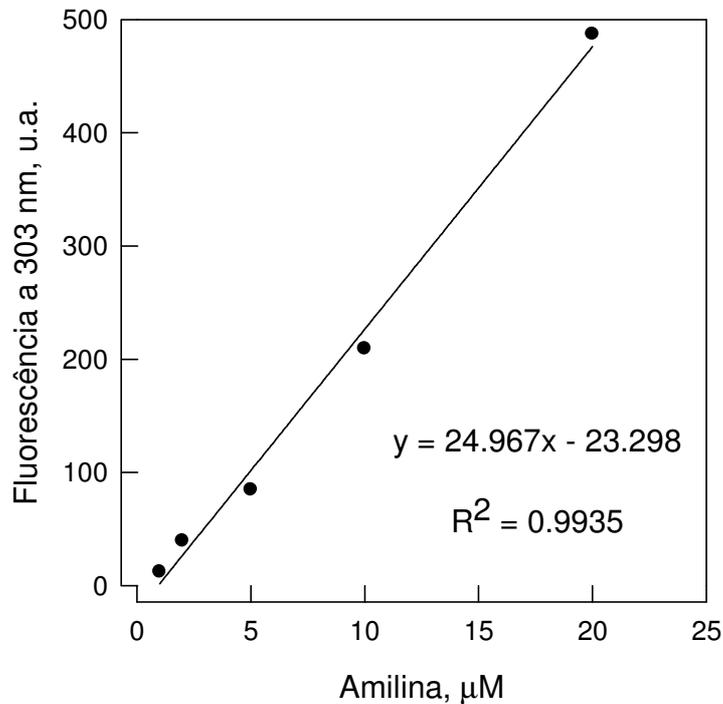


Figura 19 - Dosagem de amilina por espectrofluorimetria usando emissão de tirosina a 303 nm.

O método usando fluorescamina, quando empregado para a detecção e quantificação da amilina apresentou linearidade, expressa pelo valor de $R^2 = 0,999$ na faixa de concentração de 0,1 mg a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figs. 20 e 21). A equação obtida da regressão linear é apresentada a seguir:

$$y = 7.3482x + 6.9113$$

sendo: y = intensidade de fluorescência a 475 nm em u.a.

x = concentração de amilina em $\mu\text{g/mL}$

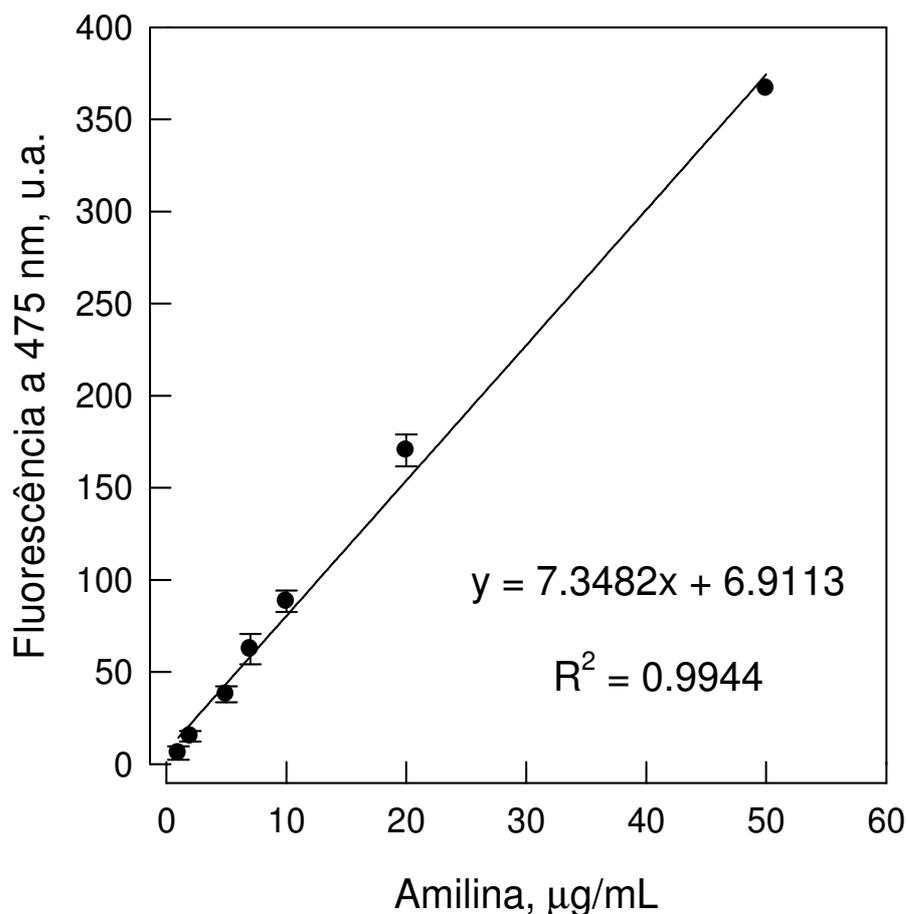


Figura 20 - Dosagem de amilina humana por fluorimetria usando fluorescamina como derivatizante, indicando boa linearidade na faixa de concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$.

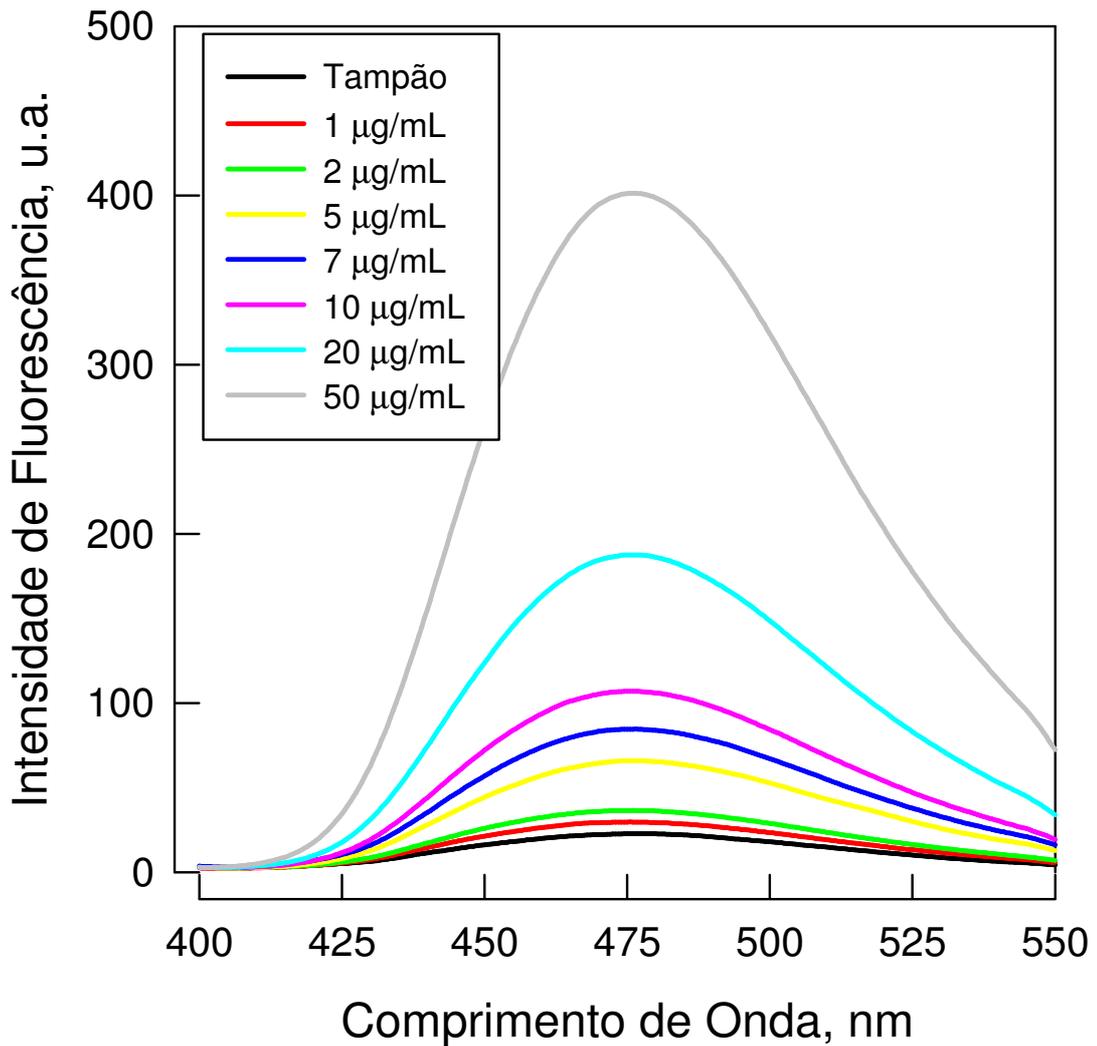


Figura 21 - Espectros representativos de várias concentrações de amilina humana derivatizadas por fluorescamina, indicando que o aumento da concentração de amilina leva ao aumento na intensidade de fluorescência. Detalhes em Material e Métodos.

Este método também apresenta seletividade adequada, uma vez que os componentes da formulação vazia não interferem no sinal obtido (Fig. 22).

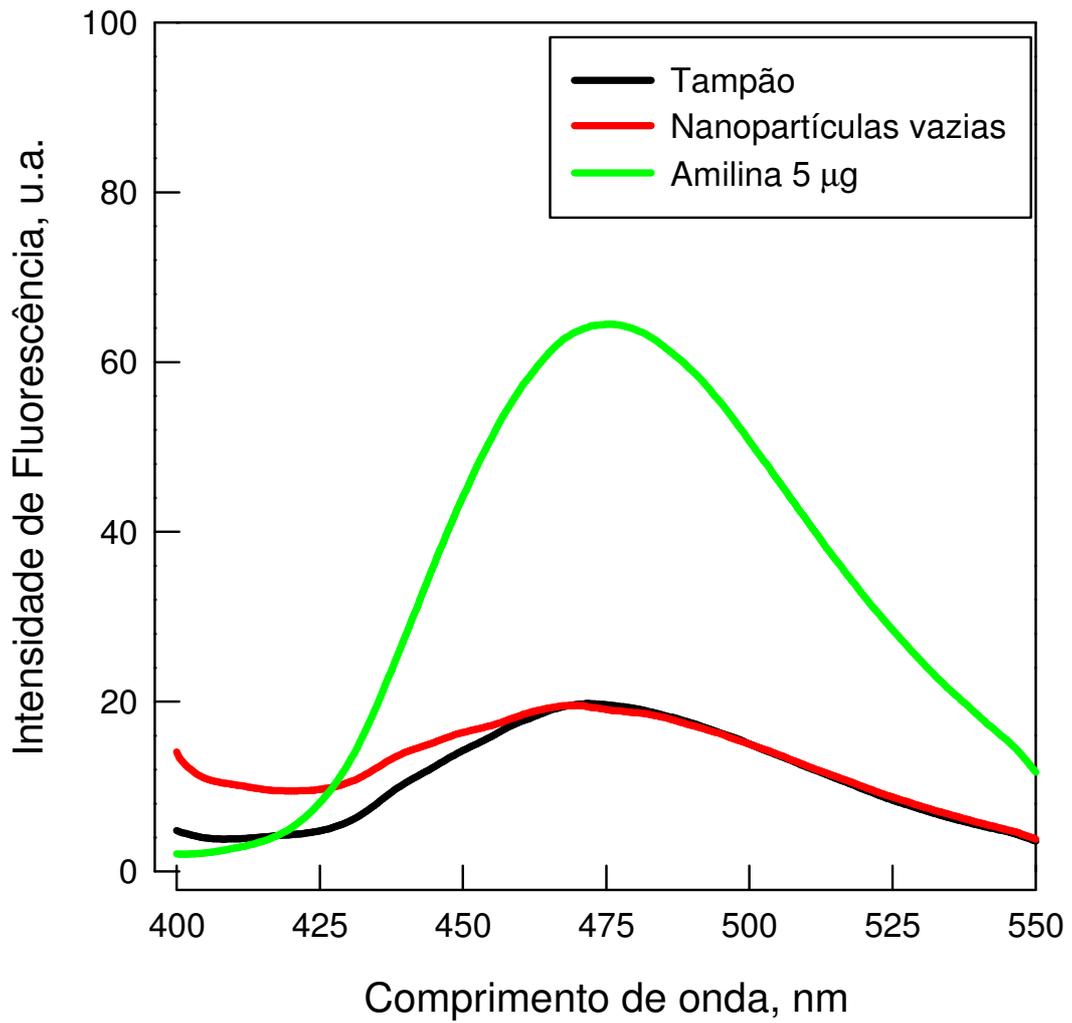


Figura 22 - Espectros de fluorescência de nanopartículas de PCL vazia e amilina humana.

4.2. Eficiência, rendimento e sedimentação

A eficiência calculada a partir dos sobrenadantes das lavagens foi igual a 81,4 %, com desvio padrão igual a 7,6 %. O rendimento foi obtido a partir da pesagem do material após a liofilização sendo este igual a 89.1 % \pm 6.8 %.

A sedimentação das amostras foi acompanhada visualmente durante os experimentos de liberação, onde foi observado que não havia sedimentação perceptível após 24 h. Após 48 h de experimento, foi possível observar a deposição de material, contudo o material não chegou a sedimentar totalmente mesmo após várias semanas (Fig. 23).

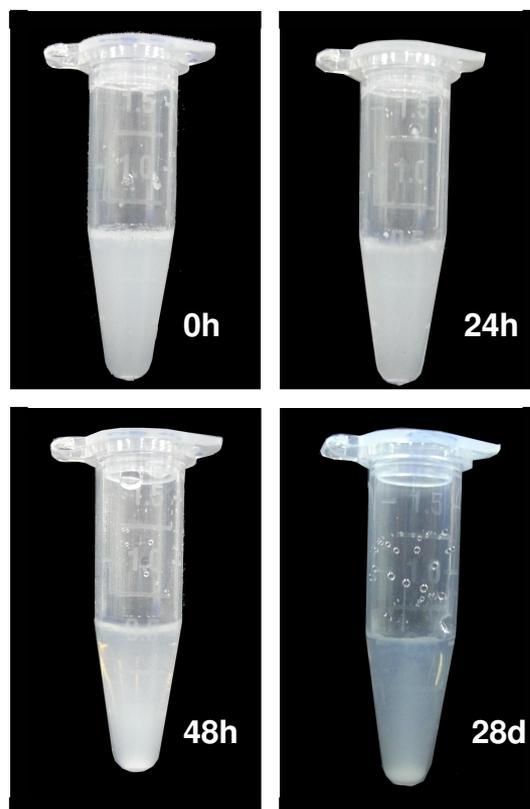


Figura 23 - Fotos de microtubos contendo suspensões de nanopartículas mostrando a sedimentação destas, indicando que mesmo após 28 dias a sedimentação não foi completa. O material foi armazenado a 37°C em PBS contendo 0.1% polisorbato, em repouso.

4.3. Distribuições de tamanhos da nano e micropartículas

Inicialmente foram preparadas micropartículas sem o peptído empregando-se Ultraturrax® como agente emulsificador (Fig.24). As imagens obtidas por microscopia óptica revelaram que as amostras lavadas com água agregavam após as centrifugações, e aquelas lavadas com uma solução de 1,5 % de PVA permaneciam desagregadas. A análise das amostras por espalhamento de luz dinâmica mostrou que as mesmas possuíam valores de diâmetro de 589,2 nm (Fig. 25 e Tabela 11).

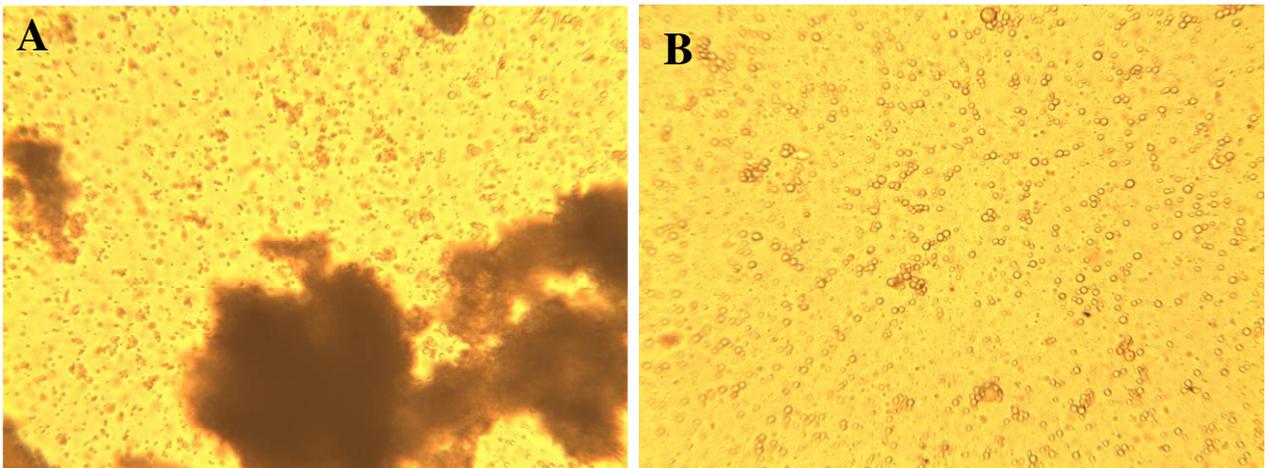


Figura 24 - Imagens de nanopartículas de PCL (aumento de 40x). A – amostras lavadas com água, B – amostras lavadas com solução aquosa de 1,5% de PVA.

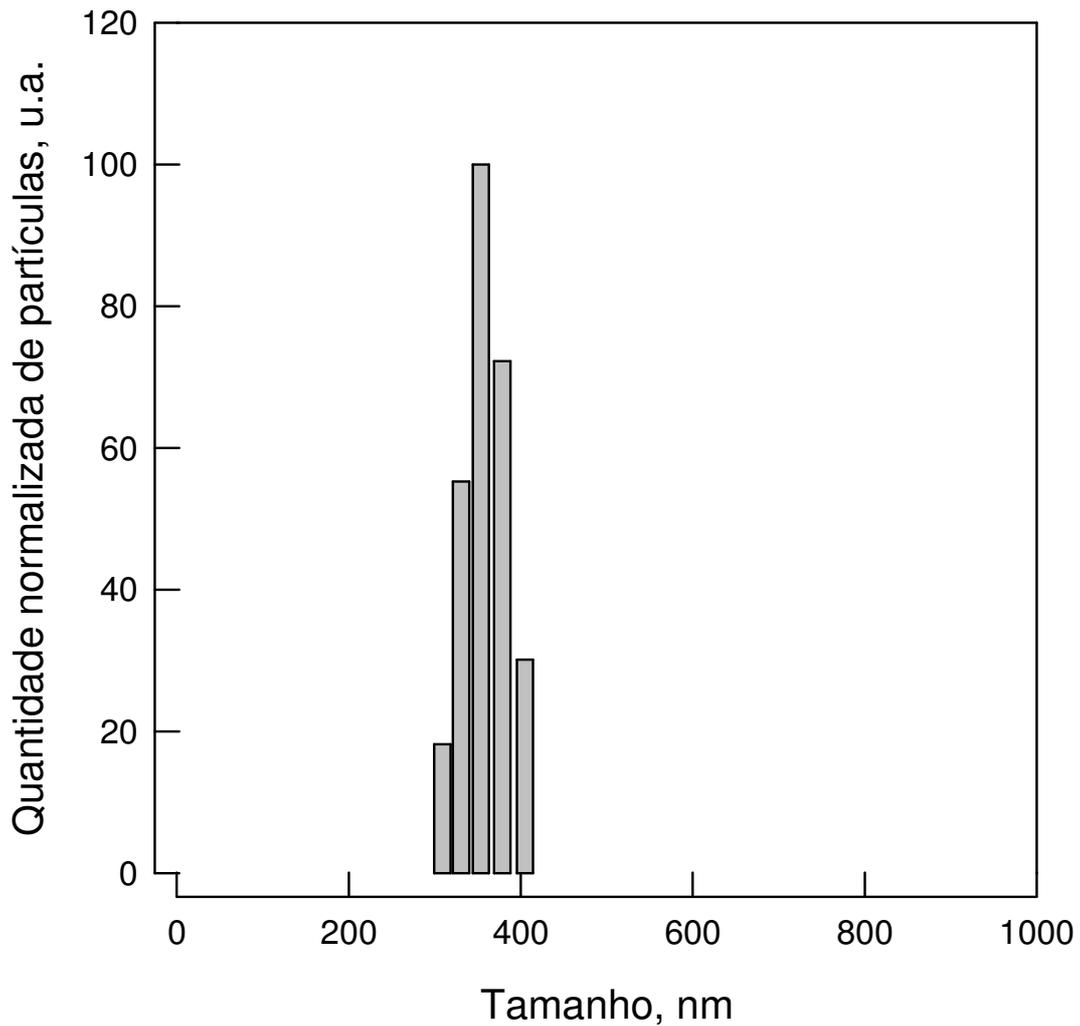


Figura 25 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com Ultra-turrax® (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

Tabela 11 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com Ultra-turrax® (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

	Diâmetro, nm	Polidispersividade
	529,0	0,288
	558,5	0,234
	680,3	0,271
Média	589,2	0,265
Erro padrão	46,3	0,016

A análise mais apurada do resultado obtido por DLS, usando a intensidade de espalhamento em função do diâmetro das partículas, indica a presença de duas populações distintas: a primeira composta por nanopartículas com diâmetros inferiores a 500 nm, e outra mais heterogênea com micropartículas de diâmetros superiores a 1,3 μm (Fig. 26).

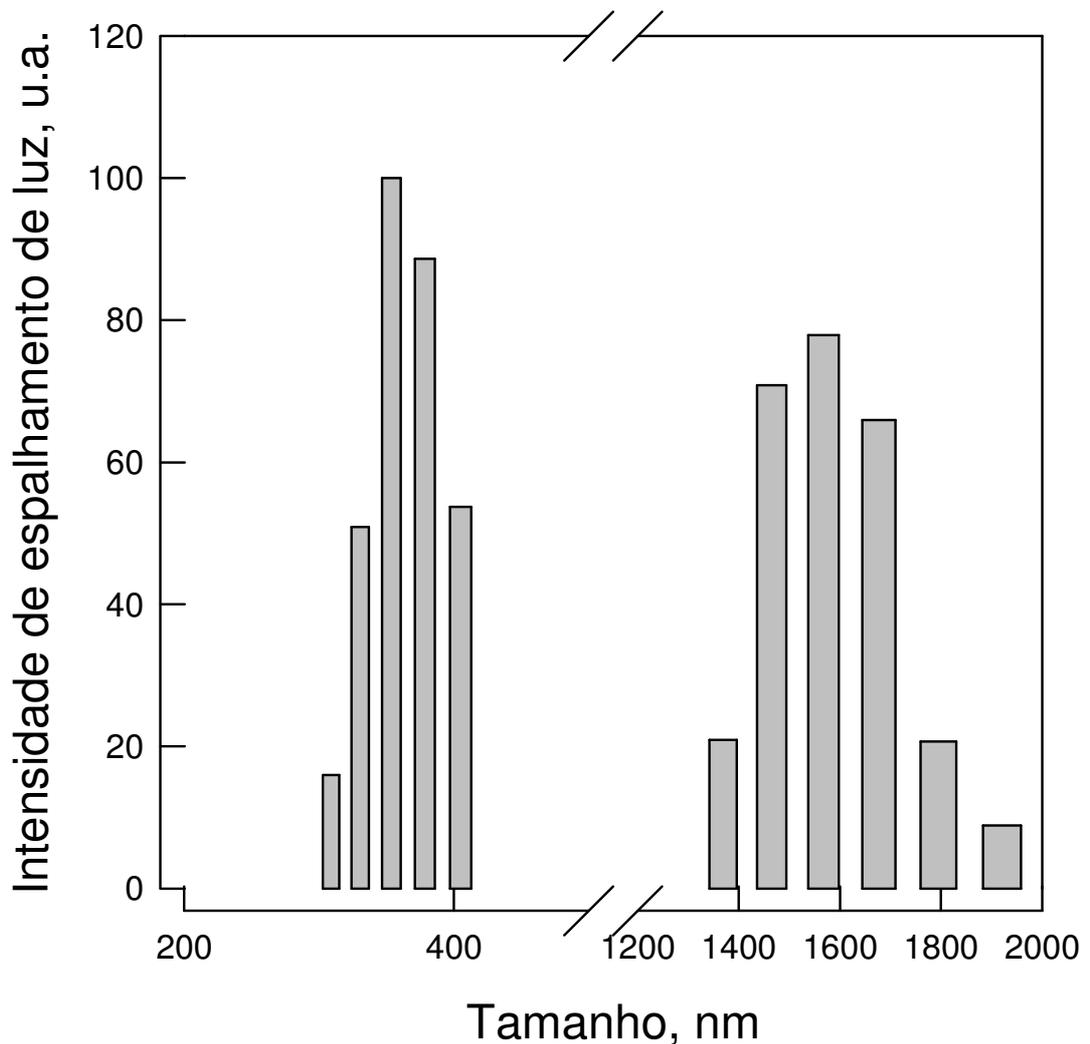


Figura 26 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com Ultra-turrax®, mostrando um perfil bimodal (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

Posteriormente foram preparadas nanopartículas sem o peptídeo empregando-se um sonicador. Estas amostras não puderam ser analisadas por microscopia óptica por apresentarem diâmetros muito pequenos. A análise das amostras por DLS revelou que as mesmas possuíam valores de diâmetro de aproximadamente 278,5 nm e polidispersividade de 0,208 (Fig. 27 e Tabela 12). De posse dos resultados obtidos pelos dois métodos (sonicação e agitação com Ultraturrax®), optou-se por dar prosseguimento aos experimentos empregando-se apenas o método com sonicação.

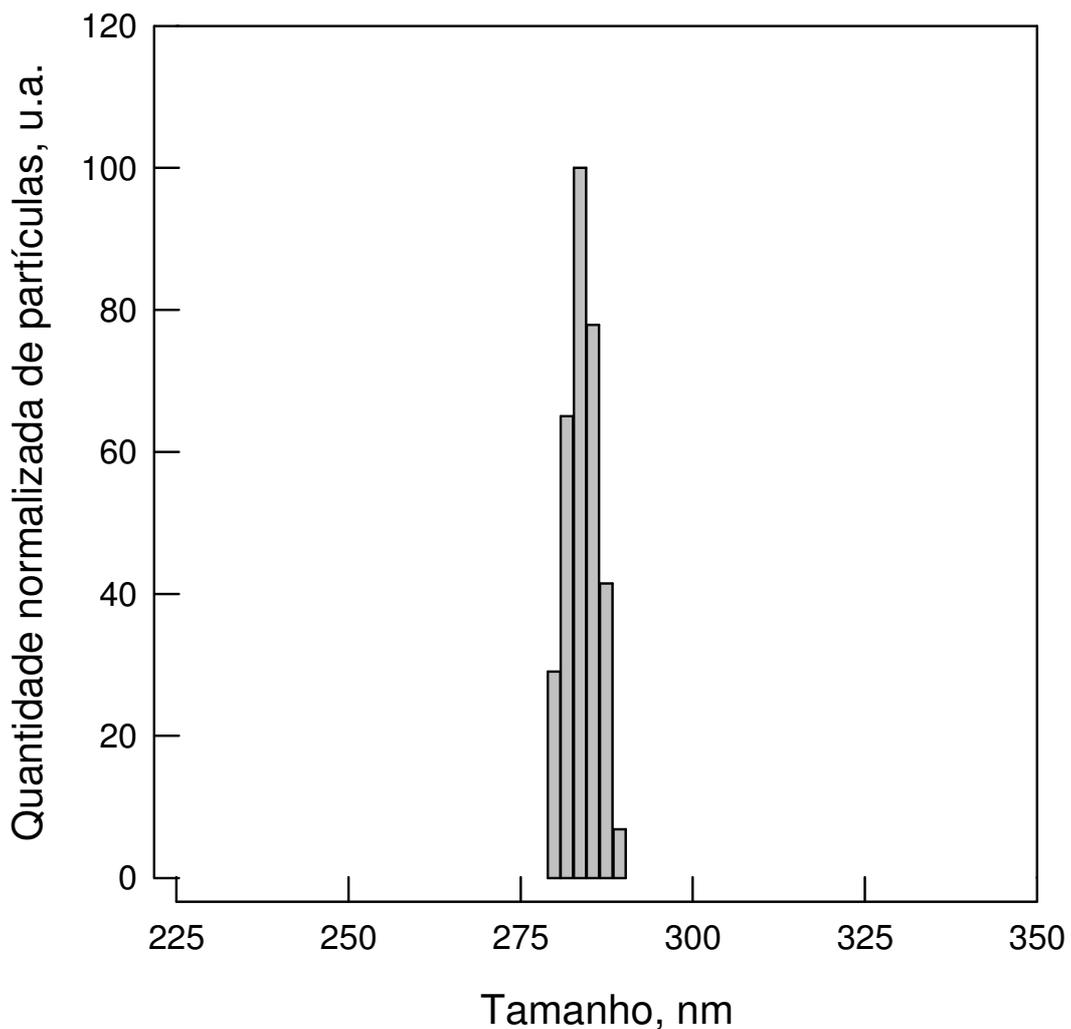


Figura 27 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonicador (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

Tabela 12 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonificador (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

	Diâmetro, nm	Polidispersividade
	295,2	0,236
	219,3	0,237
	321,0	0,150
Média	278,5	0,208
Erro padrão	30,5	0,029

Em um passo subsequente, a Amilina humana (hIAPP) foi empregada na produção das nanopartículas e outra preparação sem o peptídeo também produzida para efeito de comparação entre estas. A amostra contendo Amilina humana (hAIPP) apresentou diâmetro de 153,3 nm e polidispersividade de 0,116 (Fig. 28 e Tabela 13).

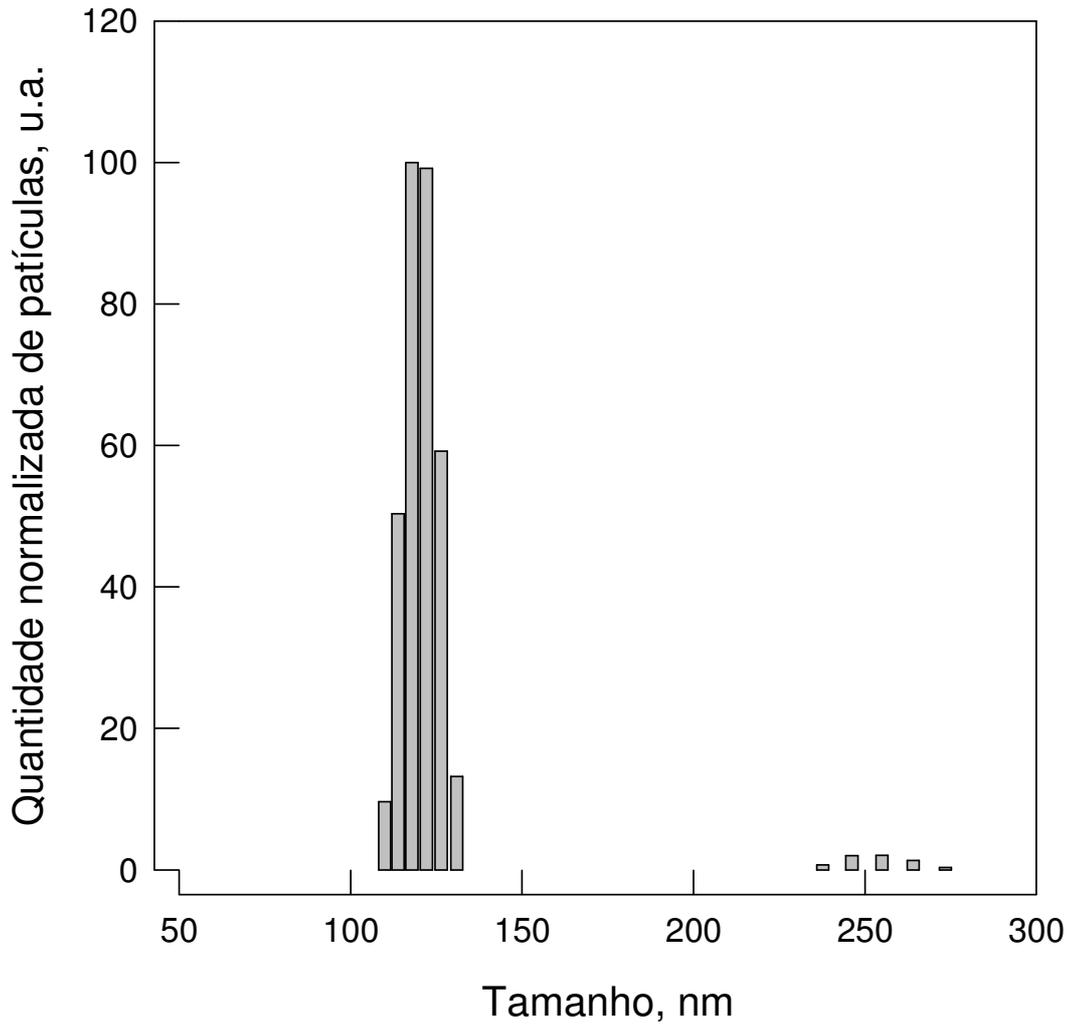


Figura 28 - Distribuição de tamanho das nanopartículas contendo hIAPP produzidas com sonificador, mostrando um perfil bimodal (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

Tabela 13 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de com hIAPP produzidas sonificador (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

	Diâmetro, nm	Polidispersividade
	156,2	0,101
	148,2	0,108
	154,5	0,139
Média	153,3	0,116
Erro padrão	2,1	0,011

Uma preparação sem o peptídeo foi produzida em paralelo com a anterior, sendo que esta possuía diâmetro médio de 169,1 nm e polidispersividade de 0,098 (Fig. 29 e Tabela 14).

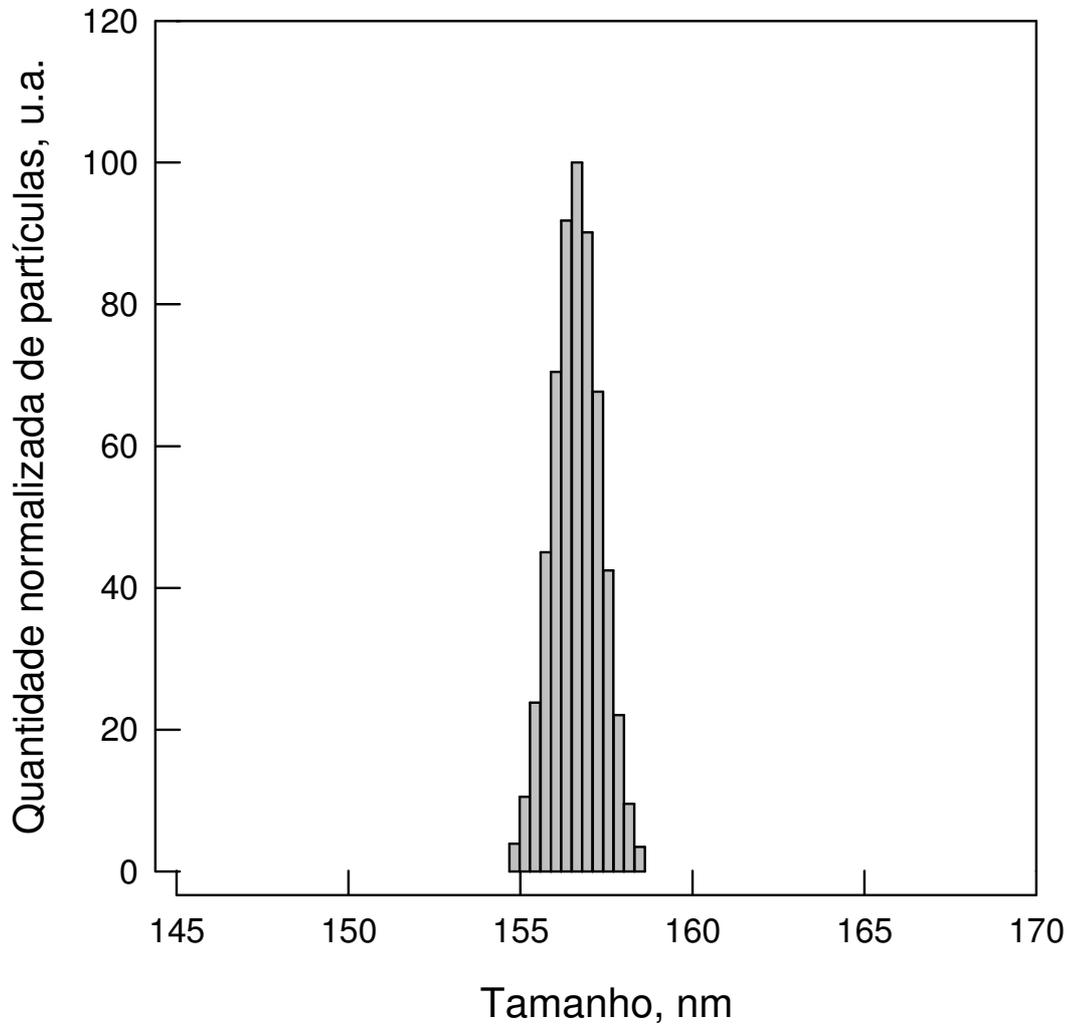


Figura 29 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonificador, indicando um perfil monomoda (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

Tabela 14 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonificador (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

	Diâmetro, nm	Polidispersividade
	173,1	0,005
	171,3	0,005
	162,9	0,283
Média	169,1	0,098
Erro padrão	3,2	0,093

Outro experimento usando amilina humana foi realizado, e novamente apresentou partículas nanométricas com baixa polidispersividade. Na Fig. 30 e na Tabela 15 são apresentados os resultados das medidas feitas por DLS.

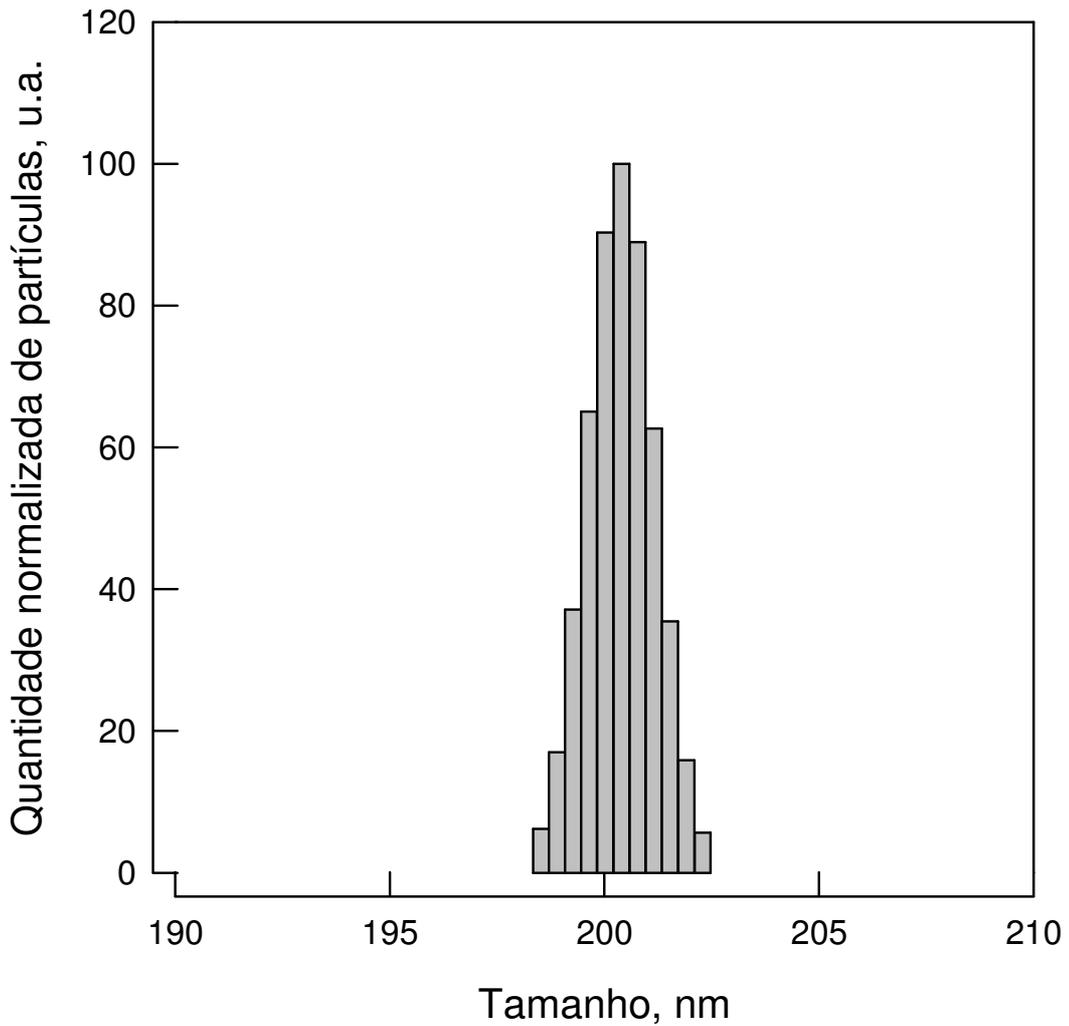


Figura 30 - Distribuição de tamanho das nanopartículas contendo hIAPP produzidas com sonificador, mostrando um perfil monomodal (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

Tabela 15 - Distribuição de tamanho das nanopartículas de PCL sem o peptídeo produzidas com sonificador (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico).

	Diâmetro, nm	Polidispersividade
	202,0	0,099
	211,0	0,005
	192,1	0,150
Média	202,0	0,085
Erro padrão	5,7	0,042

4.4. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV estão de acordo com os resultados do DLS, indicando diâmetros nanométricos para a maior parte da população de partículas presente na amostra. Além dos diâmetros nanométricos é possível observar que as partículas apresentam morfologia esferóide compatível com o esperado. A seguir são apresentadas imagens resultantes da análise por MEV (Figs. 25, 26 e 27), vale ressaltar que tal amostra foi lavada em solução aquosa contendo 1,5 % de PVA, sendo este gel também visualizado na Fig. 31.

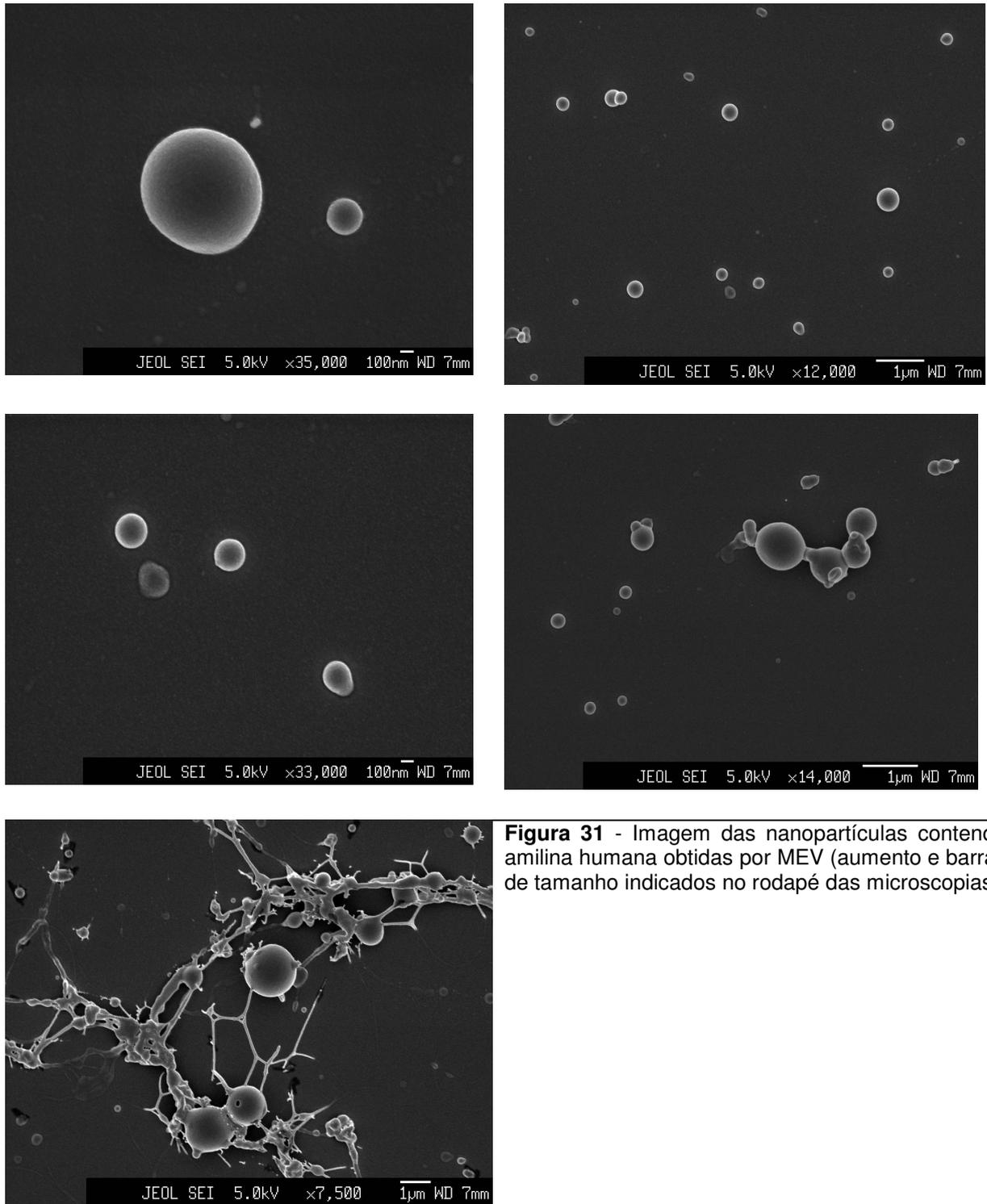


Figura 31 - Imagem das nanopartículas contendo amilina humana obtidas por MEV (aumento e barras de tamanho indicados no rodapé das microscopias).

4.5. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras também foram analisadas por MET, o resultado indica (assim como os dados de DLS e MEV) uma população nanométrica de partículas. Contudo, a morfologia das partículas obtida por MET aponta para formas mais elípticas, diferentemente daquelas vistas anteriormente. Outro dado importante das imagens de MET é a ausência de fibras amilóides, indicando que o processo evitou que a amilina humana formasse agregados amilóides. Na Fig. 32 é apresentado o resultado oriundo da MET.

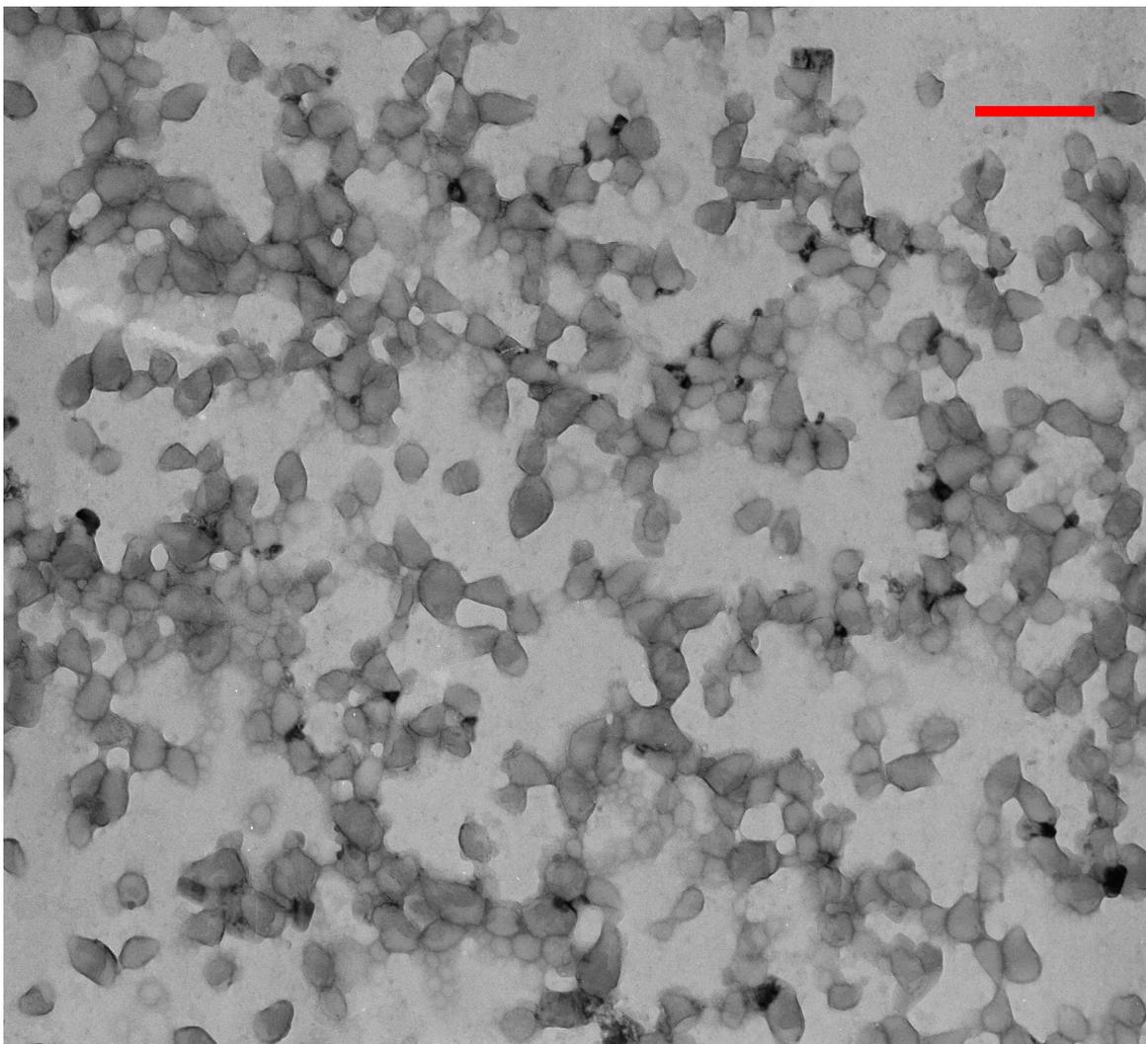


Figura 32 - Imagens das nanopartículas contendo amilina humana obtidas por MET (aumento de 25.000x), indicando partículas de formas elípticas com tamanhos nanométricos (barra = 300nm).

4.6. Perfil de liberação das nanopartículas com amilina *in vitro*

Diversos experimentos realizados em dias diferentes indicaram que este sistema apresenta uma cinética de liberação superior a quatro dias e que, decorridas 24 horas do início do experimento, menos de 50 % de amilina havia sido liberada. Na Fig. 33 é possível observar o perfil de liberação das formulações de amilina nanoencapsulada, sendo que as mesmas apresentam cinéticas de liberação superiores a três dias.

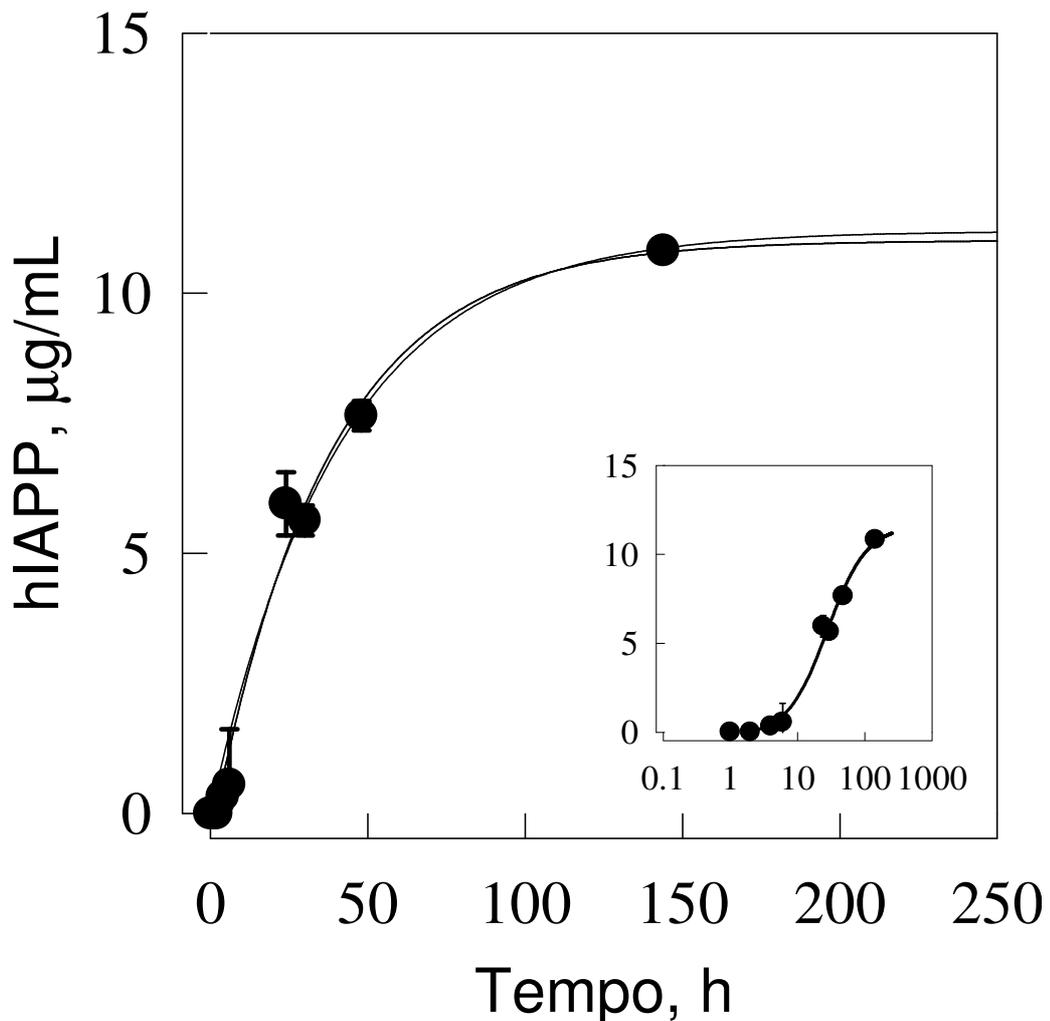


Figura 33 - Perfil de liberação do sistema contendo amilina humana nanoencapsulada. *Inset*: escala log. Linhas sólidas representam ajuste com função exponencial simples com 3 ou quatro parâmetros (sendo o quarto a concentração inicial de amilina). Detalhes em Material e Métodos.

No *inset* da Fig. 33 os mesmos resultados são apresentados, mas com a ordenada do gráfico em escala logarítmica, sendo possível a melhor visualização das primeiras horas do experimento.

Ajustamos os dados com uma função de cinética de primeira ordem, como segue:

$$C_{\text{obs}} = C_0 + A \cdot e^{(-k \cdot t)}$$

onde C_{obs} é a concentração de amilina do tempo t , C_0 é a concentração de amilina no tempo 0, A é o total cumulativo liberado e k é a constante cinética.

Tabela 16 - Dados cinéticos de liberação *in vitro* de amilina humana a partir de nanopartículas de PCL.

first order exp rise	3 parâmetros	4 parâmetros
C_0	---	-0.51 ± 0.30
Amp	11.2 ± 0.78	11.52 ± 0.68
k	$0.024 \pm 0.0037 \text{ h}^{-1}$	$0.027 \pm 0.0038 \text{ h}^{-1}$
r^2	0.979	0.986

A partir dos dados obtidos e a partir do ajuste da cinética de liberação *in vitro* de amilina humana a partir de nanopartículas de PCL, observamos uma cinética lenta de liberação com constante de 0.025 h^{-1} , equivalente a uma liberação sustentada por até $1/k = 1/0.025 \text{ h}^{-1} = 40$ horas.

Alguns dos espectros de fluorescência obtidos durante as duas liberações são apresentados na Fig. 34, onde é possível observar o aumento da intensidade de fluorescência como passar do tempo, indicando que a amilina esta sendo liberada.

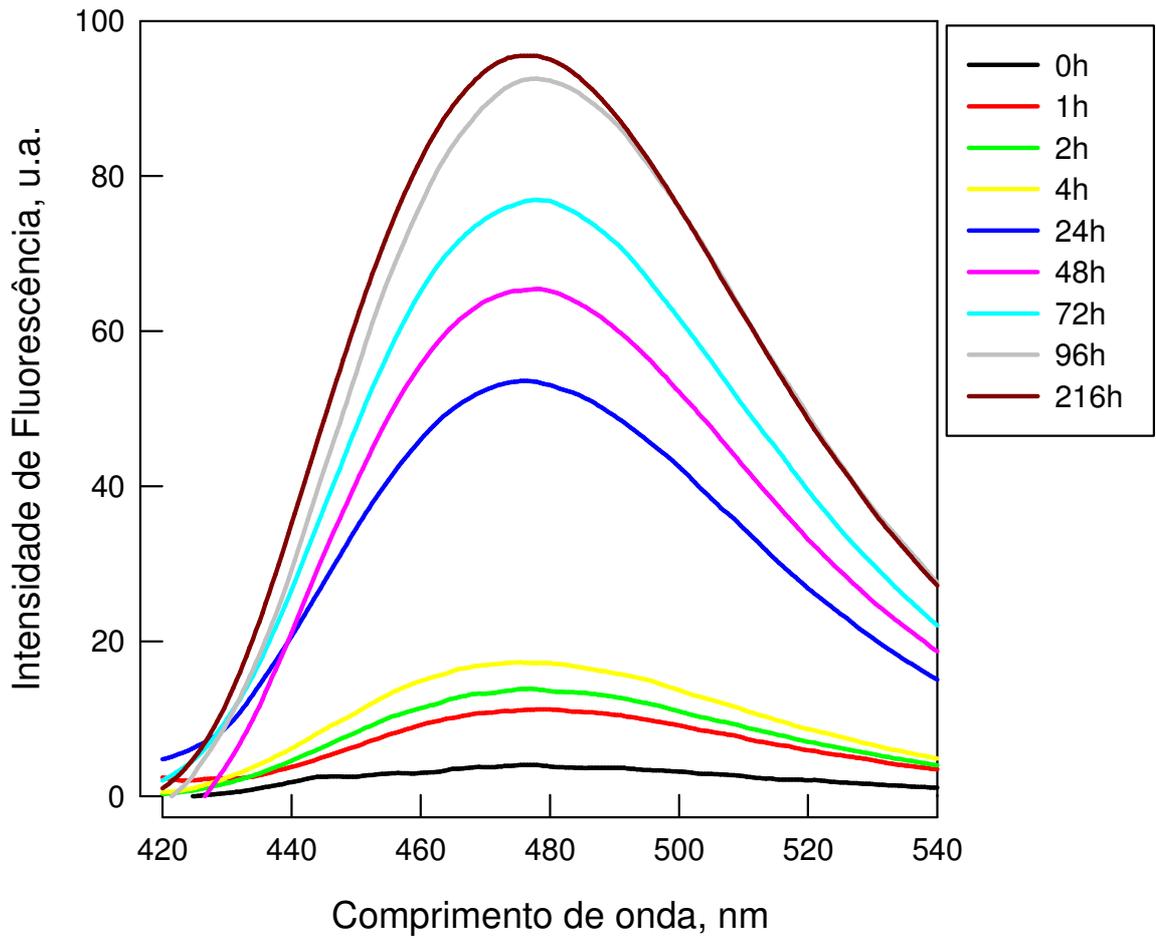


Figura 34 - Espectros de fluorescência de amostras coletados em diferentes tempos, indicando o aumento na intensidade de fluorescência com o passar do tempo.

4.7. Perfil farmacológico das nanopartículas com amilina (*in vivo*)

A formulação contendo amilina humana nanoencapsulada foi capaz de promover um efeito hipoglicemiante em camundongos em jejum, conforme é apresentado na Fig. 35. Este efeito hipoglicemiante perdurou até o fim do experimento (32 h) indicando um potencial uso terapêutico para a formulação.

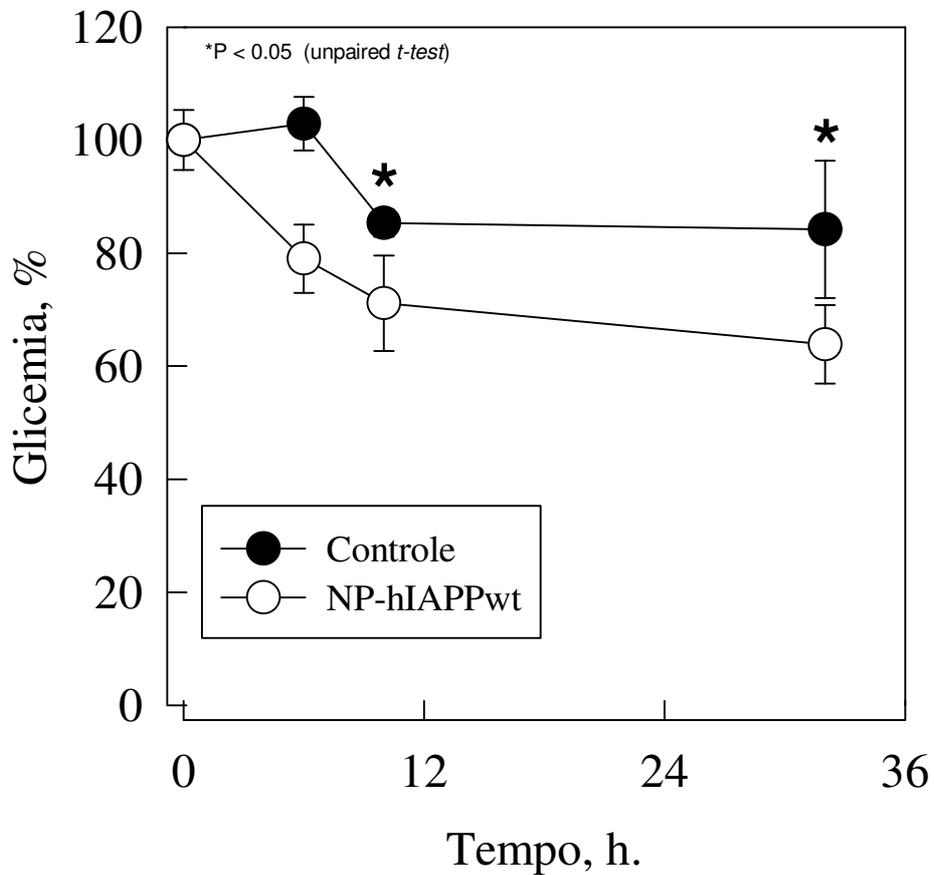


Figura 35 - Perfil de liberação *in vivo* da preparação contendo amilina humana nanoencapsulada. Ensaio foram realizados com camundongos normais (não-diabéticos) em jejum. Detalhes em Material e Métodos.

5. RESULTADOS MICROPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA

5.1. Dosagem de insulina pelo método de Bradford

Após diálise e liofilização, a insulina obtida do medicamento Humulin® foi dosada por espectrofotometria e a seguir utilizada para a realização da curva de dosagem empregando-se o método de Bradford (Fig. 36). Para se verificar a especificidade do método foram feitas leituras do sobrenadante de micropartículas sem insulina e soluções aquosas de PVA a 0,5 e 1,5 %, sendo que nenhuma destas condições resultou em sinal significativo de absorbância a 595 nm. O método também apresentou linearidade aceitável (sempre com $R^2 > 0,99$) nas concentrações testadas (1 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$). A equação obtida da regressão linear é apresentada a seguir:

$$y = 0.0245x + 0.2029$$

sendo: y = absorbância a 595 nm em u.a.

x = concentração de insulina em $\mu\text{g/mL}$

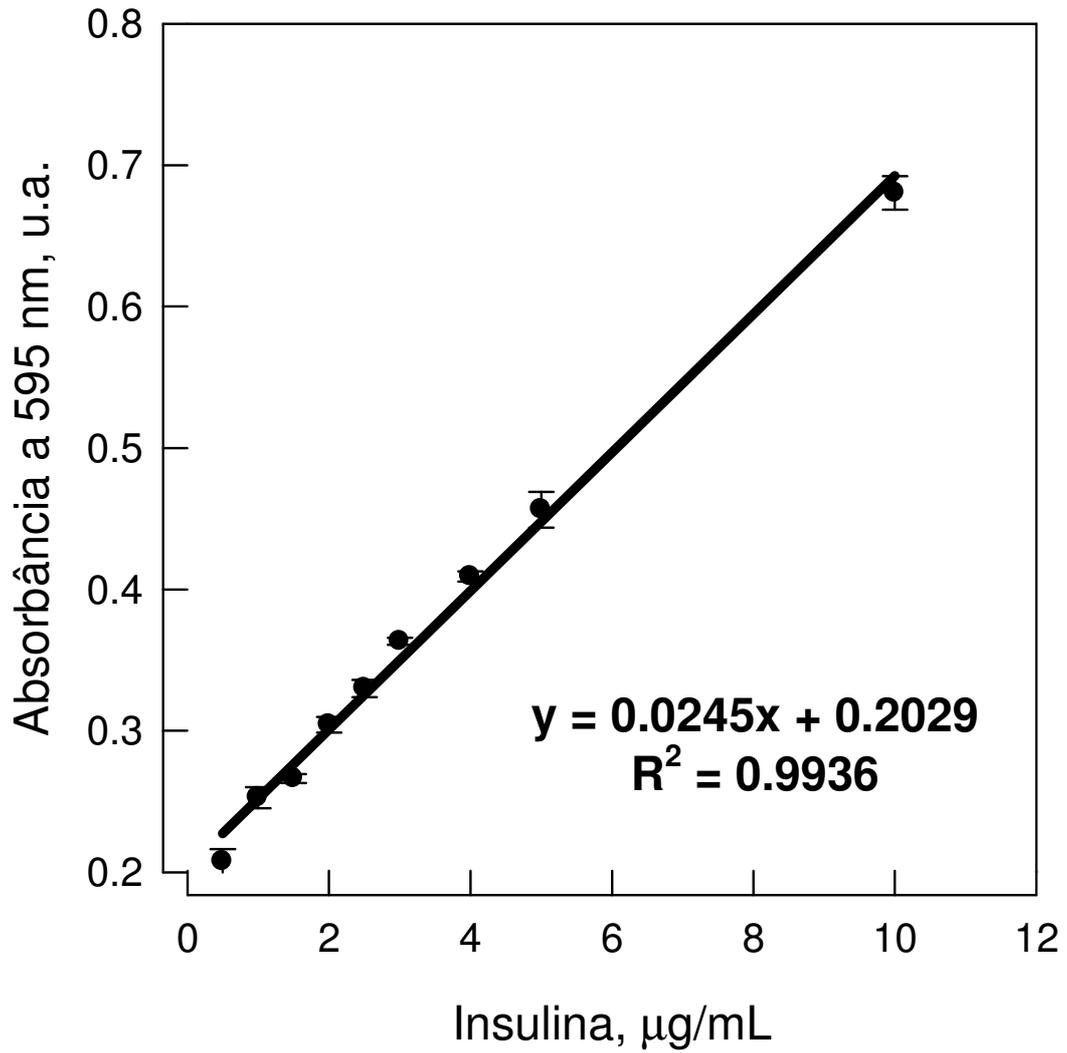


Figura 36 - Dosagem de insulina usando o método de Bradford, indicando boa linearidade do método na faixa de concentração testada.

5.2. Eficiência, rendimento e sedimentação

A eficiência calculada a partir dos sobrenadantes das lavagens foi igual a 64,5% com desvio padrão igual a 6,8%. O rendimento foi obtido a partir da pesagem do material após a liofilização sendo este igual a $88,4 \% \pm 4,2 \%$.

A sedimentação das amostras foi acompanhada visualmente durante os experimento de liberação. Foi observado que havia sedimentação perceptível após poucas horas sendo que após 24 h a maior parte do material havia sedimentado, e com 72 h de experimento a deposição foi quase completa (Fig. 37).

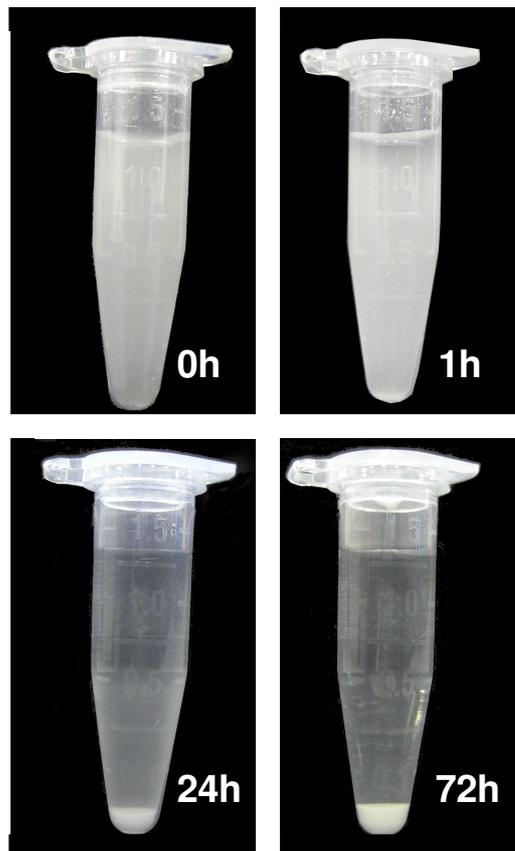


Figura 37 - Fotos de microtubos contendo suspensões de micropartículas mostrando a sua sedimentação após armazenamento a temperatura de 37°C em repouso.

5.3. Distribuição de tamanhos das micropartículas

As partículas resultantes do método de dupla-emulsão empregando agitador magnético apresentaram tamanhos variados. A análise das amostras por espalhamento de luz dinâmica (Fig. 38) mostrou que as mesmas possuíam valores de diâmetro médio e desvio padrão iguais a 9,82 μm e 0,56 μm respectivamente.

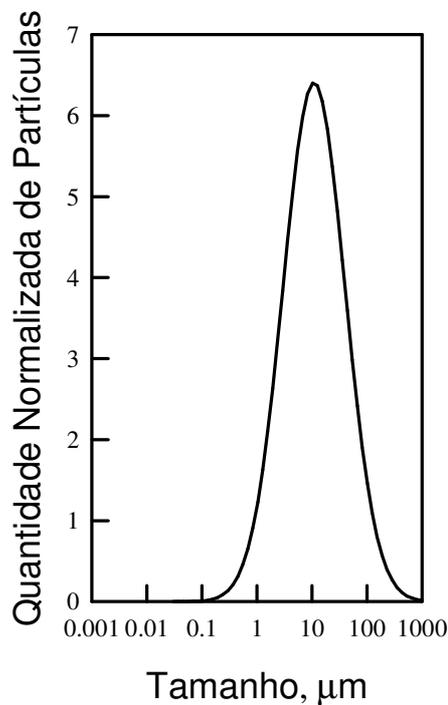


Figura 38 - Distribuição de tamanhos das micropartículas contendo insulina (dados obtidos por espalhamento de luz dinâmico)

5.4. Análise morfológica por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas por MO (Fig. 39 e 40) estão de acordo com os resultados do DLS indicando diâmetros micrométricos para a maior parte da população de

partículas presentes na amostra. Também é possível observar que as partículas apresentam morfologia esferóide sendo que nas partículas maiores é possível identificar compartimentalizações compatíveis com o esperado para partículas obtidas pelo método de dupla-emulsão.

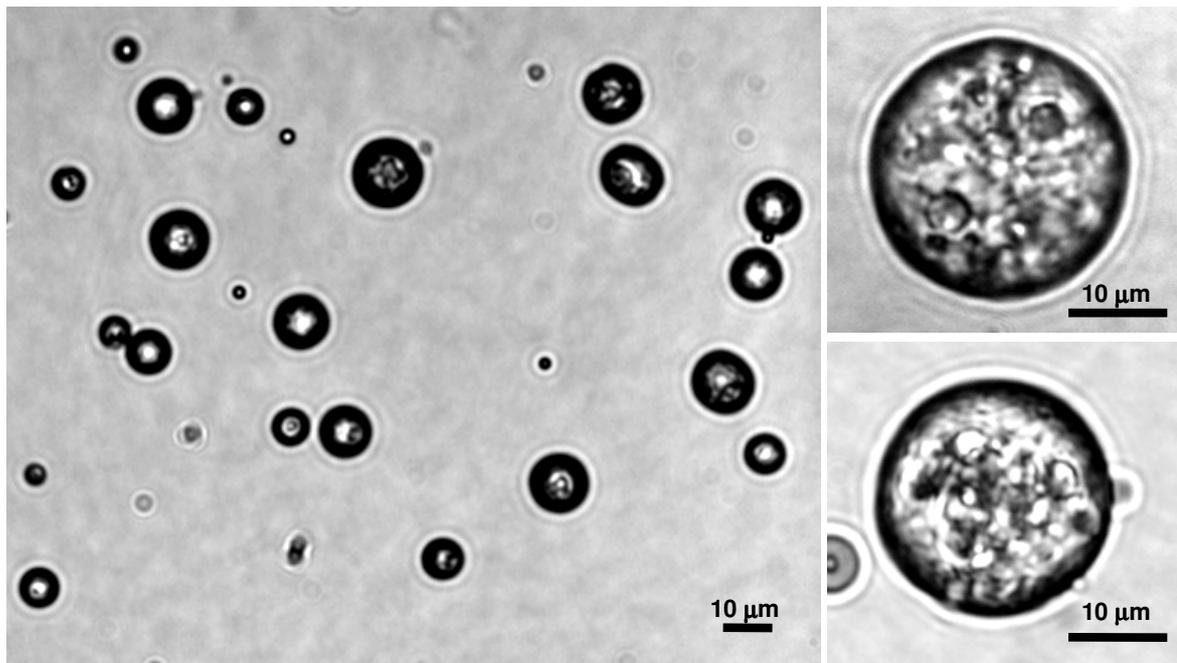


Figura 39 - Imagens de MO das micropartículas contendo insulina microencapsulada. Imagens a direita obtida usando objetiva de 40x e imagens à esquerda objetivas de 100x.

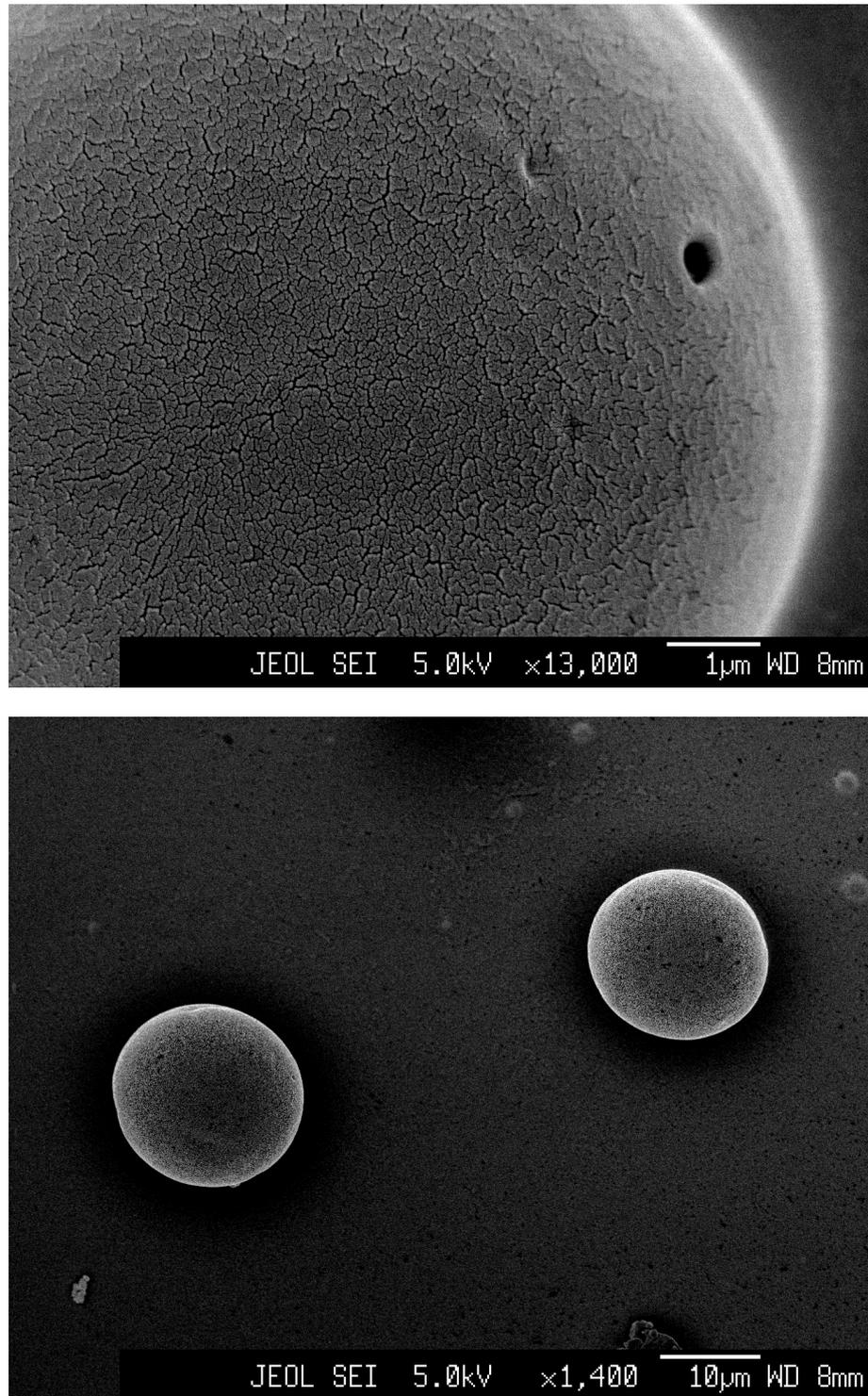


Figura 40 - Imagens de MEV das micropartículas contendo insulina microencapsulada.

5.5. Perfil de liberação das micropartículas com insulina *in vitro*

Diversos experimentos realizados em dias diferentes indicaram que este sistema apresenta uma cinética de liberação bifásico, com amplitudes de 50 % para cada uma, sendo a primeira de duração de cerca de 2 h e a segunda até 48 h. Na Fig. 41 é possível observar o perfil de liberação obtido das preparações de insulina microencapsulada.

Ajustamos os dados com uma função dupla de cinética de primeira ordem, como segue:

$$C_{\text{obs}} = C_0 + A_1 * e^{(-k_1 * t)} + A_2 * e^{(-k_2 * t)}$$

onde C_{obs} é a concentração de insulina do tempo t , C_0 é a concentração de insulina no tempo 0, A é o efeito total, k é constante cinética e 1 e 2 são as fases cinéticas. Considerando que o efeito glicêmico é bifásico, ocorrendo restauração dos níveis originais de glicemia, os dados farmacológicos *in vivo* foram ajustados usando $A_1 = A_2$.

Tabela 17 - Dados cinéticos de liberação *in vitro* e efeitos farmacológicos *in vivo* de amilina humana a partir de nanopartículas de PCL.

	Liberação <i>in vitro</i>	Liberação <i>in vivo</i> (glicemia)	
	MP:Insulina	MP:Insulina	Humulin
A_1	43,9 ± 9,9	---	---
k_1	0,76 ± 0,39 h ⁻¹	2,58 h ⁻¹	2,59 h ⁻¹
A_2	54,7 ± 9,8	---	---
k_2	0,023 ± 0,0095 h ⁻¹	0,047 h ⁻¹	0,18 h ⁻¹
r^2	0,916	0,92	0,93

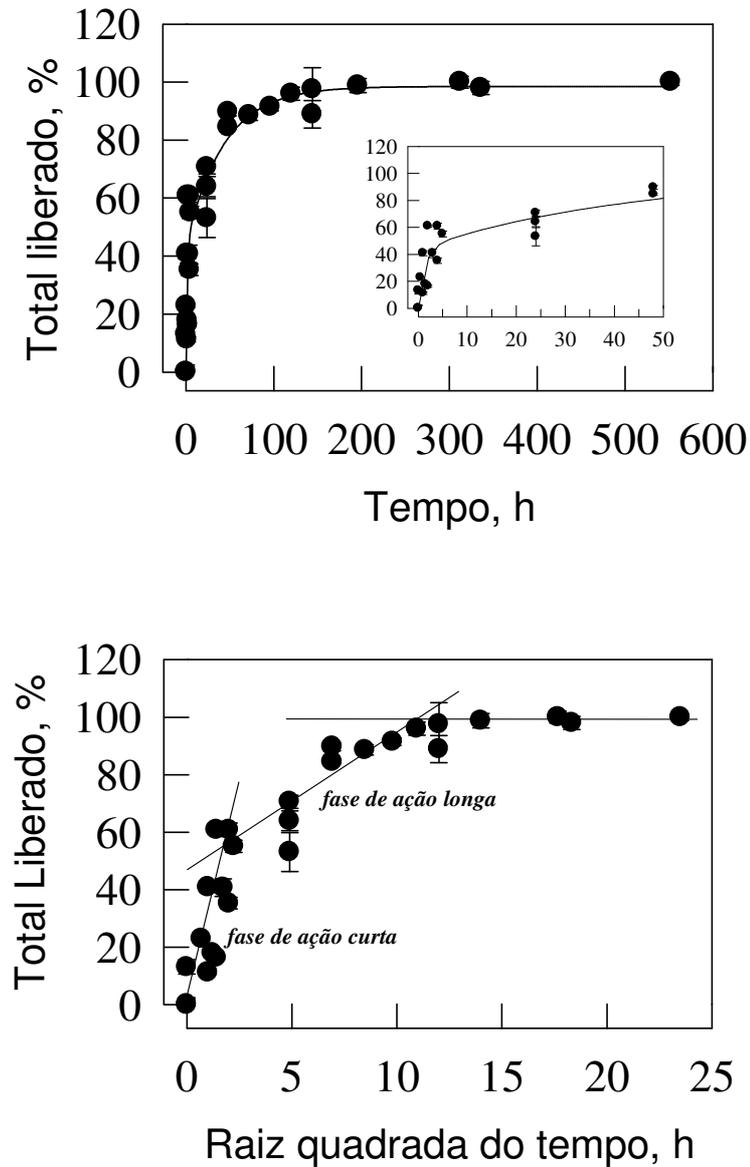


Figura 41 - Cinética de liberação *in vitro* (PBS pH 7,4 a 37°C) de insulina microencapsulada em partículas de poli-ε-caprolactona. A) escala linear. Inset: detalhe mostrando tempos iniciais. Linhas contínuas são ajustes com equação $C_{obs} = C_0 + A_1 * e^{(-k_1 * t)} + A_2 * e^{(-k_2 * t)}$ de dupla cinética de primeira ordem. B) escala de quadrado do tempo – plot de Higuchi. Detalhes em Matéril e Métodos.

5.6. Perfil farmacológico das micropartículas com insulina (*in vivo*)

Camundongos adultos foram tratados com streptozotocina para a indução de Diabetes Mellitus, uma vez constatada glicemia superior a 300 mg/dL os animais foram separados para o experimento de liberação *in vivo*. Os camundongos diabéticos foram divididos em três grupos: um grupo recebeu micropartículas sem insulina, outro recebeu insulina comercial e no grupo teste foram administradas as micropartículas contendo insulina. Os animais que receberam micropartículas vazias (sem insulina) não apresentaram variações significativas em suas glicemias. A comparação entre as glicemias médias do grupo que recebeu insulina comercial (Humulin®) e o grupo que recebeu insulina microencapsulada mostrou que estas glicemias diferiam de forma estatisticamente significante nos tempos de 6 h e 24 h indicando que a insulina liberada pelas micropartículas foi capaz de reduzir a glicemia destes animais por um período superior a forma farmacêutica comercial (Fig. 42).

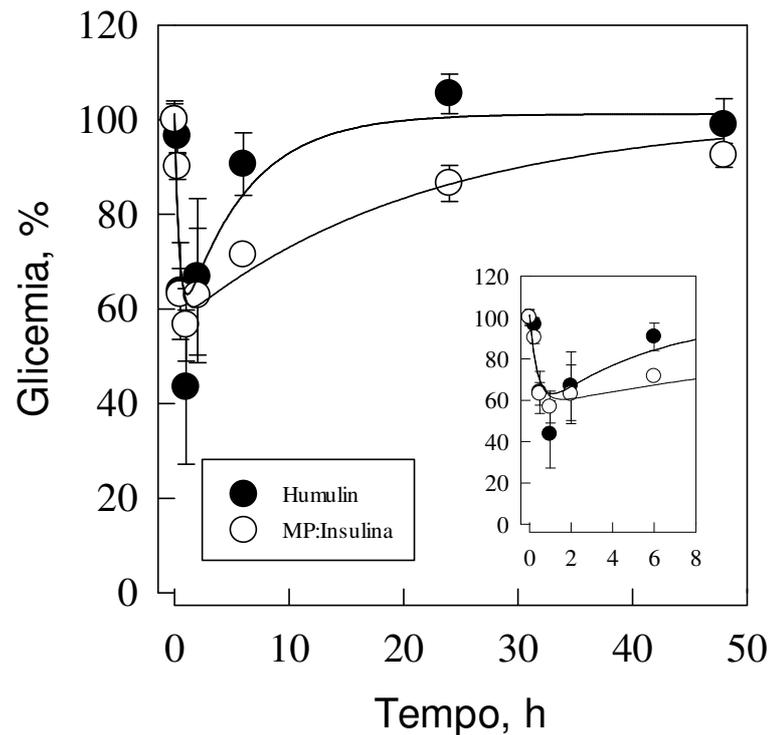


Figura 42 - Efeito farmacológico das micropartículas contendo insulina em camundongos diabéticos (indução por streptozotocina, glicemia maior que 300 mg/dL).

Na Fig. 42 são destacadas as primeiras horas do experimento evidenciando que a preparação testada manteve a glicemia dos animais mais baixa por período de tempo mais prolongado, até 48 h, se comparada a formulação comercial. Por sua vez, a fase inicial de declínio da glicemia se mostrou similar ao observado para insulina humana solúvel. As constantes cinéticas das duas fases de efeito glicêmico, de declínio e recuperação, se mostraram equivalentes ao observado para a liberação *in vitro* (Tabela 17) sugerindo uma forte correlação *in vitro x in vivo* para esta formulação.

6. DISCUSSÃO

6.1. Porque sistemas de liberação sustentada?

Não há dúvidas quanto a importância dos medicamentos anti-diabetes existentes, uma vez que tais medicamentos possibilitaram um grande aumento na expectativa de vida dos pacientes com DM, reduzindo drasticamente as chances de complicações desta patologia quando usados de forma racional (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009c). Todavia, o uso racional de medicamentos com Humulin® (insulina regular) e pramlintide demanda grande disciplina e autocontrole dos pacientes. Assim, tendo como exemplo um paciente com DM que faz quatro refeições diárias pode vir a necessitar de doze procedimentos invasivos por dia (quatro aplicações de insulina, quatro aplicações de pramlintide e quatro tomadas de sangue para aferição da glicemia). Portanto, embora se tenha evoluído muito no que diz respeito à longevidade dos pacientes com DM, a qualidade de vida destes ainda é uma questão a ser aperfeiçoada. Desta forma, o desenvolvimento de medicamentos de liberação sustentada para o tratamento do DM visa tanto a melhoria na eficácia e segurança deste tratamento quanto redução da frequência de procedimentos dolorosos o que é de grande importância para o bem estar destes pacientes.

6.2. Avaliação da formulação contendo amilina nanoencapsulada

O uso do pramlintide no tratamento do DM é algo relativamente recente quando comparado à terapia de reposição com insulina, não havendo relatos na literatura pesquisada sobre formulações semelhantes à desenvolvida nesta dissertação, o que reforça o caráter inovador deste trabalho.

A metodologia analítica empregada na detecção e quantificação da amilina humana usada nos experimentos se mostrou adequada quanto a parâmetros como: limites de detecção, linearidade na faixa de concentrações testada, reprodutibilidade, precisão e seletividade. O desenvolvimento desta metodologia possibilitou de forma simples, rápida e confiável a avaliação de parâmetros da formulação de amilina como: a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação *in vitro*.

A eficiência de encapsulação superior a 60% está de acordo com o esperado para o processo, uma vez que segundo BLANCO e ALONSO (1997) e PÉREZ *et al.* (2000) a metodologia de emulsão e extração do solvente usando emulsões do tipo O/A é indicada para fármacos e biofármacos lipofílicos (que é o caso da amilina humana usada nos experimentos). O rendimento de aproximadamente 90 % também foi outro achado satisfatório obtido nesta preparação.

As análises dos tamanhos por espalhamento de luz dinâmico revelaram que estas possuíam valores médios de diâmetros de aproximadamente 200 nm com baixa polidispersividade fato considerado como positivo por muitos autores visto que a uniformidade de tamanhos freqüentemente esta associada a perfis de

liberação adequados. A lenta sedimentação da formulação acompanhada durante os experimentos de liberação é outro fato que confirma o tamanho reduzido das partículas, uma vez que segundo a lei de Stokes a velocidade de sedimentação é proporcional ao quadrado do diâmetro das partículas (AULTON, 2005), e portanto quanto menor o diâmetro das partículas menores serão suas velocidades de sedimentação.

A morfologia das nanopartículas avaliada por MEV e MET resultou em dados semelhantes (na MEV observou-se partículas predominantemente esféricas, enquanto que na MET as imagens indicaram formas mais elípticas), no entanto o material usado para estas duas metodologias recebeu tratamentos diferentes (condições diferentes para cada tipo de microscopia eletrônica) o que pode justificar as diferenças encontradas. Outro dado importante obtido da MET foi a ausência de fibras amilóides indicando que a amilina humana se manteve estável na formulação sem agregar. Com relação ao material amorfo encontrado nas imagens de MEV é possível supor que o mesmo trata-se na realidade de PVA presente na formulação, essa suposição tem por base os achados de Liu *et al.* (2007), que compararam formulações de insulina em PLGA com e sem PVA (Fig. 43)

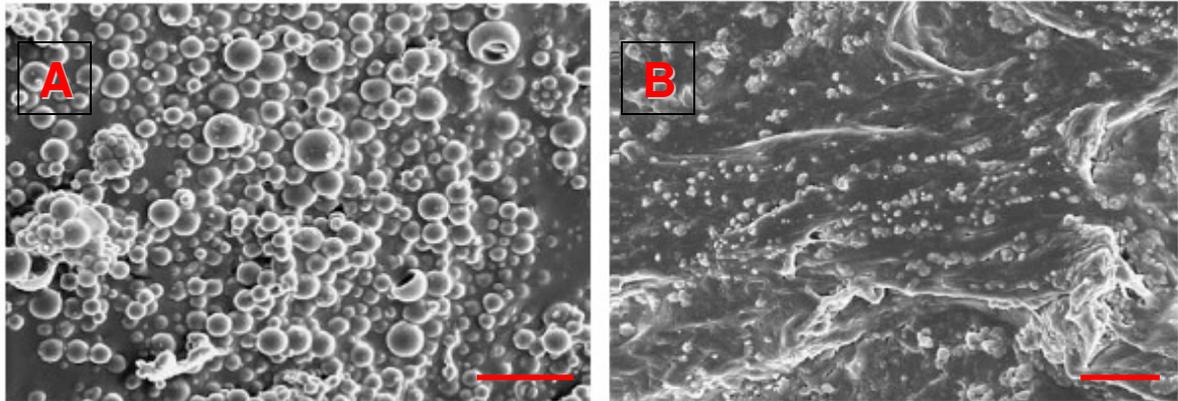


Figura 43 - Imagens de MEV de formulações de insulina microencapsulada em PLGA. **A** -formulação apenas com insulina de PLGA (barra = 10 μm) e **B** - formulação de insulina e PLGA em 5% de PVA (barra = 5 μm) (adaptado de LIU *et al.*, 2007).

A cinética de liberação *in vitro* apresentou perfil bifásico com uma fase inicial de liberação mais lenta nas primeiras horas seguida por uma segunda fase de liberação mais acelerada nos dias subseqüentes atingindo seu fim por volta do quarto dia de experimento.

Os resultados *in vivo* sugerem um efeito hipoglicemiante da formulação superior a 32 h, indicando que a mesma tem potencial terapêutico no tratamento do DM. Vale resaltar que embora tenha sido reportado que a amilina quando administrada em ratos em jejum ou em culturas de células tenha efeito hiperglicemiante de curta duração (SHERIFF, FISCHER, BALASUBRAMANIAM, 1992) os efeitos sobre a glicemia a longo prazo ainda não estão totalmente caracterizados.

6.3. Avaliação da formulação contendo insulina microencapsulada

Existem diversos estudos de formulações de liberação sustentada para insulina descritos na literatura (GEDULIN *et al.*, 2005; DAMGE, MAINCENT, UBRICH, 2007; LIU *et al.*, 2007; HUYNH *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008; HAN *et al.* 2009; UNGARO *et al.*, 2009; RASTOGI *et al.*, 2009, etc.). Todavia, até o presente momento não há registro de medicamentos contendo insulina microencapsulada visando esta forma de liberação.

Portanto, como a metodologia empregada para a análise de amilina usando fluorescamina, o uso do método de Bradford para a detecção e quantificação da insulina usada nos experimentos se mostrou adequado quanto a parâmetros como: limites de detecção, linearidade na faixa de concentração testada, reprodutibilidade, precisão e seletividade. O uso deste método possibilitou de forma simples, rápida e confiável a avaliação de parâmetros da formulação de amilina como: a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação *in vitro*.

A eficiência de encapsulação de 64,5 % está abaixo do esperado para a metodologia de dupla-emulsão e extração do solvente usando emulsões do tipo A/O/A uma vez que outros autores usando metodologias semelhantes à empregada neste trabalho obtiveram valores de eficiência mais elevados (GEDULIN *et al.*, 2005; DAMGE, MAINCENT, UBRICH, 2007; LIU *et al.*, 2007; HUYNH *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008; HAN *et al.* 2009; UNGARO *et al.*, 2009; RASTOGI *et al.*, 2009). No entanto, a baixa eficiência de encapsulação, por si só, não constitui um critério de

exclusão uma vez que existem outros parâmetros a serem analisados que também possuem grande relevância.

O rendimento de 88,4 % calculado com base na massa de material recuperado após a liofilização está de acordo com o observado em outros trabalhos que utilizam metodologias semelhantes à usada nesta dissertação (GEDULIN *et al.*, 2005; DAMGE, MAINCENT, UBRICH, 2007; LIU *et al.*, 2007; HUYNH *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008; HAN *et al.* 2009; UNGARO *et al.*, 2009; RASTOGI *et al.*, 2009, etc.).

Diferentemente do observado na preparação de amilina nanoencapsulada, as análises de tamanho das partículas (por espalhamento de luz dinâmico) revelou que estas possuíam valores médios de diâmetros de 9,82 μm com uma ampla faixa de distribuição de tamanhos, o que representaria um ponto desfavorável se esta formulação fosse destinada a administrações envenosas, no entanto como se trata de uma formulação para uso subcutâneo o tamanho micrométrico por si só não constitui um problema em potencial.

A observação da micropartículas usando microscópio óptico e eletrônica de varredura revelou que estas possuíam morfologia esférica e eram compartimentalizadas, fato também observado em outros trabalhos que utilizam o método da dupla-emulsão (Fig. 44) (BLANCO E ALONSO, 1998).

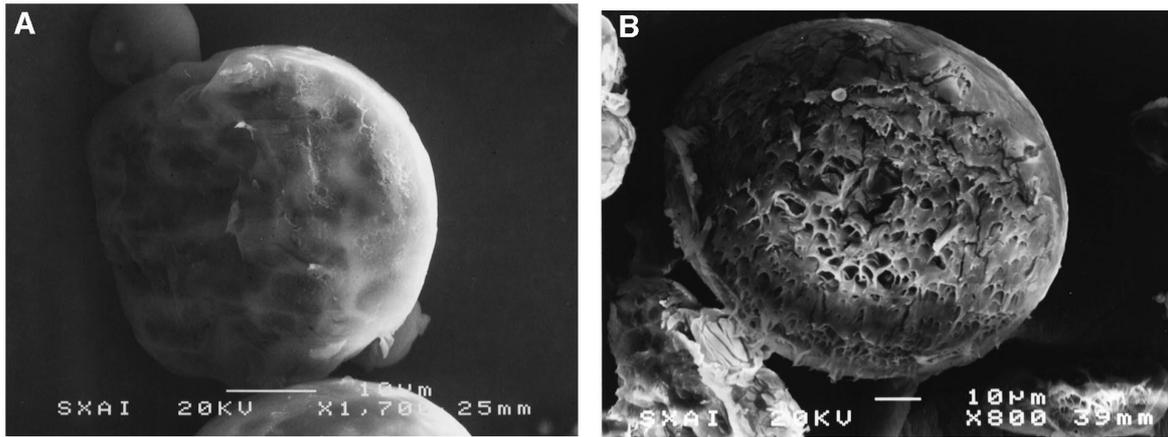


Figura 44 - Imagens de MEV de micropartículas de PLGA contendo albumina de soro bovino preparadas pelo método de dupla-emulsão (BLANCO E ALONSO, 1998).

Com relação ao perfil de liberação *in vitro* foi observado que a preparação apresenta uma cinética de liberação superior a três dias, sendo que no primeiro dia há liberação da maior parte do material. Esta cinética de liberação acentuada nas primeiras 24 h também foi observada no experimento usando camundongos diabéticos, sendo que o efeito hipoglicemiante da formulação foi superior a 24 h de experimento. Interessantemente, mesmo possuindo uma cinética de liberação *in vitro* mais rápida que as descritas por outros autores que trabalharam com formulações semelhantes a aqui desenvolvida a liberação *in vivo* se mostrou mais duradoura que a maioria dos trabalhos pesquisados (GEDULIN *et al.*, 2005; DAMGE, MAINCENT, UBRICH, 2007; LIU *et al.*, 2007; HUYNH *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008; HAN *et al.* 2009; UNGARO *et al.*, 2009; RASTOGI *et al.*, 2009, etc.), o que sugere que esta formulação manteve de forma mais duradoura a atividade da insulina usada indicando um efeito estabilizante nesta.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que as formulações de amilina nanoencapsulada e insulina microencapsulada foram capazes de promover as liberações sustentadas destes biofármacos por períodos superiores a dois dias, o que sugere um potencial terapêutico para os sistemas estudados nesta dissertação. Com relação à análise destas formulações é possível afirmar que: as metodologias empregadas na quantificação dos peptídeos foram adequadas a cada sistema, a análise de espalhamento de luz e microscopia confirmaram os tamanhos nanométricos e micrométricos das partículas contendo amilina e insulina, respectivamente, e por fim, os parâmetros eficiência e rendimento apresentaram níveis moderados com eficiências superiores a 60% e rendimentos de aproximadamente 90%. Por todo o exposto, conclui-se que as formulações aqui estudadas possuem características promissoras para o desenvolvimento de medicamentos anti-diabetes usando este tipo de sistema. Como perspectivas futuras serão realizados outros experimentos visando o aperfeiçoamento de tal formulação como: teste de outros polímeros como PLGA, uso de géis como Pluronic F27 para se prolongar a liberação do sistema, estudos de estabilidade em temperatura ambiente e sob refrigeração, mudanças nas concentrações dos componentes da formulação a fim de se melhorar parâmetros como eficiência e rendimento, busca por metodologias alternativas às lavagens com centrifugação, inocuidade, escalonamento do processo, etc.

8. REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S.A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T.M. **Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery.** J. Control. Release 100, 5–28, 2004.
- ALAJUUMA, P. *et al.* **Amylin competes for binding sites of CGRP in the chamber angle and uvea of monkey, cat, and pig eye.** J.Ocul.Pharmacol.Ther. 19(6), 555-67, 2003.
- ALAM, A. S. *et al.* **Amylin inhibits bone resorption by a direct effect on the motility of rat osteoclasts.** Exp.Physiol 78(2),183-96, 1993.
- ALLEN, T.M.; CULLIS, P.R. **Drug delivery systems: entering the mainstream** Science 303, 1818–1822, 2004.
- ALMEIDA e SOUTO 2007 Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 478–490, 2007.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Executive Summary: Standards of Medical. Care in Diabetes—2009** Diabetes Care 32 (1), S6-12, 2009a.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Standards of Medical Care in Diabetes—2009.** Diabetes Care 32(1), S13-61, 2009b.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care 32(1), S62-67, 2009c.
- AMINABHAVI, T.M. *et al.* **Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.** J. Control. Release 70, 1–20, 2001.
- ARONNE, L. **Progressive reduction in body weight after treatment with the amylin analog pramlintide in obese subjects: a phase 2, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study.** J Clin Endocrinol Metab. 92(8),2977-83, 2007.
- AULTON, M.E. Delineamento de formar farmacêuticas (2005) 2ª ed, Porto Alegre –RS, Artmed, 2005
- AZRIEL, R.; GAZIT, E. **Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide: an experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation.** J Biol Chem 276, 34156-34161, 2001.
- BARTH, S. W. *et al.* **Differential effects of amylin and salmon calcitonin on neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and the arcuate nucleus of the rat.** Neurosci.Lett. 341(2), 131-34, 2003.
- BELL, D. *et al.* **Hypertrophic effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin on adult mammalian ventricular cardiomyocytes.** J.Mol.Cell Cardiol. 27(11), 2433-43, 1995.
- BELL, D.; MCDERMOTT, B. J. **Activity of amylin at CGRP1-preferring receptors coupled to positive contractile response in rat ventricular cardiomyocytes.** Regul.Pept. 60 (2-3), 125-33, 1995.
- BENOIT, M.A.; BARAS, B e GILLARD, J., **Preparation and characterization of protein-loaded poly(-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery,** International Journal of Pharmaceutics, 184(1), 73-84, 1999.
- BERNEY, T. *et al.* **Transplantation of islets of Langerhans: new developments.** Swiss Med Wkly 131, 671-80, 2002.

- BHOOGAL, R. *et al.* **The effects of IAPP and CGRP on guinea pig tracheal smooth muscle *in vitro*.** Peptides 15(7), 1243-47, 1994.
- BIRNBAUMER, M. **V2R structure and diabetes insipidus.** Receptors Channels 8 (1), 51-56, 2002.
- BLAKELY, P.; VAUGHN, D. A.; FANESTIL, D. D. **Amylin, calcitonin gene-related peptide, and adrenomedullin: effects on thiazide receptor and calcium.** Am.J.Physiol 272(3), 410-415, 1997.
- BLANCO, M.D. e ALONSO, M.J. **Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 43(3), 287-294, 1997.
- BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem 7;72:248-54, 1976.
- BRAIN, S. D. *et al.* **The demonstration of vasodilator activity of pancreatic amylin amide in the rabbit.** Am.J.Pathol. 136(3), 487-90, 1990.
- BRUNETTI, L. *et al.* **Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus.** Eur.J.Pharmacol. 454(2-3), 189-92, 2002.
- CHANCE, W. T. *et al.* **Amylin increases transport of tyrosine and tryptophan into the brain.** Brain Res. 593(1), 20-24, 1992.
- CHANCE, W. T. *et al.* **Anorexia following the intrahypothalamic administration of amylin.** Brain Res. 539(2), 352-54, 1991.
- CLARK, A. *et al.* **ISLET AMYLOID FORMED FROM DIABETES-ASSOCIATED PEPTIDE MAY BE PATHOGENIC IN TYPE-2 DIABETES** Lancet 2, 231–234, 1987.
- CLEMENTI, G. *et al.* **Anti-inflammatory activity of amylin and CGRP in different experimental models of inflammation.** Life Sci. 57(14), 193-197, 1995.
- COOPER, D.K.C, CASU, A. **The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes—Chapter 4: Pre-clinical efficacy and complication data required to justify a clinical trial.** Xenotransplantation 16, 229–238. 2009.
- COOPER, G.J. *et al.* **Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients.** Proc Natl Acad Sci U S A 84(23),8628-32, 1987.
- COOPER, G. J., *et al.* **Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle.** Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 85(20), 7763-66, 1988.
- DACQUIN, R. *et al.* **Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation *in vivo*.** J.Cell Biol. 164(4), 509-14, 2004.
- DAMGE,C.; MAINCENT, P. e UBRICH, N. **Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats,** Journal of Controlled Release, 117(2), 163-170, 2007.
- DATTA, H. K. *et al.* **In vivo and in vitro effects of amylin and amylin-amide on calcium metabolism in the rat and rabbit.** Biochem.Biophys.Res.Commun. 162(2), 876-81, 1989.
- DÉGANO, P. *et al.* **Amylin inhibits glucose-induced insulin secretion in a dose-dependent manner. Study in the perfused rat pancreas.** Regul.Pept. 43(1-2), 91-96, 1993.

- DEWITT, B. J. *et al.* **Comparison of responses to adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide in the pulmonary vascular bed of the cat.** *Eur.J.Pharmacol.* 257(3), 303-06, 1994.
- EDELMAN, S.V. **Does addition of pramlintide to basal insulin improve glycemic control in type 2 diabetes mellitus?** *Nature Reviews Endocrinology* 4, 194–195, 2008.
- FERRER, M. *et al.* **The scientific muscle of Brazil's health biotechnology.** *Nature Biotechnology* 22(12), DC8–DC10, 2004.
- FLOOD, J. F.; J. E. MORLEY. **Differential effects of amylin on memory processing using peripheral and central routes of administration.** *Peptides* 13(3), 577-80, 1992.
- FONTANA, A. *et al.* **Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins** *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 13–28, 2008.
- FUNAKOSHI, A., *et al.* **Stimulatory effects of islet amyloid polypeptide (amylin) on exocrine pancreas and gastrin release in conscious rats.** *Regul.Pept.* 38(2), 135-43, 1992.
- GEDULIN, B. R., T. J. Rink, and A. A. Young. **Dose-response for glucagonostatic effect of amylin in rats.** *Metabolism* 46(1), 67-70, 1997.
- GEDULIN, B. R. *et al.* **Dose–response for glycaemic and metabolic changes 28 days after single injection of long-acting release exenatide in diabetic fatty Zucker rats,** *Diabetologia* 48, 1380–1385, 2005
- GIEZEN, T.J. *et al.* **Safety-Related Regulatory Actions for Biologicals Approved in the United States and the European Union** *JAMA* 300(16), 1887-1896, 2008.
- GLENNER, G.G.; EANES, D.; WILEY, C. **Amyloid fibrils formed from a segment of the pancreatic islet amyloid protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 15;155(2): 608-14, 1988.
- GOODMAN e GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 2006 11^aed McGraw Hill Cap. 60, 1459-1488, 2006.
- GRUESSNER, A.C., SUTHERLAND, D.E.R., GRUESSNER, R.W.G. **Pancreas transplantation in the United States: a review.** *Curr Opin Organ Transplant* 15, 93–101, 2010.
- GUIDOBONO, F., *et al.* **Amylin given by central and peripheral routes inhibits acid gastric secretion.** *Peptides* 15(4), 699-702, 1994.
- GUIDOBONO, F., *et al.* **Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats.** *Br.J.Pharmacol.* 120(4), 581-86, 1997.
- HAN, Y. *et al.* **Insulin nanoparticle preparation and encapsulation into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres by using an anhydrous system,** *International Journal of Pharmaceutics* 378, 159–166, 2009
- HARRIS, P. J., *et al.* **Amylin stimulates proximal tubular sodium transport and cell proliferation in the rat kidney.** *Am.J.Physiol* 272(1), 13-21, 1997.
- HAYDEN, M.R.; TYAGI, S.C. **"A" for Amylin and Amyloid in type 2 Diabetes Mellitus.** *J Pancreas* 2 (4), 124-139, 2001.
- HOLLANDER, P. *et al.* **Effect of pramlintide on weight in overweight and obese insulin-treated type 2 diabetes patients.** *Obes Res.* 12(4),661-8, 2004.
- HUYNH, D.P. **Functionalized injectable hydrogels for controlled insulin delivery,** *Biomaterials* 29, 2527-2534, 2008

- IWAMOTO, Y., et al. **Effect of islet amyloid polypeptide (IAPP/amylin) on 2-deoxyglucose uptake in mouse pancreatic acini.** *Diabetes Res.Clin.Pract.* 15(1), 71-75, 1992.
- JAIKARAN, E.T. *et al.* **Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis.** *J Mol Biol* 308, 515-525, 2001.
- JANES, S. *et al.* **The Selection of Pramlintide for Clinical Evaluation.** *Diabetes* 45(2), 235A, 1996.
- KIM, B.S. *et al.* **Insulin-Loaded Microcapsules for In Vivo Delivery,** *MOLECULAR PHARMACEUTICS* 6(2)353–365, 2009
- KLEPPINGER, E.L.; VIVIAN, E.M. **Pramlintide for the treatment of diabetes mellitus.** *Ann Pharmacother* 37 (7-8): 1082-1089, 2003.
- KOLTERMAN, O. G.*et al.* **Reduction of postprandial hyperglycemia in subjects with IDDM by intravenous infusion of AC137, a human amylin analogue.** *Diabetes Care.* 18(8),1179-82, 1995.
- KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. **Role of nanotechnology intargeted drug delivery and imaging: a concise review.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 1,193–212, 2005
- KOVATCHEV, B. P., J. CREAM, and A. MCCALL. **Pramlintide reduces the risks associated with glucose variability in type 1 diabetes.** *Diabetes Technol.Ther.* 10(5), 391-96, 2008.
- LAMPRECHT *et al.*, **Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification,** *International Journal of Pharmaceutics*, 184(1), 97-105, 1999.
- LEIGHTON, B. and G. J. COOPER. **Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro.** *Nature* 335(6191), 632-35, 1988.
- LINCE, F.; MARCHISIO, D.L.; BARRESI, A. A. **Strategies tocontrol the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications** *Journal of Colloid and Interface Science* 322, 505–515, 2008.
- LIU *et al.* **Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: Preparation and characterization,** *International Journal of Pharmaceutics*, 340(1-2), 153-162, 2007.
- LOPES, D.H.J. **Polipeptídeo amilóide pancreático: clonagem, expressão heteróloga e amiloidogenicidade.** 2004. 243f. Tese (doutorado em Química Biológica), Rio de Janeiro 2004 UFRJ. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- LORENZO, A., *et al.* **Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus."** *Nature* 368(6473), 756-760, 1994.
- LÜLLMANN, H. *et al.* **Farmacologia: texto e atlas.** 2008, 5ª ed, Artmed, 272-279, 2008
- MAY, P. C., L. N. BOGGS, and K. S. FUSON. **Neurotoxicity of human amylin in rat primary hippocampal cultures: similarity to Alzheimer's disease amyloid-beta neurotoxicity.** *J.Neurochem.* 61(6), 2330-2333, 1993.
- MCAULAY, V.; FRIER, B.M. **Insulin analogues and other developments in insulin therapy for diabetes.** *Expert Opin Pharmacother* 4 (7), 1141-1156, 2003.
- MILES, P. D., et al. **Islet amyloid polypeptide (amylin) increases the renal excretion of calcium in the conscious dog.** *Calcif.Tissue Int.* 55(4), 269-273, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <http://portal.saude.gov.br>. acesso em 17/10/2009

- MOLINA, J. M., et al. **Induction of insulin resistance in vivo by amylin and calcitonin gene-related peptide.** Diabetes 39(2), 260-65, 1990.
- MORLEY, J. E.; J. F. FLOOD. **Amylin decreases food intake in mice.** Peptides 12(4): 865-869, 1991.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório - Princípios e Interpretações – 2009, 5ª Ed.,** Medbook, Rio de Janeiro, 2009.
- MULDER, H., et al. **Islet amyloid polypeptide in the gut and pancreas: localization, ontogeny and gut motility effects.** Peptides 18(6): 771-783, 1997.
- MUNDARGI, R. C. *et al.* **Nano/microtechnologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives.** Journal of Controlled Release 125, 193–209, 2008.
- NATURE GROUP – **Biopharmaceutical firms up R&D spending 89% - 1994.** BIO/TECHNOLOGY VOL. 12 JULY 1994.
- NETTI, C., et al. **Inhibitory effect of amylin on growth hormone responsiveness to growth-hormone-releasing hormone in the rat.** Neuroendocrinology 62(3) 313-318, 1995.
- NILSSON, M.R.; RALEIGH, D.P. **Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin.** J Mol Biol 294, 1375-1385, 1999.
- NIOSI, J. **Biotechnology and Nanotechnology: Science-based Enabling Technologies as Windows of Opportunity for LDCs?** WorldDevelopment 35(3),.426–438, 2007.
- OPIE, E.L. **The relation of diabetes mellitus to lesion of the pancreas: hyaline degeneration of the islands of Langerhans.** J Exp Med 5, 527-540, 1901.
- PAPAS, K.K., SUSZYNSKI, T.M., COLTON, C.K. **Islet assessment for transplantation.** Curr Opin Organ Transplant 14, 674–682, 2009.
- PARMAR, H. C. **Biopharmaceuticals market overview.** Disponível em <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/article/articleDetail.jsp?id=310779>, acesso em 02/01/2010.
- PAVLOU, A. K., REICHERT, J. M. **Recombinant proteins therapeutics – success rates, markets trends and values to 2010,** Nature Biotechnology 22(12), 1513-1519, 2005.
- PÉREZ, C. *et al.* **Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA,** Journal of Controlled Release, 75(1-2), 211-224, 2001.
- PIAO, F. L., et al. **Amylin-induced suppression of ANP secretion through receptors for CGRP1 and salmon calcitonin.** Regul.Pept. 117(3), 159-166, 2004.
- PULLMAN, J.; DARSOW, T.; FRIAS, J. P. **Pramlintide in the management of insulin-using patients with type 2 and type 1 diabetes.** Vasc Health Risk Manag. 2(3),203-12, 2006.
- RASTOGI,R.; ANAND, S. e KOUL, V. **Evaluation of pharmacological efficacy of ‘insulin–surfoplex’ encapsulated polymer vesicles,** International Journal of Pharmaceutics, 373(1-2), 107-115, 2009.
- ROBERTS, A.N. *et al.* **Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus.** Proc Natl. Acad. Sci. USA 86, 9662-9666. 1989.
- ROGLIC, G. *et al.* **The Burden of Mortality Attributable to Diabetes Realistic estimates for the year 2000.** Diabetes Care 28(9), 2130–2135, 2005.

- RONEY, C. *et al.* **Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood–brain barrier for Alzheimer's disease**, J. Control. Release 108, 193–214, 2005.
- SHERIFF, S.; FISCHER, J.E. e BALASUBRAMANIAM, A. **Amylin inhibits insulin-stimulated glucose uptake in C₂C₁₂ muscle cell line through a cholera-toxin-sensitive mechanism**, Bioch. e Biophysica Acta 1136, 219-222, 1992
- SINHA *et al.*, **Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview**, International Journal of Pharmaceutics, 278(1), 1-23, 2004
- SINGH-FRANCO, D.; ROBLES, G.; GAZZE, D. **Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus**. Clinical Therapeutics 29(4), 535-562, 2007.
- TENIDIS, K. *et al.* **Identification of a penta- and a hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties**. J Mol Biol 295, 1055-1071, 2000.
- THOMPSON, R. G., et al. **Pramlintide: a human amylin analogue reduced postprandial plasma glucose, insulin, and C-peptide concentrations in patients with type 2 diabetes**. Diabet.Med. 14. (7), 547-55, 1997.
- UNGARO, F. *et al.* **Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: In vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs**, Journal of Controlled Release 135, 25–34, 2009
- UDENFRIEND, S.*et al.* **Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range**. Science. 178(63), 871-2, 1972.
- USAN council. List No.392. **New names. Amlintide**. Clin Pharmacol Ther. 61(4),500, 1997.
- VERONESE, F. M. **Peptide and protein PEGylation: are view of problems and solutions** Biomaterials 22, 405-417, 2001.
- VINE, W., et al. **Effects of rat amylin on renal function in the rat**. Horm.Metab Res. 30(8): 518-522, 1998.
- VINE, W., et al. **Lactate production from the rat hindlimb is increased after glucose administration and is suppressed by a selective amylin antagonist: evidence for action of endogenous amylin in skeletal muscle**. Biochem.Biophys.Res.Commun. 216(2): 554-559, 1995.
- WAGNER, U., et al. **Amylin immunoreactivity in the rat trachea and characterization of the interaction of amylin and somatostatin on airway mucus secretion.** Res.Exp.Med.(Berl) 195(5): 289-296, 1995.
- WALSH, G. **BIOPHARMACEUTICAL BENCHMARKS 2006**, NATURE BIOTECHNOLOGY 24(7), 769-776, 2006
- WESTERMARK, P. *et al.* **A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibrilprotein in the endocrine pancreas**. Biochem Biophys Res Commun 140, 827-831, 1986.
- WESTERMARK, P. *et al.* **Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid-fibril formation**. Proc Natl Acad Sci USA 13, 5036-5040, 1990.
- WHITEHOUSE, F. *et al.* **A randomized study and open-label extension evaluating the long-term efficacy of pramlintide as an adjunct to insulin therapy in type 1 diabetes**.Diabetes Care 25(4),724-30, 2002.
- WILD, S. *et al.* **Global Prevalence of Diabetes, Estimates for the year 2000 and projections for 2030**. Diabetes Care 27 (5),1047–1053, 2004.

- WOOKEY, P. J., et al. **Amylin as a growth factor during fetal and postnatal development of the rat kidney.** *Kidney Int.* 53(1): 25-30, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION **Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation.** WHO Press, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em <http://www.who.int/diabetes/en/index.html> acesso em 17/10/2009.
- YOUNG, A. A., et al. **Muscle glycogen synthesis and disposition of infused glucose in humans with reduced rates of insulin-mediated carbohydrate storage.** *Diabetes* 37.3 (1988): 303-08.
- YOUNG, A. A., M. W. Wang, and G. J. Cooper. **Amylin injection causes elevated plasma lactate and glucose in the rat.** *FEBS Lett.* 291(1), 101-04, 1991
- YOUNG, A. **Amylin: physiology and pharmacology.** 2005. 341 p. Elsevier Academic Press, London, 2005.
- YOUNG, A., O. Kolterman, and J. Hall. **Amylin innocent in essential hypertension?** *Diabetologia* 42(8), 1029, 1999
- ZHAO, J. et al. **Preparation of hemoglobin-loaded nano-sized particles with porous structure as oxygen carriers,** *Biomaterials*, 28(7), 1414-1422, 2007.

9. ANEXO



Av. Pedro Calmon, 550 • Prédio da Reitoria
8º andar • Sala 810-B • CEP 21941 901
Cidade Universitária • Ilha do Fundão
Rio de Janeiro • RJ • Brasil
Tels.: (21) 2598 1748 / 1838 • Fax: (21) 2598 1806

DECLARAÇÃO

Declaramos que em consonância o que dispõe a Portaria UFRJ nº 2754, de 16 de outubro de 2007, que criou a Agência UFRJ de Inovação e estabeleceu as suas competências e, de acordo com o Art.2º §3º, encontra-se em fase de exame técnico a invenção “Sistema Nanoestruturado de Liberação controlada de Amilina (polipeptídeo amilóide pancreático, IAPP) Humano e Análogos”, em que Luiz Henrique Guerreiro Rosado consta como um dos inventores.

Referida invenção será objeto de pedido de patente que terá como titular a UFRJ, a ser depositado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial/INPI, observadas as normas vigentes.



Ricardo Pereira
Coordenador

