



Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos

Cristiane da Silva Melo¹; Armando da Silva Cunha Junior¹; Sílvia Ligório Fialho^{2,*}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), Brasil.

² Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte (MG), Brasil.

RESUMO

A utilização terapêutica de peptídeos e proteínas é de grande importância para o tratamento de várias doenças. Entretanto, essas macromoléculas, devido às características intrínsecas, muitas vezes não alcançam o local de ação necessário para exercerem sua atividade. Neste contexto, este artigo de revisão apresenta os principais sistemas poliméricos de liberação em estudo atualmente, tais como micro e nanopartículas poliméricas e hidrogéis, que podem melhorar a efetividade do tratamento de doenças que requerem a administração de peptídeos e proteínas. O artigo, também, cita possíveis modificações químicas, tais como a peguilação, que também podem oferecer vantagens para o uso dessas macromoléculas como entidades terapêuticas.

Palavras-chave: Sistemas poliméricos. Proteínas. Liberação controlada.

INTRODUÇÃO

As proteínas são formadas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas e constituem as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, cujas funções são cruciais em todos os processos biológicos. Atuam como catalisadores, transportam e armazenam outras moléculas, fornecem apoio mecânico e proteção imunitária, geram movimento, transmitem impulsos nervosos e controlam o crescimento e a diferenciação celular (Berg et al., 2004). A aplicação das proteínas e peptídeos, como moléculas terapêuticas, é de grande importância para o tratamento de várias doenças devido às altas especificidade e atividade que apresentam em concentrações relativamente pequenas, quando comparadas aos fármacos convencionais (Wang, 1999). Entretanto, a manutenção da complexidade estrutural dessas macromoléculas pode tornar-se uma barreira para que sejam usadas terapeuticamente. Elas

possuem conformação tridimensional, com estrutura secundária, terciária e em alguns casos quaternária, com ligações frágeis e grupos químicos reativos. A destruição dessas estruturas tridimensionais ou modificações na cadeia de resíduos de aminoácidos pode provocar a perda da atividade ou causar imunogenicidade (Sinha & Trehan, 2003).

Desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, nos anos de 1980, é crescente o número de novas moléculas de origem biotecnológica estudadas, como proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e ácidos nucleicos, que apresentam um alto potencial terapêutico. Mais de 125 produtos biotecnológicos já haviam sido aprovados para uso clínico pelo Food and Drug Administration (FDA) até o ano de 2006. No relatório da *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America* de 2006, estão descritas ainda 418 novas substâncias biotecnológicas identificadas para o tratamento de mais de 100 doenças que se encontram em estudos clínicos ou em revisão pelo FDA. Essas doenças incluem, principalmente, o câncer, as doenças infecciosas, as autoimunes e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Biotechnology Medicines in Development, 2011).

Apesar dos avanços biotecnológicos, a aplicação de peptídeos e proteínas como fármacos, ainda constitui um desafio devido aos obstáculos que dificultam o transporte e liberação dessas substâncias no organismo. Enquanto os fármacos convencionais são relativamente estáveis, apresentam baixa massa molecular, são razoavelmente lipofílicos e podem ser transportados satisfatoriamente, através das barreiras celulares para o sangue e seus locais de ação, as proteínas, por sua vez, são instáveis, hidrofílicas, e apresentam elevada massa molecular, estrutura complexa e baixa permeabilidade. Além das limitações encontradas na absorção, os peptídeos e proteínas geralmente apresentam curta meia-vida, devido à degradação enzimática no local de administração ou durante o seu percurso para o local de ação (Almeida & Souto, 2007).

Há, portanto, um crescente número de moléculas de origem biotecnológica com potencial terapêutico, porém acompanhadas de limitações de natureza farmacocinética. Dessa forma, torna-se necessária a utilização de recursos farmacotécnicos para a utilização efetiva dessas macromoléculas. Diferentes sistemas poliméricos têm sido

Autor correspondente: Sílvia Ligório Fialho - Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte (MG), CEP 30510-010 - Brasil - telefone: 31 33144713 - email: silvia.fialho@funed.mg.gov.br

estudados para o transporte de peptídeos e proteínas, sendo os principais as micro e nanopartículas poliméricas e os hidrogéis poliméricos. Estes sistemas podem promover uma liberação prolongada e também proteger as proteínas de degradação e neutralização no organismo, resultando em uma maior atividade (Almeida & Souto, 2007).

As proteínas e os peptídeos terapêuticos são administrados, principalmente, na forma de soluções ou suspensões pela via parenteral (subcutânea ou intravenosa), pois esta via proporciona maior biodisponibilidade (Moeller & Jorgensen, 2008). A via parenteral apresenta algumas desvantagens que incluem o risco de contaminação, dor, desconforto para o paciente, necessidade de preparações estéreis e dificuldade para a auto-administração. Além disso, a administração sistêmica de proteínas requer injeções repetidas, que podem promover uma menor eficácia terapêutica devido à obtenção de níveis sanguíneos irregulares do fármaco e baixa adesão do paciente à terapia (Carrascosa et al., 2004). Muitos esforços de pesquisa estão sendo feitos para melhorar a adesão do paciente ao tratamento, seja através do emprego de vias alternativas de administração, ou pela redução da frequência de injeções por meio do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e/ou prolongada (Jorgensen et al., 2006). Vias alternativas como a oral, pulmonar, nasal, bucal, ocular, retal, vaginal e transdérmica têm sido estudadas (Rosen & Abribat, 2005; Sudhakar et al., 2006).

Desta forma, esta revisão descreve os recentes avanços no estudo de sistemas poliméricos de transporte de peptídeos e proteínas. Ela descreve as principais características e formas de preparo de micropartículas, nanopartículas e hidrogéis poliméricos, além de seus mais recentes estudos. O artigo cita também, possíveis modificações químicas, tais como a peguilação, que também pode oferecer vantagens para o uso dessas macromoléculas como entidades terapêuticas.

Dificuldades na administração de peptídeos e proteínas

Desde a década de 80 descreve-se que uma das principais limitações na utilização das proteínas na clínica se deve à dificuldade de administração por via oral. Atualmente, esta limitação ainda é estudada e discutida, sendo um assunto de intensa pesquisa. A via oral é a rota de administração de medicamentos de primeira escolha e a mais utilizada. No entanto, a instabilidade inerente das proteínas ao trato gastrointestinal, assim como a baixa permeabilidade através das membranas biológicas, devido à alta massa molecular e à superfície polar características, impossibilitam o uso desta via, sendo empregada a via parenteral. No entanto, essa via apresenta inconveniente ao paciente, especialmente nos casos crônicos, diminuindo a adesão ao tratamento, comprometendo, assim, o resultado clínico esperado. Desta forma, esforços estão sendo feitos para melhorar a adesão do paciente, seja através do emprego de vias alternativas de administração ou por redução da frequência de injeções (Frokjaer & Otzen, 2005; Jorgensen et al., 2006; Santos & Fialho, 2007).

A formulação de medicamentos contendo proteínas depende do conhecimento das suas características físico-químicas e biológicas, incluindo estabilidade, imunogenicidade e propriedades farmacocinéticas. A

estrutura da proteína é flexível e sensível a condições externas, o que significa que a sua produção, formulação e manipulação necessitem de atenção especial (Frokjaer & Otzen, 2005; Santos & Fialho, 2007).

O aumento do uso das proteínas terapêuticas na indústria farmacêutica tem salientado questões como a sua estabilidade durante o período de estocagem e a liberação eficaz de forma a evitar a ocorrência de efeitos adversos. Modificações químicas controladas tais como substituições, acilação e peguilação têm cumprido algumas, mas não todas as suas promessas, enquanto sistemas poliméricos podem desempenhar um papel importante (Frokjaer & Otzen, 2005; Santos & Fialho, 2007).

Modificações de peptídeos e proteínas

As proteínas terapêuticas, inicialmente aprovadas para uso na medicina geral, eram simples proteínas de reposição (ex. insulina recombinante e fatores sanguíneos). Nos últimos anos, tem-se observado um aumento proporcional dos biofármacos desenvolvidos como proteínas modificadas ou análogos. O objetivo dessas modificações é alterar as propriedades das proteínas, tais como a eficácia, a estabilidade, a especificidade, a imunogenicidade e a farmacocinética, buscando assim, a melhoria terapêutica (Buckel, 1996).

A conjugação química com polietilenoglicol (PEG), denominada peguilação, é uma técnica utilizada para prolongar o tempo de permanência das proteínas no sangue e para, em alguns casos, promover uma liberação local do fármaco. A peguilação diminui a taxa de eliminação plasmática por reduzir a degradação metabólica e a endocitose da proteína da corrente sanguínea mediada por receptores. Esta modificação também reduz a imunogenicidade e melhora o perfil de segurança da proteína por proteger epítomos imunogênicos. Muitas proteínas peguiladas já estão no mercado, incluindo peg-adenosine adenosine (Adagen®, Enzon Pharmaceuticals, EUA), pegfilgrastim (Neulasta®, Amgen, EUA), PEG-L-asparaginase (Oncaspar®, Enzon, EUA), pegvisomant (Somavert®, Pfizer, EUA), PEG-alpha-interferon-2b (PegIntron®, Schering-Plough, EUA) e PEG-alpha-interferon-2a (Pegasys®, Roche, Suíça) (Almeida & Souto, 2007).

A polisialização consiste na conjugação de peptídeos e proteínas com o ácido poli-sialílico. A polisialização promete ser tão efetiva quanto à peguilação, mas sem o inconveniente de toxicidade. O PEG não é biodegradável e, quando conjugado com proteínas, não é eliminado pelo rim e termina acumulando-se em tecidos dentro dos lisossomas celulares. Os ácidos poli-sialílicos são polímeros lineares do ácido N-acetilneuramínico e estão, abundantemente, presentes na superfície das células e em muitas proteínas. A polisialização de proteínas e peptídeos terapêuticos tem resultado em uma marcante redução da proteólise, prolongamento do tempo de meia-vida na circulação e redução da imunogenicidade e antigenicidade, com a manutenção da atividade biológica da proteína *in vivo* (Gregoriadis et al., 2005).

As modificações químicas em peptídeos e proteínas podem proporcionar inúmeras vantagens, mas ainda não têm cumprido todas as suas promessas. Os sistemas de

liberação prolongada associados ou não às modificações químicas também têm sido muito explorados e podem desempenhar um papel importante na melhoria da utilização dos peptídeos e proteínas terapêuticos (Frokjaer & Otzen, 2005).

Sistemas de liberação poliméricos para administração de proteínas e peptídeos

A existência de diferentes sistemas de liberação aumentou o questionamento sobre qual deles poderia ser o mais adequado para a finalidade desejada. Claro que não há uma resposta simples para essa questão. Os aspectos a serem considerados para o apropriado desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos incluem: capacidade de incorporação do fármaco, possibilidade de liberação local-específica, o destino *in vivo* do sistema (interação com moléculas biológicas, taxa de degradação, acúmulo em órgãos, toxicidade aguda e crônica), possibilidade de produção em larga escala e custos (Mehnert, 2001).

A maior complexidade bioquímica e estrutural das proteínas terapêuticas, comparada com os fármacos convencionais, torna o preparo da formulação dessas macromoléculas uma tarefa difícil e desafiadora. O desenvolvimento de sistemas para liberação de proteínas depende ainda das características fisiológicas, biofísicas e bioquímicas das moléculas de proteínas, incluindo seu tamanho molecular, tempo de meia-vida biológico, imunogenicidade, estabilidade conformacional, dose requerida, local e taxa de administração, farmacocinética e farmacodinâmica. A estabilidade química e física das proteínas deve ser avaliada para a escolha do método de preparação da formulação, pois pode ser comprometida por fatores ambientais presentes nos processos de produção, como pH, temperatura, alta pressão, solventes não aquosos, íons metálicos e agitação, que podem levar a perda da atividade da proteína (Sinha & Trehan, 2003; Almeida & Souto, 2007).

Os principais sistemas de liberação poliméricos, em estudo atualmente, incluem as micropartículas e nanopartículas poliméricas e os hidrogéis poliméricos. Estes sistemas, que serão descritos a seguir, podem melhorar a terapêutica com peptídeos e proteínas já que podem oferecer liberação prolongada e/ou local-específica, redução dos efeitos adversos e um aumento da biodisponibilidade do biofármaco.

Micropartículas Poliméricas

As micropartículas (Figura 1) são definidas como sistemas poliméricos de tamanho entre 1 a 1000 μm . Elas são classificadas em duas categorias, microcápsulas e microesferas, sendo que as microcápsulas são sistemas poliméricos do tipo reservatório, enquanto as microesferas são sistemas matriciais (Benoit et al., 1996).

As micropartículas poliméricas têm sido muito estudadas como sistemas de liberação de peptídeos e proteínas terapêuticos por promoverem liberação prolongada e proteção contra degradação do fármaco incorporado no organismo, resultando em uma maior eficácia terapêutica. Entretanto, esse sistema é inadequado para a administração intravenosa e liberação local-específica devido ao diâmetro das partículas (Mehnert & Mader, 2001). Os problemas que podem estar associados à formulação, como a perda da atividade da proteína durante o processo de produção e a exibição de um perfil de liberação inadequado do agente incorporado, limitam a quantidade de produtos já comercializados. Esses problemas encontrados no desenvolvimento da formulação de micropartículas podem ser solucionados ou pelo menos minimizados pela otimização do tamanho da partícula, escolha adequada do método de preparo e do polímero utilizado e pelo uso de estabilizantes para proteínas (Sinha & Trehan, 2003; Giteau et al., 2008; Mundargi et al., 2008).

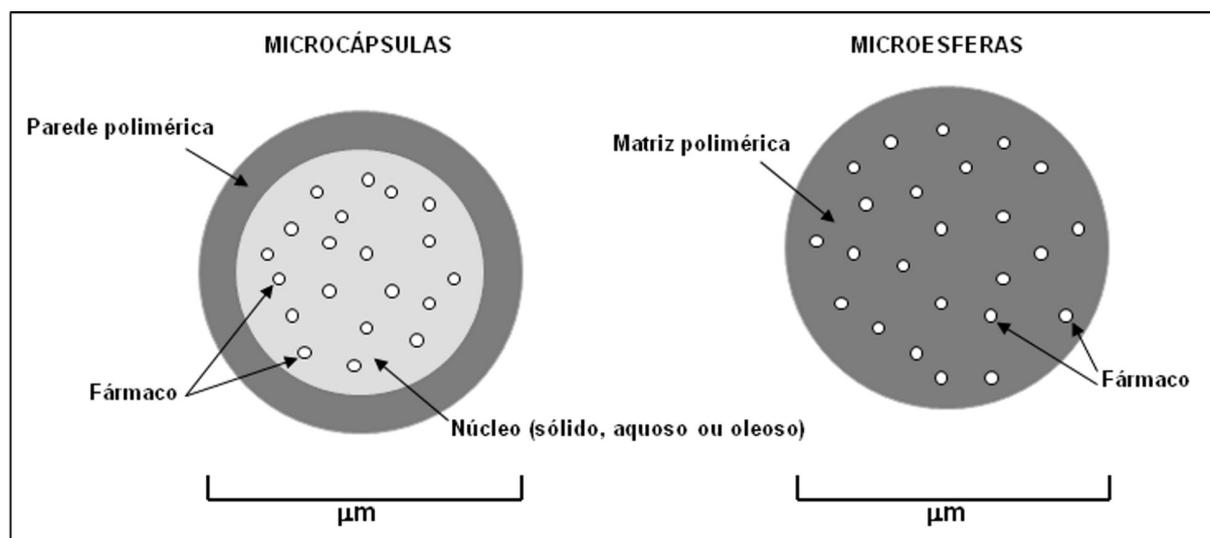


Figura 1: Representação de micropartícula (microcápsula e microesfera) e de nanopartícula (nanocápsula e nanoesfera).

As micropartículas são constituídas, principalmente, por polímeros biodegradáveis, que geralmente não possuem problemas de toxicidade e dificuldade de eliminação do organismo. Uma variedade de polímeros biodegradáveis sintéticos e naturais tem sido estudada, incluindo poliésteres, polianidridos, poliortoésteres e polissacarídeos (Sinha & Trehan, 2003). Entre esses, o copolímero biodegradável dos ácidos lático e glicólico (PLGA), da classe dos poliésteres, tem sido o mais usado no desenvolvimento de nano e micropartículas para liberação prolongada de fármacos (Mundargi et al., 2008).

Diferentes métodos são descritos para o preparo de micropartículas, sendo que, para a incorporação de peptídeos e proteínas, os mais usados são os métodos de emulsão múltipla, de separação de fase e de secagem por aspersão (*spray drying*) (Mundargi et al., 2008). Inicialmente, para esses três métodos, uma emulsão de água em óleo é obtida pela dispersão de uma solução aquosa contendo a proteína a ser encapsulada em um solvente orgânico contendo o

polímero dissolvido. No método de emulsão múltipla, esta emulsão é emulsificada, com uma grande quantidade de meio aquoso, para formar uma emulsão múltipla de água em óleo em água, onde a proteína se encontra na fase aquosa interna e o polímero na fase orgânica (ou oleosa); as micropartículas são posteriormente formadas pela remoção do solvente. No método de separação de fases, um não-solvente é adicionado sobre agitação à emulsão de água em óleo obtida, onde a proteína se encontra na fase aquosa interna e o polímero na fase orgânica (ou oleosa) induzindo a coacervação e formação das micropartículas. E no método de secagem por aspersão as micropartículas são formadas pela atomização da emulsão de água em óleo (a proteína se encontra na fase aquosa interna e o polímero na fase orgânica ou oleosa), dentro de uma corrente de ar quente onde ocorre vigorosa evaporação do solvente. A Tabela 1 lista os últimos estudos utilizando proteínas encapsuladas em micropartículas poliméricas.

Tabela 1- Estudos utilizando proteínas encapsuladas em micropartículas poliméricas.

Proteína	Polímero	Método de preparo	Principais resultados	Referência
Insulina	Alginato	Spray drying	- Eficiência de encapsulamento de 38,2±9,5% - Método de preparo não alterou a estrutura da proteína.	Bowey et al., 2012
Interferon-alfa	PCL	emulsão múltipla seguido de evaporação do solvente	- Encapsulamento de 16% da proteína - 82% do interferon-alfa encapsulado foi liberado em 28 dias	Melo et al., 2012
Lisozima	HPMC e quitosano	Liofilização	- Liberação mais lenta <i>in vitro</i> da proteína incorporada nas micropartículas; - aumento significativo da permeação <i>in vitro</i>	Cho et al., 2011
Hormônio do crescimento	PLGA	emulsão múltipla seguido de evaporação do solvente	- Eficiência de encapsulamento de 45%; proteína foi encontrada no soro de animais por um período de 30 dias.	Rafi et al., 2010
Toxóide diftérico e tetânico	PLGA	emulsão múltipla seguido de evaporação do solvente	Houve indução da proteção <i>in vivo</i> , apesar de ser observada degradação da proteína <i>in vitro</i>	Quintilio et al., 2009

Geng e colaboradores (Geng et al., 2008) desenvolveram microesferas de PLGA contendo eritropoetina, que é considerada a proteína que forma agregados mais facilmente durante o processo de microencapsulação, gerando séria resposta imunológica *in vivo*. Neste estudo, foram obtidas partículas de dextrano contendo eritropoetina, e a proteína apresentou resistência a solventes orgânicos e foi encapsulada sem degradação significativa. A eritropoetina foi liberada das microesferas preparadas de forma prolongada, e uma única injeção da formulação em ratos resultou em uma elevação das hemácias correspondente a 12 injeções da formulação em solução. Os resultados obtidos indicaram que os camundongos que receberam as microesferas não desenvolveram uma resposta imunológica contra a eritropoetina maior do que a observada com a aplicação da proteína em solução.

Em um estudo realizado por Cho e colaboradores (Cho et al., 2011), micropartículas para a administração nasal de proteínas foram desenvolvidas. As micropartículas foram preparadas utilizando hidroxipropilmetilcelulose ou quitosana como polímeros e lisozima como proteína e apresentavam diâmetro entre 6 e 12 μm . A manutenção da conformação da proteína foi confirmada por eletroforese e o estudo *in vitro* mostrou que a atividade da lisozima foi

mantida durante o processo de preparo das micropartículas. O estudo de liberação *in vitro* mostrou uma liberação mais lenta da proteína incorporada nas micropartículas e um aumento significativo da permeação *in vitro*.

Em nosso grupo de pesquisa, o interferon-alfa foi encapsulado em microesferas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), visando a obtenção de uma alternativa aos tratamentos atuais da hepatite C crônica (Melo et al., 2012). As microesferas apresentaram encapsulamento de 16% da proteína, sem alterações significativas na integridade estrutural do interferon, durante o processo de preparo do sistema polimérico. Observou-se também que, 82% do interferon-alfa encapsulado foi liberado em 28 dias e as microesferas desenvolvidas não apresentaram citotoxicidade para linhagem de células hepáticas.

Em um trabalho recente, micropartículas de alginato-poloxamer visando à administração pulmonar de proteínas foram preparadas (Moebus et al., 2012). Para o preparo das micropartículas contendo albumina bovina foi usada a técnica de secagem por aspersão seguida de cross-linking (ligação cruzada) das partículas. As micropartículas desenvolvidas apresentaram tamanho entre 4-6 μm e são adequadas para a administração pulmonar com liberação controlada de proteínas.

Nanopartículas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas (Figura 2) são sistemas coloidais poliméricos com tamanho entre 10 e 1000 nm, onde o fármaco pode se encontrar dissolvido, recoberto, encapsulado ou disperso. Elas são classificadas em duas categorias, as nanocápsulas e as nanoesferas. As

nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco encontra-se no interior de uma cavidade aquosa ou oleosa, a qual é circundada por uma membrana polimérica. As nanoesferas são sistemas matriciais em que o fármaco encontra-se disperso fisicamente e uniformemente na matriz (Dés Rieux et al., 2006).

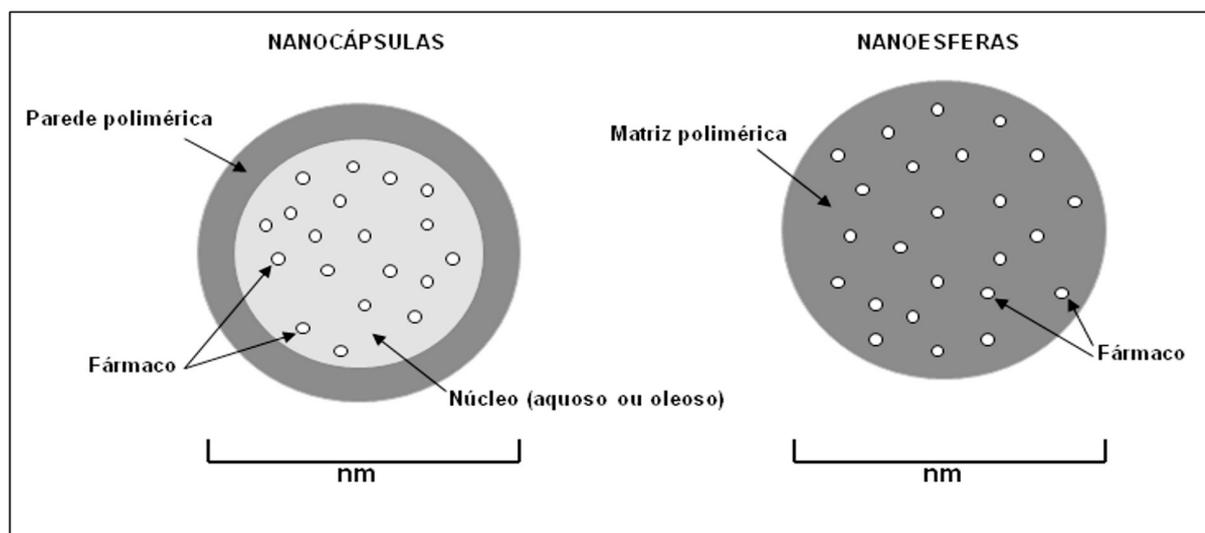


Figura 2: Representação de nanopartícula (nanocápsula e nanoesfera).

As vantagens da utilização de nanopartículas incluem a liberação controlada e/ou prolongada da substância nelas encapsuladas, a redução de efeitos adversos associados à substância, a proteção de compostos da inativação antes de atingirem o local da ação e o aumento da penetração intracelular (Teixeira et al., 2005). É possível introduzir nas nanopartículas modificações em sua superfície por adsorção ou ligação química de certas moléculas como compostos bioativos, que podem promover a liberação local-específica (Mahapatro & Singh, 2011). O pequeno diâmetro das nanopartículas oferece vantagens sobre as micropartículas para a administração oral. Muitos pesquisadores têm observado que o número de nanopartículas que atravessa o epitélio intestinal é bem maior que o de micropartículas. O tamanho das nanopartículas também favorece a administração parenteral (Reis et al., 2006).

Os problemas associados às nanopartículas poliméricas são provenientes de resíduos de solventes orgânicos usados no processo de produção, da citotoxicidade do polímero e do aumento da escala de produção para a aplicabilidade industrial. Em muitos processos de produção a concentração de nanopartículas é baixa e não ultrapassa 2% (Mehnert & Mader, 2001).

Os polímeros usados na formulação de nanopartículas são os mesmos empregados para o preparo das micropartículas e incluem os sintéticos (ácido poli-lático, copolímeros dos ácidos lático e glicólico, poli(ϵ -caprolactona), polimetilmetacrilatos e polialquilcianoacrilatos) e os naturais (albumina, gelatina,

alginato, colágeno e quitosana). Os poliésteres, como por exemplo, o ácido poli-lático, os copolímeros dos ácidos lático e glicólico e a poli(ϵ -caprolactona), sozinhos ou em combinação com outros polímeros são os mais comumente usados nas formulações de nanopartículas (Lu et al., 2011).

Diferentes métodos são encontrados para o preparo de nanopartículas poliméricas, os quais permitem a modulação de sua estrutura, da sua composição e das suas propriedades fisiológicas (Dés Rieux et al., 2006; Grabnar & Kristl, 2011). A escolha do método de preparo depende do polímero e da solubilidade do fármaco a ser encapsulado (Reis et al., 2006). Para a incorporação de peptídeos e proteínas, os métodos mais usados para o preparo de nanopartículas são os de emulsão múltipla, secagem por aspersão e separação de fase, semelhante à fabricação de micropartículas (Mundargi et al., 2008).

Para os métodos de emulsão múltipla e separação de fase, independente do modo de preparo, a formulação final obtida é uma dispersão coloidal aquosa. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio aquoso, resultando em problemas na estabilidade da formulação que podem ser minimizados pela secagem das dispersões. A técnica de liofilização tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais (Schaffazick et al., 2003). No caso da técnica de secagem por aspersão, o produto final obtido já se encontra na forma de pós, o que poderia garantir sua maior estabilidade. A Tabela 2 lista os últimos estudos utilizando proteínas encapsuladas em micropartículas poliméricas.

Tabela 2- Estudos utilizando proteínas encapsuladas em nanopartículas poliméricas.

Proteína	Polímero	Método de preparo	Principais resultados	Referência
17-AAG	PLGA-PEG-ácido fólico	Nanoprecipitação	- Encapsulamento de $8,25 \pm 2,49\%$ - 80% da proteína foi liberado em 10 dias; - maior penetração intracelular de nanopartículas contendo ácido fólico.	Saxena et al., 2012
Amilina	PCL	emulsão simples seguido de evaporação do solvente	- Eficiência de encapsulamento de 80%; - Liberação controlada in vitro por 240 hs; - Redução da glicemia por 36 hs.	Guerreiro et al., 2012
Insulina	PLGA	emulsão multipla seguido de evaporação do solvente	- Aumento da bioadesão - Ausência de citotoxicidade	Zhang et al., 2012
Ovalbumina (OVA)	Ácido poli- γ -glutâmico (γ -PGA)	emulsão simples seguido de evaporação do solvente	- nanopartículas foram captadas pelos macrófagos e transportaram a OVA do endossomo para o citoplasma; - o tamanho da partícula influenciou a degradação intracelular.	Akagi et al., 2011
Insulin	Poli-etil-2-cianoacrilato (PECA)	Polimerização interfacial	- Encapsulamento médio de insulina de 78%; Liberação in vitro de insulina foi controlada e apenas 30% permaneceram no sistema.	McDowell et al., 2009

Jain e colaboradores (Jain et al., 2008) prepararam nanopartículas de amido como um sistema mucoadesivo para administração intranasal de insulina. O efeito hipoglicêmico apresentado pela administração intranasal das nanopartículas preparadas em ratos diabéticos foi prolongado e significativo por até 6 horas. A melhor formulação obtida mostrou 48,6% de atividade farmacológica quando comparada à administração subcutânea da proteína.

Em trabalho realizado pelo nosso grupo, foram desenvolvidas nanopartículas de PLGA contendo proteínas tumorais como adjuvantes para vacinas (Prata, 2011). Os sistemas desenvolvidos apresentaram uma taxa de encapsulamento de 59% da proteína e não causaram toxicidade para linhagem de células renais embrionárias.

Em um trabalho recente desenvolvido por Zhang et al. (2012) foram preparadas nanopartículas de PLGA revestidas de quitosana contendo insulina. As nanopartículas desenvolvidas, carregadas positivamente, apresentaram maior capacidade de bioadesão quando comparadas às nanopartículas com carga negativa. Não foi evidenciado sinal de citotoxicidade da formulação desenvolvida.

Hidrogéis Poliméricos

Os hidrogéis (Figura 3) são sistemas que apresentam estrutura tridimensional de cadeias de polímeros solúveis em água, com ligações cruzadas e grande quantidade de água, geralmente mais que 50 % do peso total. Esses sistemas podem ser formulados em uma grande variedade de formas físicas, incluindo formulações de depósito, micropartículas, nanopartículas, revestimentos e filmes. Estas formas farmacêuticas têm sido muito usadas em sistemas de liberação de proteínas, especialmente para aplicações em engenharia de tecidos (Lee & Yuk, 2007; Hoare & Kohane, 2008).

Os hidrogéis apresentam uma estrutura altamente porosa que pode ser facilmente modelada pelo controle do número de ligações cruzadas e pela hidrofiliabilidade do polímero. A porosidade permite a liberação de fármacos a uma taxa dependente do coeficiente de difusão das moléculas no hidrogel. A biodegradação ou dissolução desses sistemas pode ocorrer por via enzimática, hidrolítica

ou dependente de modificações do meio (pH, temperatura ou campo elétrico) (Lee & Yuk, 2007).

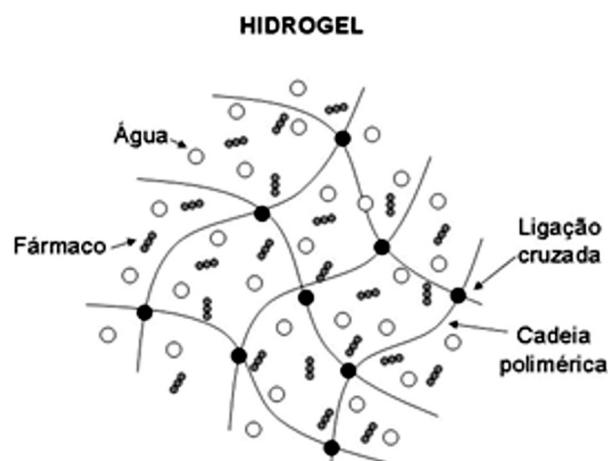


Figura 3: Representação da estrutura do hidrogel.

Apesar das inúmeras vantagens, os hidrogéis apresentam muitas limitações. Essa forma farmacêutica pode dissolver prematuramente ou fluir do local da aplicação onde seria desejada a liberação do fármaco por via tópica. O grande conteúdo de água e os poros largos da maioria dos hidrogéis frequentemente geram uma liberação relativamente rápida do fármaco, dentro de um período de poucas horas a poucos dias. Além disso, a aplicação também pode ser problemática, pois alguns hidrogéis são suficientemente deformáveis para serem injetados e outros não, necessitando de implantação cirúrgica (Hoare & Kohane, 2008).

Os géis sensíveis à temperatura são sistemas promissores para o desenvolvimento de formulações injetáveis. Soluções aquosas de certos polímeros exibem baixa viscosidade a temperatura ambiente, permitindo que a solução flua pela seringa durante a injeção, e exibem um intenso aumento de viscosidade em temperaturas mais elevadas, produzindo um gel como um depósito do fármaco a temperatura corporal. Muitos polímeros com

essa sensibilidade térmica têm surgido, tais como o poli-isopropilacrilamida e o copolímero dos óxidos de etileno e propileno (Liu et al., 2007).

Géis sensíveis a estímulos, como pH, resíduos químicos, biomoléculas, campo elétrico e sinais mecânicos, têm sido desenvolvidos recentemente para liberação de fármacos. As mudanças no ambiente induzem modificações estruturais nos géis que ocasionam a liberação do fármaco no ambiente pretendido ou de forma planejada (Liu et al., 2007; Sokker et al., 2009).

Os hidrogéis podem ser constituídos por polímeros naturais como fibrina, alginato e quitosana ou por polímeros sintéticos como óxido de polietileno e álcool polivinílico. Várias técnicas para a obtenção das ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas do hidrogel podem ser usadas, incluindo a fotopolimerização por luz ultravioleta e métodos químicos (Hoare & Kohane, 2008).

Géis biodegradáveis, sensíveis ao pH, formados *in situ* e a base de quitosana, foram desenvolvidos para liberação de insulina em resposta a um aumento da concentração de glicose (Kashyap et al., 2007). Neste trabalho, o gel era constituído por glicose ligada às cadeias do polímero. A enzima glicose oxidase converte a glicose em ácido glicurônico na presença de oxigênio e a formação do ácido resulta na diminuição do pH, levando ao inchaço do gel e consequente aumento da permeabilidade à água, facilitando, dessa forma, a liberação de insulina por difusão. A eficácia das formulações foi avaliada *in vitro* e *in vivo* em ratos diabéticos e os resultados demonstraram a capacidade do sistema em liberar insulina em resposta a concentrações elevadas de glicose. A Tabela 3 lista os últimos estudos utilizando proteínas incorporadas em hidrogéis poliméricos.

Tabela 3- Estudos utilizando proteínas incorporadas em hidrogéis poliméricos.

Proteína	Polímero	Método de preparo	Principais resultados	Referência
Albumina	Hidroxietilcelulose e PVA	Polimerização química	- Liberação sustentada da proteína por 160 dias.	Appel et al., 2012
Influenza H5N1	Quitosana	Polimerização química	- Aumento do tempo de permanência do antígeno na cavidade nasal; - Aumento do transporte transepitelial; - Maior resposta imune.	Wu et al., 2012
Albumina	CMC-acrilato de sódio-alginato de sódio	Polimerização química	- Estudos confirmaram que o hidrogel formado é pH sensível; A quantidade de albumina liberada em 2 hs em pH 2,1 foi relativamente baixa (18,1%) e maior após 8 hs em pH 7,4.	El-Sherbiny et al., 2011
<i>Horseradish</i> peroxidase	Alginato de cálcio e derivados de dextrano-metacrilato	Fotopolimerização por luz ultravioleta	- A massa molar e o grau de polimerização das cadeias de dextrano afetam a velocidade de liberação da proteína; - Não houve alteração da atividade enzimática da proteína	Pescosolido et al., 2010
Insulina	Quitosana	Polimerização química	- O sistema foi capaz de liberar insulina em resposta a concentrações elevadas de glicose.	Kashyap et al., 2007

Em um trabalho realizado por Nelson e colaboradores (Nelson et al., 2012), uma formulação de hidrogel termo-sensível biodegradável contendo ou não micropartículas dispersas em sua estrutura e com capacidade de incorporação de proteínas foi desenvolvido. A albumina bovina foi utilizada como modelo e foi liberada dos sistemas por 3 meses. As microesferas incorporadas no hidrogel liberaram a proteína mais lentamente e são adequadas para a utilização em aplicações de engenharia de tecidos.

Recentemente, uma formulação de hidrogel termo-sensível como vacina para administração intranasal e imunização de influenza H5N1 foi desenvolvida (Wu et al., 2012). O gel foi capaz de prolongar o tempo de permanência do antígeno na cavidade nasal e também promoveu um aumento do transporte transepitelial. Comparado ao antígeno de H5N1 sozinho e incorporado ao adjuvante MF59, o hidrogel induziu maior resposta imune.

CONCLUSÕES

A administração de proteínas e peptídeos ainda é um desafio, já que eles apresentam curto tempo de meia-vida no organismo, devido à degradação enzimática e pequena permeabilidade através das membranas biológicas. Dessa forma, essas macromoléculas, independente da via de administração utilizada, muitas vezes não alcançam o local de ação necessário para exercerem sua atividade como entidades terapêuticas. Entretanto, os sistemas de liberação em estudo tais como, micro e nanopartículas poliméricas, emulsões e hidrogéis, podem superar essas limitações existentes por oferecerem proteção contra degradação, aumento da permeabilidade através de membranas e liberação prolongada e/ou local-específica. As dificuldades encontradas para a preparação dessas formas farmacêuticas vêm sendo melhoradas constantemente por pesquisas de novos métodos de produção. Esses sistemas para liberação

de proteínas e peptídeos são candidatos potenciais para o desenvolvimento de novos medicamentos, que serão de importante aplicação para o tratamento de doenças ainda sem terapêutica totalmente eficaz e para a melhoria da adesão do paciente, seja pela redução do número de injeções, ou pela administração por outras vias que não a parenteral.

ABSTRACT

Polymeric delivery systems for the administration of therapeutic peptides and proteins

The therapeutic application of peptides and proteins is of great importance for the treatment of numerous diseases. However, due to intrinsic properties of these macromolecules, they sometimes fail to reach the site of action required to promote their therapeutic effect. In this context, this review presents the main drug delivery systems under study nowadays, such as polymeric micro and nanoparticles and hydrogels, that can improve the effectiveness of the treatment of diseases that require the administration of peptides and proteins. The article also describes possible chemical modifications, such as pegylation, that can offer advantages for the use of these macromolecules as therapeutic agents.

Keywords: Polymeric systems. Protein. Controlled release.

REFERÊNCIAS

- Akagi T, Shima F, Akashi M. Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(21):4959-67.
- Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems for peptides and proteins. *Adv Drug Del Rev*. 2007;59(6):478-90.
- Appel EA, Loh XJ, Jones ST, Dreiss CA, Scherman OA. Sustained release of proteins from high water content supramolecular polymer hydrogels. *Biomaterials*. 2012;33(18):4646-52.
- Benoit J, Marchais H, Rolland H, Velde VV. Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology. In: Benita S. Microencapsulation: methods and industrial applications. New York: Marcel Dekker Inc; 1996. chap. 3.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Estrutura e Função das Proteínas. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 124-139.
- Bowey K, Swift BE, Flynn LE, Neufeld RJ. Characterization of biologically active insulin-loaded alginate microparticles prepared by spray drying. *Drug Dev Ind Pharm*. 2012. DOI:10.3109/03639045.2012.662985.
- Buckel P. Recombinant proteins for therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17(12):450-6.
- Carrascosa C, Torres-Aleman I, Lopez-Lopez C, Carro E, Espejo L, Torrado S, Torrado JJ. Microspheres containing insulin-like growth factor I for treatment of chronic neurodegeneration. *Biomaterials*. 2004;25(4):707-14
- Cho HJ, Balakrishnan P, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Evaluation of protein stability and in vitro permeation of lyophilized polysaccharides-based microparticles for intranasal protein delivery. *Int J Pharm*. 2011;416(1):77-84.
- Dés Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y, Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J Control Release*. 2006;116(1):1-27.
- El-Sherbiny IM, Salama A, Sarhan AA. Ionotropically cross-linked pH-sensitive IPN hydrogel matrices as potential carriers for intestine-specific oral delivery of protein drugs. *Drug Dev Ind Pharm*. 2011;37(2):121-30.
- Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):298-306.
- Geng Y, Yuan W, Wu F, Chen J, He M, Jin T. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation. *J Control Release*. 2008;130(3):259-65.
- Giteau A, Venier-Julienne MC, Aubert-Pou essel A, Benoit JP. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int J Pharm*. 2008;350(1-2):14-26.
- Grabnar PA, Kristl J. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *J Microencapsul*. 2011;28(4):323-35.
- Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids. *Int J Pharm*. 2005;300(1-2):125-30.
- Guerreiro LH, Da Silva D, Ricci-Junior E, Girard-Dias W, Mascarenhas CM, Sola-Penna M, Miranda K, Lima LM. Polymeric particles for the controlled release of human amylin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;94:101-6.
- Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008;49(8):1993-2007.
- Jain AK, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV. Effective insulin delivery using starch nanoparticles as a potential trans-nasal mucoadhesive carrier. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;69(2):426-35.
- Jorgensen L, Moeller EH, Van de Weert M, Nielsen HM, Frokjaer S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *Eur J Pharm Sci*. 2006;29(3-4):174-82.
- Kashyap N, Viswanad B, Sharma G, Bhardwaj V, Ramarao P, Ravi Kumar MNV. Design and evaluation of biodegradable, biosensitive in situ gelling system for pulsatile delivery of insulin. *Biomaterials*. 2007;28(11):2051-2060.
- Lee KY, Yuk SH. Polymeric protein delivery systems. *Prog Polym Sci*. 2007;32(7):669-97.
- Liu Y, Lu W, Wang J, Zhang X, Zhang H, Wang X, Zhou T, Zhang Q. Controlled delivery of recombinant hirudin

- based on thermo-sensitive Pluronic® F127 hydrogel for subcutaneous administration: In vitro and in vivo characterization. *J Control Release*. 2007;117(3):387-95.
- Lu XY, Wu DC, Li ZJ, Chen GQ. Polymer nanoparticles. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;104:299-323.
- Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology*. 2011;28:9-55.
- McDowell A, McLeod BJ, Rades T, Tucker IG. Polymeric nanoparticles as an oral delivery system for biocontrol agents for the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *N Z Vet J*. 2009;57(6):370-7.
- Biotechnology Medicines in Development. Research Promises to Bolster the Future of Medicine with More Than 900 Medicines and Vaccines in Development. 2011. [cited 2012 February 14]. Available from: <http://www.phrma.org/sites/default/files/1776/biotech2011.pdf>
- Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Del Rev*. 2001;47(2-3):165-96.
- Melo CS, Pereira BG, Silva-Cunha A, Fialho SL. Poly-ε-caprolactone microspheres containing interferon alpha as alternative formulations for the treatment of chronic hepatitis C. *Braz J Pharm Sci*. 2012;48(1). DOI: 10.1590/S1984-82502012000100006.
- Moebus K, Siepmann J, Bodmeier R. Novel preparation techniques for alginate poloxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(3):358-66.
- Moeller EH, Jorgensen L. Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals. *Drug Discov Today Technol*. 2008;5(2-3):e89-e94.
- Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*. 2008;125(3):193-209.
- Nelson DM, Ma Z, Leeson CE, Wagner WR. Extended and sequential delivery of protein from injectable thermoresponsive hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(3):776-85.
- Pescosolido L, Miatto S, Di Meo C, Cencetti C, Coviello T, Alhaique F, Matricardi P. Injectable and in situ gelling hydrogels for modified protein release. *Eur Biophys J*. 2010;39(6):903-909.
- Prata, WM. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de proteínas como potenciais adjuvantes para uso em vacinas. [Dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.
- Quintilio W, Takata CS, Sant'Anna OA, da Costa MH, Raw I. Evaluation of a diphtheria and tetanus PLGA microencapsulated vaccine formulation without stabilizers. *Curr Drug Deliv*. 2009;6(3):297-04.
- Rafi M, Singh SM, Kanchan V, Anish CK, Panda AK. Controlled release of bioactive recombinant human growth hormone from PLGA microparticles. *J Microencapsul*. 2010;27(6):552-60.
- Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine*. 2006;2(2):53-65.
- Rosen H, Aribat T. The rise and rise of drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(5):381-5.
- Santos RMM, Fialho SL. Nanopartículas: uma alternativa para a administração de biofármacos. *Biocientia Cienc Desenvolv*. 2007;37:52-9.
- Saxena V, Naguib Y, Hussain MD. Folate receptor targeted 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric nanoparticles for breast cancer. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;1(94):274-80
- Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AF. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*. 2003;26(5):726-37.
- Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release*. 2003;90(3):261-80.
- Sokker HH, Abdel Ghaffar AM, Gad YH, Aly AS. Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release. *Carbohydr Polym*. 2009;75(2):222-9.
- Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release*. 2006;114(1):15-40.
- Teixeira M, Alonso MJ, Pinto MMM, Barbosa CM. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;59(3):491-500.
- Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*. 1999;185(2):129-88.
- Wu Y, Wei W, Zhou M, Wang Y, Wu J, Ma G, Su Z. Thermal-sensitive hydrogel as adjuvant-free vaccine delivery system for H5N1 intranasal immunization. *Biomaterials*. 2012;33(7):2351-60.
- Zhang X, Sun M, Zheng A, Cao D, Bi Y, Sun J. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(5):632-8.

Recebido em 14 de fevereiro de 2012

Aceito para publicação em 18 de maio de 2012

