

ESTUDO BIOQUÍMICO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA ALBUMINA SUBMETIDA AO PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO EM MICROESFERAS DE PLGA

Paulo Henrique de Holanda Veloso Júnior (ICV), Antônio Carlos Melo Lima Filho (colaborador, UFPI – CMRV), Lucas Rodrigues de Carvalho (colaborador, UFPI – CMRV), Reginaldo Almeida da Trindade (Orientador, Depto de Biomedicina – UFPI – CMRV)

INTRODUÇÃO

Dentre os sistemas carregadores de fármacos, as nanopartículas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis ocupam posição de destaque. Sendo o PLGA (poliéster de ácido láctico-co-glicólico) o mais analisado, em parte devido a sua aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) (TALUJA *et al.*, 2007; SAEZ *et al.*, 2007). Em se tratando de encapsulação de proteínas, devem ser observados vários parâmetros antes da realização do processo de encapsulação, tais como, determinar um método de dosagem da proteína de interesse que seja padronizado e que se tenha maior certeza dos valores de caracterização das nanopartículas formadas. Além da determinação de qual solvente será utilizado no método de dupla emulsão que gere menos dano a proteína. Dentre os métodos de dosagem existentes, três deles são bem definidos na literatura: dosagem a 280 nm, método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e método de Bradford (ZAIA *et al.*, 1998; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). Para a caracterização conformacional são utilizados métodos bioquímicos e biofísicos de análise estrutural da proteína, tais como, eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) e medida de fluorescência intrínseca. A proteína utilizada neste estudo foi a albumina bovina.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo determinar e padronizar as dosagens de albumina, para subseqüentemente, utilizá-los na detecção da proteína após o processamento com diferentes soluções salinas, atuando como excipientes, além da análise estrutural da albumina antes e após o processamento pelos métodos de fluorescência e SDS-PAGE.

METODOLOGIA

Foram preparadas soluções-mãe de albumina na concentração de 1 mg/mL em tampão PBS com pH 7,20, a qual foi posteriormente diluída em diferentes concentrações a fim de se produzir uma curva de calibração para a dosagem da albumina pelos métodos de Lowry (720 nm), Bradford (595 nm) ambos no espectrofotômetro Biospectro sp220, e leitura de absorvância a 280 nm (espectrofotômetro Shimadzu UV1800). Com o objetivo de analisar as possíveis alterações sofridas pela albumina causadas pelos diferentes condições excipientes, (H₂O, PBS, NaCl, MgCl₂, NaH₂PO₄, KSCN - todas com pH 7,20 a 50 mM) foi então simulado a fase da primeira emulsão W₁/O. A técnica de eletroforese (SDS-PAGE) foi utilizada no intuito de observar a presença de fragmentos de proteína gerados pós-processamento, com o kit Hoefer Mighty Small II SE250/SE260 a 50 mA, 120 V por 1 hora. Para análise conformacional da albumina, utilizou-se o método da fluorescência intrínseca no espectrofluorímetro PC1 - ISS®, utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de comprimento óptico, utilizando as relações medidas em 350/330 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tomando como padrão o valor da absorbância a 280 nm, estabeleceu-se este ponto como marcador para a dosagem da proteína em diferentes concentrações. Em seguida, foram realizadas dosagens de albumina pelos métodos de Lowry (720 nm) e Bradford (595 nm), obtendo-se os seguintes resultados respectivamente (Figuras 1.1 e 1.2):

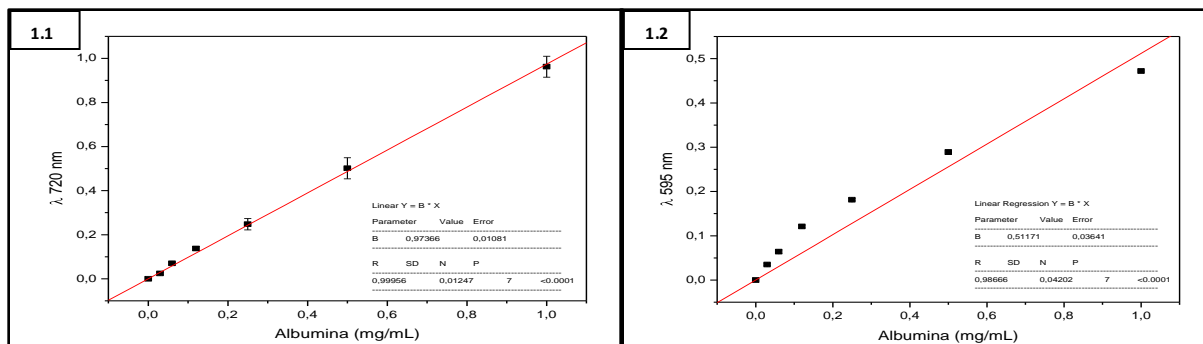


Fig.1-(1) Curva de calibração pelo método de Lowry. **(2)** Curva de calibração pelo método de Bradford com amostra de 20 µl.

Após o processamento da albumina em diferentes soluções excipientes, obtiveram-se os gráficos que representam a quantidade da albumina recuperada após processamento.

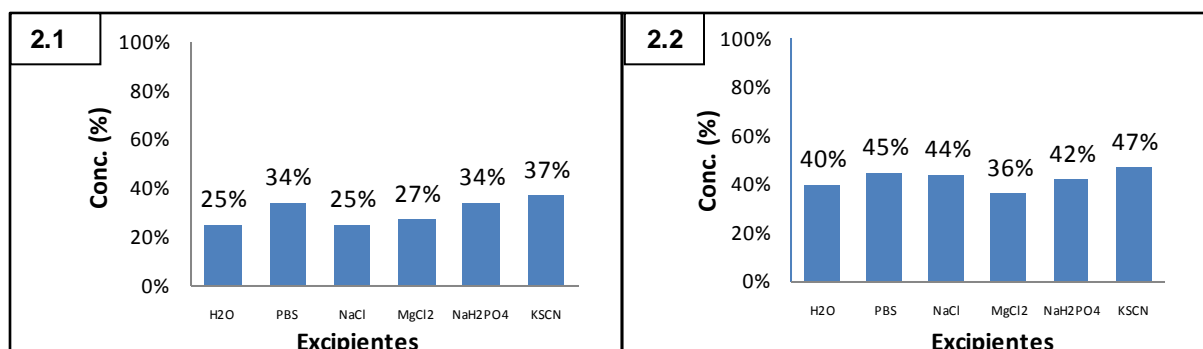


Fig.2- Porcentagem de recuperação da proteína albumina após processamento de microencapsulação em diferentes excipientes analisada por: **(1)** método de Lowry. **(2)** método de Bradford.

Foi realizada também, a eletroforese da albumina antes e após o processamento, no intuito de se fazer análise do perfil eletroforético da proteína antes e depois do processamento.

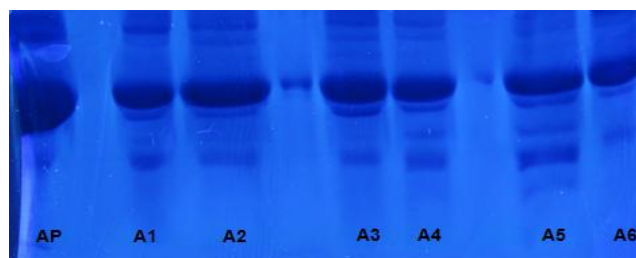


Fig.3- Eletroforese da albumina, onde AP representa a albumina nativa. As demais linhas representam a albumina após a simulação do processo de dupla emulsão em diferentes soluções: (A1) albumina em água, (A2) em PBS, (A3) em NaCl, (A4) em MgCl₂, (A5) em NaH₂PO₄ e (A6) em KSCN.

A espectroscopia de fluorescência da albumina demonstrou que quando em PBS e NaH_2PO_4 , as alterações sofridas na disposição dos aminoácidos da proteína são menores.

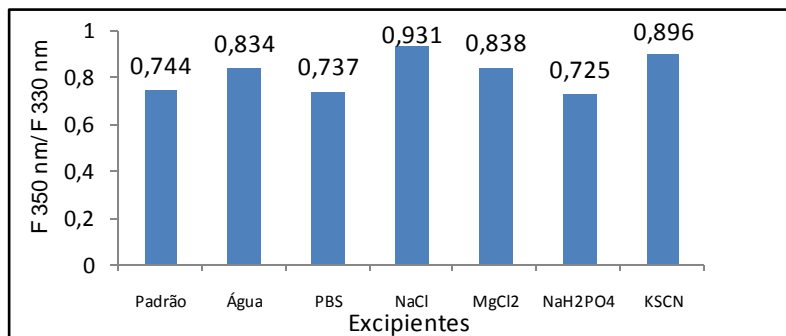


Fig.4- Relação entre as intensidades de fluorescência A350nm/A330nm da proteína processada em diferentes excipientes.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que os três métodos podem ser utilizados para as dosagens da proteína, sendo que o método de Lowry e leitura a 280 nm foram os que apresentaram um melhor coeficiente de correlação. Além disso, a amostra processada com solução KSCN foi a que obteve maior recuperação da proteína com o processamento, sendo a solução mais adequada para o processo. A análise conformacional revelou que as soluções de PBS e NaH_2PO_4 foram as que menos alteraram a estrutura da proteína. Portanto, a escolha do método quantitativo mais adequado e das soluções salinas mais favoráveis, permitiu dar procedência ao experimento para posterior conclusão do processamento em dupla emulsão.

APOIO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent.** J. Biol. Chem, 1951.
2. QUINTANAR-GUERRERO, D; ALLÉMAN, E; DOELKER, E; FESSI, H. **Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique.** Pharmaceutical Research, 1998.
3. SAEZ V.; HERNÁNDEZ J. R.; PENICHE, C. **Microspheres as Delivery Systems for the Controlled Release of Peptides and Proteins.** Biotechnol Appl, 2007.
4. TALUJA, A; YOUN, Y. S.; BAE, Y. H. **Novel Approaches in Microparticulate PLGA Delivery Systems Encapsulation Proteins.** J Mater Che, 2007.
5. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. **Determination of Total Protein by Spectrophotometry: Advantages and Disadvantages of Proposed Methods.** Química nova, 1998.

PALAVRAS-CHAVE: Albumina. Encapsulação. PLGA.

