

Sofia Moreira Botelho

Novas Estratégias de Administração de Proteínas e Peptídeos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Carla Vitorino

Assinatura da Tutora

(Professora Doutora Carla Vitorino)

Sofia Botelho

Assinatura da Aluna

(Sofia Moreira Botelho)

Eu, Sofia Moreira Botelho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2006014316, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de julho de 2014

as)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Carla Vitorino, pela sua disponibilidade, colaboração e pela transmissão de conhecimentos.

Aos meus pais e amigas, por todo o apoio que sempre me deram, pela sua paciência e compreensão.

Resumo

Nos últimos anos a importância das proteínas e peptídeos como agentes terapêuticos tem vindo a crescer em áreas como a diabetes, doenças metabólicas, cardiovasculares e infecciosas. O aumento do número destes agentes terapêuticos tem levado a inúmeros desafios relacionados com o seu transporte, sendo o principal objetivo proteger e encaminhar a molécula até ao seu local de ação. O baixo efeito terapêutico de proteínas e peptídeos pode dever-se a vários fatores, à semelhança do que acontece com outras moléculas, como por exemplo, à eliminação através da filtração renal, ao *uptake* pelo sistema reticuloendotelial e à acumulação em células que não as células alvo. Outros problemas destes agentes são a sua baixa estabilidade hidrolítica e o seu elevado peso molecular e composição química, que dificultam a sua captação por parte das células alvo.

A necessidade de contornar estas questões tem levado assim a uma crescente procura de estratégias de administração adequadas. Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidas diversas técnicas para permitir uma administração segura e eficaz de proteínas e peptídeos, preservando a sua atividade biológica e permitindo assim a maximização do seu efeito terapêutico.

Atualmente existem inúmeras estratégias de administração em estudo, sendo este um campo extremamente vasto. Assim sendo, no presente trabalho serão referidas algumas destas estratégias, tais como transportadores lipídicos e outros tipos de transportadores, como nanopartículas poliméricas e nanomateriais inorgânicos. Como exemplo específico para a administração por via oral de proteínas e peptídeos serão também abordadas as nanopartículas com ligandos peptídicos.

Para administração destes agentes terapêuticos também serão referidas algumas estratégias, em particular para a sua administração por via transdérmica (métodos ativos e passivos) e por via pulmonar (para ação tópica e sistémica).

Palavras-chave: proteínas, peptídeos, transportadores lipídicos, nanopartículas poliméricas, nanomateriais inorgânicos, nanopartículas com ligandos peptídicos, via transdérmica, métodos ativos, métodos passivos, via pulmonar

Abstract

In recent years the importance of proteins and peptides as therapeutic agents has been increasing in areas such as diabetes, metabolic, cardiovascular and infectious diseases. The increasing number of protein and peptide drugs has led to numerous challenges related to their transport, with the aim of protecting and taking the molecules to their targets.

Similarly to what happens to other molecules, the low therapeutic effect of proteins and peptides may be due to several factors, such as elimination via renal filtration, uptake by the reticuloendothelial system and accumulation in cells other than target cells. Other issues of protein pharmaceuticals are their low hydrolytic stability, high molecular weight and chemical composition, which hamper their uptake by target cells.

The need to overcome these issues has, therefore, led to a growing demand for suitable administration techniques. In recent years, several strategies have been developed to allow the safe and effective administration of protein pharmaceuticals by preserving their biological activity and maximizing its therapeutic effect.

Currently, there are many administration strategies under study, making this an extremely wide field. In the present work, some of these techniques will be referred, including lipid carriers and other carriers, such as polymeric nanoparticles and inorganic nanomaterials. As a specific example for the oral administration of proteins and peptides, nanoparticles with peptide ligands will be also addressed. Approaches for the delivery of therapeutic proteins and peptides through particular pathways, involving transdermal (active and passive techniques) and pulmonary (for topical and systemic applications) routes of administration will be additionally presented.

Keywords: proteins, peptides, lipid carriers, polymeric nanoparticles, inorganic nanomaterials, nanoparticles with peptide ligands, transdermal delivery, active techniques, passive techniques, pulmonary delivery

Lista de Figuras

Figura 1- Administração de fármacos através de microagulhas

22

Siglas e Abreviaturas

ARDS - Síndrome da dificuldade respiratória aguda

CNTs - Nanotubos de carbono

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crónica

ED - Eficiência de administração

EN - Eficácia de nebulização

Er:YAG - Laser de lítio e alumínio

FR - Fração respirável

GLP-I - Peptídeo semelhante ao glucagon

hGH - Hormona de crescimento humano

IgG - Imunoglobulina humana G

IL-2 - Interleucina 2

INF- α - Interferão alfa

INFalfa2b - Interferão alfa-2b

LFS- Sonoforese de baixa frequência

LHRH - Hormona libertadora da hormona luteinizante

NLCs - Transportadores lipídicos nanoestruturados

NPs - Nanopartículas

OVA - Ovalbumina

PEG - Polietilenoglicol

PLGA - Ácido poliláctico-co-glicólico

PTH - Hormona paratiroideia

rhG-CSF - Fator estimulante de colónias de granulócitos

SA-R8 - Ácido esteárico-octaarginina

SLNs - Nanopartículas lipídicas sólidas

TNF- α - Fator de necrose tumoral

VIP - Peptídeo intestinal vasoativo

1. Introdução	8
2. Transportadores de proteínas e peptídeos	9
2.1. Transportadores lipídicos	9
2.1.1. Lipossomas	10
2.1.2. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs)	12
2.1.3. Transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs)	13
2.2. Outros tipos de transportadores	14
2.2.1. Nanopartículas poliméricas	14
2.2.2. Nanomateriais inorgânicos	15
2.2.2.1. Sílica mesoporosa	15
2.2.2.2. Hidroxiapatite	15
2.2.2.3. Nanotubos de carbono (CNTs)	15
2.2.3. Nanopartículas com ligandos peptídicos para administração oral	16
3. Administração transdérmica de proteínas e peptídeos	17
3.1. Métodos ativos	18
3.1.1. Iontoforese	18
3.1.2. Eletroporação	19
3.1.3. Sonoforese	20
3.1.4. Microagulhas	21
3.1.5. Ablação térmica	23
3.1.6. Ablação por radiofrequência	24
3.1.7. Ablação por laser	24
3.2. Métodos passivos	24
4. Administração pulmonar de proteínas e peptídeos	25
4.1. Aplicação tópica	25
4.2. Administração sistêmica	26
5. Conclusão	27
6. Bibliografia	27

I. Introdução

Os peptídeos e proteínas usados na terapêutica são moléculas que deviam ser produzidas pelo organismo mas que, por alguma razão, nomeadamente uma determinada patologia, não conseguem ser sintetizados naturalmente.

A crescente importância destas moléculas pode ser atribuída ao desenvolvimento de métodos analíticos, que permitiram a descoberta de novos agentes aplicáveis como biofármacos, à biologia molecular e engenharia genética que, por sua vez, levaram a uma produção em larga escala de polipeptídeos, bem como a uma melhor compreensão do papel das proteínas reguladoras na fisiopatologia de doenças humanas¹.

A seletividade e ação eficaz e potente das proteínas e peptídeos têm tornado estes agentes terapêuticos como uma referência no tratamento de inúmeras doenças, como é o caso da insulina, hormona de crescimento humano (hGH), calcitonina, oligonucleótidos, vasopressina, hormona paratiroideia (PTH), interferões, entre muitas outras usadas no tratamento de diversas patologias².

Contudo, o potencial terapêutico e a aplicação clínica de proteínas e peptídeos é, muitas vezes, prejudicado por problemas relacionados com a sua via de administração, bem como com a sua instabilidade e consequente dificuldade em atingir o alvo terapêutico.

Apesar de ser a via preferida de administração de fármacos em geral, a administração oral de proteínas e peptídeos não é viável devido à fraca biodisponibilidade oral, provocada pela sua suscetibilidade à degradação por enzimas gastrointestinais, acidez do estômago que causa a sua desnaturação, grande dimensão das moléculas, reduzida absorção pela membrana intestinal, imunogenicidade e tendência para agregar e adsorver¹. Nos últimos anos têm vindo a ser estudadas diversas formas de encapsular as proteínas e peptídeos em transportadores adequados, de forma a serem administradas pela via oral, evitando os problemas anteriormente referidos e preservando assim o seu efeito terapêutico¹.

Atualmente, a maior parte das proteínas é administrada por via parentérica. No entanto, a administração pela via parentérica também apresenta desvantagens, pois leva a uma baixa adesão à terapêutica pelo facto do curto tempo de meia vida das proteínas e peptídeos requerer administrações repetidas, o que é desconfortável para os doentes³. Outra desvantagem desta via de administração é o facto de se tratar de um procedimento invasivo e de requerer cuidados quanto à higiene e assepsia, às vias de aplicação e suas técnicas, o que requer a supervisão de um profissional de saúde especializado³. Por estas razões, tem havido um crescente interesse no desenvolvimento de técnicas não invasivas para administração de proteínas e peptídeos, como é o caso da administração transdérmica,

evitando assim a degradação gastrointestinal e promovendo a manutenção de níveis sanguíneos de fármaco constantes. No presente trabalho, serão referidas algumas das estratégias de administração transdérmica de proteínas, abrangendo métodos ativos e passivos.

Outras vias de administração alternativas às vias injetáveis têm sido objeto de estudo, como é o caso da absorção através das mucosas. As mucosas apresentam uma menor barreira que a pele e a vantagem de evitarem a eliminação de primeira passagem associada à via oral⁴.

Independentemente da via através da qual são administradas, muitas proteínas terapêuticas não possuem propriedades físico-químicas necessárias para a sua absorção, para atingirem e penetrarem as células alvo. Assim sendo, são necessários sistemas de transporte especificamente direcionados às células alvo, de modo a serem ultrapassadas as limitações anteriormente referidas e melhorar a performance dos fármacos proteicos.

Existem vários tipos de transportadores, sendo os transportadores lipídicos, as nanopartículas poliméricas, as nanopartículas com ligandos peptídicos e os transportadores inorgânicos os escolhidos como objeto de revisão no presente trabalho.

2. Transportadores de Proteínas e Peptídeos

2.1. Transportadores Lipídicos

Os transportadores lipídicos têm sido estudados nos últimos anos como uma alternativa para o transporte de peptídeos e proteínas, tendo como objetivo protegê-los e encaminhá-los até ao seu local de ação. Estes transportadores funcionam assim como veículos de fármacos, tendo como constituintes fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol e triglicéridos.

Existem vários tipos de transportadores lipídicos para administração controlada de proteínas e peptídeos, tais como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), suspensões de óleos, microemulsões, implantes lipídicos, microcilindros e microtúbulos lipídicos, microbolhas e microsferas⁵.

No presente trabalho será discutido o uso de lipossomas, SLNs e NLCs como transportadores lipídicos de proteínas e peptídeos.

2.1.1. Lipossomas

Descritos pela primeira vez nos anos 60, os lipossomas são vesículas formadas por bicamadas lipídicas concêntricas, compostas principalmente por fosfolípidos naturais ou sintéticos, envolvendo um ou vários compartimentos aquosos. Devido à sua natureza anfífilica, podem incorporar tanto substâncias ativas hidrofílicas como hidrofóbicas. As substâncias lipofílicas podem ser incorporadas dentro das bicamadas lipídicas e as hidrofílicas são solubilizadas no centro aquoso ou espaços intralamelares⁶.

A administração de lipossomas pode ser realizada através de quase todas as vias de administração, sendo a mais frequente a injeção intravenosa.

No caso específico da administração de proteínas e peptídeos encapsulados em lipossomas, têm sido estudadas diferentes vias de administração dos mesmos, como é o caso das vias parentérica, oral, pulmonar, intranasal, transdérmica e ocular⁷.

Existem diferentes tipos de lipossomas, obtidos consoante o seu método de preparação. O método de preparação deve ser escolhido cuidadosamente, pois o número de bicamadas, a composição química e o volume do encapsulado têm uma grande influência sobre a aplicação dos lipossomas. A preparação deste tipo de transportador lipídico pode ser assim dividida em três fases: preparação das fases aquosa e lipídica, hidratação do lípido e também, para a maioria dos sistemas, um procedimento secundário, necessário para a obtenção do produto final⁸.

Quanto ao seu diâmetro os lipossomas classificam-se em:

- vesículas unilamelares pequenas (SUV, do inglês *small unilamellar vesicles*): constituídas apenas por uma bicamada fosfolipídica e um pequeno compartimento aquoso. O seu diâmetro varia entre 25 a 50 nm⁹;
- vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *large unilamellar vesicles*): constituídas apenas por uma bicamada fosfolipídica e um grande compartimento aquoso. O seu diâmetro varia entre 100 e 200 µm⁹;
- vesículas multilamelares (MLV, do inglês *multilamellar vesicles*): formadas por bicamadas lipídicas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos, tendo um diâmetro médio de 1 µm a 2 µm (10 camadas)⁹.

A libertação do fármaco, a estabilidade *in vivo* e a biodistribuição são determinadas pelo tamanho das vesículas, pela carga da sua superfície, hidrofobia da superfície e fluidez da membrana⁹.

Os diferentes tipos de lipossomas têm assim uma forte influência no perfil farmacocinético do fármaco libertado, especialmente no caso de proteínas e peptídeos. A

permeabilidade membranar pode ser controlada através da seleção da composição dos fosfolípidos e pela presença de outros componentes, como moléculas de colesterol⁹.

São vários os métodos utilizados na encapsulação de péptidos e proteínas em lipossomas, sendo eles: hidratação do filme lipídico; extrusão; congelamento e descongelamento; sonicação; desidratação e rehidratação; evaporação em fase reversa; método “pro-lipossoma”, entre outros^{6,9}.

Os lipossomas podem ser facilmente alterados através da ligação de polímeros hidrofílicos à sua superfície, transformando o lipossoma num “stealth liposome”, um sistema estabilizado, aumentando assim o seu tempo de meia vida na corrente sanguínea pelo facto de ser “invisível” ao sistema imunitário. O desenvolvimento de sistemas estabilizados permite também a criação de estratégias de direcionamento de fármacos^{5,9}.

A existência de polímeros à superfície pode assim afetar a libertação do fármaco, bem como controlá-la, sendo o polietilenoglicol (PEG) o polímero mais utilizado. O revestimento de lipossomas por polímeros demonstrou ser eficaz no transporte de peptídeos. Como exemplo temos a insulina, que incorporada num lipossoma revestido por PEG, levou a uma diminuição dos níveis de glucose plasmática em ratinhos⁷. Noutro estudo feito em ratos, foi incorporado o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) em lipossomas, tendo ocorrido a diminuição da pressão arterial em ratos hipertensos⁷.

Relativamente à administração oral de lipossomas revestidos por quitosano, a incorporação de insulina nos mesmos levou a um aumento da absorção, assim como a uma diminuição dos níveis de glucose sanguínea⁷.

As proteínas, em geral, são incorporadas no compartimento aquoso dos lipossomas, no entanto, a parte hidrofóbica da proteína pode interagir com a membrana lipídica, transformando-se a proteína num “molten globule” (glóbulo fundido). Nestes casos a proteína existe numa conformação intermédia, desdobrada, facilitando a partição da parte hidrofóbica da proteína nas bicamadas lipídicas. Este foi o mecanismo proposto para a interação do fator estimulante de colónias de granulócitos (rhG-CSF) e do fator de necrose tumoral (TNF- α) com vesículas lipídicas, devendo também ser consideradas as interações eletrostáticas⁵.

No caso da incorporação de interleucina-2 (IL-2) em lipossomas, esta revelou ser dependente do pH e carga dos lipossomas e também da força iónica do meio de hidratação. O valor mais alto de eficiência de incorporação foi de cerca de 81% e foi obtido com o uso de lipossomas constituídos por fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol (9:1), carregados negativamente. Com este estudo concluiu-se que a administração de lipossomas contendo IL-2 provoca uma melhoria da resposta auto imune⁵.

Desta forma, pode-se concluir que os lipossomas são bons sistemas de transporte de proteínas e peptídeos, pois são biocompatíveis, adequados a fármacos que são rapidamente metabolizados e excretados, permitem controlar os níveis de fármaco em circulação e é com facilidade que se modifica a sua superfície⁹.

2.1.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLNs – *Solid lipid nanoparticles*)

Desenvolvidas no início dos anos 90, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) apresentaram-se como um sistema alternativo de encapsulação de princípios ativos em relação aos sistemas coloidais tradicionais, como lipossomas, emulsões e nanopartículas poliméricas³. São partículas tipicamente esféricas, com um tamanho que varia entre 50 a 1000nm. Consistem numa matriz lipídica sólida, estabilizada por uma solução aquosa de tensoativo(s), (lecitina, polissorbato 80, entre outros, tipicamente numa concentração 0,5-5%). A matriz é constituída por lípidos biocompatíveis e biodegradáveis (por exemplo, triglicéridos, glicéridos parciais, ácidos gordos de cadeia longa e ceras), na qual o fármaco é dissolvido ou disperso. A grande diferença em relação aos outros sistemas é a sua estabilidade físico-química excelente, que lhes confere uma maior proteção contra a degradação das moléculas. Relativamente às nanopartículas poliméricas, as SLN apresentam um perfil de citotoxicidade mais favorável^{5,10}.

Outras vantagens das SLN são, por exemplo, a sua vasta aplicação, maior biodisponibilidade, modulação da libertação, uso de lípidos fisiológicos, o facto de não serem usados solventes orgânicos na produção, a possibilidade de produzir nanossuspensões lipídicas altamente concentradas e de serem produzidas em larga escala. Como principais desvantagens temos a dinâmica imprevisível das transições polimórficas associadas aos lípidos e a possibilidade de formação de líquidos sobre-arrefecidos (*supercooled melts*), que podem causar problemas de estabilidade durante o armazenamento ou administração (por exemplo, expulsão do fármaco, aumento do tamanho de partícula, tendência para gelificar) e a sua baixa eficiência de incorporação devido à estrutura cristalina do lípido sólido^{9,11}.

Podem ser administradas por várias vias, como a oral, parentérica, cutânea, ocular, nasal e rectal^{12,13}.

Existem vários métodos para a preparação de SLN, tais como homogeneização a alta pressão (quente e frio), microemulsificação, emulsificação-*evaporação* de solvente, dupla emulsão (A/O/A), entre outras^{5,14}. Estas partículas são mais adequadas para a incorporação de proteínas lipofílicas devido à sua natureza hidrofóbica e reduzido tamanho³.

Zhan *et al*, estudaram o uso de SLN modificadas com ácido esteárico-octaarginina (SA-R8) como transportadores de insulina, para serem administradas por via oral. Foram

feitos estudos *in vivo* em ratinhos diabéticos, tendo-se comparado a absorção de insulina contida numa solução com a da insulina contida em SLN modificadas por SA-R8. As SA-R8-Ins-SLNs protegeram parcialmente a insulina das enzimas gastrointestinais. A internalização da insulina pelas células Caco-2 foi cerca de 18,44 vezes superior no grupo em que foram administradas SA-R8-Ins-SLNs relativamente ao grupo onde apenas foi administrada uma solução de insulina. Conclui-se assim que as SA-R8-Ins-SLNs promovem a absorção de insulina por via oral, revelando assim serem um veículo promissor para administração oral de insulina. No entanto, são necessários mais estudos relativamente à estabilidade da insulina no trato gastrointestinal, bem como ao mecanismo de absorção de SA-R8-Ins-SLNs¹⁵.

As SLN também demonstraram ser um método viável de transporte de insulina para administração por via pulmonar. Segundo *Liu et al*, foram usadas SLN compatíveis com um nebulizador no transporte de insulina, tendo apresentado resultados bastante positivos. Nesse estudo, em condições ótimas, o transporte de insulina incorporada em SLN (ED-eficiência de administração), a fração respirável (FR) e a eficiência da nebulização (EN) atingiram os valores de 96,53, 82,11 e 63,28%, respetivamente, tendo as Ins-SLNs permanecido estáveis durante o período de nebulização. Os níveis de glucose em jejum baixaram para 39,41%¹⁶.

2.1.3. Transportadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCs)

Consideradas nanopartículas lipídicas de segunda geração, as NLCs na sua composição apresentam não só lípidos sólidos, mas sim uma mistura de lípidos líquidos (óleos) e sólidos, numa proporção que permita que a mistura seja sólida a uma temperatura de pelo menos 40 °C. Estes transportadores permitem uma maior incorporação de fármaco, sendo essa a sua principal vantagem relativamente às SLNs, devido à formação de uma estrutura imperfeita e menos organizada. Esta estrutura confere uma maior flexibilidade e modulação da libertação do fármaco, impedindo também a sua expulsão devido a fenómenos de recristalização⁹.

As NLCs demonstraram a sua eficácia como transportadores de calcitonina, por via oral, e ciclosporina A, por via oral e ocular^{9,17}.

2.2. Outros tipos de transportadores

2.2.1. Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são um tipo de transportador passível de ser administrado por diferentes vias, como oral, tópica, pulmonar e parentérica, à semelhança de outros transportadores já referidos.

Este tipo de nanotransportadores pode apresentar-se sob a forma de nanocápsulas ou nanoesferas, sendo as primeiras constituídas por um núcleo oleoso rodeado por um invólucro polimérico e as segundas formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido e adsorvido, não contendo nenhum óleo na sua constituição¹⁸.

Existem vários métodos de preparação, podendo ser classificados, de uma forma geral, em métodos baseados na polimerização *in situ* de monómeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados¹⁹.

O interesse neste tipo de nanotransportadores tem vindo a crescer, pois os polímeros podem ser facilmente bioconjugados e co-polimerizados, sendo também possível modificar a sua superfície para melhorar a capacidade de transporte das moléculas encapsuladas e de fazer com que atinjam as células alvo²⁰. Outras vantagens destes transportadores relacionam-se com a proteção da substância transportada, melhor biodisponibilidade e baixa toxicidade.

As nanopartículas poliméricas têm sido aplicadas para administração por via oral de proteínas e peptídeos, pois protegem-nos da degradação enzimática e hidrolítica do trato gastrointestinal, facilitando assim a sua absorção. Foi verificado que o tamanho das NPs tem uma forte influência na sua absorção e biodisponibilidade, sendo as mais pequenas absorvidas pelo trato GI e encaminhadas até aos órgãos linfáticos com maior facilidade²¹. Ainda relativamente à administração oral de proteínas e peptídeos em NPs poliméricas, esta demonstrou depender do pH, quando efetuada em NPs sensíveis a este parâmetro. Este tipo de nanopartículas é obtido com polianiões, policatiões, misturas de ambos e polímeros “*cross-linked*”²². Quanto ao mecanismo de libertação do fármaco, este pode resultar da dissolução dos transportadores ou intumescências dos mesmos e ainda de uma mistura de ambos a um pH específico²².

Quanto à administração pulmonar de NPs poliméricas, os polímeros utilizados são normalmente naturais, como a gelatina, quitosano e alginato, ou sintéticos, como poloxâmero, ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) e PEG. A gelatina é biocompatível e biodegradável, apresentando a capacidade de se ligar covalentemente ao composto ativo a ser transportado; o alginato é outro polímero natural biocompatível com a matriz hidrofílica,

sendo assim ideal para incorporar proteínas; o quitosano aumenta a mucoadesão e a permeação, facilitando desse modo a retenção das NPs poliméricas e a posterior administração pulmonar; o PLGA é sintético, biocompatível e biodegradável e permite controlar a liberação das substâncias incorporadas²⁰.

A gelatina, quitosano, alginato, PLGA, poloxâmero e PEG foram estudados como transportadores de proteínas por via pulmonar, sendo a gelatina e o PLGA os que apresentaram melhores resultados e mais viáveis²⁰.

2.2.2. Nanomateriais inorgânicos

2.2.2.1. Sílica mesoporosa

Os materiais mesoporosos permitem controlar a incorporação e liberação de moléculas, sendo bastante úteis. Podem ser formados a partir de vários materiais, mas é a sílica mesoporosa que se apresenta mais vantajosa para transporte de fármacos, pois é estável química e fisicamente, apresenta uma elevada capacidade de incorporação e controle da liberação de moléculas e não é tóxica²³.

Segundo *Qi et al*, foi possível a incorporação de IgG e glucose oxidase em sílica mesoporosa, tendo a incorporação de IgG dependido da dimensão dos poros e a glucose oxidase da área de superfície^{23,24}.

2.2.2.2. Hidroxiapatite

Uma das principais características da hidroxiapatite é a sua biocompatibilidade. É um material biodegradável, cujos produtos de degradação (iões cálcio e fosfato) não apresentam toxicidade. Uma das suas principais características é a capacidade de interagir favoravelmente com células que intervêm na osteogénese, sendo assim potencialmente útil na regeneração óssea²³. Assim sendo, o transporte de fatores de crescimento por hidroxiapatite é bastante atrativo, pois é necessário que o seu transporte não provoque alterações conformacionais, cisão de cadeias e degradação proteica até ao local de ação, problemas que são contornados aquando do uso de hidroxiapatite. Foram realizados vários estudos com o objetivo de analisar o transporte de fatores de crescimento em hidroxiapatite, tendo todos eles levado a resultados bastante favoráveis²³.

2.2.2.3. Nanotubos de carbono (CNTs)

Os CNTs têm recebido especial atenção como sistemas de transporte de fármacos. No entanto, para serem aplicados em biomedicina, necessitam de modificações na sua

superfície, de modo a evitar fenómenos relacionados com a sua toxicidade. CNTs foram testados como transportadores de peptídeos e proteínas, apresentando vantagens, tais como a sua elevada estabilidade em relação à degradação proteolítica²³.

Villa et al investigaram o uso de CNTs como transportadores de antigénios, tendo o seu estudo por objetivo melhorar a resposta imunitária a peptídeos fracamente imunogénicos, sendo esta uma característica típica de antigénios tumorais humanos. Os CNTs modificados com peptídeos foram rapidamente captados por células dendríticas e macrófagos. A imunização de ratinhos albinos com CNTs modificados com peptídeos induziu respostas específicas de IgG contra o peptídeo, não tendo isto acontecido no grupo no qual foi administrado o peptídeo isoladamente²⁵.

2.2.3. Nanopartículas com ligandos peptídicos para administração oral

A administração por via oral apresenta vantagens relativamente a outras vias, tais como uma maior adesão à terapêutica por parte do doente e o facto das formulações orais serem menos dispendiosas. A formulação e o *design* de transportadores de proteínas para administração através do trato gastrointestinal requer o recurso a diversas estratégias, tais como modificação química, formulação de veículos, inibidores de proteases, promotores da absorção e polímeros muco-adesivos¹.

As nanopartículas são bastante vantajosas como transportadores para administração oral de proteínas/peptídeos, com uma boa estabilidade durante o armazenamento, estabilidade *in vivo* após a administração, entre outras vantagens. Permitem a penetração das membranas celulares, a ligação e a encapsulação de proteínas, protegendo-as da degradação enzimática e hidrolítica.

A baixa biodisponibilidade das proteínas após administração oral deve-se principalmente à permeabilidade da membrana intestinal, metabolismo hepático e solubilidade. A forma farmacêutica deve estabilizar a proteína, facilitando assim a sua administração oral, bem como protegê-la da extrema acidez e ação da pepsina no estômago e também das enzimas intestinais. Deve, também, facilitar a solubilidade aquosa a pH neutro e promover a penetração das membranas lipídicas, permitindo a passagem das proteínas através da membrana intestinal e da membrana basal, atingindo assim a corrente sanguínea.

A modificação de nanopartículas a partir do acoplamento de uma molécula alvo na sua superfície apresenta vantagens, sendo uma via mais eficiente para melhorar o *uptake* de proteínas por via oral.

O acoplamento de ligandos peptídicos nestes transportadores faz com que os mesmos sejam reconhecidos apenas pelas células-alvo, ligando-se aos recetores existentes na sua superfície. No caso da administração oral de nanopartículas com ligandos peptídicos, o objetivo é promover o seu reconhecimento pelos recetores do epitélio, aumentando o *uptake* e a entrega do fármaco¹.

Existem vários tipos de ligandos, sendo as lectinas os mais estudados. Foi investigada a administração de insulina incorporada em nanopartículas com lectinas como ligandos, como uma alternativa à injeção¹. Os resultados desse estudo foram positivos, tendo os níveis de glucose sanguínea baixado. Mesmo sendo um peptídeo hidrofílico, a insulina pode ser incorporada em nanopartículas, apresentando estabilidade física, libertando-se de forma controlada¹.

Apesar das vantagens, são necessários mais estudos para tentar determinar os mecanismos de *uptake* e clearance, toxicidade, direcionamento para tecidos específicos e controlo do trânsito GI¹. No entanto, o recurso a nanopartículas com ligandos peptídicos para administração oral de proteínas apresenta um enorme potencial.

3. Administração transdérmica de proteínas e peptídeos

A via transdérmica como forma de administrar proteínas e peptídeos leva a que sejam evitadas as desvantagens associadas à via parentérica, uma via invasiva, bem como a outras vias, como a oral e nasal. No entanto, apesar de se apresentar vantajosa relativamente aos métodos anteriores, pode ser usada apenas para um número limitado de moléculas²⁶.

Os métodos passivos (relacionados com a otimização da formulação ou uso de transportadores para melhorar a permeação através da pele) não permitem uma eficaz permeação de fármacos com peso molecular superior a 500 Da através da pele e as propriedades de barreira da mesma dificultam a permeação passiva de macromoléculas hidrofílicas, como é o caso das proteínas e dos peptídeos, permitindo apenas o transporte de moléculas pequenas de fármacos lipofílicos em quantidades necessárias para produzir o efeito terapêutico desejado^{26,27}. Assim sendo, para haver permeação de proteínas e peptídeos, torna-se necessário recorrer a métodos elétricos e mecânicos que ajudem a transportar as macromoléculas através da pele (métodos ativos). A iontoforese, eletroporação e sonoforese são exemplos de métodos elétricos. Como métodos mecânicos, que envolvem um procedimento de microporação, temos as microagulhas, ablação térmica, por radiofrequência e a laser.

Relativamente aos métodos passivos, métodos esses relacionados com a formulação e que podem ser associados aos métodos ativos, temos os transportadores nanoparticulados, como é o caso dos lipossomas e outros tipos de nanopartículas já referidos no capítulo anterior, adição de surfactantes, álcoois e sulfóxidos como promotores químicos da permeação cutânea, modificação química de peptídeos, entre outros³.

3.1. Métodos ativos

3.1.1. Iontoforese

A iontoforese é uma técnica não invasiva, que não provoca alterações significativas das propriedades de barreira da pele, atuando diretamente sobre a molécula. Esta técnica consiste na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade (<5V), que facilita a penetração de uma grande variedade de fármacos, carregados ou não, em pequenas quantidades fisiologicamente aceitáveis, provocando a passagem das moléculas através de membranas biológicas até à corrente sanguínea^{3,26,28}.

A eletrorrepulsão e eletrosmose são os mecanismos associados ao transporte iontoforético mais conhecidos. A primeira consiste no movimento ordenado de iões na presença de uma corrente elétrica aplicada ao meio e é responsável pelo transporte de moléculas de fármaco carregadas através da pele^{3,28}. Quando uma molécula é colocada sob um eletrodo com a mesma polaridade, ocorre repulsão entre as cargas, o que provoca a passagem da molécula através da pele³. A eletrosmose corresponde ao fluxo de um volume de solvente que, conseqüentemente promove a movimentação de moléculas neutras ou carregadas quando uma diferença de potencial elétrico é aplicada na pele²⁸.

O mecanismo de ação usado no transporte de cada molécula depende das suas características físico-químicas. A aplicação de uma corrente elétrica leva a um rápido início de transporte das moléculas e reduzido tempo de latência. Quando há uma cessação da corrente, os níveis sistémicos do fármaco baixam rapidamente, sendo assim possível controlar ou fazer uma programação do transporte do fármaco de acordo com o tratamento³.

Para serem transportados por iontoforese, os peptídeos devem ter um volume molecular pequeno, bem como uma carga elevada em relação à sua massa (rácio carga/massa elevado)³. As estruturas secundárias e terciárias do peptídeo são responsáveis pela determinação da sua mobilidade iontoforética. Durante o transporte por iontoforese, os peptídeos que se mantiverem carregados durante todo o processo serão favorecidos³.

Alguns estudos já demonstraram a eficácia da iontoforese no transporte de peptídeos tais como a insulina, vasopressina, calcitonina e [D-Arg]quiotorfina, tendo sido esta técnica bem tolerada pelos doentes, não havendo ocorrência de reações adversas graves³.

Como principais limitações desta técnica, temos o tamanho das moléculas, que deve estar compreendido entre ~10 e 15 kDa, o que faz com que a iontoforese possa ser aplicada apenas em proteínas e peptídeos de tamanho reduzido²⁶. A possibilidade de ocorrer agregação das moléculas, colocando em causa o sucesso do transporte, e questões relacionadas com o mau funcionamento do aparelho são outros problemas que poderão surgir²⁶.

3.1.2. Eletroporação

A eletroporação consiste na aplicação de corrente elétrica de alta voltagem (100-1000V) durante curtos períodos de tempo, o que provoca uma perturbação estrutural transitória da bicamada lipídica. A aplicação de corrente elétrica, provoca um rearranjo estrutural da mesma, tornando-a assim muito permeável a moléculas exógenas²⁹. Este rearranjo estrutural provoca a formação de poros, sendo esse um fenómeno reversível e não invasivo, que não altera a estrutura ou função das células alvo²⁹. Esta é uma técnica que pode ser usada isoladamente ou em combinação com a iontoforese com a finalidade de aumentar o fluxo de permeação das substâncias^{3,26,29}.

Os principais mecanismos de transporte de moléculas através da pele sujeita a eletroporação são o movimento eletroforético, a difusão promovida através da pele permeabilizada e a eletroosmose³.

A eficácia da eletroporação depende das propriedades físico-químicas do fármaco (massa molecular, carga, lipofilia), de parâmetros elétricos (voltagem, comprimento e número de pulsos), bem como de aspetos relacionados com a formulação^{3,29}.

Segundo vários estudos realizados, este método demonstra ser viável no que diz respeito ao transporte de proteínas e peptídeos. Os parâmetros de formulação a ser considerados devem incluir a otimização da concentração do fármaco, assegurando que a proteína ou peptídeo se encontram carregados no pH da formulação e devem também minimizar os iões competitivos³.

Num estudo que teve como objetivo analisar o transporte transdérmico da LHRH (hormona libertadora da hormona luteinizante) através de uma amostra de pele de porco, foi usada uma combinação de eletroporação e iontoforese e a iontoforese isolada. A combinação de iontoforese e eletroporação revelou-se mais vantajosa, tendo-se verificado

um fluxo aumentado de LHRH, em comparação com a iontoforese usada isoladamente³. O uso de ambas as técnicas em simultâneo também resultou num aumento do transporte de outras moléculas proteicas, como é o caso da calcitonina de salmão e da hormona paratiroidea³.

Esta associação revela assim resultados promissores, pois a eletroporação provoca a desorganização da camada lipídica da pele, originando novos caminhos de transporte, o que vai facilitar a posterior passagem da corrente aplicada pela iontoforese, havendo assim um aumento do transporte transdérmico²⁹.

Deste modo, conclui-se que a eletroporação, em associação com a iontoforese, mostra ser um método eficaz no que diz respeito ao transporte de peptídeos e proteínas através da pele. Contudo, o facto de ainda se desconhecerem alguns aspetos destas técnicas faz com que sejam necessários estudos mais aprofundados a fim de assegurar a sua eficácia e a segurança.

3.1.3. Sonoforese

A sonoforese consiste na aplicação de ultra-sons (frequência entre 1-3 MHz) para transportar moléculas através da pele³.

Descobriu-se recentemente que a sonoforese de baixa frequência (LFS) (20-100kHz) em particular, se apresenta mais vantajosa em relação à anterior, de frequência superior³.

Os ultra-sons induzem o crescimento e oscilação das bolhas de ar presentes na camada córnea, rompendo as bicamadas lipídicas e criando cavidades que vão levar a um aumento da permeabilidade da pele (cavitação). Contudo, estas alterações estruturais limitam-se apenas às camadas superficiais da pele e as propriedades de barreira são restauradas depois de um certo período de tempo²⁶.

Com a LFS, a extensão da perturbação da pele e, conseqüentemente, a melhoria da permeabilidade, podem ser controladas variando o tempo de aplicação de ultra-sons e outros parâmetros, tais como a intensidade, o ciclo de pulsações, entre outros. A dimensão dos poros aquosos criados na pele também pode ser controlada, fazendo variar a frequência e a intensidade dos ultra-sons utilizados³.

A LFS tem mostrado ser um método promissor no que diz respeito ao transporte de moléculas hidrofílicas e macromoléculas através da pele. Vários estudos provaram a eficácia desta técnica no transporte de peptídeos e proteínas, tais como a heparina³⁰, insulina^{31,32}, interferão γ ³² e eritropoetina³², bem como outras hormonas e oligonucleótidos. No entanto,

o transporte de cada molécula é altamente dependente das suas propriedades físico-químicas²⁶.

A Echo Therapeutics desenvolveu o sistema *SonoPrep*[®]. Este sistema emite ondas de ultra-sons de 55 kHz por curtos períodos de tempo, o que provoca a cavitação na pele. A aplicação de sonoforese usando o sistema *SonoPrep*[®] permitiu aumentar a permeação de insulina num modelo animal (porco), tendo conduzido a uma diminuição dos níveis de glucose no sangue, mostrando assim ser um sistema eficaz^{3,26}.

A LFS é geralmente bem tolerada quando aplicada durante curtos períodos de tempo. No entanto, quando são aplicados ultra-sons de intensidade superior, pode haver aparecimento de queimaduras e urticária³. Apesar da sua eficácia já provada, são necessários mais estudos para uma melhor compreensão e controlo da reprodutibilidade e segurança dos parâmetros dos ultra-sons em contexto clínico.

3.1.4. Microagulhas

As microagulhas constituem outra alternativa, minimamente invasiva, eficaz na promoção da permeação transdérmica de proteínas e peptídeos. O seu comprimento varia entre 100 a 1500µm e podem ser feitas de vários materiais, como vidro, silicone, sílica, plástico, polímeros biodegradáveis e açúcares³.

As microagulhas, quando aplicadas na pele, criam poros ou microcanais que permitem a passagem do fármaco através da camada córnea de forma simples e indolor, sem provocar a perda de sangue. Os microcanais apresentam dimensões suficientes para a passagem de fármacos, incluindo macromoléculas, permitindo assim a permeação de proteínas e peptídeos através da pele. O transporte de peptídeos e proteínas é beneficiado, pelo facto de serem de natureza aquosa³.

A administração de fármacos através de microagulhas pode ser feita de quatro formas distintas (Figura 1). Podem ser usadas previamente microagulhas sólidas para formar micro-orifícios na camada córnea, ao que se segue a aplicação de um sistema transdérmico (Figura 1A). As microagulhas sólidas podem ser revestidas pelo fármaco ocorrendo a dissolução do mesmo após a sua inserção na pele (Figura 1B), ou podem conter o fármaco encapsulado, sendo biodegradáveis e levando assim a uma rápida libertação do mesmo (Figura 1C). Por fim, existem as microagulhas perfuradas, que permitem a administração de formulações líquidas^{3,26}.

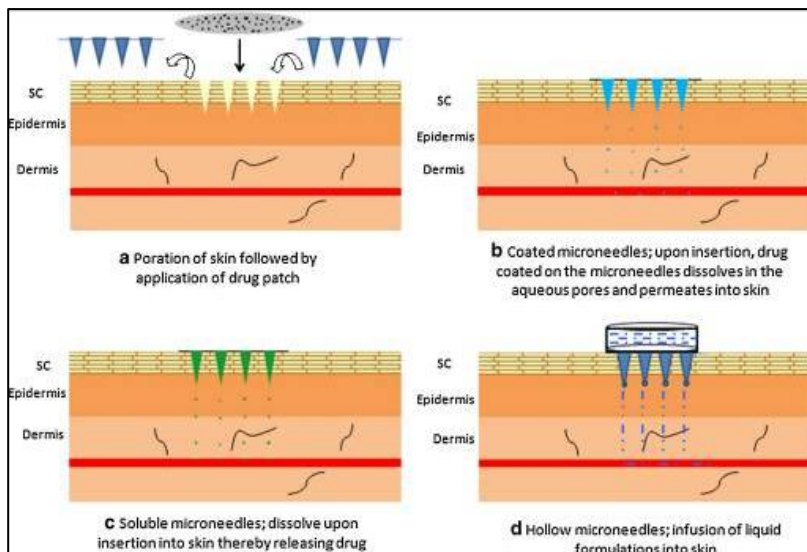


Figura 1. Administração de fármacos através de microagulhas (KALLURI H. *et al*, 2011)

Vários estudos realizados *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que as microagulhas permitem a permeação de proteínas e peptídeos com sucesso³³.

Foi estudado o transporte transdérmico de imunoglobulina humana G (IgG) com recurso a microagulhas solúveis de maltose e outras de metal, concluindo-se que ambos os tipos de microagulhas aumentavam a permeação de IgG, em comparação com o grupo controlo de administração passiva, onde não foi detetada permeação³⁴. O aumento do comprimento e número das microagulhas, e da concentração de IgG na formulação levou a um aumento da permeação de IgG³.

O uso de microagulhas revestidas por formulações de proteínas também evidenciou bons resultados. Por exemplo, num dos estudos realizados foi avaliada a influência da variação da espessura do revestimento sobre o transporte do fármaco. As microagulhas de titânio foram então revestidas por quantidades crescentes de ovalbumina (OVA) pelo processo de revestimento por imersão, verificando-se que quanto maior a espessura do revestimento, mais eficaz o transporte de OVA. Contudo, esta forma de aplicação apresenta limitações, como por exemplo, a quantidade de proteína que pode ser usada no revestimento, que não deve exceder 1mg³⁵.

A infusão de formulações líquidas de proteína através de microagulhas perfuradas é bastante promissora. Após serem inseridas na pele e provocarem a formação de microcanais, é administrada a formulação líquida contida num reservatório, atingindo as camadas mais profundas da pele. Têm sido desenvolvidos vários dispositivos para administração de fármacos por esta técnica²⁶. No entanto, esta é limitada pelo volume de formulação que pode ser administrado.

No caso da insulina, a sua administração por microagulhas tem sido estudada extensivamente, tendo revelado resultados positivos. Por exemplo, segundo um estudo efetuado em ratos diabéticos por *Martanto et al*, as microagulhas sólidas permitiram aumentar a permeação da insulina através da pele, tendo provocado uma rápida diminuição dos níveis de glucose sanguínea até 80%³⁶.

A administração de insulina através de microagulhas poliméricas também conduziu a excelentes resultados. Num estudo realizado por *Ling et al*, foi demonstrada a eficácia do uso de microagulhas de amido e gelatina na administração de insulina em ratos. Os resultados deste estudo mostraram um efeito hipoglicémico semelhante em ratos aos quais foram aplicadas microagulhas carregadas com insulina, e uma injeção subcutânea de insulina. A disponibilidade farmacológica relativa e biodisponibilidade relativa de insulina foram ambas cerca de 92%, o que confirma a manutenção da atividade biológica da insulina após a encapsulação e libertação das microagulhas³⁷.

Tendo em conta as vantagens e a segurança desta tecnologia, a administração de proteínas e peptídeos por via transdérmica com o recurso a microagulhas revela-se bastante interessante e viável.

3.1.5. Ablação térmica

A ablação térmica é outro método para criar microcanais e consiste na aplicação de um conjunto de filamentos resistentes à eletricidade à superfície da pele. A corrente elétrica passa através desses filamentos, aquecendo-os e causando a decomposição e vaporização local do estrato córneo, o que forma microcanais. Como exemplo de um dispositivo de microporação térmica, temos o sistema *PassPort*^{® 3,26}.

Os microcanais formados apresentam uma largura compreendida entre 50 e 200 μm e uma profundidade de 30 a 50 μm , não havendo assim qualquer dano nas camadas mais profundas da pele. Após a aplicação desta técnica a pele começa o processo de recuperação, havendo a regeneração do estrato córneo durante um período de tempo ainda desconhecido e não mencionado pela literatura²⁶.

Existem dados pré-clínicos relativamente ao uso do sistema *PassPort*[®] como forma de administração do antigénio da hepatite B, PTH, e interferão alfa ($\text{INF-}\alpha$), entre outras moléculas. Segundo um estudo realizado por *Badkar et al*, a administração transdérmica *in vivo* do interferão alfa-2b ($\text{INF}\alpha 2\text{b}$) foi possível recorrendo ao sistema *PassPort*^{® 38}. Tal não ocorria por aplicação de iontoforese de forma isolada, nem passivamente. A aplicação da ablação térmica em conjunto com a iontoforese demonstrou ainda melhores resultados³⁸.

3.1.6. Ablação por radiofrequência

A ablação por radiofrequência é uma técnica semelhante à ablação térmica, com o objetivo de formar microcanais na pele através da aplicação de ondas de radiofrequência (100-500kHz). Esta tecnologia está a ser desenvolvida pela TransPharma Medical™ Ltd, responsável pelo desenvolvimento do dispositivo *ViaDor*^{TM 3,26}.

O *ViaDor*TM consiste num conjunto de microelétrodos estreitamente espaçados (1 cm²) e num adesivo com o fármaco. Depois de aplicado, as ondas de radiofrequência (100-500 kHz) causam a vibração dos microelétrodos na superfície da pele, provocando um aquecimento localizado e a ablação do estrato córneo naquela região²⁶. Esta tecnologia tem sido usada na administração da hormona de crescimento humana por via transdérmica. Estudos em humanos asseguram que esta é indolor e bastante segura³.

Um estudo levado a cabo por *Levin et al*, mostrou a eficácia desta estratégia de administração, tendo revelado uma biodisponibilidade da hGH de 75% em ratos e de 33% em porquinhos da índia, quando administrada através de microcanais provocados por radiofrequência, em relação à administração por injeção subcutânea³⁹.

3.1.7. Ablação por laser

Outra técnica de microporação utilizada é a ablação por laser. Com esta técnica é também possível induzir a formação de microcanais na pele, pois os lasers provocam o aquecimento das moléculas de água existentes à superfície da pele que, ao evaporarem, conduzem à formação de microcanais³.

Lee et al testaram o uso de um laser de lítio e alumínio (Er:YAG) na capacidade de permeação transdérmica de proteínas e peptídeos. Os resultados obtidos permitiram verificar que o fluxo de peptídeos através da pele foi superior após o uso do laser do que em pele intacta⁴⁰. Verificou-se também que a permeação de peptídeos após a aplicação do laser era altamente influenciada pela sequência, peso molecular e lipofilia.

3.2. Métodos passivos

Para a permeação de proteínas e peptídeos administrados transdermicamente é necessário ter também em conta vários aspetos inerentes à formulação. Os métodos passivos e os ativos podem ser usados em conjunto, como anteriormente mencionado, melhorando assim a permeação das moléculas.

Como exemplos de métodos passivos temos os lipossomas e as nanopartículas que podem ser utilizados para administração transdérmica ou tópica. Outras alternativas são o

uso de pró-fármacos lipofílicos de peptídeos, havendo assim uma maior facilidade de permeação através do estrato córneo em relação aos peptídeos hidrofílicos.

A adição de inibidores de proteases às formulações e o tratamento com promotores químicos como é o caso de surfactantes, sulfóxidos e álcoois também pode ajudar na permeação de fármacos peptídicos³.

4. Administração pulmonar de proteínas e peptídeos

A administração pulmonar de proteínas e peptídeos é um estratégia de administração bastante atrativa, não invasiva, e constitui uma ótima alternativa à via parentérica. Esta via pode ser utilizada para administrar estes agentes topicamente, no tratamento de doenças pulmonares, ou sistemicamente, no tratamento de outras doenças. Esta via leva a uma rápida absorção sistêmica, devido à grande área de superfície dos pulmões, reduzida espessura do epitélio alveolar e elevado nível de vascularização pulmonar². São também evitados os mecanismos de degradação do trato gastrointestinal e o metabolismo hepático de primeira passagem.

Contudo, a administração de proteínas através dos pulmões apresenta inúmeros desafios, sendo necessário recorrer a estratégias de formulação apropriadas para ultrapassar as fortes interações entre as partículas e a degradação físico-química das moléculas, que pode levar à perda de atividade biológica e a problemas de segurança². É também necessário tentar maximizar a biodisponibilidade sistêmica e evitar a clearance pulmonar.

Como já foi referido, a administração de proteínas como agentes terapêuticos pela via pulmonar pode ser realizada de forma tópica ou sistêmica. No caso da aplicação tópica, esta geralmente destina-se ao tratamento da asma, cancro do pulmão e fibrose quística². A administração sistêmica de insulina e anticorpos para vacinas pulmonares também tem sido objeto de investigação nos últimos anos.

4.1. Aplicação tópica

Os aerossóis de proteínas podem ser usados para o tratamento de doenças respiratórias, levando a um rápido início de ação, em comparação com a administração oral e parentérica. Os efeitos secundários são reduzidos e o local de ação é atingido diretamente, sendo também usadas doses inferiores².

Já foram aprovados e estão a ser comercializados atualmente alguns biofármacos contendo proteínas, como é o caso do *Pulmozyme*[®], uma formulação para o tratamento da fibrose quística, que hidrolisa o DNA presente no muco, diminuindo a sua viscosidade,

ajudando assim a melhorar a eliminação das secreções². Outros exemplos já disponíveis no mercado são o *Survanta*[®], *BLES*[®], *Curosurf*[®] e *Infrasurf*[®], usados como substitutos de surfactantes no tratamento da síndrome de dificuldade respiratória aguda (ARDS)².

Atualmente encontram-se em fase de desenvolvimento várias proteínas para aplicação tópica, destacando-se as proteínas para tratamento da asma e/ou doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), como é o caso de anticorpos monoclonais, produtos derivados da interleucina e ciclosporina A². Exemplos de outras moléculas sob investigação são a α -1-antitripsina, um inibidor de protease no pulmão, potencialmente útil no tratamento da fibrose quística e também em casos onde existe uma deficiência hereditária de α -1-antitripsina. Citocinas, incluindo interferões e interleucina-2 também se encontram atualmente em estudo para tratamento de infeções respiratórias e cancro do pulmão².

4.2. Administração sistémica

A administração sistémica de proteínas pela via pulmonar constitui uma alternativa à administração parentérica, nasal e transdérmica.

Atualmente, não é possível encontrar nenhuma formulação deste tipo disponível no mercado, mas são várias as moléculas em fase de desenvolvimento clínico, sendo a insulina a mais investigada.

A primeira insulina inalável a ser desenvolvida foi a *Exubera*[®], comercializada em 2006 mas retirada do mercado em 2007 devido ao baixo volume de vendas². A *Afrezza*[®] é outra insulina inalável, produzida pela MannKind, recentemente aprovada pela FDA².

Outras moléculas sob investigação são o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), para tratamento da diabetes insulino-dependente, antigénios inaláveis, calcitonina, PTH e hGH².

5. Conclusão

As proteínas e os peptídeos têm vindo a ganhar importância como agentes terapêuticos em diversas áreas, razão pela qual, nos últimos anos, têm sido desenvolvidas diferentes estratégias de administração que visam proteger e direcionar estas moléculas para o local de ação.

Uma análise aprofundada da literatura permitiu concluir que os transportadores lipídicos, as nanopartículas poliméricas, os nanomateriais inorgânicos e as nanopartículas com ligandos específicos, têm mostrado excelentes resultados como transportadores de proteínas e peptídeos, por vias alternativas à parentérica, a mais utilizada atualmente. Algumas estratégias para administração destes agentes por via transdérmica, incluindo uma combinação de métodos passivos e ativos, bem como por via pulmonar, demonstraram também ser eficazes.

Contudo, é de salientar que a escolha da estratégia de administração deve ter em conta as características de cada molécula a transportar. Apesar dos resultados serem bastante promissores são necessários estudos mais aprofundados sobre a eficácia, estabilidade, mecanismos de ação e segurança de todas as estratégias de administração mencionadas.

6. Bibliografia

- 1- YUN, Y., CHO, Y. W., PARK, K. (2013). Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, nº65: 822-832.
- 2- DEPRETER, F., PILCER, G., AMIGHI, K. (2013). Inhaled Proteins: Challenges and perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, nº447: 251-280.
- 3- HERDWADKAR, A., BANGA, A. K. (2012). Peptide and protein transdermal drug delivery. *Drug Discovery Today: Technology*, vol. 9, nº2: e147-e154.
- 4- ALMEIDA, A. J., SOUTO, E. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 478-490.
- 5- RAWAT, M., SINGH, D., SARAF, S. (2008). Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides. *Yakugaku Zasshi*, vol. 128, nº2: 261-280.
- 6- MACHADO, L. C., GNOATTO, S. A., KLÜPPEL, M. L. (2007). Lipossomas aplicados em Farmacologia: uma revisão da literatura. *Estudos de Biologia*, vol. 29, nº67: 215-224.

- 7- DU, A. W., STENZEL, M. H. (2014). Drug carriers for the delivery of therapeutic peptides. *Biomacromolecules*, n°15: 1097-1114.
- 8- SANTOS, N., CASTANHO, M. A. (2002). Liposomes: has the magic bullet hit the target?. *Química Nova*, vol. 25, n°6B:1181-1185.
- 9- MARTINS, S., SARMENTO, B., FERREIRA, D., SOUTO, E. (2007). Lipid-Based colloidal carriers for peptide and protein delivery- liposomes versus lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, vol. 2, n°4: 595-607.
- 10- MEHNERT, W., MÄDER, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*. vol. 47, n°2-3: 165-196.
- 11- JORES, K., MEHNERT, W., BUNJES, H., DRECHSLER, M., MÄDER, K. (2003). From solid lipid nanoparticles (SLN) to nanospoons. Visions and reality of colloidal lipid dispersions. *Controlled Release Society 30th annual meeting*, #181.
- 12- ÜNER, K., YENER, G. (2007). Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, vol. 2, n°3: 289-300.
- 13- SOUTO, E. B., SEVERINO, P., SANTANA, M. H., PINHO, S. C. (2011). Solid lipid nanoparticles: classic methods of lab production. *Química Nova*, vol. 34, n°10: 1762-1769.
- 14- MUKHERJEE, S., RAY, S., THAKUR, R.S. (2009). Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 71, n° 4: 349-358.
- 15- ZHANG, Z. H., ZHANG, Y. L., ZHOU, J. P., LV, H.X. (2012). Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid–octaarginine for oral administration of insulin. *International Journal of Nanomedicine*, n°7: 3333-3339.
- 16- LIU, J., GONG, T., FU, H., WANG, C., WANG, X., CHEN, Q., ZHANG, Q., HE, Q., ZHANG, Z. (2008). Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, n°356: 333-344.
- 17- SHEN, J., DENG, Y., JIN, X., PING, Q., SU, Z., LI, L. (2010). Thiolated nanostructured lipid carriers as a potential ocular drug delivery system for cyclosporine A: Improving in vivo ocular distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 402, n°1-2: 248-253.
- 18- SOUTO, E., SEVERINO, P., SANTANA, M. H. (2012). Preparation of polymeric nanoparticles by polymerization of monomers - Part I. *Polímeros [Online]*, vol. 22, n°1: 96-100.
- 19- SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L., POHLMANN, A. R. (2003). Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration, *Química Nova [online]*. vol. 26, n°5: 726-737.

- 20- MENON, J. U., RAVIKUMAR, P., PISE, A., GYAWALI, D., HSIA, C. C., NGUYEN, K. T. (2014). Polymeric nanoparticles for pulmonary protein and DNA delivery. *Acta Biomaterialia*, n°10: 2643-2652.
- 21- HE, C., YIN, L., TANG, C., YIN, C. (2012). Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*, n°33: 8569-8578.
- 22- WANG, X. Q., ZHANG, Q. (2012). pH-sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, n°82: 219-229.
- 23- MALMSTEN, M. (2013). Inorganic nanomaterials as delivery systems for proteins, peptides, DNA, and siRNA. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, n°18: 468-480.
- 24- QI, W., LI, X., CHEN, B., YAO, P., LEI, C., LIU, J. (2012). Intramesoporous silica structure differentiating protein loading density. *Materials Letters*, n°75: 102-106.
- 25- VILLA, C. H., DAO, T., AHEAM, I., FEHRENBACHER, N., CASEY, E., REY, D. A., KORONTSVIT, T., ZAKHALEVA V., BATT, C. A., PHILLIPS, M. R., SCHEINBERG, D. A. (2011). Single-walled carbon nanotubes deliver peptide antigen into dendritic cells and enhance IgG responses to tumor-associated antigens. *ACS Nano*, vol. 5, n°7: 5300-5311.
- 26- KALLURI, H., BANGA, A. K. (2011). Transdermal delivery of proteins. *PharmSciTech*, vol.12, n°1: 431- 441.
- 27- BROWN, M. B., TRAYNOR, M. J., MARTIN, G. P., AKOMEAH, F. K. (2008). Transdermal drug delivery systems: skin perturbation devices. *Methods in Molecular Biology*, vol.437, 119-139.
- 28- GRATIERI, T., GELFUSO, G. M., LOPEZ, R. F. (2008). Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Química Nova*, vol.31, n°6:1490-1498.
- 29- VIANNA, D. R., SILVA, B. V., HARMERSKI, L. (2010). Eletroporação e iontoforese para libertação de fármacos através da pele. *Revista Virtual de Química*, vol.2, n°4: 271-279.
- 30- MITRAGOTRI, S., KOST, J. (2001). Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low frequency ultrasound. *Pharmaceutical Research*, vol.18, n°8: 1151-1159.
- 31- OGURA, M., PALIWAL, S., MITRAGOTRI, S. (2008). Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.60, n°10: 1218-1223.
- 32- MITRAGOTRI, S., BLANKSCHTEIN, D., LANGER, R. (1995). Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. *Science*, vol.269, n°5225: 850-853.

- 33- HARVEY, A. J., KAESTNER, S. A., SUTTER, D. E., HARVEY, N. G., MIKSZTA, J. A., PETTIS, R. J. (2011). Microneedle-based intradermal delivery enables rapid lymphatic uptake and distribution of protein drugs. *Pharmaceutical Research*, nº28:107-116.
- 34- LI, G., BADKAR, A., KALLURI, H., BANGA, A. K. (2010). Microchannels created by sugar and metal microneedles: characterization by microscopy, macromolecular flux and other techniques. *Journal of pharmaceutical sciences*, vol.99, nº4: 1931-1941.
- 35- WIDERA, G., JOHNSON, J., KIM, L., LIBIRAN, L., NYAM, K., DADDONA, P. E., CORMIER, M. (2006). Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine*, 2006, vol.24, nº10: 1653-1664.
- 36- MARTANTO, W., DAVID, S. P., HOLIDAY, N. R., WANG, J., GILL, H. S., PRAUSNITZ, M. R. (2004). Transdermal delivery of insulin using microneedles *in vivo*. *Pharmaceutical Research*, vol.21, nº6: 947-952.
- 37- LING, M. H., CHEN, M. C. (2013). Dissolving polymer microneedle patches for rapid and efficient transdermal delivery of insulin to diabetic rats. *Acta Biomaterialia*, vol.9, nº11: 8952-8961.
- 38- BADKAR, A. V., SMITH, A. M., EPPSTEIN, J. A., BANGA, A. K. (2007). Transdermal delivery of interferon alpha-2B using microporation and iontophoresis in hairless rats. *Pharmaceutical Research*, vol.24, nº7:1389-1395.
- 39- LEVIN, G., GERSHONOWITZ, A., SACKS, H., STERN, M., SHERMAN, A., RUDAEV, S., ZIVIN, I., PHILLIP, M. (2005). Transdermal delivery of human growth hormone through RF-microchannels. *Pharmaceutical Research*, vol.22, nº4: 550-555.
- 40- LEE, W. R., PAN, T. L., WANG, P. W., ZHUO, R. Z., HUANG, C. M., FANG, J. Y. (2008). Erbium:YAG laser enhances transdermal peptide delivery and skin vaccination. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, vol.128, nº3: 200-208.