

# **ESTUDO BIOQUÍMICO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA INSULINA SUBMETIDA AO PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO EM MICROESFERAS DE PLGA**

*Lucas Rodrigues de Carvalho (IC-CNPq/UFPI - Parnaíba), Paulo Henrique de Holanda Veloso Júnior (colaborador, UFPI – Parnaíba), Antônio Carlos Melo Lima Filho (colaborador, UFPI – Parnaíba), Reginaldo Almeida da Trindade (Orientador, Depto de Biomedicina – UFPI – Parnaíba)*

## **INTRODUÇÃO**

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Quando a produção de insulina é inadequada ocorre o diabetes *mellitus*, cujo tratamento com insulina tem como objetivo obter níveis plasmáticos idênticos aos da secreção fisiológica bimodal em indivíduos não diabéticos. A encapsulação da insulina em microesferas de PLGA, um novo método de liberação controlada de proteínas terapêuticas injetáveis, poderia permitir uma diminuição nas doses injetáveis devido a sua reduzida absorção a partir do local da injeção ou mesmo permitir a administração oral do peptídeo sem danos durante a passagem pelo TGI. Um dos principais desafios atuais de uma formulação de insulina em sistema de liberação controlada é alcançar a estabilidade necessária durante seu processo de encapsulação, o que garantiria e prolongaria a eficiência do tratamento. Com isso, vem sendo adicionado estratégias para evitar esses inconvenientes.

Portanto, este trabalho teve como objetivo determinar e padronizar as dosagens de insulina, para, subsequentemente, utilizá-los na detecção do peptídeo após o processamento com diferentes soluções salinas, atuando como excipientes, além da análise estrutural da insulina antes e após o processamento pelos métodos de fluorescência intrínseca e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

## **METODOLOGIA**

Para caracterização das proteínas, inicialmente foi determinado o método mais adequado para medidas da sua concentração. Neste trabalho, foi optado por três diferentes métodos, já classicamente conhecidos na literatura, ou seja, a dosagem a 280 nm, o método de Lowry e o método de Bradford. Por conseguinte, foi realizada uma simulação da primeira fase ( $W_1/O$ ) da dupla emulsão ( $W_1/O/W_2$ ) processando a insulina frente às diferentes soluções salinas utilizadas como excipientes, seguido da análise da recuperação da proteína pelos métodos descritos e da conformação estrutural da proteína pela medida da fluorescência intrínseca e por eletroforese (SDS-PAGE).

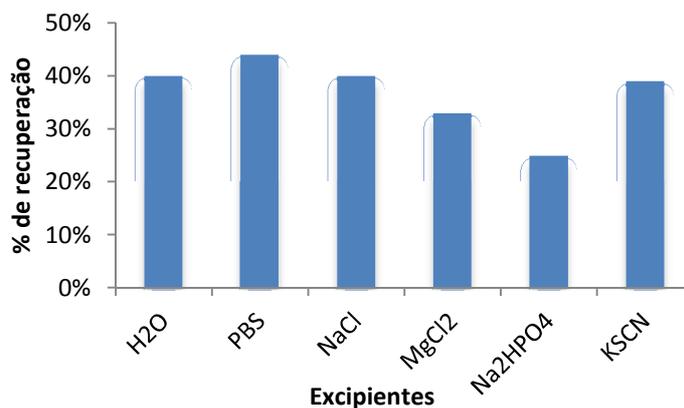
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Pelo espectro da solução de insulina 1 mg/mL em PBS se verificou um pico de absorvidade da insulina a 280 nm, e este foi utilizado como parâmetro de detecção para a dosagem do referido peptídeo no UV.

Na leitura a 280 nm, e pelo método de Lowry, houve uma baixa linearidade obtida com as concentrações mais altas da proteína quando não diluída. Já na dosagem por Bradford, verificou-se que a linearidade das menores concentrações foi aumentada, porém perdeu-se a linearidade nas concentrações maiores. Portanto, houve uma maior linearidade de absorvidade pelo método de

Bradford, com o maior coeficiente de correlação em relação ao método de Lowry e leitura a 280 nm (0,9942; 0,9582 e 0,9849, respectivamente).

Após o processamento da insulina pela fase da primeira emulsão do processo de encapsulação ( $W_1/O$ ), foram analisadas as quantidades de proteínas recuperadas, ou seja, não adsorvida nas interfaces solvente/água. A figura 1 mostra a porcentagem de recuperação da insulina processada nas diferentes soluções, quando analisadas pela leitura a 280 nm.

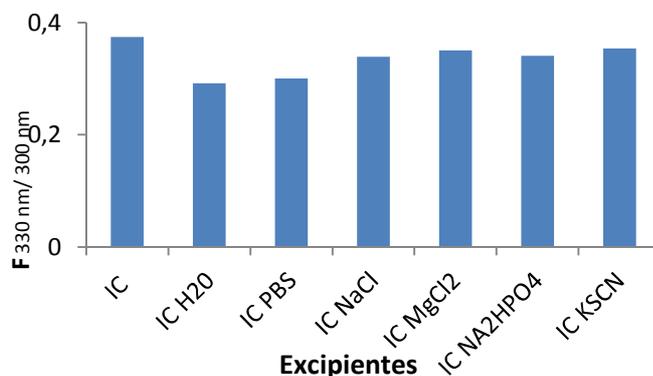


**Fig. 1-** Porcentagem de recuperação do peptídeo nas diferentes soluções na leitura a 280 nm.

Observa-se que durante o processo de encapsulação há uma extensa perda de solubilidade protéica. Quando analisada a 280 nm, verificou-se que houve uma redução de mais de 50 % na dosagem da insulina independente da solução excipiente. Ainda assim, na solução PBS encontrou-se a maior concentração da proteína, portanto, sendo a solução mais adequada para a continuidade do processamento da insulina. Vale ressaltar que a solução de fosfato, que tem sido utilizada para proteção geral de proteínas contra a desnaturação, neste caso mostrou-se a menos eficiente.

Pelo método de Lowry, as absorvâncias obtidas com a insulina processada foram maiores do que a absorvância da insulina não processada com PBS (Abs= 0,917). Esse aumento de absorvância pode ser atribuído a formação de agregados protéicos pelo contato com a interface solvente/água (cloreto de metileno) e/ou com extensa desnaturação do peptídeo.

A figura 2 mostra a relação de fluorescência nos diferentes excipientes para análise de fluorescência intrínseca.

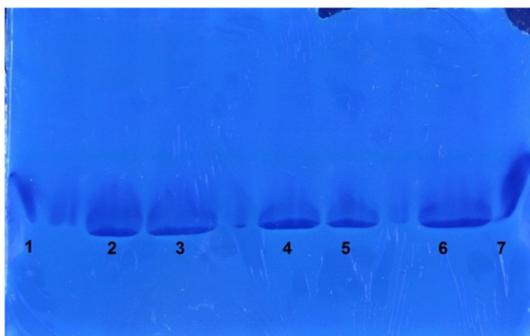


**Fig. 2-** Relação de fluorescências das amostras processadas.

A relação entre as intensidades de fluorescência I330 nm/I300 nm (que corresponde ao grau de absorbância da tirosina exposto para o meio) foi de 0,37 da proteína nativa sem processamento. De modo geral, houve alteração na conformação da insulina após o processamento em qualquer dos excipientes utilizados, entretanto, houve um internalização da tirosina quando a insulina foi processada em água ou PBS, e isto pode ter ocorrido devido à formação de pequenos agregados, que não permitiram que a emissão de fluorescência pela tirosina fosse detectada. As soluções que conseguiram manter a insulina mais próxima da conformação nativa após o processamento foram as soluções salinas, sendo o KSCN e o MgCl<sub>2</sub> os mais evidentes (Figura 2).

A análise das bandas formadas em SDS-PAGE objetivou comparar o perfil eletroforético da insulina não processada com as amostras de insulina processada.

Não foram verificadas formações de agregados supramoleculares e/ou fragmentação molecular da insulina que pudessem ser identificadas pela análise do peptídeo submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, como se pode ver pela ausência de outras bandas de peso molecular diferente comparada com o padrão (Figura 3).



**Fig. 3-** Eletroforese das amostras processadas (1. Insulina nativa; 2. Ins/H<sub>2</sub>O; 3. Ins/PBS; 4. Ins/NaCl; 5. Ins/MgCl<sub>2</sub>; 6. Ins/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 7. Ins/KSCN).

## CONCLUSÃO

A insulina processada em excipiente PBS foi a que permitiu a maior recuperação do peptídeo após o processamento. Entretanto, pela análise conformacional da insulina, as soluções de KSCN e MgCl<sub>2</sub> foram as que garantiram as menores alterações na estrutura do peptídeo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIEN, Y.W. *Human insulin: Basic sciences to therapeutic uses. Drug Development in Industrial Pharmacy*, v. 22, p.753-789, 1996.

SANTANDER-ORTEGA, M.J.; BASTOS-GONZÁLEZ, D.; ORTEGA-VINUESA, J.L.; ALONSO, M.J. *Insulin loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization. Journal Biomedical Nanotechnology*, v.5, nº1, p. 45-53, 2009.

TRINDADE, R.A.; KIYOHARA, P.K.; ARAUJO, P.S.; BUENO DA COSTA, M.H. PLGA microspheres containing bee venom proteins for preventive Immunotherapy. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v.423, p.124-133, 2012.

**Palavras-chave:** Insulina, Microencapsulação, PLGA.