



NANOPARTÍCULAS

Uma alternativa para a administração de biofármacos

Ilustrações cedidas pelas autoras

Palavras-chave: nanopartículas, biofármacos, liberação controlada.

1. BIOFÁRMACOS

Durante os anos de 1980 o termo “biofármacos” tornou-se sinônimo de proteínas terapêuticas produzidas pela tecnologia de DNA recombinante, incluindo também os anticorpos monoclonais, obtidos pela tecnologia de hibridoma. Mais tarde, os medicamentos a base de ácidos nucleicos usados para a proposta de terapia gênica e tecnologia de anti-senso, foram adicionados ao grupo (WALSH, 2002). No entanto, os produtos baseados em proteínas recombinantes podem ser considerados, atualmente, os principais representantes desse grupo.

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, na década de 1970, marcou o início da era da biotecnologia moderna. Alguns anos depois, em 1982, a insulina humana, desenvolvida pela empresa Genentech (EUA) chegou ao mercado, marcando de vez a aplicação industrial dessa tecnologia (BUCKEL, 1996). Desde então, centenas de centros de pesquisa e empresas no mundo inteiro têm se empenhado na pesquisa, no desenvolvimento e na produção dos biofármacos (DEMAIN, 2004). Nos Estados Unidos, dos novos medicamentos aprovados entre os anos de 2003 a 2006, 24% eram biofármacos. O resultado desses trabalhos é que há mais de 165 produtos aprovados em todo o mundo, com um mercado estimado, em 2004, em torno de 33 bilhões de dólares e projetado para cerca de 70 bilhões de dólares para o ano de 2010 (WALSH, 2006).

Diferentes fatores contribuíram para que as proteínas recombinantes se tornassem substâncias de grande interesse das indústrias farmacêuticas. Primeiramente, destaca-se que a tecnologia de pro-

dução dos biofármacos permitia uma provisão de medicamentos que não poderiam ser produzidos pelas tecnologias convencionais, como por exemplo, a eritropoetina e o GCSF (fator estimulador de colônias de granulócitos). Esta tecnologia possibilitava, também, a produção de uma maior quantidade dos medicamentos que até então estavam disponíveis apenas em quantidades limitadas, como por exemplo, o hormônio do crescimento. A técnica de desenvolvimento de proteínas recombinantes permitia ainda, a produção de medicamentos mais seguros, livres de vírus patogênicos humanos (BUCKEL, 1996). Uma substância que exemplifica essa situação é o hormônio do crescimento humano (hGH). Diferente da insulina, que era extraída de pâncreas bovino e suíno, o hormônio do crescimento é espécie-específico. Pacientes que sofrem de hipopituitarismo necessitam de tratamento de reposição desse hormônio. De 1960 a meados de 1980 o hormônio para esses pacientes era obtido da glândula pituitária de cadáveres. Tal tratamento era considerado satisfatório até que alguns pacientes, em decorrência de uma infecção causada pelo tratamento, apresentaram a síndrome de Creutzfeld-Jacob (CAREY, 1987). Outro ponto positivo dessa tecnologia foi a possibilidade de utilização de mais uma rota para encontrar tratamentos novos, mais seguros e eficazes para as doenças.

Nos 25 anos de existência dos biofármacos no mercado, várias doenças foram e continuam sendo o foco das atenções tanto no desenvolvimento quanto na produção dos medicamentos, sendo as principais o câncer, a hepatite, o diabetes, os distúrbios do crescimento e a hemofilia (WALSH, 2006).

Entre as proteínas, os hormônios e as citocinas representam a maior categoria de produtos (ex. insulinas e gonadotrofinas). As citocinas aprovadas incluem uma variedade de fatores hematopoiéticos recom-

Roberta Márcia Marques dos Santos

Doutora em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais. Serviço de Desenvolvimento Biotecnológico, Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.
roberta@funed.mg.gov.br

* **Sílvia Lígório Fialbo**

Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Minas Gerais. Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brasil.
silvia.fialbo@funed.mg.gov.br

binantes, incluindo eritropoetinas, fatores estimuladores de colônia e produtos baseados nos interferons. Proteínas terapêuticas aprovadas relacionadas ao sangue incluem uma variedade de fatores da coagulação sanguínea, trombolíticos e anticoagulantes recombinantes. A tabela 1 apresenta uma visão geral das principais classes das proteínas recombinantes terapêuticas. Além dessas, há ainda uma variedade de vacinas de subunidades e de produtos baseados nos anticorpos monoclonais, indicados para o tratamento ou detecção de vários cânceres e para prevenção de rejeição de transplante de órgão.

Os biofármacos podem ser produzidos em um dos vários sistemas de expressão disponíveis para a produção de proteínas terapêuticas, incluindo bactérias, leveduras, células de insetos e mamíferos,

mercado, como o anticoagulante Hirusidina (Refludan/Hoechst e Revasc / Canyon Pharmaceuticals) e alguns análogos de insulina como, por exemplo, a insulina Aspart (Novolog/Novo Nordisk), ambos produzidos em *Saccharomyces cerevisiae* (GERNGROSS, 2004; WALSH, 2006).

As células de mamíferos, apesar de serem sistemas de produção industrial tecnicamente complexos, lentos, de baixa produtividade e de alto custo, continuam a ser os de escolha devido a sua similaridade com as células humanas em relação às modificações pós-traducionais e padrões de glicosilação. Cerca de 60 a 70% das proteínas recombinantes terapêuticas são produzidas em células de mamíferos, principalmente nas células de ovário de hamster chinês (CHO). Avanços têm sido alcançados para aumentar a

para as proteínas. Alguns autores consideram essas proteínas modificadas como a segunda geração dos biofármacos, sendo de primeira geração, as proteínas recombinantes idênticas às que ocorrem em humanos (BUCKEL, 1996; WASH, 2004). As modificações controladas de propriedades biofísicas específicas de proteínas podem impactar potencialmente em uma variedade de características terapêuticas. Para modulação das propriedades das proteínas, tais como a eficácia, a estabilidade, a especificidade, a imunogenicidade e a farmacocinética, uma variedade de estratégias têm surgido, dentre elas, a manipulação da estrutura primária, a incorporação de modificações químicas e pós-traducionais e a utilização de “auxiliares” de fusão (MARSHALL et al., 2003).

A rota mais comum para otimização é a mutagenese sítio-específica. O desenvolvimento de um análogo de insulina é um excelente exemplo da abordagem das proteínas modificadas. Devido às suas características intrínsecas, quando estocadas nas concentrações da dose terapêutica, as moléculas individuais de insulina interagem umas com as outras formando oligômeros (principalmente hexâmeros). Após a administração subcutânea ou intramuscular, a sua ação na circulação sanguínea é retardada pela necessidade de deoligomerização inicial. Através da mutação sítio-específica dos aminoácidos envolvidos na auto-associação, tornou-se possível alterar essa propriedade. Análogos de insulina monoméricas com um perfil de tempo de ação mais rápido do que a insulina humana estão no mercado, como por exemplo a Insulina Lispro (Eli Lilly), a Insulina Aspart (NovoRapid/Novo Nordisk) e a Glulisina (Apidra/Sanofi-Aventis). Como consequência prática, essa insulina modificada pode ser administrada minutos antes das refeições, trazendo mais flexibilidade nos horários de alimentação dos pacientes (FROKJAER AND OTZEN, 2005; COELHO, 1997; VAJO AND DUCKWORTH, 2000; WANNMACHER, 2005).

Outra forma de insulina modificada é a insulina glargina (Lantus® e Opsulin®) aprovada como um análogo que apresenta um aumento significativo na duração da atividade. A mudança feita na seqüência de aminoácidos aumentou o ponto isoelétrico da molécula de 5,4 para aproximadamente 7,0. Dessa forma, quando a insulina é formulada, no pH ácido, ela se encontra solúvel e, após a administração, no pH fisiológico, ocorre a formação de microprecipitados de insulina no local da injeção e as moléculas individuais de insulina entram na circulação sanguínea muito lentamente, com duração de 24 ho-

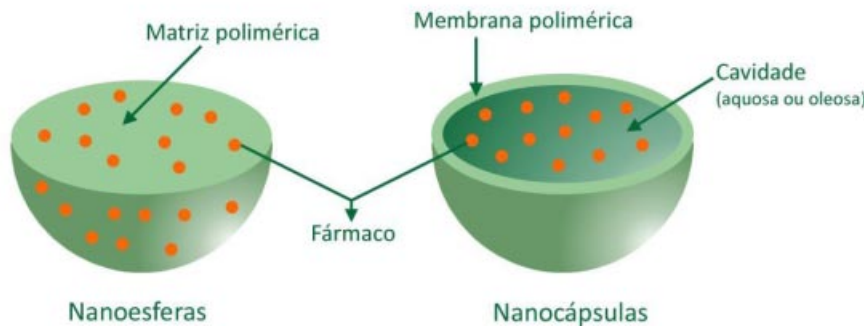


Figura 1 – Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas

ros. A escolha do melhor sistema envolve várias questões, sendo que as principais são as intrínsecas à estrutura da proteína e aquelas relacionadas ao custo da produção.

As bactérias como a *Escherichia coli* apresentam vantagens como uma produção rápida, com bons rendimentos e econômica. No entanto, dentre as desvantagens, estão a incapacidade de modificações pós-traducionais, como a glicosilação, e a possibilidade de formação de corpos de inclusão (JANA AND DEB, 2005). As leveduras e fungos têm a sua utilização para a produção de proteínas terapêuticas para uso humano limitada devido ao perfil de glicosilação diferente daquele das células humanas. Ainda assim, há alguns produtos no

produtividade desse tipo de cultura. Atualmente, são obtidos rendimentos 100 vezes maiores do que a 20 anos atrás, quando da primeira utilização de cultura de células de mamíferos para produção industrial de proteínas recombinantes (WURM, 2004; BROWNE AND AL-RUBEAI, 2007).

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 características funcionais comercialmente importantes

Tabela 1 – Classes de biofármacos e seus principais representantes

CLASSE	PRODUTO	ORGANISMO PRODUTOR	INDICAÇÃO TERAPEUTICA	ANO DA PRIMEIRA APROVAÇÃO
Fatores Sanguíneos recombinantes	Fator VIII	Células CHO e BHK	Hemofilia A	1992
	Fator VIIa	BHK	Algumas formas de hemofilia	1996
	Fator IX	Células CHO	Hemofilia B	1997
Anticoagulantes e trombolíticos recombinantes	Fator ativador de plasminogênio	Células CHO e <i>Escherichia coli</i>	Infarto do miocárdio e infarto agudo do miocárdio	1996
	Hirudina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Terapia anticoagulante e prevenção de trombose venosa	1997
	Proteína C ativada	Células humanas	Septicemia	2001
Hormônios Recombinantes	Insulina	<i>Escherichia coli</i>	Diabetes mellitus	1982
	Insulina análoga	<i>Escherichia coli</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Diabetes mellitus	1996
	Insulina inalável	<i>Escherichia coli</i>	Diabetes mellitus	2006
	Hormônio do crescimento humano	<i>Escherichia coli</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Algumas formas de deficiência de crescimento em crianças e adultos	1985
	Hormônio do crescimento humano análogo (antagonista)	<i>Escherichia coli</i>	acromegalia	2002
CLASSE	PRODUTO	ORGANISMO PRODUTOR	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA	ANO DA PRIMEIRA APROVAÇÃO
Hormônios Recombinantes	Hormônio foliculo estimulante	Células CHO	Infertilidade, anovulação e superovulação	1995
	calcitonina	<i>Escherichia coli</i>	Osteoporose pós menopausa e doença de Paget	1999
	Hormônio luteinizante	Células CHO	Algumas formas de infertilidade	2000
	Glucagon	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hipoglicemia	1998
Fatores de crescimento recombinantes	Eritropoetina	Células CHO	Anemia	1989
	Eritropoetina análoga	Células CHO	Anemia	2001
	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF)	<i>Escherichia coli</i>	Neutropenia induzida por quimioterapia	1991
Interferons e interleucinas	Interferon alfa	<i>Escherichia coli</i>	Hepatites B e C e vários tipos e cancer	1986
	Interferon beta	<i>Escherichia coli</i> e Células CHO	Esclerose múltipla	1993
	Antagonista de receptor de interleucina 1	<i>Escherichia coli</i>	Artrite reumatóide	2001
	Interleucina 2	<i>Escherichia coli</i>	Carcinoma de células renais	1992
Enzimas recombinantes	Glucosidase	Células CHO	Doença de Pompe-	2006
	L-iluronidase	Células CHO	Mucopolissacaridose I	2003
	N-acetilgalactosamina 4 sulfatase	Células CHO	Mucopolissacaridose VI	2005
	Alfa galactosidase	Células CHO	Doença de Fabry	2001

Baseada em WALSH, 2003 e 2006

ras, permitindo uma única injeção ao dia (WALSH, 2003; VAJO AND DUCKWORTH, 2000).

Alterações nas moléculas também permitem melhorar a sua estabilida-

de. A utilização de métodos de otimização racional permite que as proteínas possam ser modificadas de forma que a sua estrutura e a sua atividade sejam mais robustas quando expostas

à protease, ao estresse oxidativo e às mudanças na temperatura, no pH e nas condições da solução. Mutações dos aminoácidos cisteína por serina foram introduzidas com sucesso em várias

proteínas terapêuticas como, por exemplo, com o interferon beta 1b (MARK et al., 1984; MARSHALL et al., 2003).

Uma ferramenta que tem sido utilizada para alterar a farmacocinética de alguns biofármacos é a peguilação, um processo em que cadeias de polietilenoglicol são ligadas aos peptídeos e proteínas. Em geral, a peguilação reduz a velocidade de *clearance* plasmático por reduzir a degradação metabólica e a captação mediada pelo receptor da proteína da circulação sistêmica. Esta técnica também melhora o perfil de segurança das proteínas por conferir uma proteção antigênica e imunogênica aos seus epitopos. Vários biofármacos estão no mercado na forma peguilada como o interferon alfa (PEGasys® e PEG-Intron®), o hormônio do crescimento (Somavert®) e a asparaginase (Oncaspar®) (MARSHALL et al., 2003; FROKJAER AND OTZEN, 2005; HARRIS AND CHESS, 2003).

2. DIFICULDADES NA ADMINISTRAÇÃO DE BIOFÁRMACOS

As proteínas e peptídeos têm proporcionado um crescente interesse devido ao seu papel na fisiopatologia e ao seu progresso nas áreas de biotecnologia e bioquímica. O uso dessas moléculas em medicina, no entanto, tem sido limitado devido a sua baixa biodisponibilidade, a qual resulta da sua baixa estabilidade frente às enzimas proteolíticas e à degradação hidrolítica, da baixa permeabilidade, e da curta meia-vida na circulação sistêmica (REIS et al., 2006). Desde 1987, Carey já enfatizava que uma das principais limitações na utilização das proteínas recombinantes na clínica era a questão da impossibilidade de administração por via oral. Vinte anos depois, esse continua a ser, sem dúvida, um ponto a ser totalmente solucionado.

A via oral é a rota de administração de medicamentos preferida e mais amplamente utilizada. No entanto, ela geralmente não está disponível para a liberação de macromoléculas tais como proteínas. 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, implicam no tratamento pela via parenteral (FROKJAER AND OTZEN, 2005; JORGENSEN et al., 2006). No entanto, essa via apresenta alguns inconvenientes ao paciente, especial-

mente nos casos crônicos, o que diminui a adesão ao tratamento, comprometendo, assim, o resultado esperado. Muitos esforços de pesquisa 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. A maioria dos medicamentos a base de proteínas é formulada como suspensões ou soluções aquosas prontas para o uso ou como pó liofilizado para reconstituição do produto. A formulação de proteínas depende do conhecimento das suas características físico-químicas e biológicas, incluindo estabilidade química e física, imunogenicidade e propriedades farmacocinéticas. A atividade terapêutica de proteínas é altamente dependente da sua estrutura conformacional. No entanto, 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 na otimização da eficácia e da segurança, incluindo a minimização da resposta imune (FROKJAER AND OTZEN, 2005).

De uma perspectiva de formulação, as proteínas são moléculas complexas e desafiadoras para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. O sucesso de uma formulação depende da capacidade da proteína em manter sua estrutura nativa e atividade durante a preparação e a liberação no organismo, assim como durante o período de estocagem. Algumas proteínas precisam de liberação sustentada, enquanto outras requerem uma liberação controlada, imediata ou pulsada. A liberação pode ser alcançada utilizando diferentes sistemas particulados de liberação de fármacos, tais como as micro e nanopartículas poliméricas, os hidrogéis, os lipossomas e as emulsões (JORGENSEN et al., 2006).

A demanda por melhores formas para a administração de proteínas tem resultado na pesquisa pelo desenvolvimento de tecnologias farmacêuticas, e empresas focadas nos métodos de liberação de fármacos têm crescido a cada ano. A maioria das proteínas que estão no mercado podem ser consideradas como candidatas para os novos métodos de liberação, uma vez que são facilmente liberadas pelas vias tradicionais como na forma de injeções subcutâneas (SC), intramusculares (IM) ou intravenosas (IV) e têm a sua farmacologia bem caracterizada. Devem ser considerados fatores como a competição de mercado, a conveniência, a adesão

do paciente, a necessidade de liberação tópica ou local, a toxicidade sistêmica e as questões de segurança. Alguns métodos estão sendo desenvolvidos e estão direcionados para a competição de mercado para os biofármacos aprovados, como a insulina, o hormônio do crescimento humano, os interferons e a eritropoietina. Esses sistemas objetivam uma melhoria na adesão do paciente ao tratamento. Em muitos casos, a administração tópica de proteínas constitui uma via preferencial à sistêmica, pois esta última não promove níveis significativos no local da doença. Em determinadas situações são necessários elevados níveis sistêmicos para alcançar efeito local nos tecidos alvo, o que muitas vezes causa efeitos tóxicos indesejáveis. Devem ser ainda consideradas questões como o impacto dos processos de produção do sistema de liberação na integridade da proteína, e também a integridade da proteína após sua liberação no local de administração. A administração de proteínas degradadas pode representar além dos efeitos colaterais, a perda da potência. Para a administração sistêmica de proteínas, a quantidade liberada na circulação é dependente da eficiência do sistema de liberação e da biologia intrínseca da via de administração (CLELAND et al., 2001). Quando são consideradas as novas opções para administração de proteínas, a via mais comumente abordada é a parenteral, devido ao maior número de estudos em animais e aos testes clínicos que garantem uma maior segurança e eficácia. Os pulmões têm sido extensivamente estudados como uma via de administração de proteínas pela sua grande área de superfície e por permitir uma rápida absorção devido ao contato próximo entre os alvéolos e a circulação (GONDA, 2000; CLELAND et al., 2001). A insulina é, sem dúvida, o protótipo biofarmacêutico, tendo sido o Exubera® (Pfizer) a primeira formulação inalatória aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration), e que permite administrar uma forma de insulina em pó seco. Cerca de 40% da proteína chega ao pulmão profundo e 10% é biodisponível. O início de ação da insulina inalada é mais rápido do que a injetável de ação rápida, o que permite a sua utilização pré-prandial (MCMAHON AND ARKY, 2007). Estudos clínicos demonstraram uma equivalência significativa comparativamente a várias formas de insulina convencional. A insulina inalada apresentou-se efetiva, bem tolerada e melhor aceita em pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2 (HOLLANDER et al., 2004; WANNMACHER, 2005).

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 de liberação prolongada podem desempenhar um papel importante (FROKJAER AND OTZEN, 2005). Devido a suas propriedades de liberação sustentada e prolongada, ao pequeno tamanho e a biocompatibilidade com tecidos e células, as nanopartículas podem ser sistemas promissores para a administração de proteínas e peptídeos (RIEUX et al., 2006.).

3. NANOPARTÍCULAS

A aplicação de materiais poliméricos com finalidades terapêuticas está crescendo muito rápido e tem sido evidenciada em diversos campos como engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo ósseo e outros (NAIR AND LAURENCIN, 2007).

Os sistemas poliméricos estão sendo amplamente estudados e utilizados, e não só permitem uma liberação lenta e gradual do fármaco, como também podem possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo, como sítios de inflamação ou tumor.

Embora o conceito de sistemas de liberação de fármacos não seja novo, um grande progresso tem ocorrido no tratamento de uma variedade de doenças. O transporte de fármacos para o local de ação é considerado o aspecto mais importante, e para que este consiga liberar uma dose eficaz do fármaco no local de ação são necessários veículos adequados. As nanopartículas apresentam aplicações potenciais na administração de substâncias terapêuticas com o objetivo de aumentar a eficiência do transporte de fármacos e melhorar os perfis de liberação (KUMAR, 2000).

A nanotecnologia pode ser definida como um campo científico multidisciplinar baseado no desenvolvimento, na caracterização, na produção e na aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com forma e tamanho na escala nanométrica. Atualmente há um investimento global na nanotecnologia em torno de U\$ 7 bilhões e estima-se para 2011-2015 um investimento de cerca de U\$ 1,5 trilhão (STYLIOS et al., 2005).

Na nanomedicina, ou seja, no desenvolvimento de tratamentos efetivos baseados na nanotecnologia, ocorre a interseção de diferentes áreas, entre elas a biologia, a química, a física, as engenharias química e mecânica, a ciência de materiais e a medicina clínica (FAROKHZAD AND LANGER, 2006). Os primeiros esforços na nanomedicina foram focados no aumento das propriedades das modalidades terapêuticas e de diagnóstico já disponíveis. Recentemente, houve uma alocação de \$144 milhões pelo Instituto Nacional do Câncer e \$54 milhões pelo Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue nos Estados Unidos para a pesquisa em nanotecnologia nos anos de 2004 e 2005, respectivamente. Esses investimentos, juntamente como o grande aumento do número de patentes na área nos últimos cinco anos, ampliou significativamente o interesse dos pesquisadores pela nanomedicina (FAROKHZAD AND LANGER, 2006).

A nanomedicina ainda se encontra nos estágios iniciais e este assunto ainda precisa ser amadurecido. O que se espera é uma entrada contínua de novas plataformas de nanotecnologia que apresentarão um grande impacto positivo em diferentes níveis, incluindo: a detecção de alterações moleculares causadoras de doenças, diagnóstico e imagem de doenças, transporte de fármacos, sistemas multifuncionais para aplicações terapêuticas e de diagnóstico, veículos que aumentem a eficácia *in vivo* de agentes terapêuticos e tecnologias nanométricas que acelerem a pesquisa científica (FAROKHZAD AND LANGER, 2006).

No campo da nanotecnologia os sistemas de liberação controlada de fármacos se destacam e têm apresentado um crescente avanço (EMERICH AND THANOS, 2006). Entre eles, as nanopartículas foram inicialmente desenvolvidas em meados dos anos 70 com o objetivo de transportar substâncias nos organismos, tecidos ou até mesmo células, para melhorar a eficácia terapêutica e diminuir o efeito tóxico das substâncias nelas carregadas (MONTASSER et al., 2000; FATTAI et al., 2002). Elas foram inicialmente desenvolvidas como sistemas de transporte para vacinas e fármacos antineoplásicos. Visando aumentar a captação pelo tumor, a estratégia de transporte do fármaco para o local específico foi empregada e o primeiro passo importante da pesquisa objetivou o desenvolvimento de métodos para redução da

captação das nanopartículas pelas células do sistema reticular endotelial. Simultaneamente, a utilização das nanopartículas para diferentes vias de administração também foi estudada (KUMAR, 2000). Nas últimas quatro décadas, a tecnologia polimérica de liberação controlada apresentou um impacto nas diferentes áreas da medicina, sendo elas, principalmente, a oftalmologia, a pneumologia, a relacionada à dor, a endocrinologia, a cardiologia, a ortopedia, a imunologia e a neurologia, com diferentes produtos já presentes na prática clínica (FAROKHZAD AND LANGER, 2006). O mercado anual no mundo de sistemas poliméricos de liberação controlada, incluindo os sistemas de liberação de fármacos, é estimado em 60 bilhões de dólares e estes sistemas estão sendo utilizados por mais de 100 milhões de pessoas a cada ano.

As nanopartículas são sistemas coloidais poliméricos com tamanho entre 10 e 1000 nm (RIEUX et al., 2006), nos quais o fármaco pode se encontrar dissolvido, recoberto, encapsulado ou disperso. Elas são classificadas em duas categorias, as nanoesferas e as nanocápsulas, as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural. As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco encontra-se no interior de uma cavidade aquosa ou oleosa circundada por uma membrana polimérica, ou podendo também ser encontrado adsorvido na membrana polimérica. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco encontra-se disperso ou adsorvido (Figura 1) (ABDELWAHED et al., 2006). Estes sistemas podem promover um aumento da solubilidade do fármaco neles incorporado, proteger as substâncias de degradação e modificar sua distribuição (LACOEUILLE et al., 2007; RIEUX et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Diferentes aplicações terapêuticas das nanopartículas têm sido estudadas, principalmente para administração pelas vias parenteral e oral. Por meio da administração parenteral, objetiva-se uma distribuição mais seletiva do fármaco, aumentando, assim, seu índice terapêutico. Com relação à administração oral, as pesquisas têm sido direcionadas principalmente à diminuição dos efeitos adversos e à proteção de fármacos passíveis de degradação no trato gastrointestinal, tais como peptídeos e proteínas, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos (KUMAR, 2000; RIEUX et al., 2006; REIS et al., 2007).

As vantagens da utilização de nanopartículas incluem a liberação controlada e/ou prolongada da substância nelas en-

capsuladas, a redução de efeitos adversos associados à substância, a proteção de compostos da inativação antes de atingirem o local de ação, o aumento da penetração intracelular e o aumento da atividade farmacológica (TEIXEIRA et al., 2005).

Diferentes métodos são encontrados para o preparo de nanopartículas, os quais permitem a modulação da sua estrutura, da sua composição e das suas propriedades fisiológicas (RIEUX et al., 2006). A escolha do método de preparo depende do polímero e da solubilidade do fármaco a ser encapsulado. Estes métodos podem ser classificados em duas categorias principais, sendo elas a polimerização de monômeros e a utilização de polímeros pré-formados (REIS et al., 2006). Com exceção dos alquilcianoacrilatos e do malonato de poli-dialquilmetilideno, grande parte dos monômeros adequados para o processo de polimerização micelar promovem uma formação de polímeros não biodegradáveis ou que se degradam muito lentamente. Além disso, as moléculas residuais no meio de polimerização podem ser mais ou menos tóxicas, o que requer a purificação do material. Para contornar as limitações dos métodos de polimerização de monômeros, têm sido empregados os métodos de preparo utilizando polímeros pré-formados.

Entre os métodos que utilizam polímeros pré-formados, a técnica de dispersão de polímeros pré-formados tem sido a mais empregada. Nela, o polímero é disperso em um solvente orgânico imiscível com água como o diclorometano, o clorofórmio e o acetato de etila. A dispersão formada é emulsificada com uma fase aquosa contendo um emulsionante e a fase orgânica é então evaporada. Após evaporação completa do solvente orgânico as nanopartículas são separadas por meio de centrifugação (RIEUX et al., 2006) e podem ser armazenadas como suspensão ou serem liofilizadas.

4. POLÍMEROS

Para que um polímero seja caracterizado como biomaterial ele não deve ser causador de resposta inflamatória ou reações tóxicas no local de aplicação, deve apresentar uma meia-vida adequada, o seu tempo de degradação deve ser compatível como o processo de cicatrização ou regeneração, deve apresentar propriedades mecânicas adequadas à aplicação desejada, seus produtos de degradação não devem ser tóxicos, devem ser capazes de serem metabolizados e eliminados do organismo, e devem apresentar permeabilidade apropriada à aplicação desejada.

Os sistemas de liberação de peptídeos e proteínas são preparados, geralmente, a partir de polímeros biodegradáveis. No entanto, o desenvolvimento de sistemas biodegradáveis requer o controle de um maior número de variáveis já que a cinética de degradação do polímero, *in vivo*, deve permanecer constante para que seja obtida uma liberação controlada da substância. Portanto, fatores como o pH e a temperatura, que podem promover um aumento ou uma redução na velocidade de degradação do sistema, devem ser avaliados durante o desenvolvimento (DASH AND CUDWORTH II, 1998).

Tanto os polímeros sintéticos quanto os naturais têm sido amplamente estudados como biomateriais. O processo de biodegradação envolve a clivagem hidrolítica ou enzimática das ligações levando a erosão do material polimérico (NAIR AND LAURENCIN, 2007).

Os polímeros naturais podem ser considerados como os primeiros biomateriais utilizados clinicamente. No entanto, apesar de apresentarem algumas vantagens, eles podem promover uma atividade antigênica, a qual está associada ao seu processo de purificação, e também podem transmitir doenças. Como exemplos de polímeros naturais, destacam-se aqueles à base de proteínas como as albuminas bovina e humana, o colágeno e a gelatina.

Os polímeros sintéticos, geralmente, são biologicamente inertes, apresentam propriedades mais previsíveis, maior uniformidade lote a lote, além de outros fatores. Eles são representados pelas poliamidas, pelos poliaminoácidos, pelos polialquilcianoacrilatos, pelos poliésteres, pelos poli (ortoésteres), pelos poliuretanos e pelas poliacrilamidas.

A natureza dos polímeros empregados em sistemas de liberação de fármacos influencia significativamente no tamanho e no perfil de liberação do sistema. Os polímeros biodegradáveis sintéticos têm apresentado crescente interesse na aplicação como sistemas de liberação, já que os naturais apresentam, geralmente, uma rápida liberação do fármaco. Os principais critérios na seleção de um polímero são, principalmente, a biodisponibilidade, a biocompatibilidade e a sua velocidade de degradação (RIEUX et al., 2006).

O perfil e o mecanismo de liberação do fármaco dependem da natureza do polímero e também das propriedades físico-químicas da substância nele in-

corporada. Alguns polímeros são menos sensíveis às condições empregadas nos processos de preparação, o que pode ser devido à sua composição química, à sua massa molar e à sua cristalinidade (RIEUX et al., 2006).

Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli(ε-caprolactona), o poli(D,L-lático) (PLA) e os copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico (PLGA) (DASH AND CUDWORTH II, 1998). São polímeros termoplásticos e constituem a classe mais antiga e a mais estudada dos polímeros biodegradáveis (NAIR AND LAURENCIN, 2007). Eles podem ser preparados a partir de uma variedade de monômeros pela abertura do anel e por vias de polimerização dependendo da unidade monomérica. Os derivados dos ácidos lático e glicólico foram empregados como material de fios de sutura na década de 1960 e, desde então, outros poli-ésteres alifáticos foram desenvolvidos como polímeros biodegradáveis e têm despertado bastante atenção devido a biocompatibilidade e aos perfis de degradação controláveis que apresentam.

5. ESTUDOS E PATENTES DA APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PARA A ADMINISTRAÇÃO DE BIOFÁRMACOS

Alguns estudos têm demonstrado que as nanopartículas podem prolongar a liberação e também aumentar a biodisponibilidade de peptídeos e proteínas.

Sánchez e colaboradores (2003) desenvolveram micro e nanopartículas para administração parenteral de interferon. Neste estudo, foi realizada uma comparação da taxa de encapsulamento e da liberação do peptídeo a partir de micro e nanopartículas preparadas por diferentes técnicas de encapsulamento, utilizando o copolímero dos ácidos lático e glicólico (PLGA) como matriz e contendo poloxamer como agente estabilizante. Os resultados mostraram que o interferon pode ser eficientemente encapsulado em micro e nanopartículas. Os sistemas exibiram um perfil de liberação similar e a integridade e a bioatividade da substância foram mantidas. A atividade antiproliferativa do interferon variou dependendo da formulação desenvolvida.

Nanopartículas de polietilenoglicol e ácido poli-lático contendo um peptídeo neuroprotetor (peptídeo intestinal vasoativo) para administração intranasal também foram estudadas (GAO et al., 2007). A biodistribuição, a liberação no cérebro e o efeito neuroprotetor da formulação foram avaliados. Os resultados mostraram que

a formulação de nanopartículas promoveu uma maior concentração do peptídeo no cérebro de camundongos quando comparado à formulação na forma de solução. De acordo com os pesquisadores, as nanopartículas desenvolvidas podem ser carreadores promissores para peptídeos e proteínas.

Reis e colaboradores (2007) avaliaram nanoesferas de alginato-dextrano contendo insulina. As nanoesferas foram caracterizadas quanto ao tamanho e sua distribuição e quanto à forma. A eficiência de encapsulamento e a liberação *in vitro* da insulina também foram determinadas. A bioatividade da proteína foi avaliada *in vitro* e em ratos diabéticos. Os resultados mostraram que as nanoesferas desenvolvidas, de 267 nm a 2760 nm, apresentaram uma eficiência de encapsulamento de 82,5 %. As nanopartículas impediram a liberação da insulina no meio ácido e permitiram uma liberação sustentada do peptídeo em meio neutro. A insulina encapsulada foi bioativa, como demonstrado pelos estudos *in vitro* e *in vivo*.

Algumas patentes também descrevem a utilização de nanopartículas para administração de peptídeos e proteínas:

- patente US 5,500,224 intitulada "Composições farmacêuticas de nanocápsulas" descreve uma composição farmacêutica na forma de suspensão coloidal de nanocápsulas preparadas com o polímero polialquilcianoacrilato (VRANCKX et al., 1996). Esta formulação é adequada para a administração oral de polipeptídeos e polissacarídeos.

- patente US 5,641,745 intitulada "Liberação controlada de micro e nanoesferas biodegradáveis contendo ciclosporina" descreve uma formulação farmacêutica de liberação controlada contendo ciclosporina encapsulada em microesferas ou nanoesferas biodegradáveis (RAMTOOLA, 1997). A formulação apresenta propriedades de liberação lenta da ciclosporina e é adequada para o transporte do peptídeo para o intestino quando administrada pela via oral.

- patente US 20060033224 intitulada "Microesferas/nanoesferas poliméricas e encapsulamento de proteínas" descreve um processo de formulação de microesferas e nanoesferas e o encapsulamento de proteínas com atividade terapêutica e outras substâncias (CASTOR, 2006). Os sistemas formados foram capazes de encapsular as proteínas e promover uma liberação controlada destas substâncias.

- patente US 7,291,598, intitulada "Nanopartículas para o transporte de proteínas", descreve nanopartículas compos-

tas de quitosano, ácido poli-glutâmico e pelo menos uma substância ativa e que apresentam uma superfície carregada positivamente (SUNG et al 2007). As nanopartículas desenvolvidas são capazes de aumentar a permeabilidade da proteína encapsulada por meio do transporte pela via paracelular.

- patente US 20070009605 intitulada "Encapsulamento de peptídeos hidrossolúveis" descreve um processo de preparo de microesferas ou nanoesferas biodegradáveis por meio da técnica de emulsificação óleo em água (IGNATIOUS, 2007). Estas formulações são adequadas para a liberação controlada de peptídeos bioativos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os gastos com pesquisa e desenvolvimento na área biofarmacêutica estão em torno de 19 a 20 bilhões de dólares nos últimos três ou quatro anos. Estima-se que aproximadamente 2.500 fármacos de base biotecnológica estejam em fase de descoberta, 900 em triagem pré-clínica e 1.600 em testes clínicos (WALSH, 2006). Do ponto de vista técnico, avanços na engenharia de proteínas e nos sistemas de liberação irão garantir a aprovação de um número ainda maior de produtos modificados e de liberação controlada.

A eficiência e a segurança da administração de proteínas terapêuticas são a chave do sucesso comercial e, em alguns casos, a demonstração da eficácia nos atuais e futuros produtos biotecnológicos. Várias empresas têm se dedicado à busca por diferentes e mais eficientes métodos de liberação de proteínas. Para avaliar criticamente as opções, cada método deve ser considerado em termos de quão fácil ele pode ser para a produção, para o impacto na qualidade da proteína, para a biodisponibilidade e para a toxicidade. Em geral, os sistemas de liberação de proteínas evoluíram muito nos últimos anos, mas, um grande esforço em pesquisa e desenvolvimento ainda é necessário para tornar a maioria desses sistemas viáveis para a comercialização. Os sistemas nanoparticulados são uma oportunidade para melhorar a adesão do paciente ao tratamento e sua qualidade de vida por meio da redução do número de injeções.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H. A pilot study of freeze drying of

poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, p. 178-188, 2006.

Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends in Biotechnology*, v. 25, p. 425-32, 2007.

Buckel, P. Recombinant proteins for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 17, p. 450-6, 1996.

Carey NH. Production and use of therapeutic agents. *British medical journal (Clinical research ed.)*, v. 10, n. 295, p. 907-8. 1987.

Castor TP. Polymer microspheres/nanospheres and encapsulating therapeutic proteins therein. *United States Patent 20060033224*. Feb 2006.

Cleland JL, Daugherty A, Mersny R. Emerging protein delivery methods. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p. 212-9, 2001.

Coelho, MAS. Insulina Lispro: um produto da biotecnologia. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.1, p. 28-29, 1997.

Dash AK, Cudworth II GC. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, v. 40, p. 1-12, 1998.

Demain, AL. The Biopharmaceutical Revolution. 2004. http://pharmalicensing.com/articles/dispatch/1130421281_4360dc215fedf. Acesso em 06/12/2007

Emerich DF, Thanos CG. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. *Biomolecular Engineering*, v. 23, p. 171-184, 2006.

Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n. 14, p.1456-1459, 2006

Fattal E, Vauthier C. Nanoparticle as Drug Delivery Systems, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, p.1864-1881, 2002,.

Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 4, p. 298-306, 2005

Gao X, Wu B, Zhang Q, Chen J, Zhu J,

- Zhang W, Rong Z, Chen H, Jiang X. Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration. *Journal of Controlled Release*, v. 121, p. 156-167, 2007.
- Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, v. 22, p. 1409-1414, 2004.
- Gonda I. The ascent of pulmonary drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, n. 7, p. 940-945, 2000.
- Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 2, n. 3, p. 214-221, 2003.
- Hollander PA, Blonde L, Rowe R, Mehta AE, Milburn JL, Hershon KS, Chiasson JL, Levin SR. Efficacy and safety of inhaled insulin (exubera) compared with subcutaneous insulin therapy in patients with type 2 diabetes: results of a 6-month, randomized, comparative trial. *Diabetes Care*, v. 27, n. 10, p. 2356-2362, 2004.
- Ignatious FX. Encapsulation of water soluble peptides. United States Patent 20070009605. Jan 2007.
- Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, n. 3, p.289-298. 2005.
- Johnson, I S. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*, v. 219, n.4585, p. 632-637.
- Jorgensen L, Moeller EH, van de Weert M, Nielsen HM, Frokjaer S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, n. 3-4, p. 174-182, 2006.
- Kumar MNVR. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3 (2), p. 234-258, 2000.
- Lacoeuille F, Hindre F, Moal F, Roux J, Passirani C, Couturier O, Cales P, Le Jeune, JJ, Lamprecht A, Benoit JP. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.06.014.
- Mark, D F et al. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, v.81, p. 5662-5666,1984.
- Marshall SA, Lazar GA, Chirino AJ, Desjarlais JR. Rational design and engineering of therapeutic proteins. *Drug Discovery Today*, v.8,n. 5, p. 212-221, 2003.
- McMahon GT, Arky RA. Inhaled insulin for diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, v. 356, p. 497-502, 2007.
- Montasser I, Briançon S, Lieto J, Fessi H. Méthodes d'obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques. *Journal de Pharmacie de Belgique*, v. 55, p. 155-167, 2000.
- Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 762-798, 2007.
- Ramtoola Z. Controlled release biodegradable micro- and nanospheres containing cyclosporine. United States Patent 5,641,745. Jun 1997.
- Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 2, p. 53-65, 2006.
- Reis CP, Ribeiro AJ, Houg S, Veiga F, Neufeld RJ. Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30, p. 392-397, 2007.
- Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, v. 116, p. 1-27, 2006.
- Sánchez A, Tob o M, González L, Fabra A, Alonso MJ. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *European Journal of Pharmaceutics Science*, v.18, p. 221- 229, 2003
- Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracteriza o e Estabilidade F sico-química de Sistemas Polim ricos Nanoparticulados para Administra o de Fármacos. *Química Nova*, v. 26 (5), p. 726-737, 2003.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.
- Stylios GK, Giannoudis PV, Wan T. Application of nanotechnologies in medical practice. *International Journal of the Care of the Injured*, v. 365, p. S6-S13, 2005.
- Sung HW, Lin YH, Tu H. Nanoparticles for protein drug delivery. United States Patent 7,291,598. Nov 2007.
- Teixeira M, Alonso MJ, Pinto MMM, Barbosa CM. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 491-500, 2005.
- Vajo Z, Duckworth WC. Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millennium. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 1, p. 1-9, 2000.
- Vranckx H, Demoustier M, Deleers M. Pharmaceutical compositions containing nanocapsules. United States Patent 5,500,224. Mar 1996.
- Walsh G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15, n. 2, p. 135-138, 2002.
- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nature Biotechnology*, v. 8, p. 865-870, 2003
- Walsh G. Second-generation biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, n.2, p. 185-196, 2004
- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 7, p. 769-776, 2006.
- Wannmacher L. Novas insulinas: qual a real vantagem? *Uso Racional de Medicamentos:temas selecionados*. ISSN 1810-0791, v. 2, n. 8, p. 1-6, 2005.
- Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, v. 22 n. 11, p. 1393-1398, 2004.