

Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil- β -ciclodextrina e insulina:hidroxipropil- β -ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis

Viviane Conceição Fernandes¹, Ângelo Márcio Leite Denadai², Ruben Dario Sinisterra Millán², Ricardo José Alves¹, Armando da Silva Cunha Júnior^{1*}

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, ²Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais

A etapa principal na ativação e ligação da insulina ao seu receptor é a dissociação dos hexâmeros do hormônio, normalmente presente nas preparações farmacêuticas, para a forma monomérica bioativa. A utilização de diferentes ciclodextrinas (CDs) como adjuvantes em formulações contendo insulina vem sendo explorada e os estudos realizados demonstram que estas substâncias podem aumentar a absorção da insulina principalmente por diminuírem sua capacidade de formar dímeros e hexâmeros em meio aquoso. No presente trabalho, complexos de insulina:hidroxipropil- β -ciclodextrina (INS:HP- β -CD) e insulina:dimetil- β -ciclodextrina (INS:DM- β -CD) foram caracterizados utilizando técnicas de titulação calorimétrica isotérmica e espalhamento dinâmico de luz. Por meio da titulação calorimétrica foram determinados os parâmetros termodinâmicos de interação entre a insulina e as CDs utilizadas, sugerindo que o mecanismo de complexação ocorre com aumento de entropia para ambos os sistemas. Os experimentos de espalhamento dinâmico de luz não indicaram diminuição do diâmetro hidrodinâmico das espécies moleculares de insulina após a complexação com as CDs. Os complexos INS:HP- β -CD e INS:DM- β -CD foram encapsulados em microesferas (MEs) de PLGA 50:50. A caracterização das MEs obtidas revelou aumento considerável na taxa de encapsulamento de insulina quando complexada com as CDs sem que ocorresse diferença significativa no diâmetro das partículas em função da complexação.

Unitermos

- Insulina
- Ciclodextrinas
- Microesferas
- Titulação calorimétrica isotérmica
- Diâmetro hidrodinâmico

*Correspondência:

A. S. Cunha Júnior
Faculdade de Farmácia da UFMG
Avenida Antônio Carlos, 6627 –
Pampulha
31270-010 - Belo Horizonte - MG,
Brasil
E-mail: armando@ufmg.br

INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades glicosídicas unidas por intermédio de uma ligação do tipo α -(1-4). As CDs podem ser consideradas moléculas anfífilas, por apresentarem duas regiões de comportamento diferentes. O seu exterior é formado por grupos hidroxilas sendo altamente polar, enquanto o interior da cavidade é relativamente apolar. Dessa forma, as CDs são capazes de interagir com diversas espécies, formando complexos estabilizados por ligações não covalentes, os quais são denominados complexos de inclusão. Estes complexos são caracterizados pela penetração parcial ou total de moléculas na cavidade das CDs. A formação dos complexos pode ter o propósito de aumentar a solubilidade, a estabilidade, a taxa de absorção ou reduzir a toxicidade do fármaco neles associado (Loftsson; Brewster, 1996; Irie, Uekama, 1997, 1998; Rajewski, Stella, 1996; Stella, Rajewski, 1997).

A insulina é uma proteína com massa molecular de 5,8 KD e ponto isoelétrico em pH 5,4. Suas moléculas existem sob a forma monomérica apenas em concentrações inferiores a 0,6 $\mu\text{g/mL}$. Em concentrações mais altas, freqüentemente encontradas nas preparações farmacêuticas, ocorre uma auto-associação reversível dos monômeros para formação de dímeros e hexâmeros. Esta auto-associação é mediada por ligações de hidrogênio intermoleculares não covalentes entre grupos da cadeia lateral do peptídeo nas posições B24 e B26 de cada monômero e influenciada pela concentração molar, pH, força iônica, temperatura e presença de ions divalentes (ex. Zn^{2+}) no meio. Em soluções ácidas (pH \sim 2) e à temperatura ambiente a insulina apresenta-se predominantemente sob a forma de dímeros. O hexâmero representa a estrutura quaternária estável da molécula de insulina, que permite a conservação das preparações farmacêuticas por vários meses, sob refrigeração. A etapa principal na ativação e ligação da insulina ao seu receptor é a dissociação da forma hexamérica do hormônio, normalmente presente nas preparações farmacêuticas, para a forma monomérica bioativa (Derewenda *et al.*, 1989; Chien, 1996; Heinemann *et al.*, 2002; Kjeldsen, Pettersson, 2003).

A utilização de diferentes CDs como adjuvante em formulações contendo insulina vem sendo explorada por diferentes grupos de pesquisadores nos últimos anos (Shao *et al.*, 1992, 1994a, 1994b; Watanable *et al.*, 1992; Rodrigues-Junior *et al.*, 2003; Santiago *et al.*, 2003). Os estudos realizados demonstram que as CDs podem aumentar a taxa de absorção da insulina principalmente por diminuir a sua capacidade de formar dímeros e hexâmeros em meio aquoso (Menard, Rhodes, 1990; Shao *et al.*, 1992,

1994a, 1994b; Watanable *et al.*, 1992; Schipper *et al.*, 1993; Rajewski, Stella, 1996; Aguiar *et al.*, 2004).

A estabilidade térmica da insulina complexada com metil- β -CD e com hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) foi avaliada, empregando-se o mesmo método analítico, por Dotsikas *et al.* (2002) e por Santiago *et al.* (2003), respectivamente. Em ambos os estudos, o aumento da estabilidade da insulina quando complexada com as CDs foi observado, ficando a taxa de degradação da insulina significativamente menor quando submetida ao processo de aquecimento em comparação à insulina livre. Estes resultados sugerem que as espécies de CDs avaliadas têm um pronunciado efeito estabilizador na decomposição da insulina, provavelmente atribuído ao impedimento estérico resultante da complexação, que protegeria o hormônio de um ataque nucleofílico em meio aquoso.

Apesar dos possíveis benefícios da complexação da insulina com as CDs, tais como o aumento da estabilidade, a inibição da auto-associação e o aumento da absorção, o complexo não é capaz de promover uma liberação controlada do fármaco, condição importante para o tratamento do diabetes. Desse modo, a incorporação do complexo em uma forma farmacêutica que possibilite a obtenção de um medicamento com perfil de liberação controlada é de fundamental importância (De Rosa *et al.*, 2004).

Vários estudos utilizando microesferas de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) encapsulando insulina foram realizados nos últimos anos com ênfase na obtenção de sistemas destinados à administração pulmonar, *per os* e nasal. Os resultados obtidos indicam a clara viabilidade na utilização de microesferas como formas alternativas para o transporte de insulina para diferentes sítios de absorção (Soriano *et al.*, 1996; Uchida *et al.*, 1996, 1997; Ben-Jebria *et al.*, 2000; Aguiar *et al.*, 2004). Rodrigues-Junior *et al.* (2003) complexaram insulina com dimetil- β -CD (DM- β -CD) e relataram aumento na taxa de encapsulamento em microesferas de PLGA. Além disso, observaram que a administração intratraqueal destas microesferas apresentou resultados similares na redução da glicose plasmática de ratos quando comparada à insulina administrada por via parenteral.

São encontrados, na literatura, alguns artigos descrevendo estudos de caracterização de complexos de insulina:CDs. Entre estes, destacam-se o estudo desenvolvido por Aguiar *et al.* (2001), no qual foram utilizadas técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e dicroísmo circular para caracterizar complexos de insulina:DM- β -CD (INS:DM- β -CD), e o trabalho realizado por Quaglia *et al.* (2003), em que a técnica de dicroísmo circular foi empregada para caracterizar complexos de

insulina:hidroxipropil-β-ciclodextrina (INS:HP-β-CD). Entretanto, até o presente momento, nenhum estudo de caracterização de complexos INS:HP-β-CD e INS:DM-β-CD utilizando técnicas de titulação calorimétrica isotérmica e espalhamento dinâmico de luz foi encontrado. Portanto, um dos objetivos do presente estudo foi a caracterização de complexos de INS:HP-β-CD e INS:DM-β-CD por meio das técnicas citadas. A obtenção de microesferas de PLGA 50:50 contendo os referidos complexos e a avaliação da influência do tipo de complexo no diâmetro das partículas, na taxa de encapsulamento e no perfil de liberação do hormônio encapsulado, também foram objeto deste trabalho.

A titulação calorimétrica isotérmica é uma das mais poderosas ferramentas utilizadas no estudo de processos de complexometria. Esta técnica utiliza como fundamento a medida direta do fluxo de calor envolvido em uma reação. Considerando que qualquer processo reacional envolve sempre quebra e formação de interações intermoleculares, e que associado a estes fenômenos existe um fluxo de calor, esta técnica atua como detector universal de reações químicas (Microcal, 1998; Ladbury, 2001; Turnbull, Daranas, 2003).

A técnica de espalhamento de luz tem demonstrado importância fundamental no estudo do tamanho e da forma de partículas presentes em uma grande variedade de sistemas (Dalglish, Hallet, 1995). Esta técnica se baseia no fenômeno conhecido por “espalhamento Rayleigh” ou “espalhamento quasi-elástico”, onde a radiação espalhada apresenta o mesmo comprimento de onda da radiação incidente (Tanford, 1961; Hiemenz, 1986).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Cristais de insulina suína sódica (Lote N° MLS-2-464, potência: 26.3 I.U.mg⁻¹, Novo Nordisk, Brasil). 2,6-dimetil-β-ciclodextrina (Sigma-Aldrich Co, EUA). 6,5-hidroxipropil-β-ciclodextrina, (C Cavitron® 82006, Cerester Inc., EUA). Polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) 50:50 (Resomer® RG 504, Boehringer Ingelheim, Alemanha). Álcool polivinílico (PVA, MW 72000, Sigma-Aldrich Co, EUA). Água ultra pura obtida por Milli-Q. Os demais reagentes utilizados e não listados foram de grau analítico ou apropriados para uso farmacêutico.

Métodos

Titulação calorimétrica isotérmica

Os experimentos consistiram na titulação das CDs

em soluções contendo insulina (INS). Todas as titulações foram realizadas a 25 °C e todas as soluções foram preparadas em tampão KH₂PO₄ (0,2 molL⁻¹), pH 8,2. Para a obtenção dos sistemas insulina:dimetil-β-ciclodextrina (INS:DM-β-CD) e insulina:hidroxipropil-β-ciclodextrina (INS:HP-β-CD), foram tituladas soluções de insulina 1 mmolL⁻¹ em tampão KH₂PO₄, pH 8,2, com soluções de DM-β-CD e HP-β-CD, ambas na concentração de 150 mmolL⁻¹. Foi realizado, também, experimento de diluição das soluções de DM-β-CD e HP-β-CD, a 150 mmolL⁻¹, em tampão, o qual serviu de branco. O Microcalorímetro VP-ITC®, MICROCAL (EUA), foi empregado na realização deste experimento.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata após a calibração elétrica e química do calorímetro e o volume utilizado na cela calorimétrica foi de 1,5 mL. Cada titulação consistiu de 40 injeções de 5 mL e uma primeira injeção de 1 μL, a qual foi descartada para eliminar efeitos de difusão de material da seringa para a cela e da cela para a seringa. O volume total injetado foi de 201 μL. O tempo de injeção foi de 2 segundos e o intervalo de tempo entre cada injeção foi de 360 segundos, o qual foi suficiente para garantir o alcance do equilíbrio termodinâmico entre as sucessivas injeções. A correção das concentrações bem como a conversão do fluxo de calor envolvido nos experimentos em entalpia molar parcial de injeção – Δ_{inj}H°, foi feito automaticamente com o emprego do programa MICROCAL ORIGIN 5.0®, para ITC.

Neste experimento, foi possível utilizar o modelo matemático denominado “*Isoterma de Wiseman*” para fazer o ajuste não-linear dos pontos das curvas calorimétricas e determinar os parâmetros termodinâmicos de interação. Desse modo, antes do ajuste não-linear, os dados calorimétricos foram subtraídos dos respectivos brancos (Turnbull, Daranas, 2003).

Espalhamento dinâmico de luz

O objetivo da utilização desta técnica foi a determinação do diâmetro hidrodinâmico das espécies moleculares de insulina em função da concentração de HP-β-CD e DM-β-CD, em tampão KH₂PO₄ (0,2 molL⁻¹), pH 8,2. Foram empregadas as seguintes condições: temperatura 25 °C, ângulo do feixe incidente de 90° e comprimento de onda do laser de 633 nm.

Os experimentos foram realizados utilizando soluções de insulina na concentração de 1 mM e soluções de HP-β-CD e DM-β-CD ambas na concentração de 150 mM. Para cada sistema, INS:DM-β-CD e INS:HP-β-CD, alíquotas de 10 mL da solução de ciclodextrina, DM-β-CD ou HP-β-CD, foram adicionadas a uma cubeta de polietileno contendo 1,5 mL da solução de insulina. Um

total de 25 alíquotas foi adicionado em intervalos de 120 segundos entre cada adição. Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando o equipamento ZETASIZER nano ZS®, Malvern Instruments, EUA.

Obtenção de microesferas de PLGA 50:50 contendo complexos de insulina:ciclodextrina

Para o preparo do complexo de INS:DM- β -CD, 12,5 mg de insulina e 14,50 mg de DM- β -CD foram pesadas e dissolvidas em tampão KH₂PO₄, pH 8,2. A solução resultante, de razão molar em INS:CD igual a 1:5, foi agitada a temperatura ambiente durante quatro horas. De forma semelhante, para o preparo do complexo de INS:HP- β -CD, 10,9 mg de insulina e 14,15 mg de HP- β -CD foram pesadas e dissolvidas em tampão KH₂PO₄, pH 8,2. A solução resultante, de razão molar em INS:CD igual a 1:5, foi agitada à temperatura ambiente durante quatro horas. Para o preparo das microesferas contendo apenas insulina, 6,25 mg de insulina foram pesadas e dissolvidas em tampão KH₂PO₄, pH 8,2. A solução obtida foi agitada à temperatura ambiente durante quatro horas.

Para o preparo das microesferas, inicialmente, 210 mg de PLGA 50:50 foram dissolvidas em 30 mL de diclorometano utilizando um homogeneizador (Agitador ULTRATURRAX T25 IKA® (Labortechnik, Alemanha). Em seguida, para formação da emulsão A/O, a fase aquosa contendo o complexo de INS:DM- β -CD ou INS:HP- β -CD ou insulina, foi vertida à fase orgânica e mantida sob forte agitação por um minuto. A emulsão A/O obtida foi vertida, sob agitação moderada (Agitador EUROSTAR - IKA®, Labortechnik, Alemanha), em 100 mL de solução aquosa de PVA 5% para formação da emulsão A/O/A e mantida sob agitação, a temperatura ambiente, até completa evaporação do solvente orgânico.

As microesferas obtidas foram centrifugadas por 20 min, a 23.000 x g, a 4 °C, (Centrífuga HIMAC - CR21®, Hitachi, Japão) lavadas por três vezes com água destilada e novamente centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as microesferas ressuspendidas em água, congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas por 12 horas (Liofilizador de bancada E-C MODULYO®, Apparatus Inc., EUA) e armazenadas sob refrigeração.

CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE PLGA (50:50)

Determinação do diâmetro médio das partículas

Neste estudo, uma amostra de cada tipo de microesfera foi dispersa em água destilada e a distribuição de diâmetro das

partículas foi avaliada por difratometria a laser (Equipamento MASTERSIZER 2000E®, Malvern Instruments, EUA).

Determinação do teor de insulina encapsulada

Neste experimento, 10 mg de microesferas foram adicionadas a 1 mL de acetonitrila. A dispersão obtida foi sonicada em banho de ultra-som (BRANSON, modelo R-MTH 3210 da, EUA) por 30 minutos e em seguida foi centrifugada a 23.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e o *pellet* remanescente foi dissolvido em ácido clorídrico 0,1 N. Nova centrifugação foi realizada e a concentração de insulina encapsulada presente no sobrenadante obtido foi determinada por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).

Determinação do perfil de liberação in vitro

Para determinar o perfil de liberação, cinco frascos de penicilina contendo cada um 20 mg de microesferas e 1,0 mL de tampão fosfato pH 7,4 foram mantidos em banho termostático, sob agitação constante, e à temperatura de 37± 0,5 °C. Nos intervalos de 30, 60, 120, 180 e 360 minutos retirou-se cada um dos frascos, a suspensão de microesferas foi centrifugada e a quantidade de insulina presente no sobrenadante foi determinada por CLAE.

Determinação do teor de insulina por CLAE

Nesta etapa, o Cromatógrafo líquido WATERS®, equipado com bomba WATERS® modelo 515, autoinjeter WATERS® modelo 717 plus, coluna Shim-pack® LC18 (SHIMADZU) 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 μ m, detector de ultravioleta WATERS® modelo 2487 e programa MILLENIUM® v.2.15.01 foram utilizados. As seguintes condições cromatográficas foram adotadas: fase móvel constituída de solução de sulfato de sódio 0,2 M, pH 2,3, ajustado com ácido fosfórico e acetonitrila, na proporção 72:28, fluxo da fase móvel de 1 mL/minuto em modo isocrático, comprimento de onda de detecção no UV de 214 nm, volume de injeção de 20 μ L e coluna mantida à temperatura ambiente. O método descrito, adaptado de Soriano *et al.* (1996), proporcionou especificidade, linearidade na faixa de trabalho de 10 a 200 μ g/mL de insulina e também repetibilidade dos dados obtidos, sendo, portanto, considerado validado para a determinação do fármaco nas amostras a serem analisadas.

RESULTADOS

Na Figura 1 está representado as curvas de entalpia envolvidas no processo de diluição, em tampão, das soluções de DM- β -CD e HP- β -CD a 150 mmolL⁻¹. Pode-se observar que a entalpia envolvida nos dois processos de

diluição são significativas, sugerindo uma forte interação entre as CDs e o solvente utilizado (tampão).

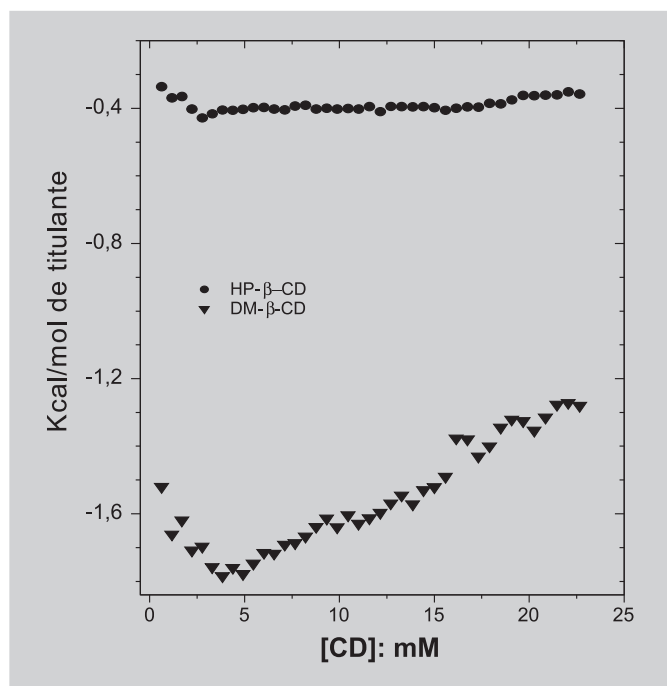


FIGURA 1 - Curvas de entalpia envolvidas nas diluições das CDs em tampão KH_2PO_4 (pH 8,2): (●) HP-β-CD e (▼) DM-β-CD.

A titulação de DM-β-CD e HP-β-CD com solução de insulina na concentração de 50 mM, originou as curvas representadas nas Figuras 2a e 3a. As curvas obtidas após subtração dos respectivos brancos estão representadas nas Figuras 2b e 3b. Como o perfil das curvas de titulação para ambos os sistemas é próximo de uma sigmóide, por intermédio da regressão não-linear da Isoterma de Wiseman (Equação 1), foi possível extrair os seguintes parâmetros termodinâmicos de interação: N - coeficiente estequiométrico, K - constante de equilíbrio e $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ - entalpia padrão de interação. Com o emprego das equações 2 e 3, foram determinados os parâmetros de energia livre padrão de interação ($\Delta_{\text{int}}G^\circ$) e de energia entrópica padrão de interação ($T\Delta_{\text{int}}S^\circ$) (Turnbull, Daranas, 2003). Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa *MICROCAL ORIGIN 5.0* para ITC e os dados obtidos encontram-se descritos na Tabela I.

$$\overline{\Delta_{\text{int}}H^\circ} = \left(\frac{dQ}{d[X]_{\text{tot}}} \right)_P = \Delta_{\text{int}}H^\circ V_0 \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R - r)^2 - 4X_R}} \right] \quad \text{Eq. 1}$$

$$\Delta_{\text{int}}G = -RTL \ln K \quad \text{Eq. 2}$$

$$\Delta_{\text{int}}G = \Delta_{\text{int}}H - T\Delta_{\text{int}}S \quad \text{Eq. 3}$$

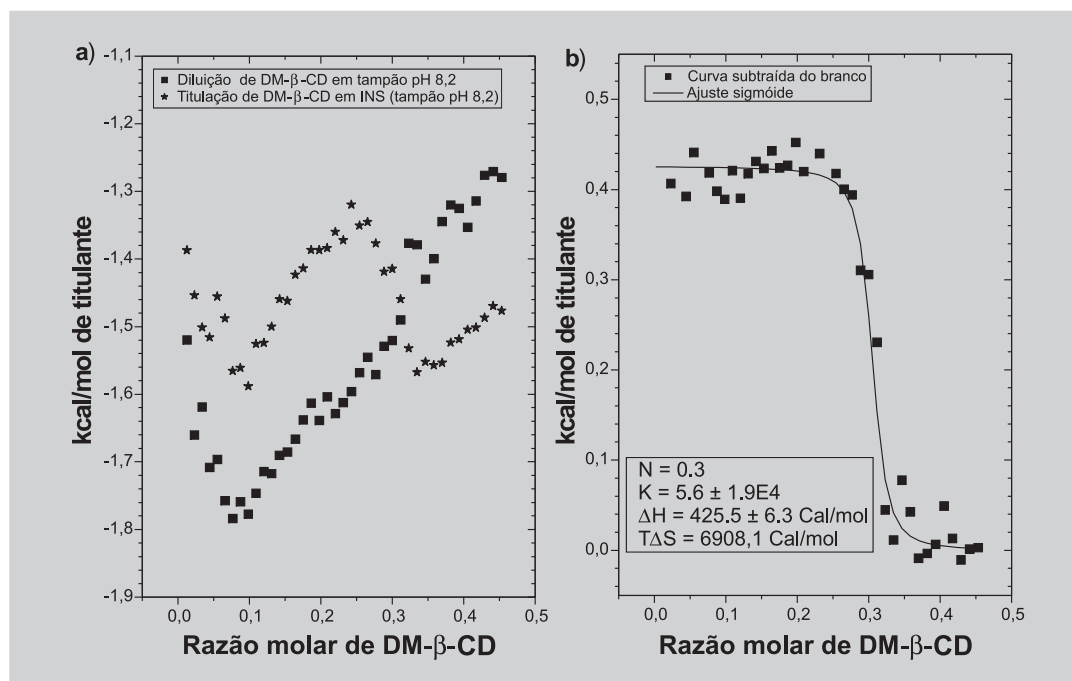


FIGURA 2 - Titulação Calorimétrica da DM-β-CD em insulina. (a): (■) diluição calorimétrica da DM-β-CD (0,150 mol/L) em tampão KH_2PO_4 (pH 8,2) e (★) titulação calorimétrica da DM-β-CD (0,150 mol/L) em INS (1×10^{-3} mol/L). (b): (■) Curva obtida após a subtração do branco e (—) ajuste sigmóide.

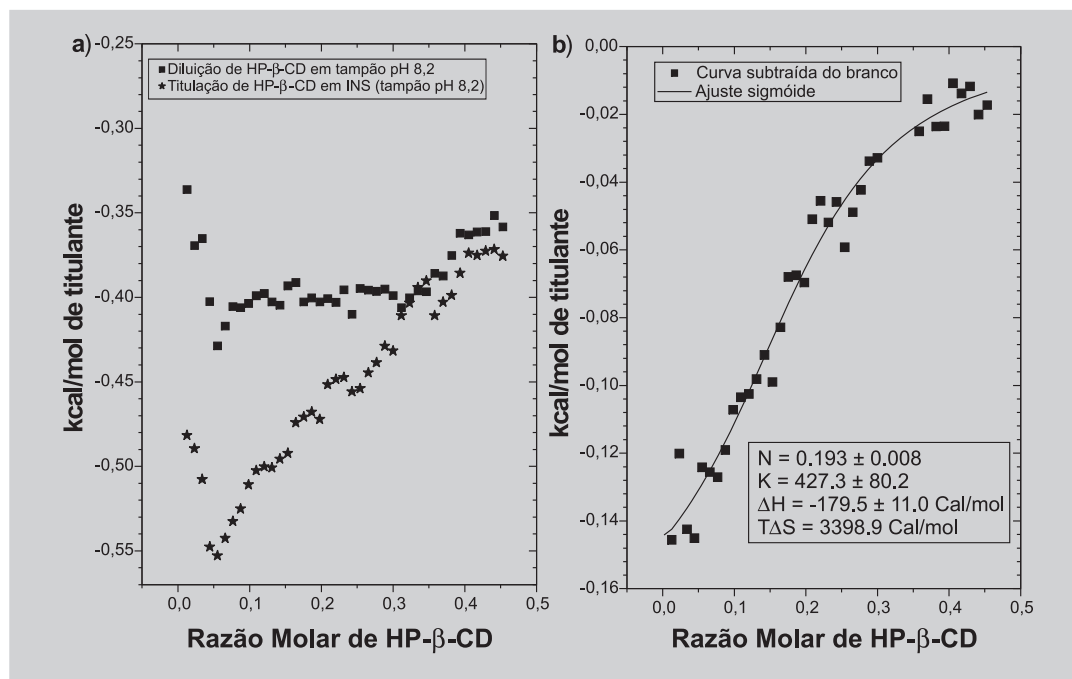


FIGURA 3 - Titulação Calorimétrica da HP- β -CD em insulina. (a): (■) diluição calorimétrica da HP- β -CD (0,150 mol/L) em tampão KH_2PO_4 , pH 8,2, e (★) titulação calorimétrica da HP- β -CD (0,150 mol/L) em INS (1×10^{-1} mol/L). (b): (■) Curva obtida após a subtração do branco e (—) ajuste sigmóide.

TABELA I - Parâmetros termodinâmicos do processo de complexação de insulina com DM- β -CD e HP- β -CD em tampão KH_2PO_4 (pH 8,2) a 25 °C

| Sistema | K (M^{-1}) | ΔH° (KJ/mol) | ΔS° (J/molK) | T ΔS (KJ/mol) | ΔG° (KJ/mol) | N |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|----|
| INS:DM- β -CD | $5,6 \text{ E}4 \pm 1,9 \text{ E}4$ | $1,8 \pm 0,26$ | 99,8 | 29,8 | -28,0 | 15 |
| INS:HP- β -CD | $427,3 \pm 80,2$ | $-0,8 \pm 0,1$ | 46,5 | 14,2 | -15,0 | 9 |

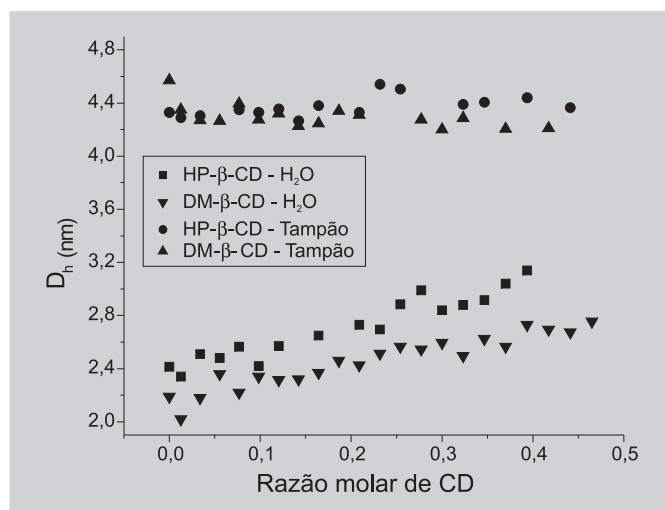


FIGURA 4 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico (D_h) das espécies moleculares de insulina em função da adição de DM- β -CD e HP- β -CD.

A Figura 4 corresponde à curva obtida nos experimentos de espalhamento dinâmico de luz. Nestes experimentos, o diâmetro hidrodinâmico (D_h) da insulina foi analisado em função das concentrações de DM- β -CD e de HP- β -CD, em tampão KH_2PO_4 (0,2 mol/L), pH 8,2. A concentração de insulina utilizada foi de 1 mM e, de acordo com Kjeldsen e Pettersson (2003) em soluções com concentrações superiores a 0,1 mM, a insulina está predominantemente na forma hexamérica e, portanto, no 1º ponto dos gráficos, onde a concentração de ciclodextrina é zero, o D_h encontrado provavelmente refere-se aos hexâmeros de insulina. Em tampão o D_h médio das partículas é pelo menos duas vezes maior do que o observado em água.

Na Tabela II estão descritos os resultados do efeito do tipo de complexo (INS:DM- β -CD ou INS:HP- β -CD) sobre o diâmetro médio e sobre o teor de insulina encapsulada nas microesferas de PLGA preparadas. Pode-se observar que,

TABELA II - Diâmetro médio e teor de insulina encapsulada nas microesferas obtidas

| Microesferas | Diâmetro médio ^a (mm) | %DPR | Insulina encapsulada ^a % |
|---------------------|----------------------------------|------|-------------------------------------|
| INSULINA | 2,27 | 9,0 | 9,00 (\pm 0,15) |
| INS:DM- β -CD | 2,20 | 3,2 | 16,71 (\pm 0,30) |
| INS:HP- β -CD | 2,55 | 5,6 | 13,74 (\pm 0,65) |

^a n= 3,0

independente da forma encapsulada do hormônio: insulina não complexada, INS:DM- β -CD e INS:HP- β -CD, não ocorreu diferença significativa no diâmetro médio das microesferas de PLGA obtidas. Entretanto, um aumento considerável na taxa de encapsulamento de insulina foi observado em função da complexação com DM- β -CD e HP- β -CD.

A avaliação do perfil de liberação de insulina a partir dos três tipos de microesferas obtidas está representada na Figura 5. Como pode ser observado, nos primeiros 30 minutos de ensaio, cerca de 80% da proteína havia sido liberada da formulação preparada com a fase aquosa contendo apenas insulina, \pm 70% foi liberada a partir das microesferas contendo o complexo INS:DM- β -CD e \pm 53% liberados a partir daquelas contendo INS:HP- β -CD.

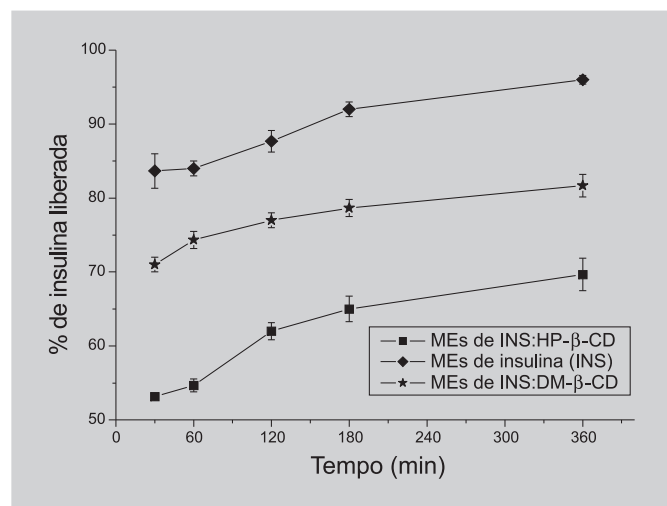


FIGURA 5 - Perfil de liberação de insulina a partir das microesferas (MEs) de PLGA contendo insulina, INS:DM- β -CD e INS:HP- β -CD (n=5).

DISCUSSÃO

Moléculas de insulina em solução existem em mistura de estados de associação, sendo que monômeros, dímeros e hexâmeros coexistem sob um equilíbrio dinâmico. Em virtude das formas mutiméricas não serem bioativas, já que estas não são capazes de se ligarem ao receptor específico do hormônio, o estado de associação da

insulina é o ponto chave no controle da sua atividade *in vivo*. Em adição, a dissociação dos hexâmeros de insulina em dímeros e monômeros é a barreira limitante para absorção subcutânea e diretamente afeta a resposta farmacológica das preparações comerciais (Chien, 1996).

Tendo em vista a literatura disponível demonstrando a utilização da HP- β -CD e DM- β -CD como promotores de absorção de insulina por reduzirem sua capacidade de formar dímeros e hexâmeros em meio aquoso, o presente estudo teve como um dos objetivos caracterizar complexos formados entre a insulina e dois tipos de CDs: HP- β -CD e DM- β -CD. Para isso foram realizadas avaliações termodinâmicas como estratégia para o aprofundamento do conhecimento das interações existentes no sistema insulina:ciclodextrina.

A entalpia está relacionada com a quebra e formação de interações. Processos exotérmicos e endotérmicos indicam, respectivamente, a formação de interações mais ou menos estáveis do que as existentes antes da complexação. A entropia está relacionada ao grau de desordem que o sistema pode assumir em função dos processos de complexação. Alterações de entropia podem informar sobre o balanço solvatação/dessolvatação das espécies durante a complexação, a variação no número de espécies no produto em relação aos reagentes, a mobilidade molecular, a mistura, a agregação, e as alterações conformacionais das macromoléculas (Rekharsky, Inove, 1998; Rekharsky *et al.*, 2002).

Inicialmente, foram realizados experimentos calorimétricos de diluição da DM- β -CD e HP- β -CD em tampão KH_2PO_4 (pH 8,2), uma vez que estes serviram de branco para o restante dos experimentos e permitiram verificar a existência de efeitos de interação das CDs com o solvente. Para ambas as CDs, observa-se que o fenômeno de complexação ocorre com aumento da entropia do sistema, ocorrendo endotermicamente com a DM- β -CD e exotermicamente com a HP- β -CD. É importante ressaltar que as soluções de CDs estão bastante concentradas ($[\text{CD}] = 150 \text{ mM}$) e se na diluição, onde moléculas são afastadas umas das outras, existe liberação de energia, é provável a ocorrência de desagregação de agregados de CDs (Menard, Rhodes, 1990; Ladbury, 2001; Rekharsky, Inove, 1998; Rekharsky *et al.*, 2002).

Toda interação intermolecular em solução é sempre um balanço de aspectos entálpicos, geralmente ligados à quebra e formação de interações; e aspectos entrópicos, geralmente ligados a solvatação/dessolvatação e mudanças conformacionais. Em sistemas mais simples, com moléculas hospedeiras com tamanho próximo ao das CDs, observa-se que a complexação é principalmente devida a formação de ligações de hidrogênio estáveis entre as moléculas de água liberadas da cavidade das ciclodextrinas com o restante das moléculas de água do solvente, podendo ser fortalecida pela formação de interações do tipo dipolares, iônicas e ligações de hidrogênio, entre grupos funcionais das moléculas hospedeiras e as ciclodextrinas. Nestes casos, é comum também atribuir a redução de entropia à diminuição da mobilidade molecular e redução do número de espécies livres em solução (Menard, Rhodes, 1990; Ladbury, 2001; Rekharsky, Inove, 1998; Rekharsky *et al.*, 2002).

No presente estudo, observa-se a formação de espécies com coeficiente estequiométrico elevado ($N \approx 15$ para DM- β -CD e $N \approx 10$ para a HP- β -CD). Segundo dados da literatura, tais complexos têm mobilidade molecular reduzida, ocasionando uma redução no número de espécies livres em solução. Mesmo observando aumento de entropia no sistema, pode-se dizer que intensa dessolvatação deve estar ocorrendo para contrabalançar a formação de espécies com coeficientes estequiométricos tão elevados. Tal dessolvatação implica em quebra de ligações de hidrogênio água-água e água-insulina, além de interações do tipo água-íons, íons-insulina, íons-íons, levando assim a valores reduzidos de $\Delta_{int}H^\circ$.

As diferenças nos valores dos coeficientes estequiométricos e nas constantes de equilíbrio entre as duas CDs podem ser atribuídas ao menor tamanho da DM- β -CD em relação à HP- β -CD. Esta última teria maior dificuldade de se aproximar da molécula de insulina do que a DM- β -CD, levando assim à formação de espécie com menor estequiometria e menor constante de interação. No caso da HP- β -CD, observa-se ainda que os valores de $\Delta_{int}H^\circ$ são negativos enquanto para a DM- β -CD estes são positivos. Esta diferença pode ser devida a presença dos grupos hidroxipropila ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), os quais são capazes de fazer ligações de hidrogênio com grupos NH, OH e O⁻ da insulina (Menard, Rhodes, 1990; Ladbury, 2001; Rekharsky, Inove, 1998; Rekharsky *et al.*, 2002).

Um dos objetivos da complexação da insulina com moléculas de CD é a sua estabilização e a inibição da formação de dímeros e hexâmeros, por meio da inclusão dos grupos hidrofóbicos expostos nos monômeros do peptídeo dentro da cavidade da CD (Tokiro *et al.*, 1997). Os resultados obtidos nos experimentos de espalhamento de luz não revelaram diminuição significativa do diâmetro hidrodinâmico

das partículas presentes no meio, o que sugere a manutenção da capacidade de formação de dímeros e hexâmeros de insulina mesmo após a adição das CDs. Entretanto, nos experimentos de titulação calorimétrica isotérmica, observou-se a formação de complexos com coeficiente estequiométrico elevado sugerindo, a princípio, que a presença das moléculas de CDs promoveria aumento ou não alteraria o tamanho médio das partículas, mesmo ocorrendo redução na capacidade de formação de dímeros e hexâmeros de insulina.

A análise dos resultados de D_h revelou diferenças entre os experimentos realizados em água e em tampão. Em água, observa-se aumento no D_h das partículas após a adição da HP- β -CD e da DM- β -CD, enquanto que em tampão, observa-se aumento muito pouco acentuado no D_h durante a titulação com HP- β -CD e pequena redução de tamanho da partícula durante a titulação com DM- β -CD. Essa diferença poderia ser atribuída, em parte, à presença de cargas na molécula de insulina, que atrairia para sua superfície maior número de íons, conferindo-lhe maior D_h em tampão quando em comparação com o peptídeo em água pura. Em tampão, a dessolvatação seria maior por haver maior número de íons na camada de solvatação da molécula de insulina, provocando uma atenuação na variação do D_h decorrente da complexação com as CDs. A intensa dessolvatação é compatível com o aumento de entropia observado nos experimentos de ITC e, também, com a quebra de interações íon-íon e íon-dipolo entre os íons e a molécula de insulina.

Na etapa seguinte do presente estudo, os complexos de INS:DM- β -CD e de INS:HP- β -CD foram encapsulados em microesferas de PLGA 50:50 e a influência do tipo de complexo de insulina:CD sobre o diâmetro médio, taxa de encapsulamento e perfil de liberação das microesferas foi avaliada.

A proporção molar equivalente a 1:5 de INS:CDs utilizada no preparo das microesferas foi baseada no trabalho realizado por Rodrigues-Junior *et al.* (2003), que, pela caracterização de microesferas de PLGA 50:50 contendo o complexo INS:HP- β -CD observaram que proporções molares acima de 1:5 acarretavam aumento significativo no diâmetro das partículas sem alteração significativa na taxa de insulina encapsulada.

No presente estudo, a utilização dos complexos INS:DM- β -CD e INS:HP- β -CD para o preparo das microesferas de PLGA 50:50 permitiu taxa significativamente maior de insulina encapsulada em comparação às partículas obtidas com o peptídeo não complexado, mas sem que ocorressem diferenças significativas no diâmetro médio das microesferas. A utilização das CDs aumentou a solubilidade da insulina em tampão KH_2PO_4 (pH 8,2), o que provavelmente permitiu o aumento observado na taxa de encapsulamento. A solubilidade apresentada pela insu-

lina em tampão KH_2PO_4 , pH 8,2 aumentou de 50 mg/mL para 87 mg/mL após a complexação com a HP-β-CD e para 100 mg/mL com a DM-β-CD.

As CDs têm sido utilizadas para modificar as características de liberação de sistemas poliméricos em virtude da sua capacidade de formar complexos de inclusão com fármacos, originando espécies com diferentes solubilidades e coeficiente de difusão. A complexação de CDs com proteínas, por meio da inclusão de aminoácidos hidrofóbicos em sua cavidade, pode afetar a estrutura tridimensional e propriedades químicas e biológicas das macromoléculas (Irie, Uekama, 1998). Sendo assim as CDs poderiam funcionar como uma ferramenta adicional para modular a taxa de liberação de insulina presente em microesferas de PLGA (De Rosa *et al.*, 2004). No presente estudo as microesferas obtidas contendo os complexos INS:DMβCD ou INS:HPβCD apresentaram liberação menor e mais lenta de insulina, quando comparada ao perfil de liberação do peptídeo não complexado. Esse resultado poderia estar relacionado às características das microesferas preparadas, como a porosidade e reduzido diâmetro das partículas obtidas e a ocorrência de interações entre os complexos de INS:DM-β-CD e de INS:HP-β-CD com o polímero PLGA, o que acarretaria liberação mais lenta de insulina a partir dos sistemas obtidos.

Embora as microesferas obtidas tenham apresentado um rápido perfil de liberação da insulina encapsulada, estes sistemas poderiam apresentar interesse em relação à administração nasal e pulmonar. De fato, o reduzido diâmetro das partículas produzidas seria ideal para administração do hormônio por estas vias. Além disso, a administração nasal requer rápida liberação do fármaco encapsulado uma vez que os movimentos ciliares podem remover o sistema do local de ação (Hinchcliffe, Illum, 1999; Patton *et al.*, 1999; White, Campbell, 2001).

Apesar de as microesferas contendo os complexos INS:DM-β-CD e INS:HP-β-CD apresentarem resultados aproximados para taxa de encapsulamento, diâmetro das partículas e perfil de liberação, a avaliação *in vivo* da resposta hipoglicemiante por meio da administração das microesferas por via não-parenteral, como por exemplo a pulmonar, é necessária para se comprovar a real similaridade dos sistemas obtidos.

ABSTRACT

Physico-chemical characterization of insulin:dimethyl-β-cyclodextrin and insulin:hydroxypropil-β-cyclodextrin complexes and evaluation of the kind of complexes on the biodegradable microspheres preparation

The main stage in the linking and activation of the specific

receptors by the insulin is the dissociation of this peptide hexamers, normally present in pharmaceutical formulations, in the monomeric active form. Because of this, the use of different cyclodextrins as adjuvants in the formulations containing insulin has been explored and the realized studies have demonstrated that the cyclodextrins can increase the absorption of the insulin mainly by reducing the ability of insulin oligomerization in aqueous media. In this work, complexes of INS:HP-β-CD and INS:DM-β-CD have been characterized by the use of isothermal calorimetry titration (ICT) and dynamic scattering of light. By means of ICT, the thermodynamic parameters of interaction between insulin and the cyclodextrins have been determined, and it was observed that the complexation occurs with an increase of entropy for both systems. The experiments of dynamic scattering of light have not showed reduction in the size of insulin particles, which could indicate the dissociation of insulin hexamers after the complexation with cyclodextrins. Then, the INS: HP-β-CD and INS:DM-β-CD complexes were encapsulated in PLGA microspheres. These systems were characterized and it was not observed any significant difference in the microspheres diameter, but a considerable increase in the hormone loading after the complexation with HP-β-CD and DM-β-CD was shown.

UNITERMS: Insulin. Cyclodextrins. Microspheres. Isothermal titration calorimetry. Hydrodynamic diameter.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, M.M.G.; RODRIGUES-JUNIOR, J.M.; SILVA-CUNHA, A. Encapsulation of insulin-cyclodextrin complex in plga microspheres: a new approach for prolonged pulmonary insulin delivery. *J. Microencapsul.*, v. 21, n. 5, p. 553-564, 2004.
- BEN-JEBRIA, A.; ESKEW, M. L.; EDWARDS, D.A. Inhalation system for pulmonary aerosol drug delivery in rodents using large porous particles. *Aerosol Sci. Technol.*, v. 21, n.5, p. 421-433, 2000.
- CHIEN, Y.W. Human insulin: basic sciences to therapeutic uses. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 22, n. 8, p.753-789, 1996.
- DALGLEISH, D. G.; HALLET, F. R. Dynamic light scattering: applications to food systems. *Food Res. Int.*, v. 28, n. 3, p. 181-193, 1995.

- DE ROSA, G.; LAROBINA, D. LA ROTONDA, M.I.; MUSTO, P.; QUAGLIA, F.; UNGARO, F. How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin system. *J. Control. Release*, v. 102, n. 1, p. 71-83, 2005.
- DEREWENDA, U.; DEREWENDA, A.; G G; HUBBARD, R. E.; KORBER, F. Molecular structure of insulin: The insulin monomer and its assembly. *Br. Med. Bull.*, v.45, n.1, p.4-18, 1989.
- DOTSIKAS, Y.; LOUKAS, Y.L., Kinetic degradation study of insulin complexed with methyl- β cyclodextrin. Confirmation of complexation with electrospray mass spectrometry and $^1\text{H NMR}$. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 29, n.3, 487-494, 2002.
- HEINEMANN, L.; PFUTZNER, A.; HEISE, T. Alternative routes of administration as an approach to improve insulin therapy: update on dermal, oral, nasal and pulmonary insulin delivery. *Curr. Pharm. Des.*, v. 7, n. p. 1327-1351, 2001.
- HIEMENZ, P.C. *Principles of colloid surface chemistry*. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1986. 650 p.
- HINCHCLIFFE, M.; ILLUM, L. Intranasal insulin delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 35, n.2-3, p. 199-2341, 1999.
- IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .3. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.*, v. 86, n.2, 147-162, 1997.
- IRIE, T.; UEKAMA, K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 36, n.1, p. 101-123, 1999.
- KJELDSEN, T., PETTERSSON, A.F. Relationship between self-association of insulin and its secretion efficiency in yeast. *Protein Exper. Purif.*, v.27, n.2, p. 331-337, 2003.
- LADBURY, J. E., Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. *Thermochim. Acta*, v. 380, n. 2, p. 209-215, 2001.
- LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 1996.
- MENARD, F. A. D., RHODES, C. T., Physicochemical aspects of the complexation of some drugs with cyclodextrins. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 16, n. 1, p. 91-113, 1990.
- MICROCAL ITC Data Analysis in Origin[®]. Tutorial Guide. 5.0; MicroCal: 1998. Disponível em: <www.microcalorimetry.com>. Disponível em: 01 nov. 2005.
- PATTON, S.J.; BUKAR, J.; NAGARAJAN, S. Inhaled insulin. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 35, n.2-3, p. 235-247, 1999.
- QUAGLIA, F.; DE ROSA, G.; GRANATA, E.; UNGARO, F.; FATTAL, E.; LA ROTONDA, M. I. Feeding liquid, non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray-drying. *J. Control. Release*, v. 86, n. 1, p. 267-278, 2003.
- RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, n. 11, p. 1142-1164, 1996.
- REKHARSKY, M. V.; INOVE, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem. Rev.*, v. 98, n. 5, p. 1875-1971, 1998.
- REKHARSKY, M. V.; INOVE, Y., TOBEY, S.; METZGER, A.; ANSLYN, E. Ion-pairing molecular recognition in water: Aggregation at low concentration that is entropy-driven. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 124, n. 50, p. 14959-14967, 2002.
- RODRIGUES-JUNIOR, J.M.; LIMA, K.M.; JENSEN, C. E. M.; AGUIAR, M. M. G.; SILVA-CUNHA, A. The effect of cyclodextrin on the in vitro and in vivo properties of insulin-loaded poly (D,L-Lactic-co-Glycolic acid) microspheres. *Artif. Organs*, v. 27, n. 5, p. 480-485, 2003.
- SANTIAGO, R. M.; FIALHO, S. L.; SIVA-CUNHA, A., Design and characterization of an oral delivery system for insulin administration. *STP Pharma Sci.*, v. 13, n. 3, p. 1-4, 2003.
- SCHIPPER, N.G.M.; ROMELIJN, S.G.; VERHOEF, J.C.; MERKUS, F.W.H. Nasal insulin delivery with dimethyl- β -cyclodextrin as an absorption enhancer in rabbits: powder more effective than liquid formulations. *Pharm. Res.*, v. 10, n.5, p. 682-686, 1993.

- SHAO, Z.; KRISHNAMOORTHY, R.; MITRA, A.K. Cyclodextrins as nasal absorption promoters of insulin: mechanistic evaluations. *Pharm. Res.*, v. 9, n.9, 1157-1163, 1992.
- SHAO, Z.; LI, Y.; CHERMAK, T.; MITRA, A. K. Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. II. Effects of β -cyclodextrin derivatives on α -chymotryptic degradation and enteral absorption of insulin in rats. *Pharm. Res.*, v. 11, n.8, 1174-1179, 1994a.
- SHAO, Z.; LI, Y.; MITRA, A.K. Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. III. Pulmonary route of delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 40, n. 5, p. 283-288, 1994b.
- SORIANO, I.; EVORA, C.; LLABRÉS, M. Preparation and evaluation of insulin-loaded poly (DL-Lactide) microspheres using an experimental design. *Int. J. Pharm.*, v. 142, n.2, 135-142, 1996.
- STELLA, V.J.; RAJAWESKI, R.A. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.*, v. 14, n. 5, p. 556-567, 1997.
- TANFORD, C.; *Physical chemistry of macromolecules*. New York: Ed John Wiley & Sons, 1961. 710 p.
- TOKIHIRO, K.; IRIE, T.; UEKAMA, K., Varying effects of cyclodextrin derivatives on aggregation and thermal behavior of insulin in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 45, n. 3, p. 525-531, 1997.
- TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c : Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.*, v. 125, n. 48, p. 14859-14866, 2003.
- UCHIDA, T.; YAGI, A.; ODA, Y.; NAKADA, Y.; GOTO, S. Instability of bovine insulin in poly(lactide-co-glicolide) (PLGA) microspheres. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 44, n.1, p. 235-236, 1996.
- UCHIDA, T.; NAGAREYA, N.; SAKAKIBARA, S.; KONISHI, Y.; NAKAI, A.; NISHIKATA, M.; MATSUYAMA, K.; YASHIDA, K. Preparation and characterization of polylactic acid microspheres containing bovine insulin by a w/o/w emulsion solvent evaporation method. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 49, n. 9, p. 1539-1543, 1997.
- WATANABLE, Y.; MATSUMOTO, Y.; KAWAMOTO, K.; YAZAWA, S.; MATSUMOTO, M. Enhancing effect of cyclodextrins on nasal absorption of insulin and its duration in rabbits. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 10, n. 11, p. 3100-3104, 1992.
- WHITE, J.R.; CAMPBELL, R. K. Inhaled insulin: an overview. *Clinical Diabetes*, v. 19, n. 1, p. 13-16, 2001.

Recebido para publicação em 21 de junho de 2006.

Aceito para publicação em 23 de novembro de 2007.