

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO

**MODELO *IN VITRO* PARA AGREGAÇÃO AMILOIDE
EM FORMULAÇÃO DE INSULINA REGULAR E
O USO DE POLIFENÓIS E VITAMINAS COMO EXCIPIENTES
PARA ESTABILIZAÇÃO**

ALESSANDRA CARVALHO DE SOUZA E SILVA

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**MODELO *IN VITRO* PARA AGREGAÇÃO AMILOIDE
EM FORMULAÇÃO DE INSULINA REGULAR E
O USO DE POLIFENÓIS E VITAMINAS COMO EXCIPIENTES
PARA ESTABILIZAÇÃO**

ALESSANDRA CARVALHO DE SOUZA E SILVA

Sob a Orientação do Professor

Luiz Henrique Guerreiro Rosado

E Co-orientação do Professor

Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ

Janeiro de 2020

S586m

Silva, Alessandra Carvalho de Souza e, 1991-
Modelo in vitro para agregação amiloide em
formulação de insulina regular e o uso de polifenóis e
vitaminas como excipientes para estabilização /
Alessandra Carvalho de Souza e Silva. - Seropédica,
2020.

73 f.: il.

Orientador: Luiz Henrique Guerreiro Rosado.

Coorientador: Luís Maurício Trambaioli da Rocha e
Lima.

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, 2020.

1. Agregação amiloide. 2. Formulação de insulina. 3.
Desenvolvimento de modelo de agregação. 4.
Estabilidade do fármaco. 5. Potenciais excipientes
para estabilização. I. Rosado, Luiz Henrique
Guerreiro, 1981-, orient. II. Lima, Luís Maurício
Trambaioli da Rocha e, -, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

ALESSANDRA CARVALHO DE SOUZA E SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/01/2020.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Luiz Henrique Guerreiro Rosado. Dr. UFRRJ. (Orientador/Presidente da banca)

Renata Nunes Oliveira. Dra. UFRRJ

Nicolás Adrián Rey. Dr. PUC-Rio



Emitido em 2020

TERMO N° 455/2020 - PPGEQ (12.28.01.00.00.00.42)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 27/11/2020 16:16)

LUIZ HENRIQUE GUERREIRO ROSADO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

CoordCGF (12.28.01.00.00.00.39)

Matrícula: 1809376

(Assinado digitalmente em 29/11/2020 21:54)

RENATA NUNES OLIVEIRA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DEQ (12.28.01.00.00.00.45)

Matrícula: 1898760

(Assinado digitalmente em 27/11/2020 14:17)

NICOLÁS ADRIÁN REY

ASSINANTE EXTERNO

Passaporte: AAB191164

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:
455, ano: **2020**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **26/11/2020** e o código de verificação: **5ff72c1135**

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre estiveram me incentivando e apoiando em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Me deram muita força para ultrapassar mais essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me orientar a cada passo dado todos os dias. Obrigada por me dar forças para não desistir nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus pais Lucrécia e Severino, por todo o apoio e motivação nesta jornada. Minha mãe pelas várias vezes em que precisou sentar ao meu lado, me abraçar e acalmar para que eu continuasse sempre forte. Por estar presente em todas as etapas importantes da minha vida, você é minha vida, meu tudo, eu te amo.

Agradeço aos meus amigos, Fernando, Beatriz, Victor, Bárbara e Felipe que me deram todo suporte emocional quando eu precisava desabafa.

Agradeço também as amigas que a UFRRJ me propôs: Carla, Isabela, Silvane e Karol, que irei levar no coração para sempre. E principalmente parceira de laboratório Liliane, pela amizade e trabalho em equipe realizado durante esse período.

Agradeço ao professor Luis Maurício e toda a equipe do laboratório pbiotech da UFRJ, pela recepção e contribuição do presente trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Luiz Henrique por todo o ensinamento proporcionado e por ter me aberto os olhos para área de estudo na qual eu me encontrei e encantei.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

RESUMO

SILVA, Alessandra Carvalho de Souza e. **Modelo *in vitro* para agregação amiloide em formulação de insulina regular e o uso de polifenóis e vitaminas como excipientes para estabilização.** 2020. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença caracterizada pelo aumento da glicose no sangue (hiperglicemia), que pode decorrer de defeitos na secreção ou na ação do hormônio insulina, que é produzido pelas células beta das ilhotas pancreáticas. A insulina é responsável por metabolizar a glicose para a produção de energia, e quando ocorre alguma disfunção na produção deste hormônio, para que haja o controle de glicose na corrente sanguínea é necessário a realização de uma reposição exógena da insulina. Todavia deve-se tomar cuidado, pois pode ocorrer formação de agregados amiloides na insulina, que decorre da desestruturação molecular da proteína fazendo com que ela perca a sua atividade biológica. Estes agregados amiloides na insulina são conhecidos na literatura, porém não são muito bem caracterizados, além de não haver relatos sobre testes de amiloides diretamente na formulação do biofármaco. Visto isso foi desenvolvido um modelo simples e reprodutível que mimetiza o transporte e armazenamento de insulina em condições não refrigeradas, para análise da formação de agregados amiloides dentro da formulação de insulina comercial. As formulações de insulina foram submetidas as condições de agitação (175 rpm) e temperatura de 37 °C, com monitoramento através das técnicas de fluorescência de Tioflavina T (ThT) e espectrofotometria de Vermelho de Congo (VC), e a morfologia dos agregados foi verificada através do uso de microscopia eletrônica de transmissão (MET). A partir destas técnicas foi possível observar que há formação de agregados amiloides em formulações comerciais de insulina, o que pode apresentar uma relação direta com a estabilidade e eficácia deste medicamento em seu uso cotidiano. Sendo assim, o sistema estudado pode ser utilizado no estudo de agregação amiloide e na busca por moléculas com potencial antiamiloidogênico. A partir do modelo de agregação proposto foram avaliadas substâncias como excipientes para o aumento da estabilidade deste biofármaco. Os resultados mostraram que os polifenóis (curcumina, quercetina e rutina) não tiveram efeito, enquanto que o uso das vitaminas (ácido ascórbico, retinol e α -tocoferol) tiveram, sendo que o retinol e o α -tocoferol demonstraram um efeito mais pronunciado que foi confirmado nas 3 técnicas aplicadas. Por conseguinte, estas duas substâncias apresentaram potencial para o uso como excipientes na melhora da estabilidade de formulações farmacêuticas, o que pode gerar no aumento da eficácia e segurança do tratamento utilizando este medicamento.

Palavras-chave: agregados amiloide; formulação de insulina; estabilidade.

ABSTRACT

SILVA, Alessandra Carvalho de Souza e. **Modelo *in vitro* para agregação amiloide em formulação de insulina regular e o uso de polifenóis e vitaminas como excipientes para estabilização.** 2020. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Diabetes Mellitus (DM) is a disease characterized by the increased glucose blood concentration (hyperglycemia), which may result from defects in secretion or action of insulin hormone, produced by pancreatic islet beta cells. Insulin is responsible for metabolizing glucose for energy production, and when some dysfunction in this hormone production happens, it is necessary to control the glucose in the bloodstream, by an exogenous replacement of insulin. However, care should be taken, as amyloid aggregates can be formed, which results from molecular destructing of the protein, causing it to lose its biological activity. These amyloid aggregates in insulin are known in the literature, but are not very well characterized, besides there are no reports on amyloid tests directly in the biopharmaceutical formulation. It was developed a simple and reproducible model that mimics the transport and storage of insulin in unrefrigerated condition, to analyze the formation of amyloid aggregates within the formulation of commercial insulin. Insulin formulations were submitted to agitation conditions (175 rpm) and temperature of 37 °C, and its activity was monitored by Tioflavin T fluorescence (ThT) and Congo Red spectrophotometry (CR), and the morphology of the aggregates was verified through the use of transmission electron microscopy (TEM). It was possible to observe that there is formation of amyloid aggregates in commercial insulin formulations, which may present a direct relationship with the stability and efficacy of this drug in its daily use. Thus, the described system can be used in the study of amyloid aggregation and in the search for molecules with anti-amyloidogenic potential. From the proposed aggregation model, substances were evaluated as excipients to increase the stability of this biopharmaceutical. Results showed that polyphenols (curcumin, quercetin and rutin) had no effect, while the use of vitamins (ascorbic acid, retinol and α – tocopherol) had, it and retinol and α – tocopherol demonstrated a more pronounced effect that was confirmed by the 3 techniques applied. Therefore, these two substances presented potential for use as excipients in improving the stability of pharmaceutical formulations, which can generate in increasing the efficacy and safety of treatment using this drug.

Keywords: amyloid aggregates; insulin formulation; stability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da pró-insulina	18
FIGURA 2. Estrutura do hormônio insulina	19
FIGURA 3. Estrutura da Insulina: monômero até formação de diferentes tipos de hexâmeros	20
FIGURA 4. Esquema da farmacocinética da insulina e seus análogos	21
FIGURA 5. Estrutura de alfa-hélice	27
FIGURA 6. A. Estrutura de folha beta. B. Folha beta antiparalela. C. Folha beta paralela.	27
FIGURA 7. Gráfico da representação do mecanismo de formação amiloide. A. Proteínas em conformação nativa desdobrada. B. Início da formação de estrutura de folha β . C. Formação do núcleo. D. Formação de protofibrilas. E. Formação de fibras maduras	28
FIGURA 8. Estrutura do corante Vermelho de Congo.	30
FIGURA 9. Espectros para diferenciação: subtração de espectros de VC livre a partir de espectros de soluções de VC ligados a fibras de insulina	31
FIGURA 10. Aumento da fluorescência da ThT após ligação a fibras amiloides	32
FIGURA 11. Estrutura da Tioflavina T	32
FIGURA 12. Comparação entre imagens de baixa ampliação (a) e alta ampliação (b) de fibras amiloides coradas através de contrastação negativa	33
FIGURA 13. Classificação de antioxidantes	34
FIGURA 14. Gráfico de fluorescência de ThT: (A) na ausência de quercetina; (B) na presença de quercetina 10 $\mu\text{g/mL}$; (C) 25 $\mu\text{g/mL}$ e (D) 50 $\mu\text{g/mL}$	35
FIGURA 15. (A) Gráfico de fluorescência de ThT após 24 horas de incubação: (1) na ausência de curcumina; (2) na presença de curcumina 1 μM ; (3) 2 μM ; (4) 3 μM ; (5) 4 μM ; (6) 6 μM e (7) 8 μM . (B) Gráfico do ensaio de VC após 24 horas de incubação: (1) na ausência de curcumina; (2) na presença de curcumina 1 μM ; (3) 2 μM ; (4) 3 μM ; (5) 4 μM ; (6) 6 μM ; (7) 8 μM e (8) espectro do VC	37
FIGURA 16. Diferentes interações entre a insulina e a curcumina: (A) na estrutura de insulina nativa no estado R; (B) no estado T	38
FIGURA 17. Gráfico de fluorescência de ThT para o efeito da agregação de amilina	39
FIGURA 18. Cinética de agregação monitorada por fluorescência de ThT de $\text{A}\beta - 42$, na ausência e presença de retinol (100 e 200 μM)	40
FIGURA 19. Acoplamento molecular do complexo $\text{A}\beta - 42 + \text{retinol}$	40
FIGURA 20. Cinética de agregação de <i>human stefin B</i> monitorada por ThT na ausência e presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico	41
FIGURA 21. Gráfico dos espectros de absorção de UV-visível para caracterização da interação de compostos exógenos com a ThT	42
FIGURA 22. Modelo esquemático da metodologia utilizada no monitoramento da cinética de agregação da insulina regular comercial	46
FIGURA 23. Polifenóis utilizados como excipientes para inibição da formação de agregados amiloides em formulação de insulina	46
FIGURA 24. Vitaminas utilizadas como excipientes para inibição da formação de agregados amiloides em formulação de insulina	47
FIGURA 25. Ensaio de fluorescência de ThT à temperatura de 37 °C com agitação horizontal	51
FIGURA 26. Ensaio de fluorescência de ThT à temperatura de 25 °C com agitação vertical e ampliação para análise do ponto inicial de agregação.	51
FIGURA 27. Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial à 37°C e 175 rpm monitorado por espectrofotometria de VC.	53

FIGURA 28. Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial à 37°C e 175 rpm monitorado por fluorescência de ThT: (A) Gráfico de Intensidade x Comprimento de onda (nm) e (B) Intensidade x Tempo (h).....	53
FIGURA 29. Imagens de MET da cinética de agregação da formulação de insulina regular (aumento de 25.000 e 50.000 cada): (A) e (B) insulina 0 h; (C) e (D) 4 h; (E) e (F) 8 h; (G) e (H) 24 h.	54
FIGURA 30. Possíveis interações entre proteínas mal dobradas e moléculas de inibidores.....	56
FIGURA 31. Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial com a adição de polifenóis à 37°C por 72 h, acompanhado por espectrofotometria de VC.	57
FIGURA 32. Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial com a adição de polifenóis à 37°C por 72 h, acompanhado por fluorescência de ThT.....	58
FIGURA 33. Espectro de absorção de UV-visível da curcumina.....	59
FIGURA 34. Espectro de absorção de UV-visível da quercetina.....	60
FIGURA 35. Imagens de MET da cinética de agregação da formulação de insulina regular na presença de polifenóis (0,3% em 24 h), (aumento de 25.000 e 50.000 cada): (A) e (B) controle de insulina 0 h; (C) e (D) controle de insulina 24 h; (E) e (F) curcumina; (G) e (H) quercetina; (I) e (J) rutina.....	61
FIGURA 36. Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial com a adição de vitaminas à 37°C por 72 h, acompanhado por espectrofotometria de VC.	63
FIGURA 37. Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial com a adição de vitaminas à 37°C por 72 h, acompanhado por fluorescência de ThT.....	63
FIGURA 38. Imagens de MET da cinética de agregação da formulação de insulina regular na presença de vitaminas (1% em 24 h), (aumento de 25.000 e 50.000 cada): (A) e (B) controle de insulina 0 h; (C) e (D) controle de insulina 24 h; (E) e (F) retinol; (G) e (H) ácido ascórbico; (I) e (J) α -tocoferol.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Alterações na cadeia polipeptídica de análogos de insulina	21
TABELA 2. Exemplos de referências com utilização de insulina em diferentes condições para agregação amiloide	25
TABELA 3. Métodos de análise para o estudo da estrutura proteica desde o monômero até formação de amiloides	29
TABELA 4. Absortividades molares de soluções de Vermelho de Congo	31
TABELA 5. Insulinas Humulin ® e Novolin ® utilizadas nos testes para agregação e inibição amiloide	44
TABELA 6. Inibidores de agregação amiloide e as respectivas concentrações utilizadas nos ensaios	47
TABELA 7. Teste t de Student para a fase lag e $T^{1/2}$	66

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CRBB – *Congo Red Binding Buffer*

DC – Dicroísmo Circular

DO – Densidade Óptica

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMT1 e DMT2– Diabetes Mellitus Tipo 1 e Tipo 2

FTIR – *Fourier-transform infrared spectroscopy* (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

NPH - *Neutral Protamine Hagedorn*

ThT – Tioflavina T

T_m – Temperatura de transição

VC – Vermelho de Congo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. INDÚSTRIA BIOFARMACÊUTICA.....	16
2.2. DIABETES MELLITUS	17
2.2.1. INSULINA.....	18
2.3. AMILOIDOSE	22
2.3.1. AMILOIDOSE DE INSULINA	22
2.4. AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS	23
2.4.1. MECANISMO DE AGREGAÇÃO: FORMAÇÃO DE FIBRAS AMILOIDES	26
2.5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE FIBRAS AMILOIDES	29
2.5.1. ENSAIO DE VERMELHO DE CONGO	29
2.5.2. ENSAIO DE TIOFLAVINA T	31
2.5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	32
2.6. ABORDAGENS TERAPÊUTICAS CONTRA AGREGAÇÃO	33
2.6.1. INIBIDORES AMILOIDES	34
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVOS GERAIS	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS	44
4.2. METODOLOGIA.....	45
4.2.1. PADRONIZAÇÃO DA CINÉTICA DE AGREGAÇÃO AMILOIDE	45
4.2.1.1. CINÉTICA DE AGREGAÇÃO AMILOIDE	46
4.2.2. ANÁLISE DE FIBRAS AMILOIDES POR ESPECTROFOTOMETRIA – VERMELHO DE CONGO (VC).....	47
4.2.3. ANÁLISE DE FIBRAS AMILOIDES POR ESPECTROFLUOMETRIA – TIOFLAVINA T (THT)	48
4.2.4. ANÁLISE DA CINÉTICA DE AGREGAÇÃO	48
4.2.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1. O MOTIVO DA ESCOLHA DA INSULINA COMO PROTEÍNA PARA O ESTUDO DE AGREGAÇÃO AMILOIDE EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA.....	50
5.2. MODELO DE AGREGAÇÃO PROTEICA PROPOSTO	50
5.3. MECANISMO DE INIBIÇÃO DE AGREGADOS AMILOIDES	55
5.4. FORMULAÇÃO DE INSULINA REGULAR COM ADIÇÃO DE POLIFENÓIS COMO ANTIAMILOIDOGÊNICOS	57
5.5. FORMULAÇÃO DE INSULINA REGULAR COM ADIÇÃO DE VITAMINAS COMO ANTIAMILOIDOGÊNICOS	62
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA – TESTE T STUDENT	66
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

O surgimento dos medicamentos com base biotecnológica revolucionou a indústria farmacêutica, visto que a utilização de fármacos com derivação animal podiam gerar alergias nos pacientes, e a produção via tecnologia de DNA recombinante obtida através de processos biológicos tornaram se mais compatíveis. A insulina foi o primeiro biofármaco produzido e que até hoje é demasiadamente utilizada, devido ao grande aumento de pessoas diabéticas ao redor do mundo.

O Diabetes Mellitus (DM) trata-se de uma doença metabólica que ocorre em razão da produção deficiente de insulina ou da resistência à sua atuação no organismo. E o tratamento é feito a partir da introdução de insulina exógena para regulação da glicose no sangue. Pelo fato da insulina ser essencial no tratamento do DM e a grande ocorrência de casos de diabetes, há a necessidade da realização de estudos sobre eventuais instabilidades que possam ocorrer em razão da perda estrutural nativa da insulina, encarregada da atividade biológica deste medicamento.

As instabilidades relacionadas as proteínas estão relacionadas a doenças que são caracterizadas por fibras proteicas insolúveis formadas a partir de modificações estruturais decorrentes de mal dobramento das proteínas, que se depositam em tecidos e nos espaços extra e intracelulares dos órgãos. Doenças muito conhecidas como o mal de Alzheimer, Parkinson, Diabetes Mellitus tipo 2 são resultantes da formação de tais fibras, além também da formação de agregados amiloides no local de injeção que podem ser verificados com aparição de nódulos subcutâneos, no caso da insulina.

Em virtude da maior parte dos trabalhos encontrados na literatura serem relacionados à formação de agregados amiloides em doenças neurodegenerativas, e não haver um modelo de estudo para agregação amiloide referente às formulações farmacêuticas, o presente trabalho teve por base o desenvolvimento de um modelo de agregação amiloide nas formulações de insulina obtidas diretamente de farmácias. Esta agregação pode ser acarretada pela instabilidade da insulina e a geração dos agregados pode ocorrer devido a fatores como temperatura, pH e agitação. Sendo assim, é necessário a realização de análises direcionadas a condições que possam ocorrer no cotidiano, como o armazenamento e transporte deste fármaco.

Baseado na instabilidade deste fármaco e sua grande demanda, se faz torna-se fundamental um melhor entendimento sobre a estrutura desta proteína, sua estabilidade e os mecanismos de agregação, objetivando a inibição da formação dos agregados amiloides com o uso de substâncias com potencial antiamiloidogênico como excipientes da formulação de insulina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Indústria Biofarmacêutica

Na década de 70 com o desenvolvimento da engenharia genética houve o surgimento da biotecnologia no setor farmacêutico, e a partir dela que foi possível se fazer uso de proteínas para formulação de novos medicamentos, assim como a insulina humana, primeiro biofármaco a ser produzido e comercializado (LADISCH E KOHLMANN, 1992; PONTES, et. al. 2018).

Ainda entre os anos de 1922 e 1972, a princípio a extração da insulina era feita a partir do pâncreas de animais como bois e porcos, e com o auxílio da engenharia genética a insulina humana começou a ser sintetizada através da tecnologia de DNA recombinante (LANDGRAF E SANDOW, 2016). O desenvolvimento do processo de produção da insulina humana recombinante iniciou-se devido à escassez de carne bovina e suína na década de 70, restringindo assim a disponibilidade do tecido pancreático para extração de insulina. E naquela época, havia o receio de que a demanda de insulina aumentasse de forma acelerada comparado com a oferta de insulina disponível para população (LADISCH E KOHLMANN, 1992).

Em 1978, a empresa de biotecnologia Genentech e a empresa farmacêutica Eli Lilly trabalharam juntamente para obtenção da insulina humana recombinante na *Escherichia coli* (E. coli). O fato da insulina ser uma proteína pequena e não possuir os resíduos dos aminoácidos metionina e triptofano foram críticos para decisão da realização da clonagem deste peptídeo e o rápido processo de fabricação, já que a presença destes aminoácidos poderia ocasionar a hidrólise e destruição do produto (LADISCH E KOHLMANN, 1992).

A insulina humana recombinante apresenta vantagens se comparada a insulina extraída do pâncreas de animais: o fornecimento de insulina recombinante é muito maior, além dela ser idêntica à insulina humana produzida pelo nosso organismo. Este último fator faz com que a insulina humana recombinante tenha menor probabilidade de apresentar reações imunológicas durante o uso terapêutico do que a derivada de animais. Já que em alguns casos, estas insulinas animais podem apresentar efeitos adversos, como por exemplo, a insulina suína após ser administrada por um longo período de tempo pode gerar reações alérgicas graves (LADISCH E KOHLMANN, 1992).

Os biofármacos são medicamentos formados por macromoléculas complexas que apresentam uma variedade de grupos funcionais suscetíveis a algum tipo de instabilidade através de diferentes vias de degradação que podem decorrer da exposição a diversas mudanças e condições ambientais. Há alterações no decorrer do processo de produção do medicamento, desde o desenvolvimento ou fabricação, purificação, formulação, embalagem, transporte, durante o armazenamento até a administração no paciente. A ocorrência de instabilidade em biofármacos gera uma preocupação direcionada a sua eficácia e potência, porém a maior apreensão inclina-se a presença de produtos de degradação que podem levar ao risco de uma resposta imune à formulação aplicada (TAMIZI E JOUYBAN, 2016).

O desenvolvimento de macromoléculas biologicamente ativas como agentes terapêuticos é demasiadamente desafiadora do que se comparado com drogas de moléculas pequenas, devido ao fato de serem menos permeáveis através das membranas biológicas, possuírem mais susceptibilidade à degradação enzimática e serem mais propensas a alterações estruturais a partir de determinadas condições. Além do fato de que há problemas de degradação no trato

gastrointestinal relacionados a macromoléculas, devido a este motivo esses biofármacos são administrados via parenteral (WANG, et. al. 2016).

Desde 1982, quando a insulina foi aprovada como o primeiro biofármaco tivemos o despertar do interesse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de medicamentos com base na utilização de proteínas. Atualmente podemos encontrar disponíveis comercialmente em torno de 250 produtos à base de proteínas e que nestas últimas décadas veem desempenhando um importante papel na melhoria da saúde dos pacientes. O interesse por este tipo de medicamento tem por base as vantagens que eles demonstram possuir sob medicamentos desenvolvidos a partir de pequenas moléculas, como menor toxicidade e uma maior especificidade em relação aos alvos. Entretanto, há um grande desafio para a formulação de produtos biológicos quando se trata de agregação de proteínas, pois pode afetar a qualidade e eficácia do produto desenvolvido, ou até mesmo provocar uma resposta imune no paciente (KHODABANDEHLOO E CHEN, 2017).

Sendo assim, o mercado global de biofármacos apresenta uma grande necessidade de investimento em tecnologia e pesquisa para produção de insulina, pois existe um grande consumo no mercado pelo aumento dos casos de diabetes, devido ao valor de comercialização e a dependência de importações. E este último caso pode levar ao risco de pacientes ficarem sem tratamento caso seja escassa a aquisição de insulina no mercado externo (PONTES, et. al. 2018).

2.2. Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus é uma doença metabólica definida pela produção insuficiente de insulina pelas células beta das ilhotas pancreáticas, que ocasiona o aumento dos níveis de glicose na corrente sanguínea (hiperglicemia), ou pode ocorrer devido à resistência à atuação do hormônio insulina no organismo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Pode ser classificada como diabetes mellitus tipo I (DMT1) e o tipo II (DMT2).

O DMT1 decorre de um distúrbio autoimune que ocasiona a destruição das células beta das ilhotas pancreáticas que são as responsáveis pela produção do hormônio insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Antigamente, o DMT1 era considerado um distúrbio com ocorrência somente em crianças e adolescentes, todavia na atualidade demonstrou-se não ser verdade, pois os sintomas podem ter início em qualquer faixa etária. Como diagnóstico inicial verifica-se os seguintes sintomas: polidipsia (sensação excessiva de sede), polifagia (apetite exagerado) e poliúria (aumento da produção de urina), juntamente com a hiperglicemia, onde existe a necessidade da reposição de insulina exógena via medicação (ATKINSON, et. al. 2014).

A insulina é um hormônio responsável pela nutrição celular, pois tem por função o transporte de glicose para o interior das células do corpo. Quando há uma resistência à insulina temos como consequência o DMT2, onde a glicose é inviabilizada de nutrir as células e devido a isso observa-se o seu aumento na corrente sanguínea. (GUIMARÃES E LAZZARETTI, 2017). E é importante frisar que o DMT2 corresponde a uma porcentagem de 90 a 95% das pessoas que apresentam diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Em contraposto ao DMT1 que requer a restituição hormonal no organismo, o DMT2, ao menos inicialmente, não apresenta a necessidade do tratamento com insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Sendo assim, pode ser tratada a partir da associação de

práticas alimentares mais saudáveis com a realização de exercícios regularmente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009). Isto é demasiadamente importante, pois, a grande maioria dos pacientes acometidos pelo DMT2 apresentam um quadro de obesidade, e esse acúmulo de gordura corporal pode gerar resistência à insulina já mencionada anteriormente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Conforme a Federação Internacional de Diabetes em 2017, o Brasil apresentou-se entre os 10 países com maior quantidade de pessoas diabéticas entre as idades de 20 e 79 anos (12,5 milhões) e estima-se que no ano de 2045 esta doença irá afetar aproximadamente 20,3 milhões de pessoas (PONTES, et. al. 2018).

Tendo em vista que a insulina é parte essencial do tratamento de DM e sua grande incidência ao redor do mundo, se faz necessário o estudo para análise de possíveis instabilidades que podem ser ocasionadas devido à perda da sua estrutura nativa, responsável pela atividade biológica do medicamento.

2.2.1. Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido e secretado pelas células beta das ilhotas pancreáticas, na forma de pré-pró-insulina que posteriormente sofre clivagem gerando a pró-insulina (Figura 1) que é transportada para o complexo de Golgi (ORÍÁ E BRITO, 2016). No complexo de Golgi ocorre a conversão da pró-insulina em insulina (Figura 2), através da remoção do peptídeo C (peptídeo de conexão) (KATZUNG, et. al, 2012).

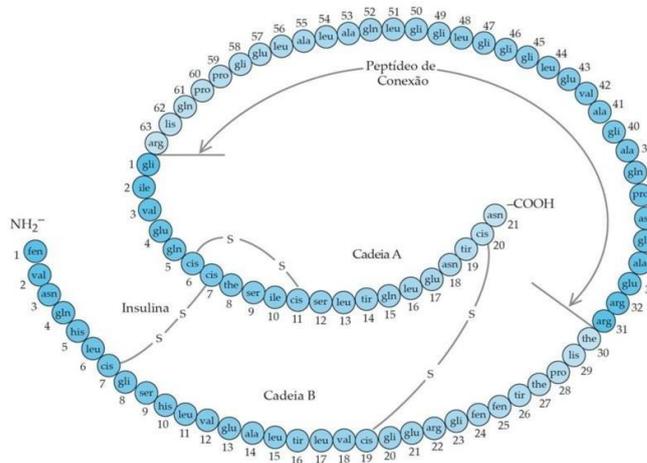


Figura 1: Estrutura da pró-insulina.
Fonte: MedicinaNet.

A insulina tem como função essencial a manutenção da homeostase glicêmica. E esse hormônio é constituído por duas cadeias: a cadeia A, com 21 resíduos de aminoácidos, ligados através de duas pontes dissulfeto à cadeia B, formada por 30 resíduos de aminoácidos (VALENTE, 2015).

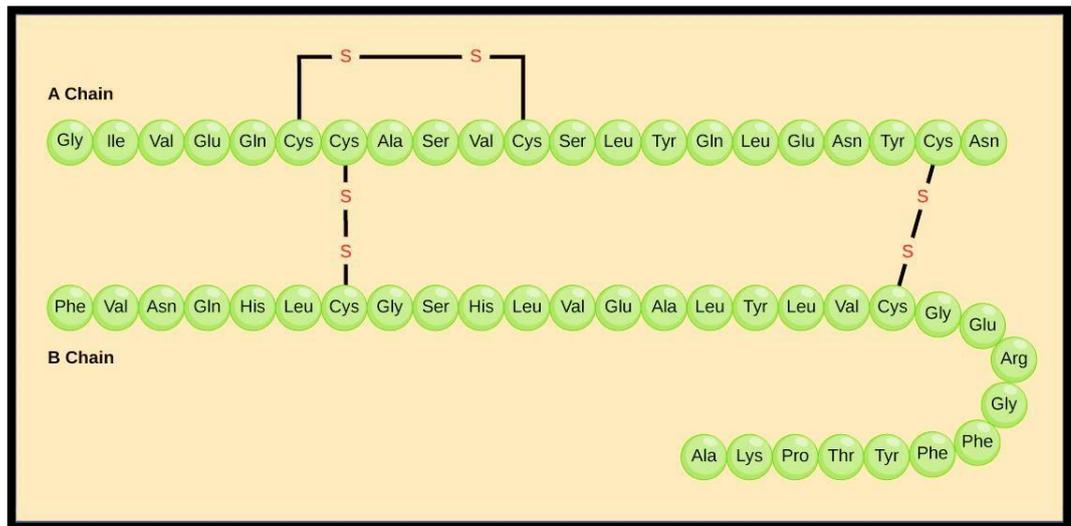


Figura 2: Estrutura do hormônio insulina.

Fonte: OpenStax Biology.

A estrutura monomérica da insulina foi descoberta em 1926, e trata-se da forma na qual ela apresenta atividade biológica. À medida que a concentração de insulina aumenta, os monômeros propendem a formar dímeros que, em soluções neutras ou moderadamente ácidas (pH 4-7) e na presença de íons de zinco levam a formação de conformações mais estáveis conhecidas por hexâmeros, que são constituídos por três dímeros (Figura 3). Estes dímeros ficam em torno de dois íons zinco, assim podendo adotar diferentes estados conformacionais, T6, T3R3 e R6, que se diferenciam na sua simetria e nos arranjos dos primeiros oito resíduos da cadeia B, onde o estado T corresponde à uma conformação alongada e o R representa uma forma de hélice (VALENTE, 2015; SCHLEIN, 2017).

Os dímeros e os hexâmeros, apesar de serem inativos, são mais estáveis comparados aos monômeros. Porém, os hexâmeros podem apresentar ainda compostos fenólicos nas formulações, como o fenol e o metacresol que lhe proporcionam uma estabilidade ainda maior. Esta estabilização advém da ligação dos compostos fenólicos a uma bolsa na interface monômero-monômero, levando a uma modificação da estrutura nos resíduos iniciais B1-B8. Esta alteração faz com que a estrutura anteriormente aberta se feche em forma de hélice, dificultando assim a difusão dos íons zinco para a parte externa do hexâmero, e não havendo essa liberação ocorre o retardo da ação da insulina no organismo, pois não haverá a dissociação em dímeros, e conseqüentemente em monômeros (VALENTE, 2015). E quando os hexâmeros são secretados pelas células beta se difundem na corrente sanguínea por meio do gradiente de concentração, e a partir de repulsões eletrostáticas e reduções no gradiente de concentração há a dissociação da estrutura hexamérica em monômeros, reavendo assim a sua atividade biológica (PAIVA, 2014).

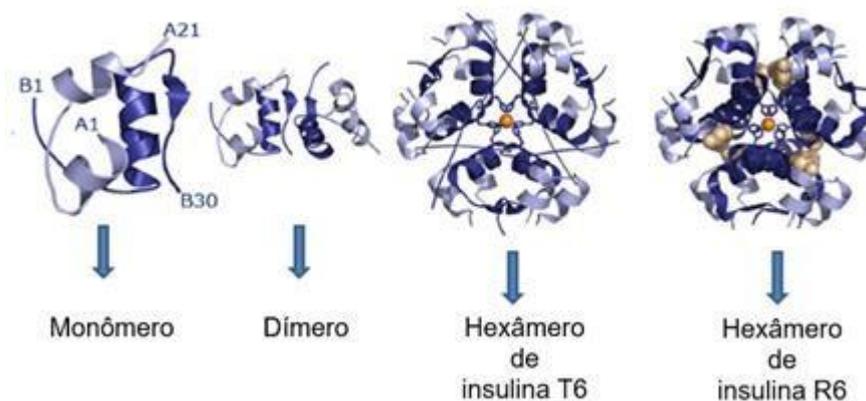


Figura 3: Estrutura da Insulina: monômero até formação de diferentes tipos de hexâmeros.
Fonte: Adaptado de Schlein, 2017.

O avanço na terapia com insulina deu origem aos seus análogos, que são nada menos do que alterações estruturais na cadeia polipeptídica para haver uma melhora no tempo de ação do medicamento (ZAYKOV, et. al. 2016).

A utilização da insulina é adaptada para cada paciente, ou seja, dependerá do controle glicêmico, e também pelo seu estilo de vida. Existem diferentes tipos de insulinas, que se diferenciam pelas suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Tabela 1 e Figura 4):

- **Insulinas de ação ultra-rápida:** têm por objetivo acelerar a absorção da insulina pelo organismo, minimizando as variações de glicemia após as refeições (HIRSCH, 2005). Ex: insulina lispro, aspártica e glulisina.
- **Insulinas regulares:** quando em altas concentrações sofrem auto-agregação gerando dímeros que são estabilizados ao redor de íons zinco transformando-se em hexâmeros, e esta estrutura hexamérica proporciona um início tardio e um maior tempo de ação se comparado aos análogos de ação ultra-rápida. Após a administração subcutânea da insulina, a estrutura hexamérica formada começa a se decompor em dímeros e por fim retorna à sua forma biologicamente ativa, monômeros. Isto ocorre devido ao tamanho e volume dos hexâmeros que apresentam dificuldade em atravessar o endotélio vascular até a corrente sanguínea (KATZUNG, et. al, 2012).
- **Insulina NPH (*Neutral Protamine Hagedorn*):** possui a sua absorção e início de ação retardado pela presença de protamina em sua composição. Após a administração subcutânea, há a degradação da protamina pelas enzimas proteolíticas para proporcionar a absorção da insulina pelo organismo (KATZUNG, et. al, 2012).
- **Insulinas de ação prolongada:** atua na manutenção dos níveis basais de insulina (KATZUNG, et. al, 2012). Ex: Detemir e glargina.

Tabela 1: Alterações na cadeia polipeptídica de análogos de insulina.

Fonte: Pires e Chacra, 2008.

Análogos de insulina	Alterações na cadeia polipeptídica
Lispro	Inversão entre os aminoácidos (a.a.) prolina e lisina nas posições B28 e B29.
Aspártica	Substituição do a.a. prolina (B28) pelo aspartato.
Glulisina	Substituições: asparagina (B3) por lisina e lisina (B29) por ácido glutâmico.
Detemir	Remoção do a.a. treonina (B30) e adição do ácido mirístico.
Glargina	Adição de 2 moléculas de arginina no terminal da cadeia B e substituição da asparagina (A21) por glicina.

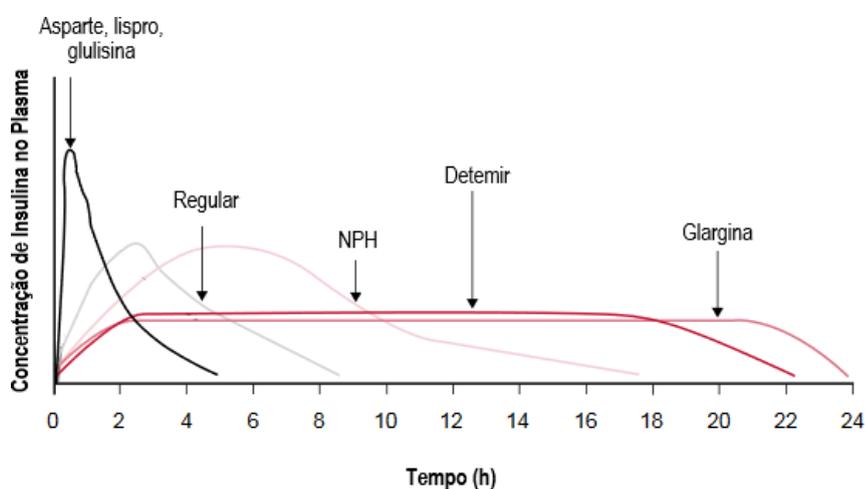


Figura 4: Esquema da farmacocinética da insulina e seus análogos.

Fonte: Adaptado de Pires e Chacra, 2008.

A formulação de insulina é constituída por cloreto de zinco, glicerol, hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico para ajustes de pH, água para injetáveis e metacresol. Para a prevenção do crescimento microbiano durante o armazenamento a longo prazo é necessário o uso de conservantes, sendo o metacresol o excipiente encontrado na composição deste medicamento responsável por esta ação, além do seu efeito como estabilizante (GUALANDI-SIGNORINI E GIORGI, 2001).

Porém, caso haja redução ou perda de estabilidade pode ser devido à formação de agregados, que se refere a alterações sofridas pela estrutura nativa da proteína.

Singh e colaboradores (2011) utilizaram um modelo com incubação a temperatura de 55 e 65 °C para formação de agregados, a partir do uso da proteína citocromo c com adição de metacresol, e monitoramento através do aumento da turbidez da solução. O metacresol foi adicionado nas mesmas concentrações nas quais são encontradas em formulações farmacológicas, e apresentou um caráter indutor de agregação na proteína estudada. Porém, foi demonstrado que o seu uso gerou um desdobramento da proteína em determinada região, isto é, a proteína se desdobrou apenas parcialmente.

Visto que podem ocorrer instabilidades mesmo com a presença do estabilizante padrão da formulação, é importante o estudo sobre o uso e aplicação da insulina.

2.3. Amiloidose

O termo “amiloidose” foi utilizado pela primeira vez por um botânico chamado de Matthias Schleiden, que descreveu o amido das plantas. E posteriormente esta nomenclatura foi usada para descrever depósitos macroscópicos anormais nos meados do século XIX por Rudolf Virchow, que usou uma combinação de iodo e ácido sulfúrico para corar os depósitos anormais apresentados em órgãos afetados em seus pacientes. Virchow descobriu que, assim como o amido, os tecidos dos órgãos analisados por ele apresentaram uma coloração azul e, portanto, recebendo o nome de amiloide (MAKOWSKI, 2009).

Houve relatos de que os órgãos afetados pela amiloidose produziam uma quantidade muito alta de nitrogênio, levando à conclusão de que a amiloide possui característica “albuminosa”, ou seja, sua composição seria de proteínas (BANCROFT, et. al. 2013).

As amiloidoses tratam-se de doenças caracterizadas pelo depósito de fibras proteicas insolúveis nos tecidos e nos espaços extracelulares e intracelulares de órgãos. Essas fibras amiloides são formadas a partir de alterações no desdobramento de proteínas. As fibras amiloides quando depositadas nos tecidos podem danificar a estrutura e sua função, resultando em doenças graves como Alzheimer, Parkinson, Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) e no caso da insulina pode gerar à formação de agregados amiloides no local de injeção (BANCROFT, 2013; XUE, et. al. 2017).

2.3.1. Amiloidose de Insulina

A insulina é um medicamento que age no controle glicêmico de pacientes com diabetes tipo I e II e pode ser administrada através de bomba, injeção ou por inalação. Todavia em alguns pacientes a insulina pode formar um tipo de depósito insolúvel no local de aplicação. A amiloidose localizada está relacionada à terapia com insulina, onde a injeção repetidamente no mesmo local pode gerar substâncias amiloides que ficam depositadas extracelularmente e podem prejudicar a função do tecido, isto é, formação de nódulo subcutâneo no local da injeção do biofármaco (GUPTA, et. al. 2015). Este nódulo formado gera uma grande preocupação, pois pode afetar consideravelmente o controle glicêmico em pacientes com diabetes dependente de insulina (NILSSON, 2016).

Caso o paciente aplique a injeção em um local que esteja carregado de amiloide, teremos por consequência uma quantidade insuficiente de insulina absorvida para redução dos níveis de glicose no sangue, levando à hiperglicemia. Existem especulações direcionadas ao fato de que a liberação de insulina pode ser imprevisível, quer dizer que os depósitos amiloides podem

desempenhar o papel de um reservatório que libera a proteína por um período de tempo, porém sem o conhecimento do paciente (NILSSON, 2016).

A aplicação repetida no mesmo local de injeção geralmente é devido ao fato de que a aplicação se torna menos dolorosa quando feita sob os nódulos (NILSSON, 2016), porém para o tratamento aconselha-se a aplicação em locais alternados e até mesmo a excisão cirúrgica para a retirada dos nódulos formados (GUPTA, et. al. 2015; IWAYA, et. al. 2019).

Em 1983, houve o primeiro relato de insulina amiloide em um paciente diabético após aplicação contínua de insulina porcina durante um período de 5 semanas, e com isso iniciaram-se análises histológicas onde verificaram a formação de fibras com características amiloides através de microscopia eletrônica, além de birrefringência verde após coloração com o corante Vermelho de Congo, para investigação de substâncias amiloidogênicas (NILSSON, 2016). Visto os diferentes modos de aplicação da insulina, desde então têm-se problemas com a utilização de bombas de insulina, que revelaram a presença de agregados amiloides devido à aplicação regularmente no mesmo local, gerando até mesmo o entupimento do cateter em alguns casos (BROWNLEE, et. al. 1984). E com relação à administração através de inalação de insulina em pó houve a hipótese de que ela podia agregar na interface ar-tecido e assim se acumular nos pulmões, e para a investigação deste caso foram realizados testes em camundongos com resultados de presença de oligômeros e fibras amiloides no tecido pulmonar dos animais (LASAGNA-REEVES, et. al. 2010).

Para evitar este problema não só na injeção de insulina local como também na própria formulação é preciso entender o funcionamento do mecanismo de formação de agregados amiloides.

2.4. Agregação de Proteínas

Uma característica provocada pela falta de estabilidade da insulina é a formação de agregados proteicos que pode ser gerada a partir de alterações que ocorrem pela ação de fatores físicos como a temperatura, pH, agitação (MAHLER, et. al. 2009; WANG, et. al. 2010). A agregação de proteínas pode levar a reações imunológicas adversas nos pacientes, então é de grande importância um entendimento abrangente da capacidade de formação dos agregados amiloides para a redução dos riscos à saúde durante o uso deste medicamento.

As proteínas podem sofrer alterações na sua estrutura nativa, isto é, pode ocorrer um enovelamento de forma incorreta, podendo levar à formação de proteínas insolúveis no meio intra ou extracelular, que se agregam e formam estruturas fibrilares chamadas de fibras amiloides, que são capazes de se depositarem em diversos órgãos e assim acarretar o mau funcionamento destes e ocasionar doenças como o Alzheimer, Parkinson, diabetes tipo 2, dentre outras (ALMEIDA, 2010).

As proteínas globulares, como exemplo a insulina, possuem a propensão em adotar e preservar sua estrutura na forma tridimensional na qual suas superfícies hidrofóbicas não fiquem expostas através do dobramento de sua estrutura. No entanto, podem ocorrer alterações na conformação nativa dessas proteínas a partir de diversos fatores comprometendo sua estabilidade. Sob determinadas condições podem formar fibras amiloides altamente estruturadas, e não há apenas uma via de agregação proteica, mas uma variedade de condições ambientais que podem induzir a formação de agregados amiloides (BRANGE, et. al, 1997). A estabilidade das proteínas pode ser classificada como física ou química, onde a primeira relaciona-se com alterações conformacionais e térmicas, gerando assim desdobramentos da

estrutura tridimensional biologicamente ativa, desnaturação, adsorção, agregação e precipitação, e no caso dos desdobramentos temos uma alteração conformacional que pode induzir a agregação irreversível de proteínas. Já quando tratamos de estabilidade química estamos associando com a formação ou quebra de ligações covalentes através de oxidação, redução, desamidação, hidrólise, dentre outras vias de degradação (TAMIZI E JOUYBAN, 2016).

A mudança do pH da solução é um dos parâmetros que pode induzir o aumento da agregação proteica, devido ao fato de determinar o tipo e a densidade da carga superficial e o grau de rompimento estrutural das proteínas, que afetam não apenas as interações intramoleculares como também as interações intermoleculares. Conseqüentemente, o pH e com o aumento da hidrofobicidade podem determinar a taxa de agregação proteica (WANG, et. al, 2010).

Em soluções ácidas, a insulina conserva-se na sua estrutura terciária, mas é basicamente monomérica quando encontrada abaixo do pH 2, e quando o pH está acima de 2 tem-se a presença de uma maior quantidade de dímeros se comparado aos monômeros, com isso observa-se o decréscimo da fibrilação. E em soluções neutras (pH 7) apresentam um processo mais lento do que quando em meio ácido, isso é devido ao fato de que a molécula de insulina em solução neutra encontra-se essencialmente na forma hexamérica, que é mais estável (BRANGE, et. al. 1997).

Estudos mostraram que na condição de pH 2,5, a insulina bovina, formou uma quantidade expressiva de fibras a 37 °C em poucas horas, todavia apresentou ser mais estável por meses em um pH 7, sem agitação. Nota-se então, que na medida que há um aumento do pH, a insulina na sua forma monomérica sofre uma mudança de conformação, gerando assim, dímeros, tetrâmeros e conseqüentemente hexâmeros, todavia é na sua forma monomérica que as proteínas possuem uma maior disposição à formação de fibras em virtude da sua extensa área hidrofóbica exposta (WANG, 1999). As proteínas podem formar agregados ou não dependendo da contribuição relativa da atração hidrofóbica intermolecular e da repulsão eletrostática (WANG, et. al, 2010).

Com relação à concentração de proteína, ela também é considerada um dos fatores para determinação de agregação proteica. O aumento da concentração de proteína propicia a geração de agregados tanto no período de incubação, quanto durante o armazenamento durante um longo período de tempo. Essa agregação ocorre devido à aglomeração da grande quantidade de moléculas de proteína no meio (ALAM, et. al. 2017).

A exposição de proteínas a condições térmicas elevadas também leva à instabilidade conformacional, e, portanto, à desnaturação das mesmas. Ocorre uma aceleração das reações químicas, como a oxidação e desamidação das proteínas, a partir do aumento da temperatura, que pode levar à geração de elevados níveis de agregados. E assim tem-se como consequência a modificação direta na conformação das cadeias polipeptídicas, isto é, a estrutura da proteína se desdobra, perdendo assim o seu estado nativo, biologicamente ativo (MAHLER, et. al. 2009).

As proteínas sofrem desdobramento acima de determinada faixa de temperatura, definida por temperatura de desnaturação ou transição (T_m), que fica por volta de 40 – 80 °C. A T_m aumenta significativamente quando há uma diminuição da hidratação da proteína, onde nota-se a sua desestabilização estrutural (WANG, 1999).

O efeito de agitação é descrito como um potencial causador de um fenômeno conhecido por cavitação, onde há a formação de espaços vazios ou bolhas dentro do líquido que produzem um fluxo turbulento que pode resultar na produção de grupamentos hidroxila e radicais hidrogênio, levando assim à formação de agregados de proteína (MAHLER, et. al. 2009).

Thomas e Geer descobriram que juntamente com a agitação há a presença de um outro parâmetro: uma interface líquido-ar para auxiliar na agregação das proteínas. A agitação gera uma interface líquido-ar que resulta no alinhamento das moléculas proteicas na interface, desdobrando-as para aumentar a área de contato dos resíduos hidrofóbicos ao ar, iniciando-se assim a formação de estruturas mais organizadas como é o caso das fibras amiloides (WANG, 1999).

Em 1983, Lougheed e colaboradores realizaram testes com agitação, onde submeteram as suas amostras a uma temperatura de 37°C, com agitação em plano horizontal e rotação no plano vertical. Em seus estudos, verificaram que a rotação apresentou uma estabilidade muito mais elevada se comparado às amostras submetidas a agitação horizontal. Isto está relacionado ao fato de que em plano horizontal há um maior espaço disponível para o ar dentro do recipiente, enquanto no plano vertical o líquido ocupará todo o espaço do interior do frasco, por conseguinte, o ar não terá espaço suficiente para facilitar a formação de agregados proteicos por estresse oxidativo.

Na literatura existem diversos estudos que estão direcionados à formação de agregados nas proteínas com algum tipo de interferência, porém nenhum deles faz uso de um modelo utilizando formulações, ao contrário deste trabalho que tem como finalidade mostrar que pode haver formação de agregados amiloides também na formulação farmacêutica, afetando a sua estabilidade. A Tabela 2 a seguir mostra alguns desses trabalhos relacionados à agregação amiloide, e a partir dela é possível observar o vasto uso da proteína bovina e humana submetidas a diferentes condições de diluição, alteração de temperatura e presença ou ausência de estresse mecânico.

Tabela 2: Exemplos de referências com utilização da proteína insulina em diferentes condições para agregação amiloide (continua).

Autores	Condições
NIELSEN, et. al. 2001	Insulina bovina e humana em 3 meios diferentes: 20% CH ₃ COOH, 20 mM Tris e 0,1 M HCl; Incubação a 60 °C (sem agitação) e 37 °C (com agitação).
GARRIQUES, et. al. 2002	Insulina humana, bovina e análogos dissolvidos em 0,1 M HCl; Incubação a 50 °C.
JIMENEZ, et. al. 2002	Insulina bovina dissolvida em H ₂ O; Incubação a 60 °C à temperatura ambiente.
ARORA, et. al. 2004	Insulina bovina diluída em 1 mg/mL de tampão glicina; Incubação a 37 °C, 44 °C e 50 °C.

Tabela 2. Continuação.

ARORA, et. al. 2004	Insulina bovina; Incubação a 100, 120, 130 e 140 °C.
LIBRIZZI E RISCHEL, 2005	Insulina bovina dissolvida em 20% CH ₃ COOH e 0,3 M NaCl; Incubação a 60 °C.
GIBSON, et. al. 2006	Insulina bovina dissolvida em 1 M HCl; Incubação a 37 °C.
FODERÀ, et. al. 2008	Insulina humana dissolvida em 20% CH ₃ COOH e 0,5 M. Incubação a 45 °C sem agitação.
HONG, et. al. 2012	Insulina bovina dissolvida em 25 mM NaCl / HCl; Incubação a 65 °C.
KHAN, et. al. 2015	Insulina humana em CH ₃ COOH; Incubação a 45°C.
YOSHIHARA, et. al. 2016	Insulina humana dissolvida em 40 mM HCl; Incubação a 70 °C, sem agitação.
ALAM, et. al. 2017	Insulina humana dissolvida em 100 mM HCl; Incubação a 37 °C, com agitação.
ALAM, et. al. 2017	Insulina humana dissolvida em 500 mM KCl-HCl + NaN ₃ ; Incubação a 60 °C.
BERNISON, et. al. 2020	Insulina bovina dissolvida em 100 mM HCl e diluída em um dos seguintes tampões: 100 mM glicina-HCl, 100 mM de citrato e 200 mM Na ₂ HPO ₄ ou em 200 mM acetato de amônio; Incubação a 60 °C.

2.4.1. Mecanismo de Agregação: Formação de fibras amiloides

A estrutura primária das proteínas é uma sequência linear de aminoácidos, sendo o nível mais simples de organização estrutural das proteínas. Já a estrutura secundária corresponde a um arranjo espacial dos aminoácidos no esqueleto polipeptídico, ao redor de um eixo imaginário, e é estabilizada por ligações de hidrogênio. Os arranjos da estrutura secundária podem ser do tipo alfa-hélice (Figura 5) ou folha beta pregueada (Figura 6 A), ambas foram propostas no ano de 1951, por Linus Pauling e Robert Corey. A alfa-hélice possui uma estrutura com uma disposição helicoidal que se mantém devido a ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupamentos C=O e NH da cadeia principal, além de possuírem as cadeias laterais dos aminoácidos projetadas para fora. O arranjo em folha beta pregueada apresenta uma configuração em forma de fitas estendidas, que podem se dispor em direções opostas, ou seja, com as extremidades N-terminal e C-terminal das folhas beta alternando-se (folha beta antiparalela, Figura 6 B), ou na mesma direção, quando os N-terminais estão juntos, chamada assim por folha beta paralela (Figura 6 C). Uma folha beta pode ser formada por apenas uma cadeia polipeptídica, dobrando-se sobre si mesma, nesta situação teremos ligações de

hidrogênio intramoleculares. Porém, se a estrutura de folha beta for formada por mais de uma cadeia, teremos então ligações intermoleculares (HARVEY E FERRIER, 2011).

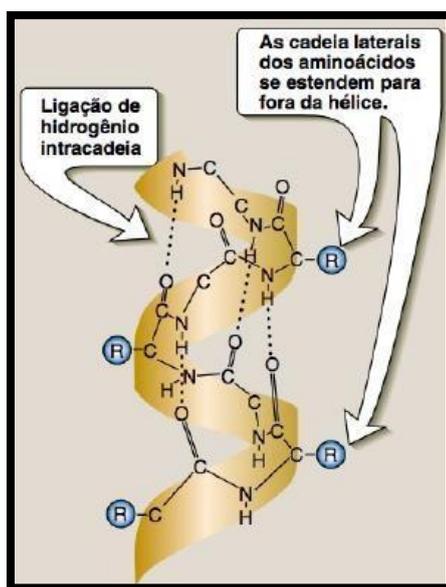


Figura 5: Estrutura de alfa-hélice.
Fonte: Harvey, 5ª ed.

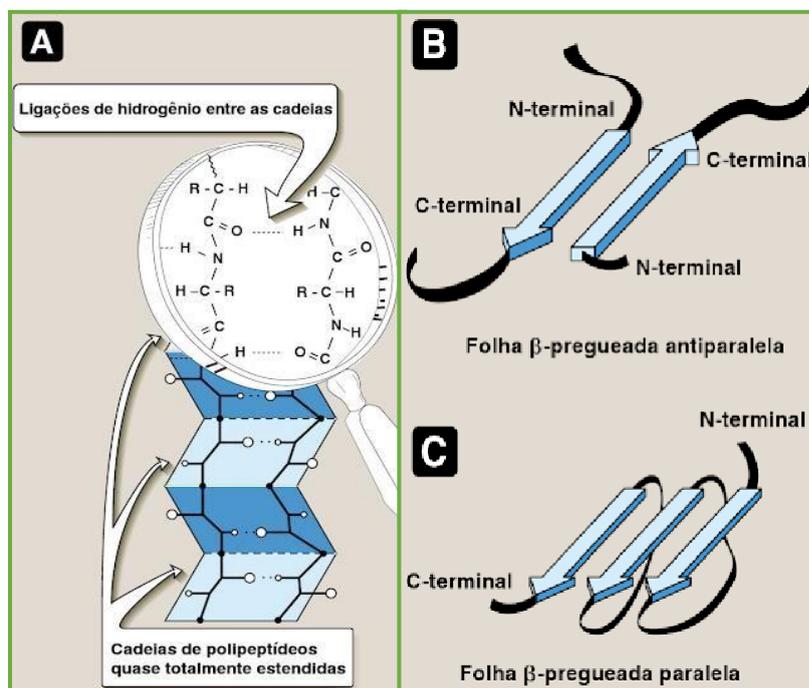


Figura 6: A. Estrutura de folha beta. B. Folha beta antiparalela. C. Folha beta paralela.
Fonte: Harvey, 5ª ed.

As estruturas amiloides são empacotadas e muito organizadas, e apresentam uma configuração do tipo folha beta pregueada. O mecanismo de formação de fibras amiloides (Figura 7) refere-se a uma reação de polimerização, e decorre de uma nucleação seguida de uma etapa de crescimento (FALCÃO, 2015). A fase inicial trata-se do tempo necessário para a formação de um intermediário amiloidogênico (núcleo), e a partir deste núcleo formado, tem-

se a etapa de crescimento, onde o núcleo se associa com monômeros ou oligômeros formando as fibras amiloides maduras (CHITI E DOBSON, 2006). A formação das fibras amiloides apresenta uma diminuição à medida que se alcança o estado de equilíbrio, representando assim o momento em que há o esgotamento de estruturas monoméricas (ZAPADKA et. al, 2017).

A reversibilidade dos agregados proteicos geralmente é dependente do estágio do processo de agregação, ou seja, na etapa inicial (nucleação) há a presença de agregados ainda solúveis, porém gradativamente vão se tornando insolúveis conforme excedem o limite de tamanho, assim sendo temos a perda da reversibilidade (FINK, A. L. 1998).

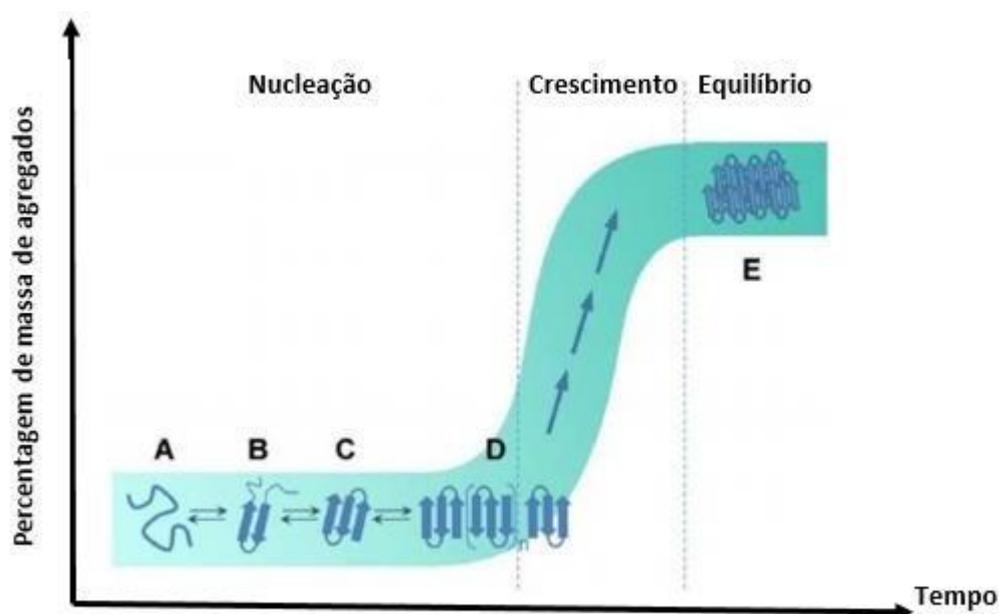


Figura 7: Gráfico da representação do mecanismo de formação amiloide.

- A. Proteínas em conformação nativa desdobrada. B. Início da formação de estrutura de folha β .
- C. Formação do núcleo. D. Formação de protofibrilas. E. Formação de fibras maduras.

Fonte: Adaptado de Belo, 2014.

Existe grande preocupação com relação à perda de estabilidade da insulina, a partir dessas mudanças conformacionais que podem ocorrer durante a produção ou na formulação final. Então para a produção de uma formulação estável há necessidade da realização de análises biológicas, químicas e físicas para a garantia da qualidade e segurança dos medicamentos (FROKJAER E OTZEN, 2005).

A indústria farmacêutica não realiza controle para agregados amiloides. Na farmacopeia brasileira pode-se encontrar ensaios para análise do teor de zinco, análise de pureza através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e testes de segurança biológica, como a contagem do número total de microrganismos mesófilos aeróbicos e endotoxinas bacterianas, porém nada envolvido com os problemas relacionados com a formação de agregados amiloides (ANVISA, 2016). Visto o fato da insulina se desestruturar e apresentar a capacidade de formar agregados, se faz necessário a inclusão de técnicas de análise e caracterização de agregados amiloides em medicamentos biológicos para a prevenção de possível perda de eficácia do tratamento.

2.5. Métodos de Caracterização de Fibras Amiloides

É indispensável o uso de métodos confiáveis e eficazes para análise e monitoramento da formação de agregados amiloides (Tabela 3), para melhor controlar a estabilidade durante o processo de fabricação até quando o medicamento for aplicado no paciente. Além de que a elucidação das estruturas fibrilares amiloides trata-se de um passo primordial para o melhor entendimento do mecanismo de sua formação, e assim levar à possibilidade do desenvolvimento de substâncias que tenham características inibidoras da formação das fibras amiloides.

Tabela 3: Métodos de análise para o estudo da estrutura proteica desde o monômero até formação de amiloides.

Fonte: Adaptado de LI, H. et. al. 2009.

	Monômeros	Oligômeros	Protofibrilas	Fibras	Amiloides (<i>in vivo</i>)
Estrutura Secundária	Dicroísmo Circular				
	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier				
			Difração por raios X		
				Vermelho de Congo	
				Fluorescência com Tioflavina T	
Morfologia		Microscopia Eletrônica de Transmissão			

Há muito tempo têm-se usado de técnicas tintoriais para detecção de fibras amiloides, como o Vermelho de Congo (VC) e a fluorescência por Tioflavina T (ThT). A caracterização também pode ser feita através de técnicas espectroscópicas que são largamente utilizadas para análise de estruturas secundárias. *In vitro*, os estudos são realizados sob condições muito mais simples do que *in vivo*, nos permitindo observar e analisar detalhes e interações específicas da estrutura, e como exemplos dispomos dos métodos de dicroísmo circular (DC) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). E para análise morfológica temos a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (LI, et. al. 2009).

2.5.1. Ensaio de Vermelho de Congo

O Vermelho de Congo (VC) representado abaixo na Figura 8, é um corante que foi largamente utilizado na indústria têxtil com o propósito de tingir fibras de celulose, porém apenas em 1922 teve seu uso direcionado ao estudo de fibras amiloides. Ele foi descoberto no momento em que o químico Paul Böttiger (1883) tentava sintetizar uma substância indicadora de pH (YAKUPOVA, et. al. 2018). Porém foi nomeado apenas em 1885, com origem a partir de uma conferência diplomática realizada em Berlim (1884-1885) para mediação de uma disputa comercial entre colônias europeias a respeito da bacia do rio Congo na África Central (KYLE, 2001).

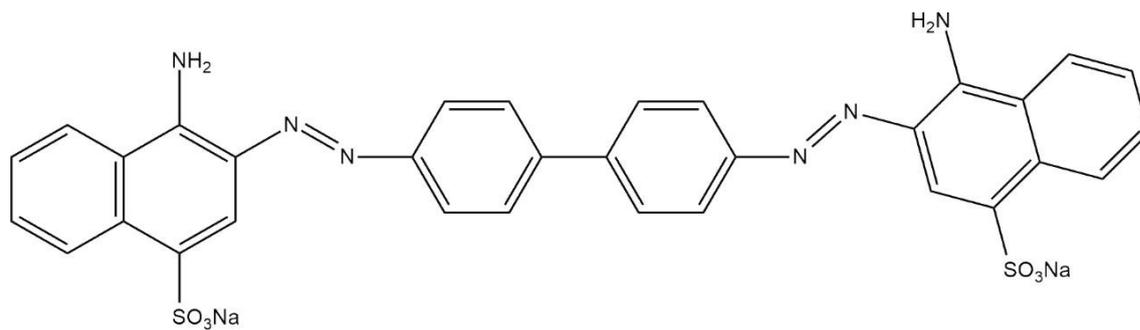


Figura 8: Estrutura do corante Vermelho de Congo.

Em 1886, o Vermelho de Congo foi empregado na detecção de ácido no trato intestinal de animais como indicador de pH, e no ano de 1922 tivemos o primeiro registro da utilização do Vermelho de Congo para identificação amiloide através do doutor Hans-Hermann Bennhold que observou o acúmulo do corante no tecido infectado após injeção intravenosa do corante no sangue de pacientes (HOWIE, 2015; YAKUPOVA, et. al. 2018).

A coloração por VC trata-se de um método quantitativo utilizado para identificação de fibras amiloides, tanto *in vitro* a partir de espectroscopia, quanto em tecidos através da microscopia birrefringente.

Este corante possui importantes propriedades espectrométricas, onde a sua combinação com as fibras amiloides deslocam o espectro de absorção UV-visível de 490 nm para 540 nm (KLUNK, et. al. 1989). Temos hipóteses de como ocorre a interação entre as fibras e o corante: uma das sugestões é que interações iônicas e hidrofóbicas possam proporcionar o alinhamento da molécula do corante dentro da estrutura fibrilar amiloide, ou, que as moléculas do corante se direcionam perpendicularmente à direção das fibras, havendo assim uma intercalação entre duas cadeias nas folhas antiparalelas (GIRYCH, 2016).

A ligação do Vermelho de Congo com as fibras amiloides demonstrou a sua fluorescência, sendo usado como diagnóstico para determinação da amiloidose. E em 1945, teve-se a primeira descrição da refringência do complexo formado pelas fibras amiloides e o corante Vermelho de Congo em cortes histológicos, pelo doutor Peter Ladewig, que identificou mudança de coloração duas vezes de amarelo para verde durante a rotação de 360° dos eixos ópticos (HOWIE, 2015; YAKUPOVA, et. al. 2018). Ou seja, presença de fibras amiloides é indicada a partir do surgimento desta birrefringência “verde-maçã” da amostra corada com o VC após sua exposição à luz polarizada (YAKUPOVA, et. al. 2018).

Klunk, Pettegrew e Abraham (1989) realizaram estudos espectrofotométricos utilizando a solução de VC, onde misturaram 10 µL de uma suspensão de fibras de insulina (200 µM) a solução tampão CRBB para totalizar um volume de 2 mL. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, e as leituras foram feitas nos comprimentos de onda de 349, 406, 477 e 540 nm. Na Figura 9, observa-se a presença de três comprimentos de onda (349, 406 e 477 nm) nos quais os espectros se cruzam, pois, eles possuem absorvidades molares iguais, tais pontos são chamados de pontos isobésticos. E o ponto de diferença espectral máximo ocorre no comprimento de 540 nm. Então, para a realização do método de Vermelho de Congo através de espectrofotometria há apenas a necessidade de se realizar uma medição em 540 nm e em um dos pontos isobésticos, todavia as absorvidades molares destes são conhecidas, Tabela 4. E nota-se que os valores em 477 nm são consistentemente os mais semelhantes, ou seja, este é o melhor ponto isobéstico para realização da metodologia.

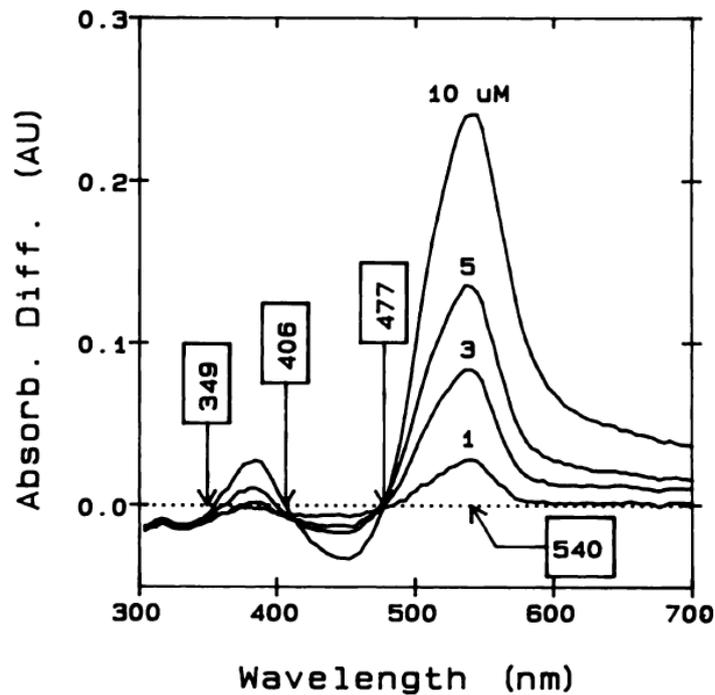


Figura 9: Espectros para diferenciação: subtração de espectros de VC livre a partir de espectros de soluções de VC ligados a fibras de insulina.
Fonte: Klunk, et.al. 1989.

Tabela 4: Absortividades molares de soluções de Vermelho de Congo.
Fonte: Adaptado de Klunk, W. E.; et. al. 1989.

W^a (nm)	a_b^b	a_f^c	% Diff ^d
540	44.578	18.955	57,5
477	34.679	34.722	0,12
406	14.912	14.677	1,6
349	28.703	28.299	1,4

a - Comprimentos de onda medidos; **b** – Absortividade molar do VC ligado a fibras;
c – Absortividade molar do VC livre determinado na ausência de fibras de insulina.
d – Diferença percentual entre as absortividades molares de VC livre e ligado.

2.5.2. Ensaio de Tioflavina T

Em 1947, o patologista austríaco Hans Chiari descobriu a capacidade de fluorescência dos agregados amiloides, a partir do uso de corantes chamados fluoróforos. Porém, apenas em 1959, Vassar e Culling recomendaram a utilização do fluoróforo conhecido por tioflavina T (BANCROFT, et. al. 2013).

A tioflavina T (ThT) é um sal benzotiazólico utilizado para detecção de fibras amiloides, que ao ser combinada com agregados amiloides, tem a excitação deslocada de 385 nm para 450 nm e emissão de 445 nm para 482 nm (Figura 10). Este corante (fluoróforo) apresenta baixa intensidade de emissão na etapa inicial de agregação, isso se deve ao fato de que a estrutura da ThT possui um eixo de rotação livre que impede a emissão em solução (Figura 11). O aumento de fluorescência nas etapas avançadas da agregação é atribuído ao fato da ligação carbono-carbono entre os anéis de benzotiazol e benzilamina tornar-se fixa, ou seja, após a ligação do fluoróforo com a estrutura fibrilar ocorre a perda do seu poder rotacional (BIANCALANA E KOIDE, 2010).

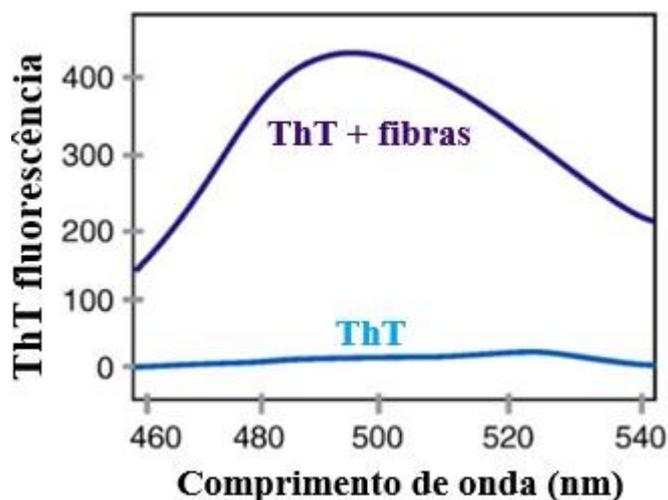


Figura 10: Aumento da fluorescência da ThT após ligação a fibras amiloides.
Fonte: Biancalana e Koide, 2010.

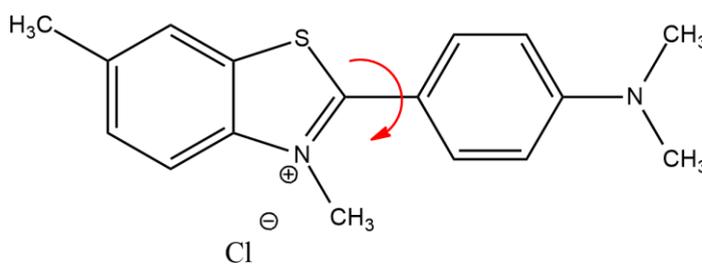


Figura 11: Estrutura da Tioflavina T.

2.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é um método eficiente na avaliação da reorganização estrutural de proteínas para a formação de fibras amiloides. Esta técnica permite visualizar as estruturas proteicas em escalas nanométricas, facilitando assim a caracterização do material agregado, além de tratar-se de um método realizado com uma maior rapidez, o que proporciona uma economia de tempo para a avaliação dos resultados (GRAS, et. al. 2011).

As imagens que são obtidas a partir do MET podem ser utilizadas tanto para análise qualitativa, quanto para geração de dados quantitativos. Pode-se analisar e verificar o comprimento, a largura das fibras e o número de protofilamentos (GRAS, et. al. 2011).

Para a obtenção de um melhor contraste e preservação da morfologia contra danos por radiação usa-se a contrastação negativa, que se trata de um método rápido de preparação das amostras para MET muito utilizado para análise de fibras amiloides em solução. Esta contrastação negativa é feita geralmente por um sal metálico, como o acetato de uranila, que forma um revestimento sobre a amostra e assim temos uma camada de material estável à radiação. O feixe de elétrons atravessa a amostra, porém é absorvido pela mancha metálica, sendo assim, a amostra irá se apresentar clara e a mancha ao redor terá uma aparência escura (GRAS, et. al. 2011).

As fibras amiloides geralmente apresentam uma distribuição desigual na grade de aplicação para o MET, ou seja, têm-se áreas com a presença de muito poucas fibras e outras com aglomerados densos. Nas áreas com grande quantidade de fibras é observado a presença de manchas bastante escuras e não é possível visualizar com muitos detalhes a morfologia fibrilar, então, para uma análise adequada deve-se utilizar uma baixa ampliação para áreas de baixa densidade fibrilar, e em seguida ir analisando essas áreas na maior amplitude que desejar, como demonstrado na Figura 12 (GRAS, et. al. 2011).

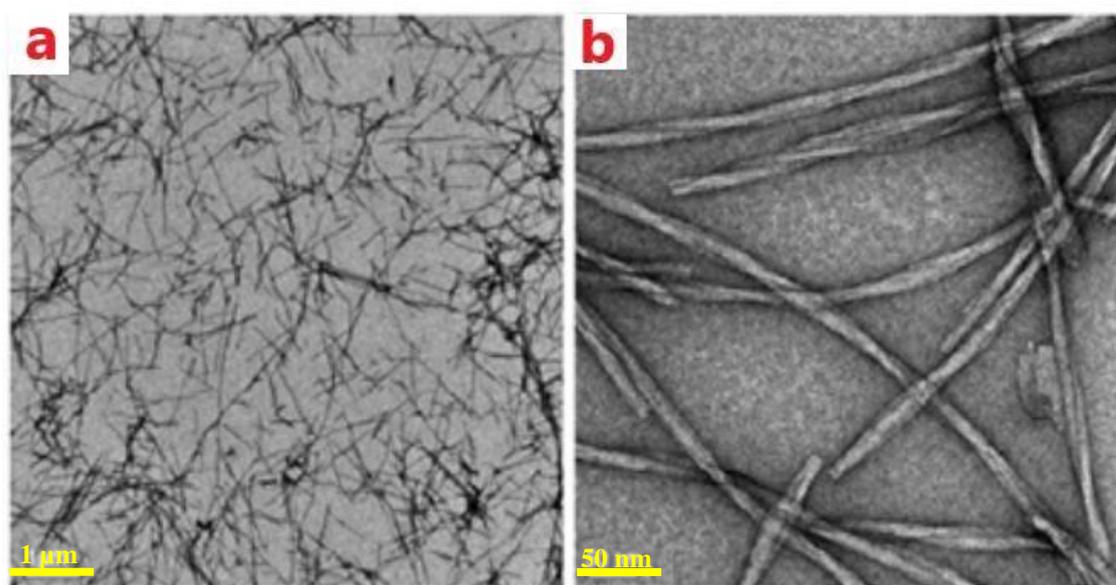


Figura 12: Comparação entre imagens de baixa ampliação (a) e alta ampliação (b) de fibras amiloides coradas através de contrastação negativa.

Fonte: Gras, et.al. 2011.

2.6. Abordagens Terapêuticas contra Agregação

O modelo de agregação utilizado neste trabalho após passar por monitoramento da formação crescente de fibras amiloides e sua caracterização, foi utilizado também com a adição de substâncias com aspectos inibitórios para analisarmos o comportamento da insulina agora exposta a mais um componente em sua formulação.

As atuais estratégias terapêuticas para a inibição da agregação amiloide estão direcionadas para a utilização de inibidores com ação antioxidante. Os antioxidantes são substâncias capazes de eliminar radicais livres, inibir ou prevenir a oxidação de outras substâncias químicas. Seu uso é bastante diversificado, podendo agir na proteção contra

oxidação lipídica dos alimentos e também proteger as células contra o estresse oxidativo (SPÍNOLA, 2011).

O estresse oxidativo provém de uma disparidade entre a formação de compostos oxidantes e a atividade do sistema de defesa antioxidante do organismo, ou seja, temos uma quantidade excessiva de espécies reativas de oxigênio para a função normal das células, gerando assim uma sobrecarga na capacidade antioxidante endógena (PORAT, et. al. 2006). A produção de radicais livres apresenta grande importância para as funções biológicas do corpo, pois sua geração em quantidades adequadas, propicia a produção de ATP (energia), através da cadeia transportadora de elétrons, porém quando produzidos em excesso podem levar a danos oxidativos. O sistema antioxidante tem a finalidade de reduzir ou inibir danos ocasionados pela atuação de radicais livres, que são nada menos do que espécies que possuem um ou mais elétrons não emparelhados que lhe conferem uma alta reatividade. Esse sistema contra oxidação pode ser dividido em enzimático ou não-enzimático (Figura 13), e no presente trabalho estamos fazendo uso do segundo caso, onde há a aplicação de uma variedade de substâncias com ação antioxidante, que pode apresentar uma fonte endógena ou ser obtido a partir de dieta (BARBOSA, et. al. 2010).

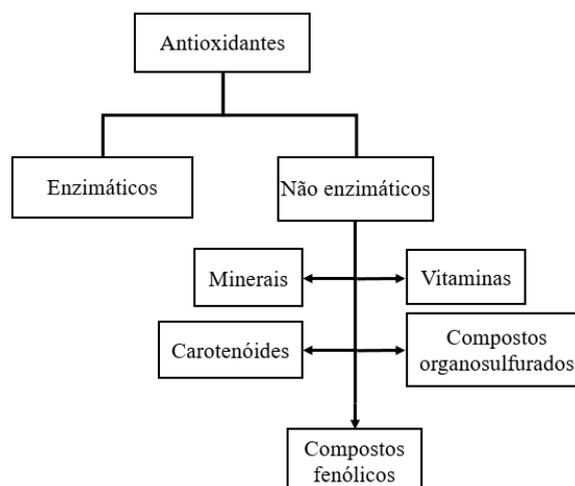


Figura 13: Classificação de antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Ratnam, et.al. 2006.

2.6.1. Inibidores Amiloides

O uso de substâncias com potencial antiamiloidogênico têm sido sugerido como uma estratégia terapêutica para a prevenção e tratamento de um grupo de doenças relacionadas a distúrbios de desdobraimento de proteínas, que são caracterizadas pelo acúmulo de proteínas que apresentam alterações anormais na sua conformação estrutural. Para serem alcançados os resultados desejados, os objetivos das recentes pesquisas estão direcionados para a redução da toxicidade dos agregados, evitando a sua formação ou tentando resgatar a sua estrutura nativa juntamente com a sua função biológica (DHOUAFI, et. al. 2018).

Atualmente são relatadas em uma variedade de trabalhos, substâncias que demonstram possuir potencial de inibição contra agregação proteica. Há por exemplo os compostos fenólicos que são um grupo diversificado de pequenas moléculas naturais e sintéticas compostas por um ou mais anéis fenólicos, são reconhecidos pelas suas características antioxidantes na prevenção

de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (DHOUAFLI, et. al. 2018). E nos últimos anos houve um aumento no interesse pelos polifenóis com relação à inibição da formação de fibras amiloides ou desestabilização de fibras pré-formadas. Os compostos fenólicos naturais são conhecidos como fitoquímicos e podem ser encontrados em chá verde, frutas vermelhas e em uma grande variedade de plantas. Há relatos de que alguns polifenóis conseguiram inibir a fase de alongamento das fibras, mas não interferiram na fase inicial de nucleação, isto demonstra que estas substâncias não reagem com a forma oligomérica da proteína, mas apenas com sua estrutura amiloidogênica, sendo assim a ligação dos polifenóis como inibidores não depende da sequência de aminoácidos, mas é dependente da estrutura conformacional (PORAT, et. al. 2006).

A quercetina é um polifenol natural membro da família flavona, têm se relatado que esta substância apresenta efeito inibitório contra a formação de amiloide do peptídeo β – amiloide ($A\beta$) que se refere à doença de Alzheimer e a α – sinucleína relacionada com a doença de Parkinson (WANG, et. al. 2011).

Em 2011, Wang e colaboradores investigaram os efeitos da quercetina como um provável inibidor amiloidogênico a partir de um modelo utilizando insulina bovina, com monitoramento por fluorescência de ThT e caracterização por MET. Foi utilizada insulina pancreática bovina dissolvida em HCl até uma concentração final de 1 mg/mL e quercetina (10 mg/mL) dissolvido em DMSO, com incubação à temperatura de 60°C. E para análise em ThT foram preparadas alíquotas da solução de insulina diluídas em tampão Tris-HCl (pH 8,0). Na Figura 14, é observado que a quercetina em diferentes concentrações obteve resultados distintos, onde o aumento da sua concentração demonstrou inibir a formação de fibras amiloides durante o período de 6 horas de incubação.

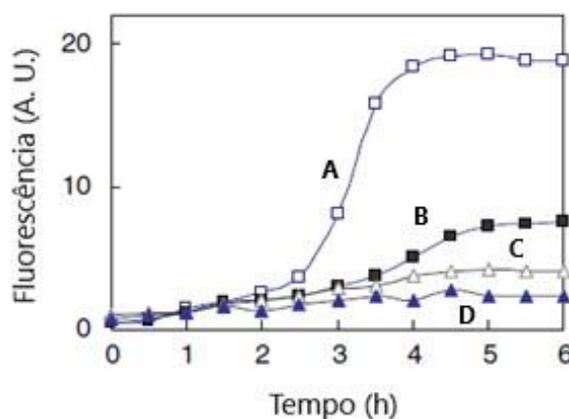


Figura 14: Gráfico de fluorescência de ThT:
(A) na ausência de quercetina;
(B) na presença de quercetina 10 µg/mL; (C) 25 µg/mL e (D) 50 µg/mL.
Fonte: Adaptado de Wang, et.al. 2011.

Os resultados inerentes ao MET ficaram de acordo com o que foi apresentado pelo teste de fluorescência, ou seja, na ausência de quercetina houve a formação de fibras amiloides longas e organizadas, já na presença do inibidor conforme o aumento da sua concentração houve melhores resultados. Então com 10 µg/mL de quercetina observa-se ainda a formação de fibras só que mais curtas, e nas concentrações de 25 e 50 µg/mL foram obtidos um material

proteico com pequenas partículas com estrutura amorfa, confirmando assim a inibição da formação de fibras amiloides nestas últimas concentrações (WANG, et. al. 2011).

O aumento de temperatura favoreceu o desdobramento da proteína fazendo com que sua região hidrofóbica ficasse exposta, ocasionando o aumento da afinidade e capacidade de formação de ligação do polifenol com a proteína, através de interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos e os aminoácidos apolares, acarretando a geração de agregados amorfos (WANG, et. al. 2011).

Outro polifenol, a curcumina vêm sendo amplamente utilizado nos estudos sobre agregação amiloide, tendo uma vasta repercussão em diversas pesquisas onde demonstrou ser uma substância que possui propriedades antiamiloidogênicas em diferentes proteínas como a β – amiloide, α – sinucleína, transtirretina, lisozima, insulina, dentre outras. Com destaque para o seu grande potencial terapêutico no tratamento da DA, inibindo a formação de agregados amiloides e desestabilizando as estruturas fibrilares ou oligoméricas (ALAM, et. al. 2017).

Rabiee e colaboradores (2013) realizaram experimentos visando a eficácia contra a fibrilação amiloide na insulina com o uso de curcumina. O modelo de agregação amiloide utilizado, foi insulina de origem bovina dissolvida a 1 mg/mL em tampão glicina 50 mM contendo EDTA 1 mM que foi dialisada contra o mesmo tampão por um período de 24 horas. A solução proteica foi incubada a uma temperatura de 37°C, por um período de 24 horas e agitada com o auxílio de barra magnética. E para a investigação do poder inibitório da curcumina frente à formação de fibras amiloides, ela foi diluída em DMSO e adicionada em diferentes concentrações. A técnica de fluorescência de ThT foi realizada a partir de 10 μ L das amostras de insulina adicionados a 590 μ L de ThT e incubados por um período de 5 minutos, e para o ensaio de Vermelho de Congo foram utilizados 10 μ L da solução de proteína, diluída em solução de VC, seguida de incubação sem agitação por também 5 minutos.

Através da análise por ThT e VC após 24 horas de incubação pode se observar que conforme há o aumento da concentração de curcumina na solução proteica temos uma maior eficácia na inibição da geração de fibras amiloides, apresentado na Figura 15 a seguir.

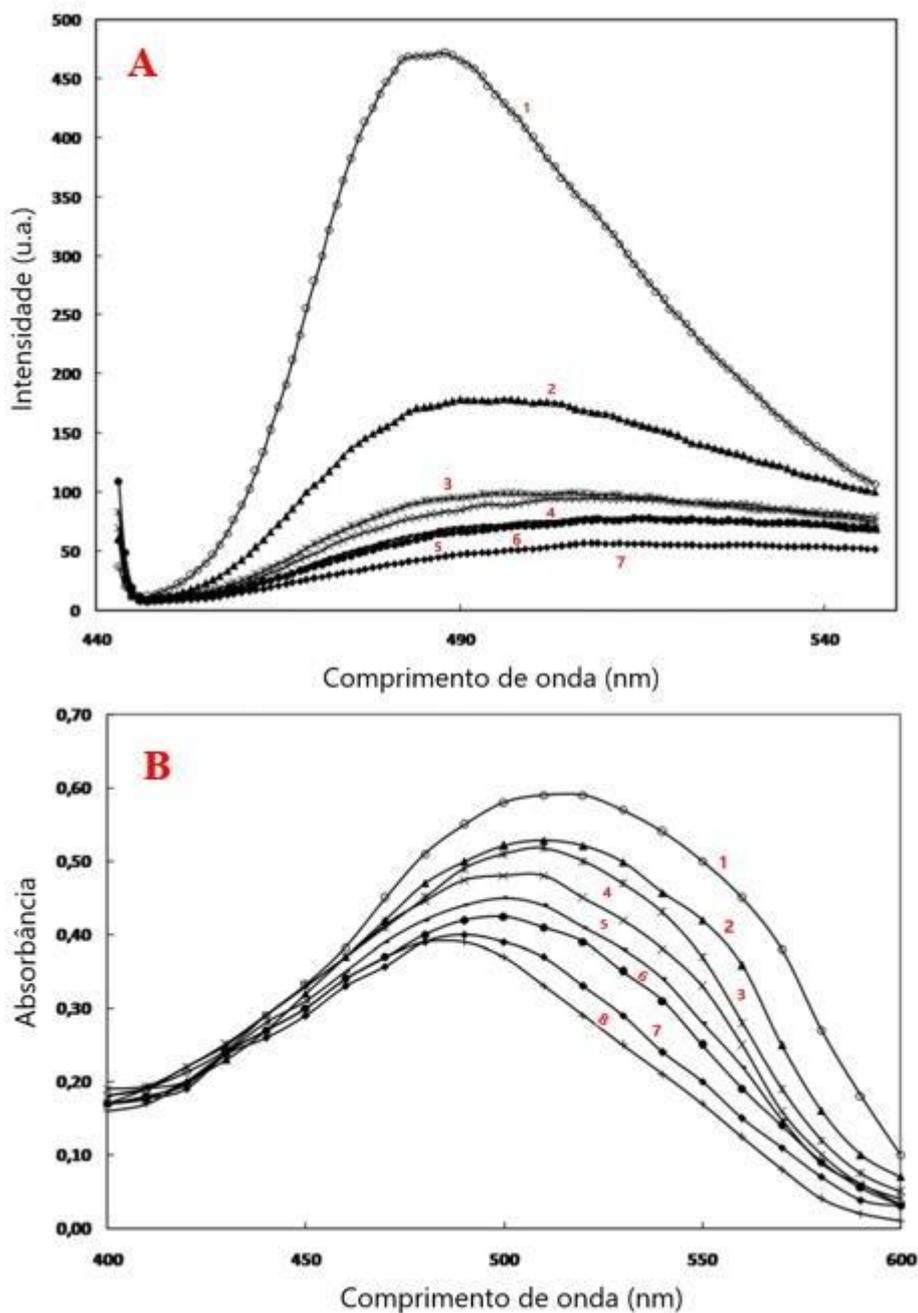


Figura 15: (A) Gráfico de fluorescência de ThT após 24 horas de incubação: (1) na ausência de curcumina; (2) na presença de curcumina 1 μM ; (3) 2 μM ; (4) 3 μM ; (5) 4 μM ; (6) 6 μM e (7) 8 μM . (B) Gráfico do ensaio de VC após 24 horas de incubação: (1) na ausência de curcumina; (2) na presença de curcumina 1 μM ; (3) 2 μM ; (4) 3 μM ; (5) 4 μM ; (6) 6 μM ; (7) 8 μM e (8) espectro do VC.
Fonte: Adaptado de Rabiee, et.al. 2013.

Quando a insulina se encontra no estado R, a curcumina apresenta uma conformação alongada na sua ligação com a proteína, assim ela consegue se estender por grande parte da cadeia B, e quando a insulina está no estado T, a curcumina acopla-se principalmente numa

conformação mais dobrada para haver interação com a região C-terminal da cadeia B (Figura 16) (RABIEE, et. al. 2013).

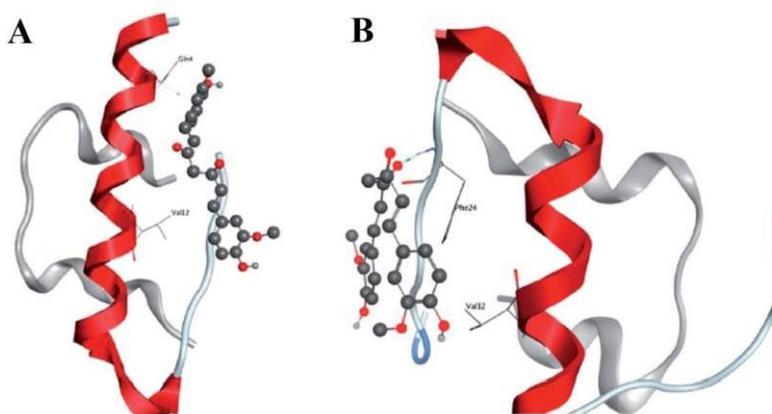


Figura 16: Diferentes interações entre a insulina e a curcumina: **(A)** na estrutura de insulina nativa no estado R; **(B)** e no estado T. **Fonte:** Rabiee, et.al. 2013.

Um problema que não pode ser descartado com relação ao uso de curcumina como inibidor amiloidogênico é a degradação durante longos períodos de incubação e temperatura elevada (RABIEE, et. al. 2013).

Em 2015, Yu e colaboradores realizaram experimentos envolvendo a agregação da proteína amilina com uso de rutina para inibição da neurocitotoxicidade que está associada com a geração de placas amiloides no cérebro. A rutina é um flavonóide que pode ser encontrado em diversas plantas e alimentos, e que possui numerosas atividades farmacológicas, como propriedades antioxidantes, efeitos anti-inflamatórios, ações citoprotetoras contra o envelhecimento e efeito anti-hiperglicemia. É uma substância que se destaca pelos seus benefícios na diminuição do estresse oxidativo e apresenta propriedade neuroprotetora contra DA, comprovados a partir de testes realizados em camundongos, onde demonstraram reduzir o nível de oligômeros A β .

Yu, et. al. (2015), prepararam a cinética de agregação da amilina a partir da dissolução da amilina em hexafluoroisopropanol, seguida de dissolução em DMSO para 2 mg/mL, diluída para 10 μ M em tampão fosfato (PBS) e finalmente incubada a uma temperatura de 37°C sem agitação. E a rutina utilizada como inibidor fibrilar foi dissolvida em DMSO e diluída em seguida com PBS. Para a determinação da formação de fibras amiloides foi realizado análise fluorimétrica com um volume de 10 μ L da amostra de amilina incubada na ausência e presença de 100 μ M e 300 μ M de rutina a 190 μ L de ThT em PBS 50 mM.

Na Figura 17 consegue-se verificar graficamente o resultado obtido da incubação na presença e ausência de rutina, que apresentou redução significativa da formação de fibras amiloides na amilina com o aumento da concentração de rutina de 100 para 300 μ M e uma elevada intensidade quando na ausência do inibidor. Além disso, foi realizado MET para análise da morfologia fibrilar, que demonstrou consistir com os resultados obtidos da fluorescência de ThT, ou seja, na ausência de rutina houve a presença de grande quantidade de fibras formadas, e já com a adição deste polifenol a 100 μ M foi obtido uma menor quantidade de fibras e após

o aumento da concentração de rutina para 300 μM não houve presença de formação de fibras amiloides.

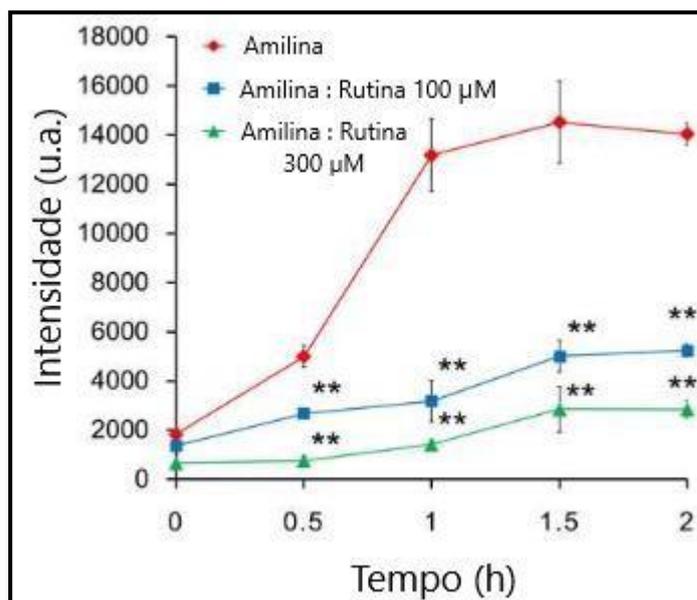


Figura 17: Gráfico de fluorescência de ThT para o efeito da agregação de amilina.
Fonte: Yu, et.al. 2015.

O mecanismo que envolve a ligação de agregados amiloides aos compostos polifenólicos pode fornecer a inibição da formação de fibras, devido à ligação da estrutura aromática do polifenol, no caso, a rutina, com a estrutura secundária hidrofóbica da folha beta, e assim pode haver uma perturbação na formação de ligações de hidrogênio do composto amiloidogênico através da ação de hidroxilas como doadores de elétrons. Então, neste trabalho Yu, et. al. 2015, concluíram que a rutina possui potencial inibidor antiamiloidogênico na amilina podendo ser aplicada no tratamento de doenças neurodegenerativas.

As vitaminas são substâncias que podemos encontrar no nosso corpo e que exercem papel fundamental nas funções fisiológicas. E diversos estudos demonstram que elas também possuem um importante papel na prevenção da agregação proteica *in vitro* e *in vivo*. Há relatos que o retinol e o α - tocoferol possuem grande eficácia antiamiloidogênica e desestabilizadora da formação de agregados amiloides, além de prevenir a morte celular neuronal que é impulsionada pelo peptídeo $\text{A}\beta$. E esta eficácia das vitaminas em relação à desestabilização amiloidogênica é atribuída à atividade antioxidante (ALAM, et. al. 2017).

Em 2019, Alam e colaboradores publicaram um estudo sobre a elucidação do retinol como potencial inibidor contra a fibrilação amiloide do $\text{A}\beta$ - 42, e para o preparo da cinética de agregação foram utilizados 100 μM de $\text{A}\beta$ - 42 em PBS 20 mM e incubados a 37°C por um período de 70 horas sob agitação constante na ausência e presença de retinol e análise realizada em intervalos de tempo determinados. As amostras foram monitoradas por uso de ThT (Figura 18) e VC em uma concentração de 30 μM em ambas as técnicas.

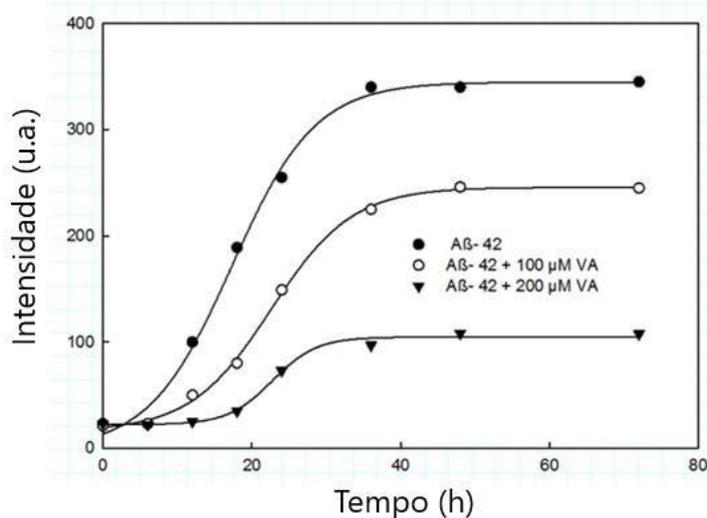


Figura 18: Cinética de agregação monitorada por fluorescência de ThT de Aβ – 42, na ausência e presença de retinol (100 e 200 μM).

Fonte: Alam, et.al. 2019.

No gráfico de fluorescência de ThT foi possível observar que as curvas tanto na ausência quanto na presença de retinol atingiram o ponto de equilíbrio no mesmo período de tempo, porém a intensidade da fluorescência final se diferenciou. Conforme o aumento da concentração de vitamina dentro da solução proteica, menor foi a intensidade apresentada, ou seja, menor foi a quantidade de fibras amiloides formadas no meio. Alam, et. al (2019) realizaram também um estudo de acoplamento molecular para obtenção de maiores informações sobre o local de ligação/interação entre o Aβ – 42 e o retinol, que foram responsáveis pela inibição da formação de fibras amiloides. Na Figura 19, verifica-se a interação entre o retinol e determinados resíduos de aminoácidos (Lisina16, Leucina17, Fenilalanina20, Alanina21, Valina24, Glicina25, Lisina28, Leucina34 e Metionina35) da Aβ – 42.

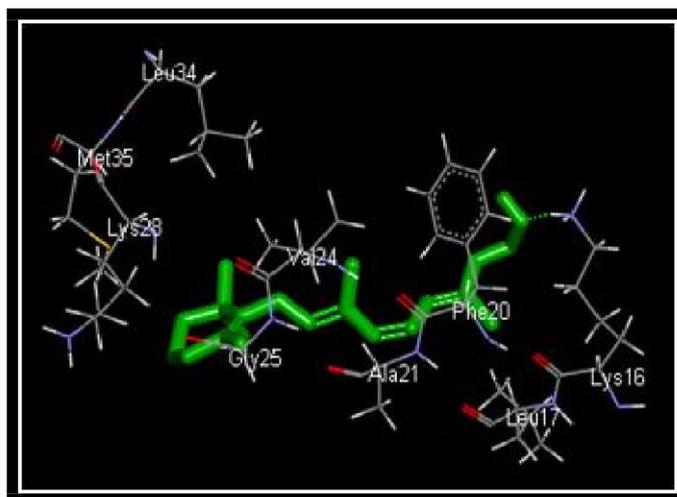


Figura 19: Acoplamento molecular do complexo Aβ – 42 + retinol.

Fonte: Alam, et.al. 2019.

A interação dos aminoácidos da região hidrofóbica central da Aβ – 42 com a retinol é responsável pela ocorrência da inibição da agregação, o acoplamento entre eles sugere que haja

a geração de um complexo através de ligação de hidrogênio e da interação hidrofóbica (ALAM, et. al. 2019).

Hasanbašić, et. al. (2018) estudaram a formação de oligômeros e de fibras amiloides a partir de um modelo de agregação de *human stefin B*, proteína recombinante onde a cisteína na posição 3 é substituída pelo trifluoroetanol (TFE), com um sistema de inibição utilizando o ácido ascórbico. A cinética de agregação foi induzida a pH ~ 5, adição de 10% de TFE à solução proteica, à temperatura ambiente. Foi realizada análise por fluorescência com a ThT dissolvida em tampão fosfato a 15 μ M, com 50 μ L da solução proteica adicionada a 570 μ L de ThT para medição.

Na Figura 20, observa-se o resultado obtido para ácido ascórbico na fluorescência por ThT, onde as concentrações de 2,5 e 4 μ M apresentaram um encurtamento da fase inicial de nucleação, porém apresentaram uma baixa intensidade de fluorescência. Isso pode ser explicado através do efeito de extinção da ThT, onde pode ocorrer a interferência das substâncias inibidoras na intensidade da fluorescência, então deve-se ter muita cautela no momento da interpretação dos resultados por este método (HASANBAŠIĆ, et. al 2018).

O efeito de extinção da ThT implica em interações diretas do fluoróforo com o composto exógeno, no caso, os inibidores de agregação, e/ou podem apresentar competição entre a ligação da ThT com as fibras (HUDSON, et. al. 2009). Sendo assim, os autores confirmaram que a redução da fluorescência não estava de acordo com as microscopias obtidas, pois através do MET foi possível verificar que havia uma quantidade maior de fibras maduras nestas concentrações de ácido ascórbico, ou seja, neste caso a menor intensidade da fluorescência não significou menor quantidade de fibras (HASANBAŠIĆ, et. al 2018).

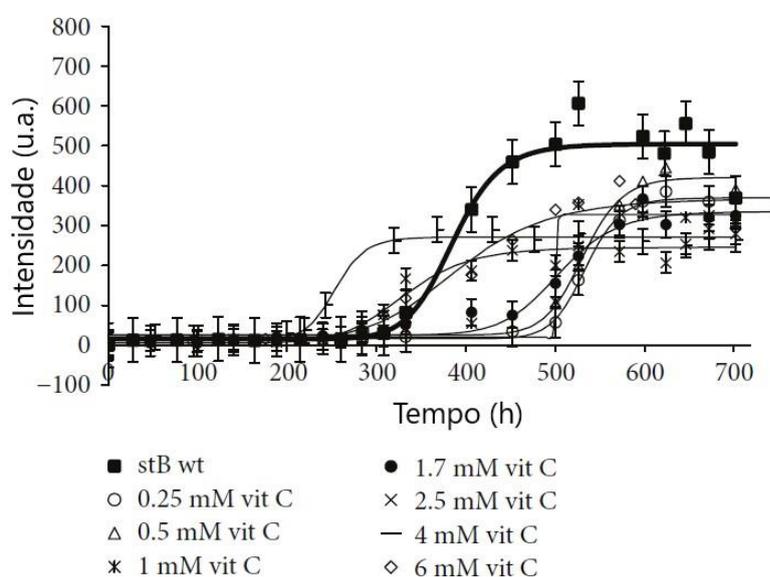


Figura 20: Cinética de agregação de *human stefin B* monitorada por ThT na ausência e presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico.
Fonte: Hasanbašić, et.al. 2018.

Hudson, et. al (2009) realizaram testes para análise das características da interação da ThT com a emissão de fluorescência de alguns polifenóis através da absorção em UV-visível (350 – 650 nm), utilizando soluções de curcumina, quercetina e resveratrol numa concentração de 100 μ M, além de uma solução proteica de RCMk-CN (k-caseína bovina carboximetilada)+

ThT incubada anteriormente por um período de 20 horas para formação de fibras. O comprimento de onda de excitação para o ensaio de fluorescência de ThT é de 440 nm e como observado na Figura 21, a quercetina e a curcumina apresentaram máximo de absorção em 374 e 426 nm, respectivamente, ou seja, a presença de ambas as substâncias pode causar efeito de extinção da fluorescência da ThT, isto é, estes polifenóis poderão absorver a luz requerida na excitação da ThT e a radiação de fluorescência da ThT emitida. Em contrapartida, o resveratrol não mostrou absorver acima de 350 nm, desse modo ele não irá influenciar na fluorescência da ThT.

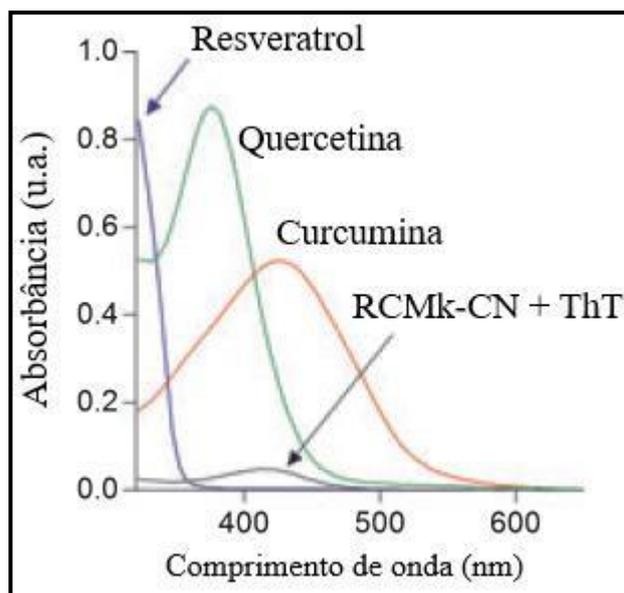


Figura 21: Gráfico dos espectros de absorção de UV-visível para caracterização da interação de compostos exógenos com a ThT.

Fonte: Hudson, et.al. 2009.

Estudos sobre a inibição da formação de agregados amiloides em proteínas não relacionadas diretamente a doenças podem fornecer informações mais gerais sobre os processos de agregação. E como observado em diversas referências, as pesquisas relacionadas ao combate da agregação proteica estão voltadas diretamente às doenças que são provenientes desse tipo de anormalidade das proteínas. Então no presente trabalho a intenção é de avaliar a formação de agregados amiloides em um importante biofármaco comercializado, para investigação da sua estabilidade a partir de um modelo de agregação que foi inicialmente desenvolvido nesta pesquisa para, por conseguinte ser feito o uso de determinadas substâncias que já foram citadas e utilizadas na literatura como potenciais antiamiloidogênicos, para aumentar a estabilidade da formulação de insulina comercial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver um modelo de agregação para insulina regular comercial, sob condições brandas, simulando situações mais próximas à realidade na qual o medicamento pode estar sujeito. E a partir deste modelo, realizar testes de inibição/retardo do efeito de agregação na formulação usando-se diferentes substâncias com ações caracterizadas como potenciais antiamiloidogênicas, para a melhora da estabilidade deste biofármaco.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar as condições ideais de temperatura, agitação e o tempo que viabilizam a modificação estrutural da proteína na formulação comercial;
- Com o auxílio de diferentes métodos (espectroscópicos, colorimétricos e análise morfológica), identificar e caracterizar a formação dos agregados amiloides no medicamento;
- Testar diferentes substâncias como excipientes na formulação de insulina com a finalidade de inibir ou retardar a cinética de agregação;
- Estabelecer quais inibidores apresentam resultados satisfatórios e determinar as concentrações ideais para a ação destes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Equipamentos

FORMULAÇÕES COMERCIAIS:

Tabela 5: Insulinas Humulin® e Novolin® utilizadas nos testes para agregação e inibição amiloide.

Nome	Fabricante	Lote	Validade	Uso
Humulin®	Eli Lilly	C809222	01/2020	30/10/2018
		C883731	02/2020	27/11/2018; 15/01/2019; 01/04/2019; 16/10/2019
		D032707	06/2020	08/10/2019
		D116737		08/10/2019; 16/10/2019
Novolin®	Novo Nordisk	HS66C02	09/2020	05/02/2019
		HS64X78	04/2020	12/02/2019
		HS66W90	10/2020	29/05/2019; 28/06/2019
		HS66Y75	01/2021	22/07/2019
		HS67F02	02/2021	02/09/2019

INIBIDORES:

- Curcumina: Fabricante Sigma-Aldrich, código – V001939-10G, lote – DCB05305V;
- Quercetina e Rutina: polifenóis obtidos no laboratório Roderick R. Barnes, IPPN – UFRJ;
- Vitaminas: retinol (Fabricante Galena Química e Farmacêutica, lote – 1801022702), ácido ascórbico (Fabricante Sigma-Aldrich, lote – 98F0244) e α – tocoferol (Fabricante Galena Química e Farmacêutica, lote – 201201708101) obtidos na farmácia universitária do CCS – UFRJ.

REAGENTES UTILIZADOS:

- Água destilada e Milli-q;

- Cloreto de Sódio (NaCl): Fabricante VETEC (código de catálogo 003132-08), lote – 0905810;
- Dimetilsulfóxido (DMSO): Fabricante VETEC (código de catálogo 347), lote – 1007431;
- Fosfato de Potássio Monobásico P.A. (KH₂PO₄): Fabricante VETEC (código de catálogo 225), lote – 0801795;
- Tampão Fosfato-salino (pastilha): Fabricante Sigma (código de catálogo 101734447), lote – # SLBP8218V;
- Tioflavina T: Fabricante Sigma, lote – T3516-25G;
- Corante Vermelho de Congo.

DESCARTÁVEIS:

- Eppendorfs (0,2 mL e 1,5 mL);
- Falcons (15 mL e 50 mL);
- Grades de microscopia eletrônica: Fabricante Electron Microscopy Sciences, modelo CF300-Cu;
- Membrana de 0,1 µm e 0,22 µm: Fabricante Millex;
- Seringas com agulha.

EQUIPAMENTOS UTILIZADOS:

- Balança analítica: Fabricante Shimadzu, modelo AY220;
- Centrífuga: Fabricante Eppendorf, modelo 5452 Minispin;
- Cuba de ultrassom: Fabricante Thornton, modelo T14;
- Espectrofotômetro: Fabricante Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis;
- Estufa: Fabricante Splabor, modelo SP – 200;
- Fluorímetro: Fabricante Jasco, modelo FP - 6300;
- Homogeneizador de Soluções: Fabricante Phoenix Lufesco, modelo AP22;
- Incubadora shaker: Fabricante New Brunswick Scientific, modelo Excella E24;
- Microscópio Eletrônico de Transmissão: Fabricante JEOL, modelo 1200 EX;
- Phmetro: Fabricante Hanna Instruments, modelo HI 2221;
- Pipetas Automáticas (2 µL, 20 µL, 200 µL e 1000 µL).

4.2. Metodologia

4.2.1. Padronização da Cinética de Agregação Amiloide

O projeto foi iniciado a partir da determinação de um modelo adequado e simples para formação de agregados amiloides em insulina regular de origem comercial. O primeiro passo foi testar as melhores condições para a ocorrência da agregação, então foram realizados testes apenas com variações de temperatura em estufa, onde a temperatura foi elevada de 37 °C até 60 °C. Porém, foi verificado que apenas alterar a temperatura não ocasionava a formação dos agregados. O próximo passo foi padronizar as condições térmicas para 25 e 37 °C, e a adição de mais uma condição, a agitação. Foi utilizado tanto recipiente de plástico como de vidro nas análises. E posteriormente, foram adicionadas substâncias com potencial estabilizante para testes de inibição dos agregados amiloides.

4.2.1.1. Cinética de Agregação Amiloide

Foram preparadas amostras em triplicata de insulina regular comercial com e sem inibidores. As amostras foram submetidas a mudança de temperatura (25 °C e 37 °C) e agitação (175 rpm – 195 rpm) por um período de 48h a 72 h. O monitoramento da formação de fibras foi realizado a partir das técnicas de Vermelho de Congo e fluorescência por Tioflavina T, no período de 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 e 72h. Além de cinéticas também realizadas de 2 em 2 horas (0h – 24 h), e também obtenção dos pontos de 48 e 72 horas de cinética para averiguar qual era o exato ponto no tempo onde a formação de agregados se iniciava. A Figura 22 representa o esquema do passo a passo da cinética de agregação amiloide da formulação de insulina regular.

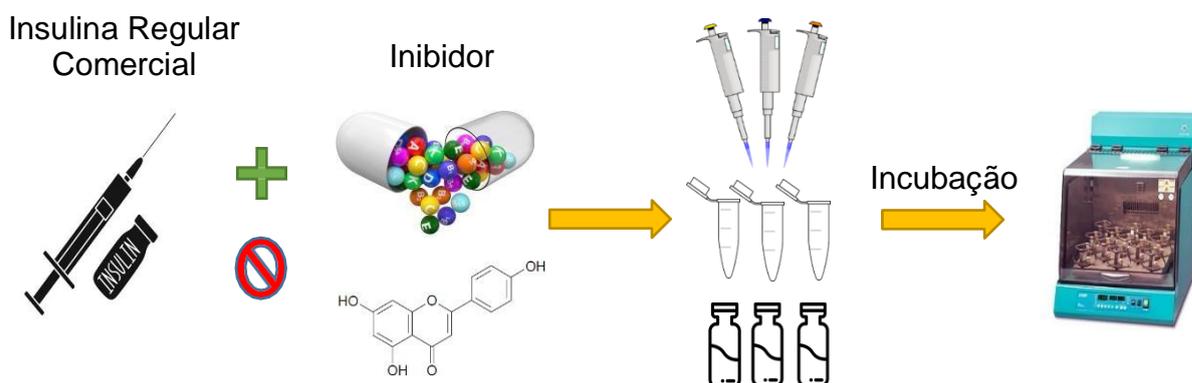


Figura 22: Modelo esquemático da metodologia utilizada no monitoramento da cinética de agregação de insulina regular comercial.

Como inibidores utilizamos 3 polifenóis (Figura 23) e 3 vitaminas (Figura 24), que estão listados na Tabela 6 com suas respectivas concentrações:

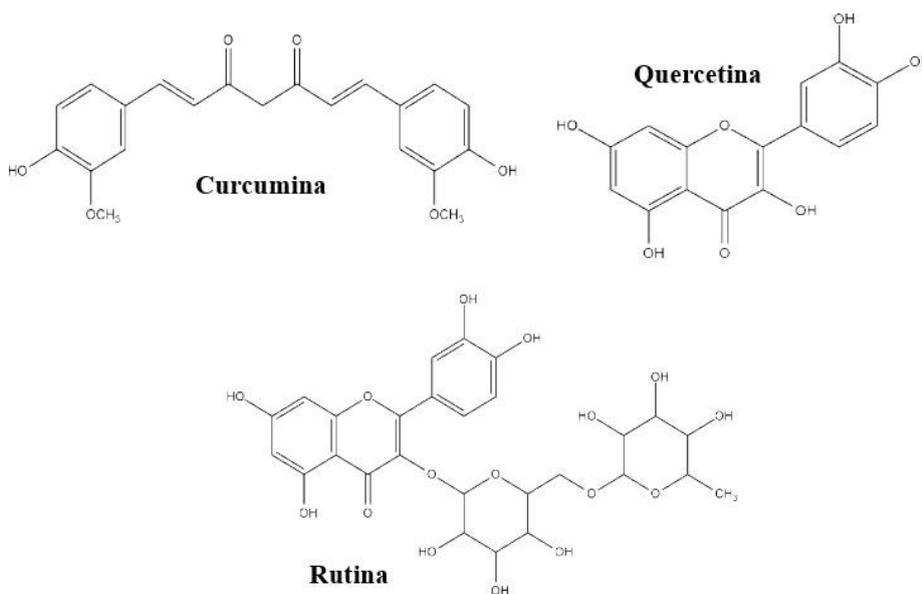


Figura 23: Polifenóis utilizados como excipientes para inibição da formação de agregados amiloides em formulação de insulina.

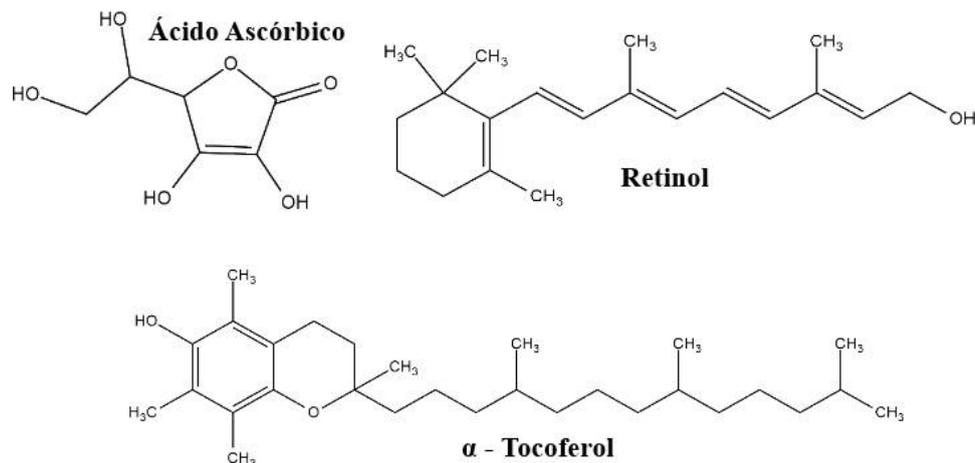


Figura 24: Vitaminas utilizadas como excipientes para inibição da formação de agregados amiloides em formulação de insulina.

Tabela 6: Inibidores de agregação amiloide e as respectivas concentrações utilizadas nos ensaios.

Inibidores	
Polifenóis	Concentrações
Curcumina	0,03 e 0,3 %
Quercetina	0,3 %
Rutina	0,3 %
Vitaminas	Concentrações
Ácido Ascórbico	1 e 10 %
Retinol	0,03 e 1 %
α - Tocoferol	0,03, 1 e 10 %

4.2.2. Análise de Fibras Amiloides por Espectrofotometria – Vermelho de Congo (VC)

O corante Vermelho de Congo (VC) foi dissolvido no tampão CRBB de pH 7,4 constituído de 5mM fosfato de potássio e 150 mM de cloreto de sódio (NaCl), em seguida a solução estoque foi colocada em um banho de ultrassom por 15 minutos e depois filtrado com o auxílio de uma membrana 0,22 µm. A concentração da solução estoque de VC foi determinada a partir de uma alíquota diluída 50x em tampão, seguida da leitura da absorbância no espectrofotômetro a 488 nm. A absorvidade molar (ϵ) usada para o cálculo da concentração foi de 59.500 L mol⁻¹ cm⁻¹, usando-se a seguinte fórmula (MONTERO-LOMELÍ E RUMJANEK, 2013):

$$[VC] = DO_{488} \times 50 / \epsilon$$

As medidas foram realizadas nos comprimentos de onda de 477 e 540 nm. E para calcular a quantidade de VC que se liga a cada mol de proteína temos:

Mol de VC ligado/Mol de proteína =

$$DO_{540} / 25.295 - DO_{477} / 46.306$$

O Vermelho de Congo adere ao vidro, ou seja, deve-se lavar a cubeta de quartzo do espectrofotômetro com água, etanol 70% e tampão CRBB. Para as leituras espectrofotométricas foram utilizadas concentrações de 20 e 50 μ M de Vermelho de Congo.

4.2.3. Análise de Fibras Amiloides por Espectrofluorimetria – Tioflavina t (ThT)

A solução estoque de tioflavina T foi preparada com concentração de 2 mM em 20 mL de água deionizada, em seguida foi particionada com um volume de 500 μ L e armazenada no congelador.

Para análise de fluorescência das amostras de insulina, preparamos o branco com a adição de 50 μ L da amostra a 495 μ L de tampão PBS 1x a pH 7,4 e 5 μ L de ThT, e as triplicatas foram preparadas com a adição de 50 μ L da amostra a 445 μ L de PBS 1x e 5 μ L de ThT.

As medidas de emissão fluorescente foram realizadas no fluorímetro Jasco FP – 6300, selecionando-se um comprimento de onda de excitação de 450 nm, com leitura de emissão em 480 nm.

4.2.4. Análise da Cinética de Agregação

As curvas de agregação geradas pelas técnicas de ThT e VC foram ajustadas com a função sigmoideal usando regressão não linear no programa SigmaPlot 12.0, usando a seguinte equação (SINÉZIA E LIMA, 2019):

$$F_{obs} = F_i + F_f / \{1 + \exp [-t_{obs} - t_{1/2} / \tau]\}$$

F é a intensidade (F_i e F_f , inicial e final, respectivamente), $t_{1/2}$ é o tempo de transição de metade da proteína nativa para formação de agregados e τ é a fase de crescimento/alongamento das fibras. E a fase lag onde há presença de monômeros e oligômeros solúveis pode ser calculada da seguinte maneira: $t_{1/2} - 2\tau$.

Foi realizado o teste t de student para análise estatística das técnicas de ThT e VC entre as amostras de controle e cada amostra contendo as substâncias usadas como estabilizantes na formulação de insulina comercial, na fase lag e $t_{1/2}$, fase onde não há a presença de agregados e o tempo em que metade da quantidade de proteína em solução sofreu agregação, respectivamente.

4.2.5. Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para esta técnica as amostras foram preparadas da seguinte forma: 5 μ L de cada amostra foram colocadas em grades cobertas por um filme de formvar, transcorrido 1 minuto o excesso

de líquido foi retirado usando papel absorvente. Em seguida foi adicionado 5 μ L de acetato de uranila 5% utilizado como contrastante e se aguardou um tempo de contato de 30 segundos, e novamente retirou-se o excesso.

A caracterização morfológica foi realizada no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO – UFRJ). Para a obtenção das imagens foi utilizado o microscópio JEOL 1200 EX. As amostras foram preparadas sobre um filme de carbono em grades próprias para a visualização no equipamento microscópico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. O Motivo da Escolha da Insulina como Proteína para o Estudo de Agregação Amiloide em Formulação Farmacêutica

Como medicamento biológico mais utilizado no mundo tem-se a insulina, e que é imprescindível no tratamento do Diabetes Mellitus (DM), e por esta razão é de imensa importância garantir a estabilidade e a eficácia deste produto. Neste trabalho, nossa preocupação está direcionada ao estudo de fibras amiloides, visto que a agregação amiloide reduz a eficácia do medicamento, então o entendimento sobre a cinética de agregação é o ponto inicial para evitar a formação dos agregados amiloides, desenvolvendo assim um produto com melhor qualidade.

O diferencial do nosso trabalho em relação aos estudos já mencionados na literatura está no fato de que a nossa pesquisa foi realizada utilizando-se a insulina comercial comprada diretamente em farmácias, ou seja, realizamos o processo de agregação diretamente na formulação do medicamento, e expomos a condições brandas e simples para agregação proteica. Já após revisão bibliográfica pudemos notar que não há um trabalho relacionado a agregação amiloide em que os testes tenham sido realizados diretamente numa formulação medicamentosa, mas utilizando a proteína insulina em condições bem drásticas para formação dos agregados.

5.2. Modelo de Agregação Proteica Proposto

Inicialmente foram realizadas diversas análises modificando as condições em que as amostras foram expostas. Primeiro as amostras de insulina foram submetidas apenas a mudança de temperatura em estufa, onde variamos de 37 a 60 °C, porém foi observado que apenas a mudança neste parâmetro não era o suficiente para gerar a formação de agregados amiloides. Sendo assim, padronizamos então a temperatura para 25 e 37 °C, e foi acrescentado outro parâmetro, a agitação dos frascos em um homogeneizador de soluções vertical e em um shaker horizontal.

Através da técnica de fluorescência de ThT foi possível observar que o modelo realizado a 37°C e agitação horizontal (Figura 25) mostrou o início da agregação amiloide em 8 horas de cinética. A curva de 72 horas apresentou uma menor intensidade se comparado aos pontos de 24 e 46 h, isso devido provavelmente à dificuldade apresentada pela maior quantidade de fibras em passar pela abertura da ponteira.

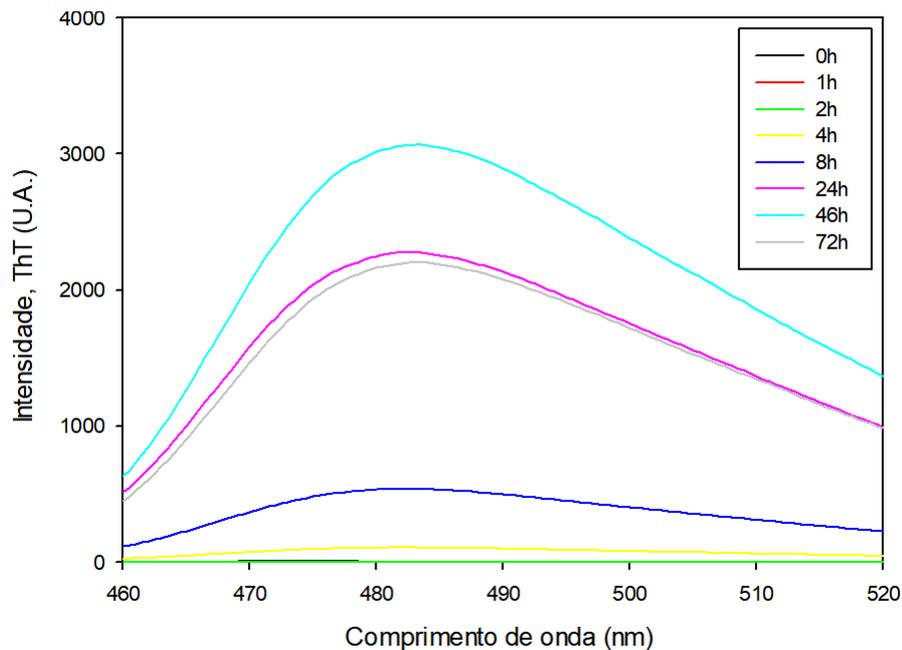


Figura 25: Ensaio de fluorescência de ThT à temperatura de 37 °C com agitação horizontal.

Outro modelo de cinética de agregação foi realizado a partir de uma temperatura de 25°C com agitação vertical (Figura 26). O início da agregação neste modelo ocorreu após 72 horas de cinética, porém apenas após 8 dias foi observado um sinal com um valor de intensidade mais significativa. Esta cinética foi estendida por mais um dia (9 dias) para a análise da intensidade do sinal de fluorescência para comparação com a cinética do modelo anterior com agitação horizontal.

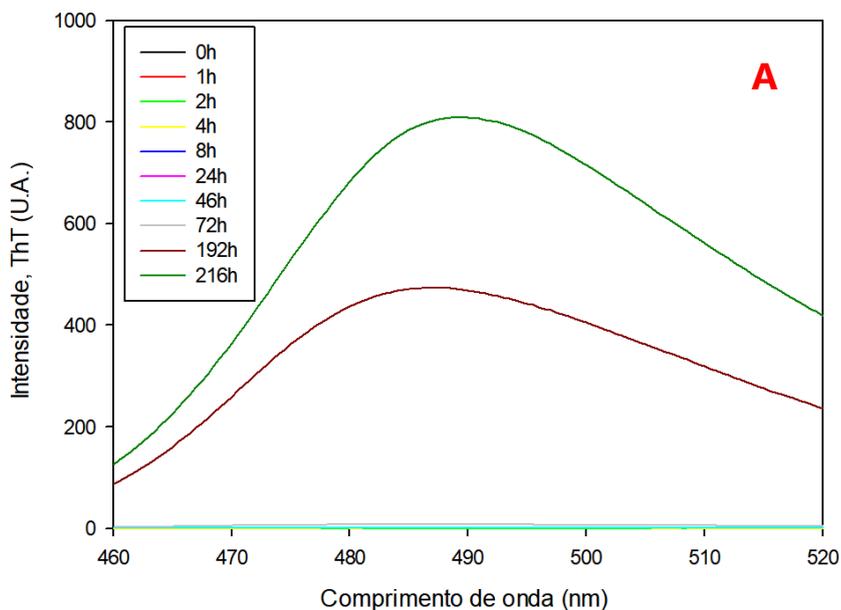


Figura 26: Ensaio de fluorescência de ThT à temperatura de 25 °C (A) com agitação vertical (B) e ampliação para análise do ponto inicial de agregação (continua).

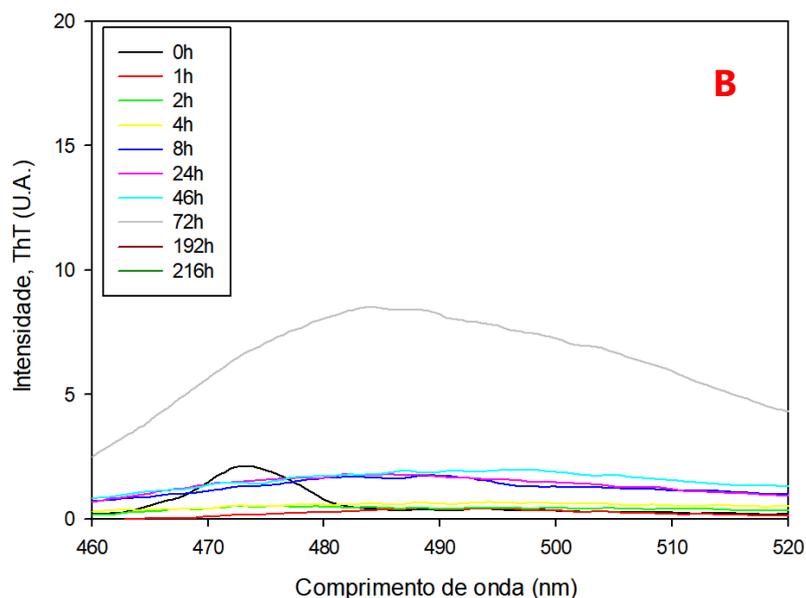


Figura 26. Continuação.

A diferença do tipo de agitação também foi um ponto significativo, onde nota-se que a amostra quando agitada horizontalmente favorece a geração de uma interface líquido-ar o que ocasiona o desdobramento da estrutura das proteínas para que possa haver um aumento da área de contato dos resíduos hidrofóbicos ao ar. Ao contrário da agitação vertical, em que a amostra ocupa todo o interior do frasco (LOUGHEED, et. al. 1983).

Isto pode explicar a diferença entre os resultados em que a cinética onde as amostras foram colocadas em agitação vertical, foram observados um sinal de intensidade de fluorescência de ThT significativa somente após 1 semana. Já as amostras submetidas a agitação horizontal o início da agregação foi logo após 4 h de cinética.

Após testes com estes dois tipos diferentes de agitação foi verificado que o mesmo também influenciava na formação de agregados, ou seja, a combinação correta do tipo de agitação e o aumento de temperatura favorecem a formação de agregados amiloides.

Então o modelo de agregação proposto para insulina regular comercial foi por fim padronizado com agitação horizontal (175 rpm) a uma temperatura de 37°C, e sob essas condições foi obtido uma coerência entre os resultados do VC e o de ThT. Através da técnica de VC (Figura 27) observa-se que já nas primeiras horas há o início da formação de fibras amiloides, devido ao aumento da intensidade com o decorrer do tempo.

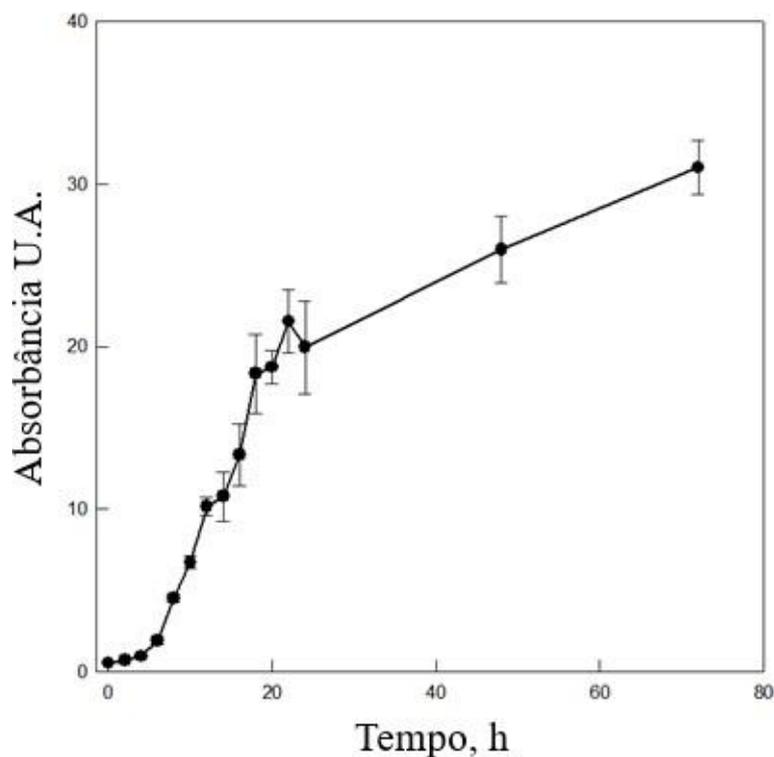


Figura 27: Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial à 37 °C e 175 rpm monitorado por espectrofotometria de VC.

Pela técnica de fluorescência de ThT (Figura 28B) é observado uma fase lag curta, com agregação iniciada em 4 horas de cinética, seguida de uma longa fase de crescimento e amadurecimento das fibras até chegar ao seu equilíbrio entre 48 e 72 horas de cinética. E a partir de um gráfico de intensidade x tempo (Figura 28A), verifica-se o aumento gradativo da intensidade no decorrer do tempo de cinética, mostrando a elevada concentração de fibras amiloides no meio.

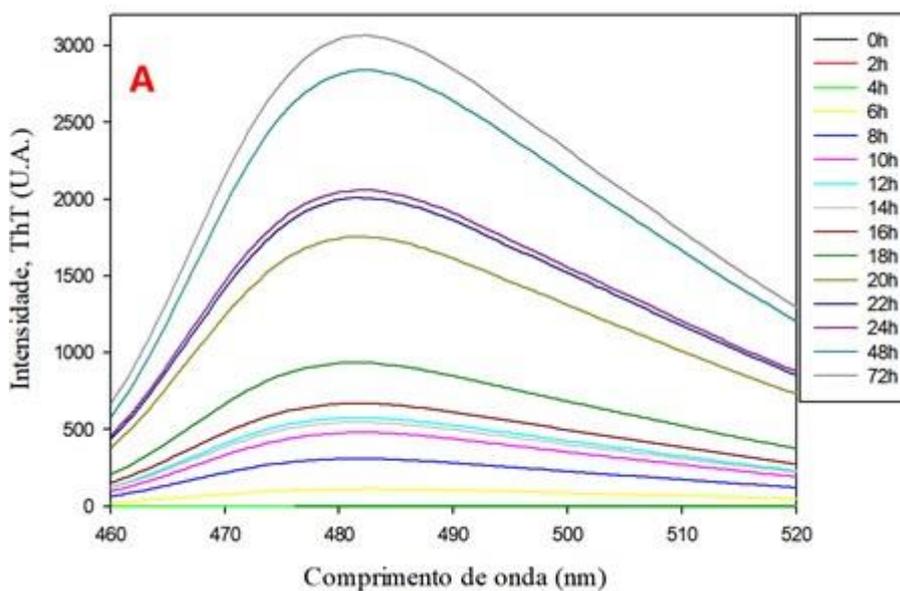


Figura 28: Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial à 37°C e 175 rpm monitorado por fluorescência de ThT: (A) Gráfico de Intensidade x Comprimento de onda (nm) e (B) Intensidade x Tempo (h) (continua).

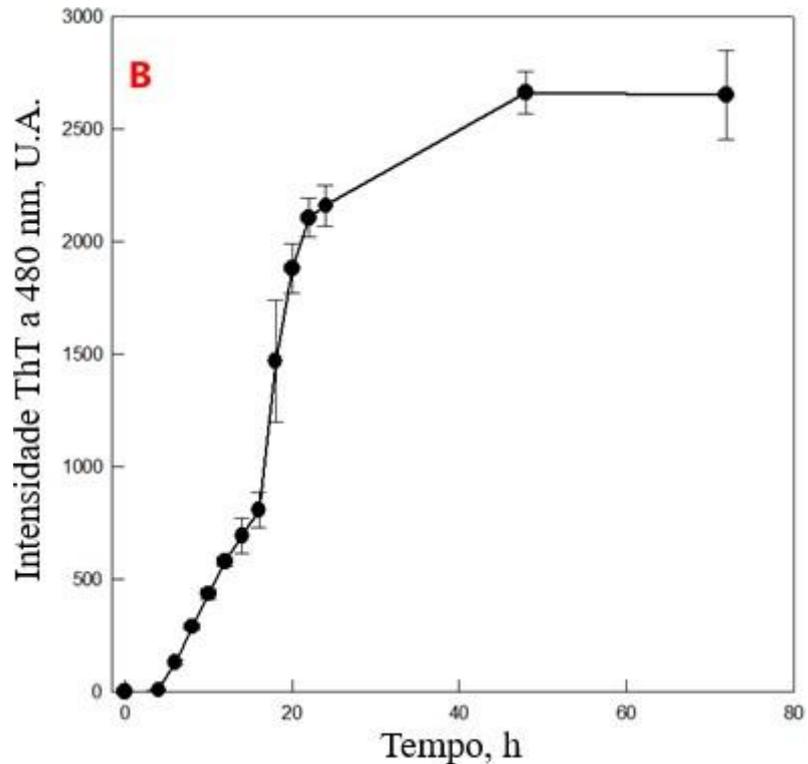


Figura 28. Continuação.

A mudança na morfologia da formulação de insulina regular pode ser observada na Figura 29 através do MET realizada, onde nota-se que inicialmente em 0 horas, com a insulina retirada diretamente da geladeira há a presença apenas de estrutura amorfa, livre da presença de agregados. Porém, após 4 horas de cinética a formulação de insulina começa a sofrer leves modificações estruturais, ou seja, verifica-se a transição entre a forma nativa e a forma fibrilar, já a partir de 8 horas é observado a formação das fibras amiloides misturadas ainda a partes amorfas presentes, e por fim temos a completa transformação da estrutura nativa da insulina em uma forma completamente fibrilar.

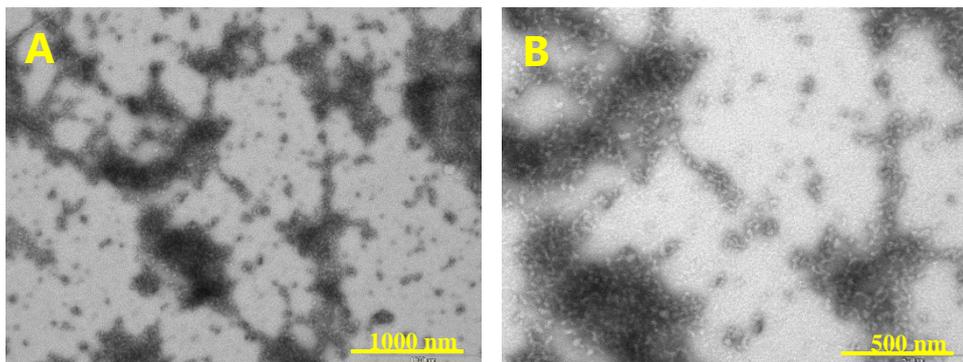


Figura 29: Imagens de MET da cinética de agregação da formulação de insulina regular (aumento de 25.000 e 50.000 cada): (A) e (B) insulina 0 h; (C) e (D) 4 h; (E) e (F) 8 h; (G) e (H) 24 h (continua).

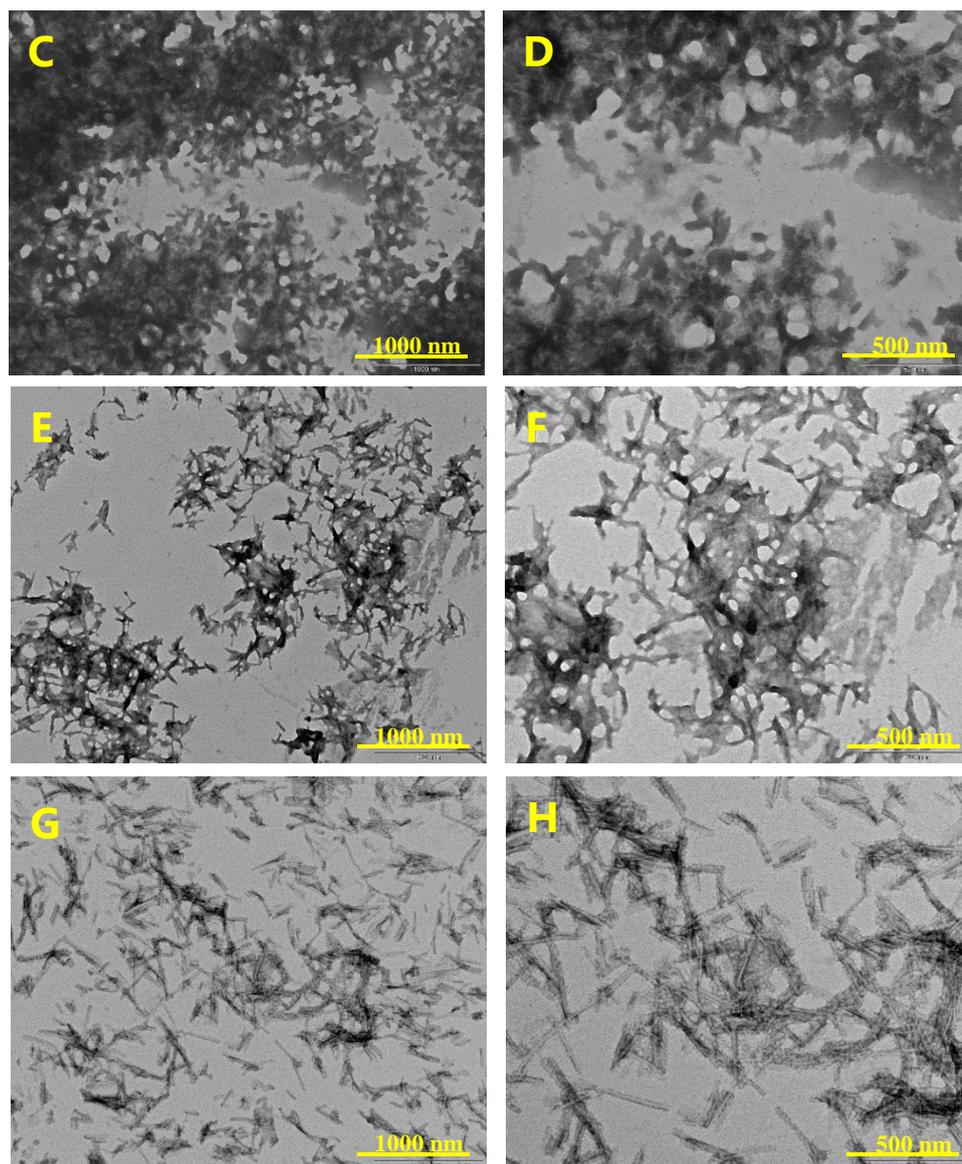


Figura 29. Continuação.

Este modelo de agregação proteica foi desenvolvido com a finalidade de mimetizar o transporte e armazenamento em condições não refrigeradas da formulação de insulina. E a partir dos resultados analisados pode-se verificar que este biofármaco sofre instabilidades. A formulação foi exposta a condições do cotidiano, em que não houve nenhuma alteração na composição da formulação, ou seja, o medicamento foi adquirido diretamente de farmácias, e submetido a agitação que pode ocorrer no momento do transporte deste medicamento e o uso de uma temperatura de 37 °C, que é compatível com as médias nacionais. Este modelo demonstrou ser reprodutível e simples, podendo ser utilizado para o estudo de substâncias inibidoras de agregação, mas também no controle de qualidade de biofármacos.

5.3. Mecanismo de Inibição de Agregados Amiloides

O mecanismo de inibição de agregados amiloides pode suceder de diferentes modos (Figura 30). Os polifenóis contribuem significativamente para o efeito antiamiloidogênico como inibidores a partir do seu caráter hidrofóbico e/ou aromático. Determinados polifenóis possuem um efeito terapêutico atribuído à presença de anéis aromáticos, que originam a

diminuição da formação de fibras. O efeito destes resíduos aromáticos é conferido pelas interações hidrofóbicas com os aminoácidos aromáticos na estrutura proteica amiloide, interrompendo assim o processo de automontagem (PORZOOOR, et. al. 2015). Tem-se também a interação $\pi - \pi$, em que os anéis aromáticos dos compostos fenólicos interagem com os resíduos aromáticos da proteína associando-se através de empilhamento (KOTORMÁN, et. al. 2017).

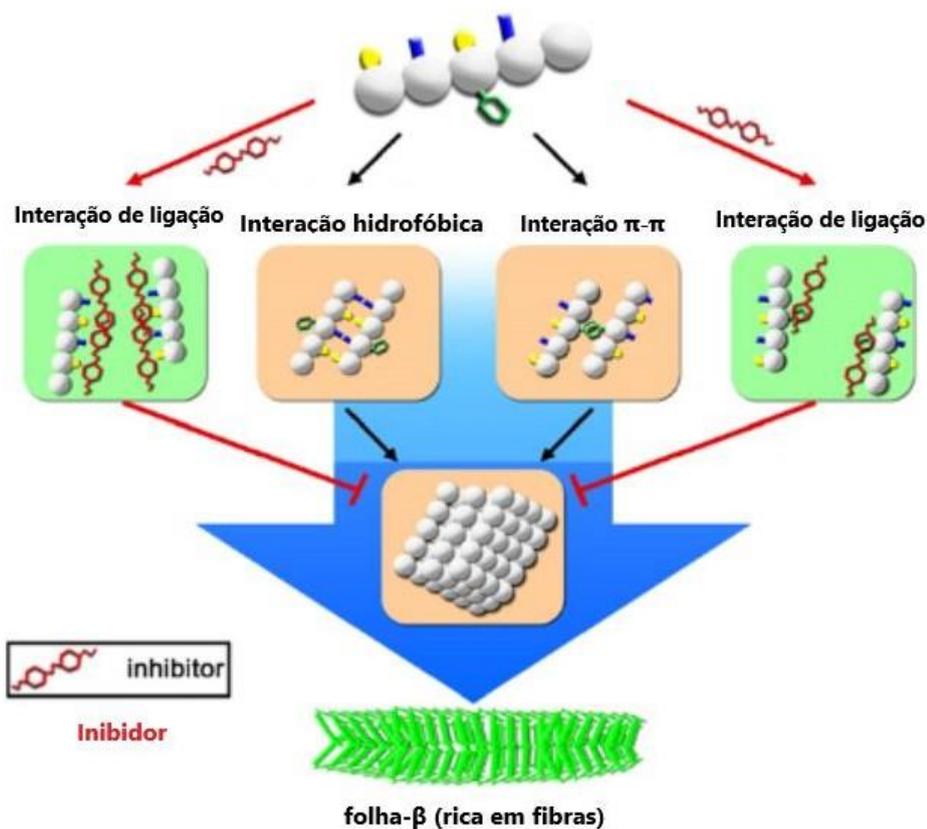


Figura 30: Possíveis interações entre proteínas mal dobradas e moléculas de inibidores.
Fonte: Cheng, et.al. 2013.

Os inibidores quando penetram no “sulco” das fibras amiloides podem estabelecer interações aromáticas e ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos localizados nessa região molecular, induzindo assim a desagregação/desestabilização da estrutura fibrilar pré-formada. Os anéis aromáticos dos inibidores interrompem a organização da fibra devido à atração e repulsão entre o inibidor e os resíduos de aminoácidos da proteína. Isto gera o alargamento deste sulco fazendo com que a estrutura fibrilar comece a se desestruturar e quebrar. A planaridade da estrutura do inibidor também é outro aspecto importante, pois é este efeito que pode aumentar o contato superficial da molécula inibidora com os resíduos proteicos, e as estruturas de ressonância destas moléculas fornecem uma planaridade suficiente para uma melhor penetração no espaço entre as fibras (LAKEY-BEITIA, et. al. 2014).

Estes possíveis mecanismos de interação entre proteínas mal dobradas e substâncias inibidoras encontram-se muito relacionados ao uso dos polifenóis, porém acreditamos que possa ocorrer também com diferentes grupos de substâncias que possuam características estruturais semelhantes.

5.4. Formulação de Insulina Regular com Adição de Polifenóis como Antiamiloidogênicos

Inicialmente foram realizadas cinéticas em um período de 48 h e também o uso de uma concentração de 0,03 % de inibidor. A cinética foi então padronizada para um período de 72 h com uma concentração de 0,3 % dos inibidores polifenólicos e leituras pontuais mais regulares (2 em 2 horas). Na Figura 31, verifica-se que o resultado pelo método de VC mostrou que o uso de substâncias polifenólicas para a estabilização da formulação de insulina não foram eficientes, pois as intensidades dos sinais foram superiores ou iguais ao do controle de insulina.

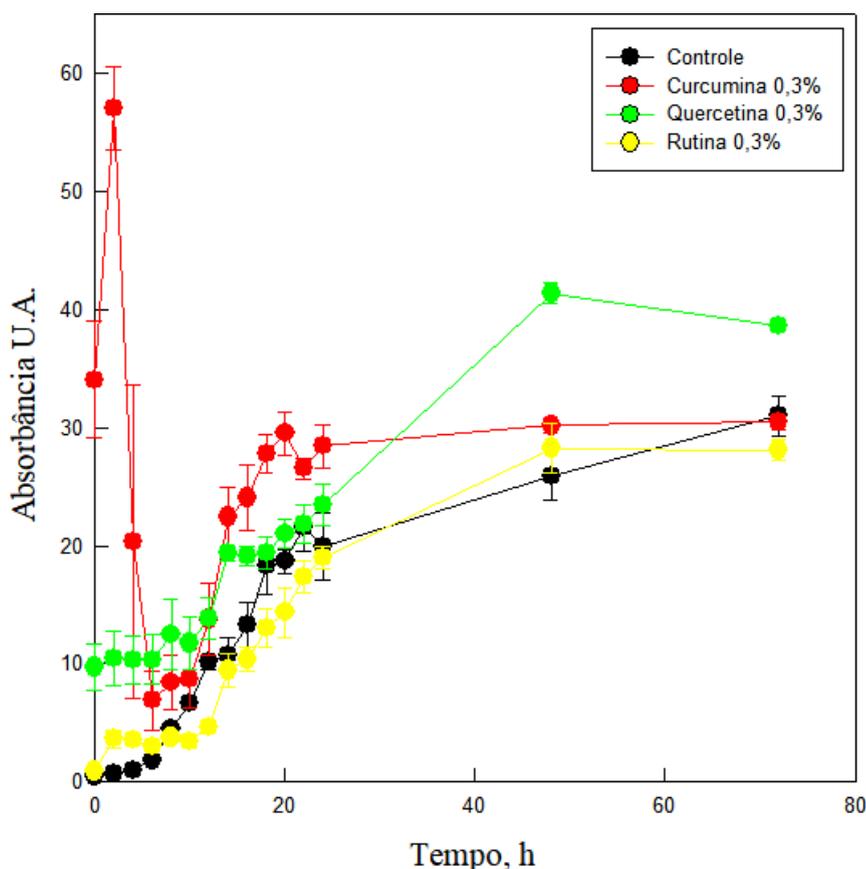


Figura 31: Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial com a adição de polifenóis à 37°C por 72 h, acompanhado por espectrofotometria de VC.

A partir do método de fluorescência de ThT (Figura 32) pode-se observar as mesmas características para a curcumina e quercetina, porém a rutina apresentou um menor tempo de latência (fase lag). A amostra contendo rutina como inibidor mostrou um início de agregação apenas após um período de 12 h, todavia igualmente a cinética anterior apresentou o mesmo valor de intensidade.

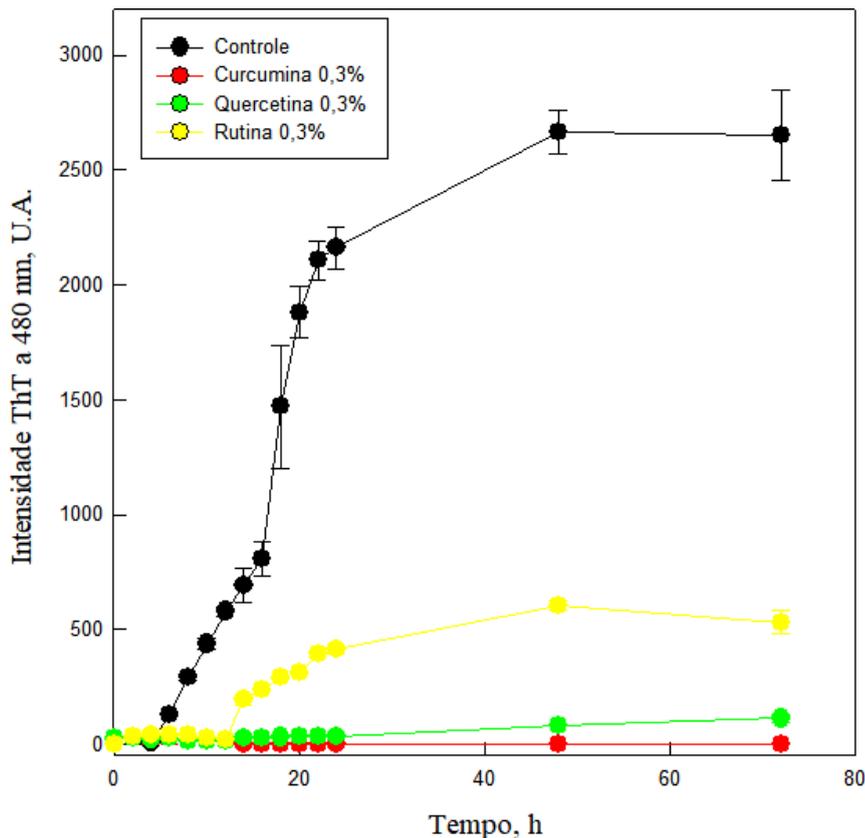


Figura 32: Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial com a adição de polifenóis à 37°C por 72 h, acompanhado por fluorescência de ThT.

Diversos trabalhos sugerem que ensaios de ligação de corante ThT na análise de formação de agregados amiloides com adição de pequenas moléculas com potenciais antiamiloidogênicos, podem estar sujeitos a resultados incorretos devido ao fato de que tais corantes podem formar micelas a partir da combinação de região polar e hidrofóbica da molécula de ThT, que vão interagir com as moléculas de inibidores, podendo assim influenciar nas propriedades espectrais dos próprios corantes e afetar o efeito inibitório (KHURANA, et. al. 2005). Para o ensaio utilizando tal corante, as substâncias escolhidas como inibidores amiloides não devem apresentar nenhuma atividade espectral na mesma faixa do corante, para que não ocorra interferência no resultado da ligação do corante com as fibras a serem formadas (JAMESON, et. al. 2012).

Outra condição que pode acarretar respostas errôneas destes ensaios envolve ligação competitiva da molécula do corante e dos inibidores com as proteínas agregadas. Caso o inibidor e o corante se liguem no mesmo local da proteína agregada, haverá competição do inibidor com o corante pelo local de ligação. Isso pode ocasionar uma ligação menos eficiente do corante aos agregados e certamente alterar a intensidade do sinal (HUDSON, et. al. 2009; BIANCALANA E KOIDE, 2010; JAMESON, et. al. 2012).

O uso de polifenóis como inibidores de fibras amiloides na formulação de insulina regular apresenta algumas ressalvas, por exemplo, estas substâncias podem absorver a luz requerida na excitação da ThT e a radiação de fluorescência da ThT emitida (HUDSON, et. al. 2009).

A curcumina é um polifenol altamente fluorescente quando ligado a regiões hidrofóbicas de proteínas, além de que o seu espectro de absorção possui um valor máximo em 426 nm, ou seja, próximo ao comprimento de onda de excitação da ThT (450 nm). Então uma análise de fluorescência de ThT utilizando a curcumina como substância inibidora da formação de agregados amiloides pode resultar em incoerência devido a esse efeito espectroscópico que pode gerar um falso positivo (HUDSON, et. al. 2009; JAMESON, et. al. 2012). E no presente trabalho pode-se confirmar este efeito, pois ao analisar as Figuras 31 e 32 (pág.57 e 58) observa-se que a curcumina no ensaio de fluorescência de ThT não apresentou nenhum sinal de intensidade, gerando assim um resultado negativo em ThT, porém através do método de VC houve a presença de um sinal de intensidade alto, tendo um resultado positivo.

Para confirmação deste dado foi feito uma espectroscopia UV-visível da curcumina (Figura 33), e a partir do gráfico obtido analisa-se que a curcumina absorve na faixa de comprimento de onda da ThT, afetando assim a intensidade da luz requerida na excitação do corante. Além de absorver na faixa dos comprimentos de onda de absorção do VC (477 e 540 nm), sendo assim, não se trata de substância adequada para ser utilizada em ambas as técnicas.

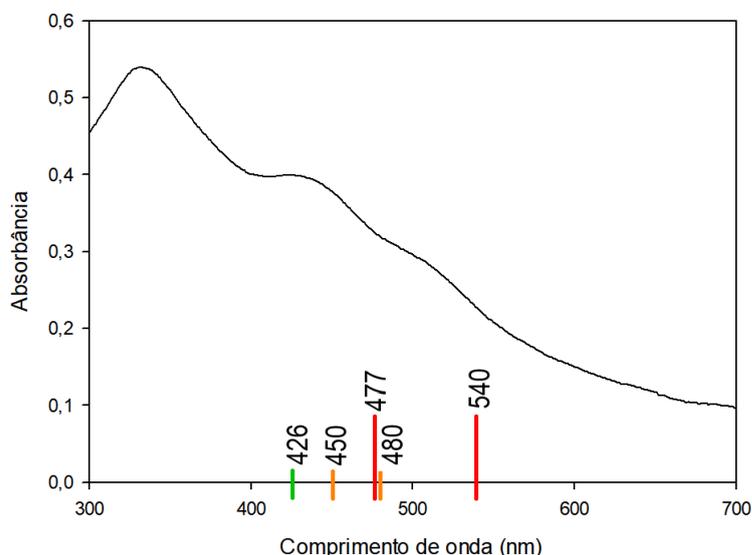


Figura 33: Espectro de absorção de UV-visível da curcumina.

Outra complicação no uso de curcumina como inibidor além dos seus problemas relacionados às técnicas de fluorescência, está relacionada à sua degradação. Em 1997, Wang e colaboradores incubaram a curcumina em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 a 37 °C e o resultado foi que em apenas 30 minutos 90% da substância havia se decomposto. Isto é devido ao fato da curcumina apresentar como principal restrição para a aplicação terapêutica a sua baixa estabilidade em pH fisiológico (JHA, et. al. 2016), situação que nos prejudica também na pesquisa, pois as condições testadas são em situações reais (pH da formulação entre 7 e 7,8), inviabilizando o seu uso como estabilizante em formulação farmacêutica.

No caso da quercetina, outro polifenol muito utilizado como inibidor contra agregação amiloide, apresenta um máximo de absorção em 374 nm, que pode se sobrepor de forma mínima ao espectro de absorção da ThT não acoplada que é de 350 nm, e pode se sobrepor de modo parcial à absorção da ThT ligada em 450 nm (HUDSON, et. al. 2009; JAMESON, et. al. 2012). E através do UV-visível (Figura 34) realizado observa-se que há exatamente este pico de

absorção, corroborando os resultados obtidos pela fluorescência de ThT, onde pode-se verificar um sinal baixo.

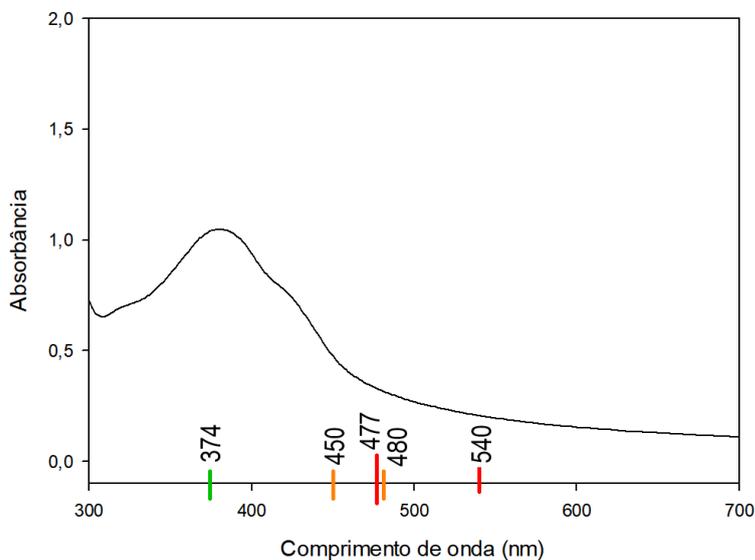


Figura 34: Espectro de absorção de UV-visível da quercetina.

Os resultados do ensaio de ThT se comparados com os de VC para a quercetina demonstraram que tal substância apresentou uma menor intensidade no método de fluorescência de ThT confirmando os efeitos espectroscópicos relacionados ao uso da quercetina como inibidor. Já os resultados relacionados a espectrofotometria de VC mostraram uma maior intensidade para quercetina, sendo assim, o uso do corante VC demonstrou ser uma alternativa viável e importante no presente trabalho, pois através desta técnica pode-se comprovar a veracidade dos resultados obtidos a partir da técnica de fluorescência por ThT, e além disso, verificou-se que a curcumina que teve um resultado negativo em ThT, apresentou-se positivamente no VC.

O uso da técnica de fluorescência utilizando ThT para monitoramento da cinética de agregação de proteínas com a adição de polifenóis para inibição da formação de fibras amiloides deve ser acompanhado de outros métodos para confirmação dos resultados, pois a presença dos anéis aromáticos fenólicos pode tornar tais substâncias fluorescentes, interferindo assim num resultado com 100% de confiabilidade (HUDSON, et. al. 2009), sendo assim, para averiguação dos resultados obtidos há a necessidade de uma terceira técnica para confirmação.

Com o auxílio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 35) foi possível observar que as 3 substâncias polifenólicas após 24 horas de cinética apresentaram estruturas fibrosas em certo nível de agregação, isto é, consegue-se diferencia-las através da morfologia apresentada. Este período de 24 h foi escolhido devido ao fato de que neste ponto da cinética o controle já apresentava boa quantidade de fibras para comparação com amostras contendo inibidores.

O uso da curcumina fez com que a insulina apresentasse similaridade com o controle obtido no mesmo período de tempo (24 horas), sendo assim é observado uma estrutura bastante fibrosa, havendo somente a presença de fibras, ou seja, a curcumina não demonstrou ser eficiente contra a formação de agregados amiloides na formulação de insulina. A adição de quercetina a formulação demonstrou um melhor resultado, mesmo após ampliação da imagem

microscópica podendo ser confirmado que há formação de fibras, também há presença de uma maior parte estrutural amorfa, mostrando que a quercetina retardou a formação de agregados amiloides por maior período de tempo. E a rutina também mostrou uma morfologia fibrilar, não sendo um bom inibidor para uso como estabilizante da formulação de insulina, deste modo o uso de polifenóis não demonstrou ser capaz de aumentar a estabilidade do medicamento.

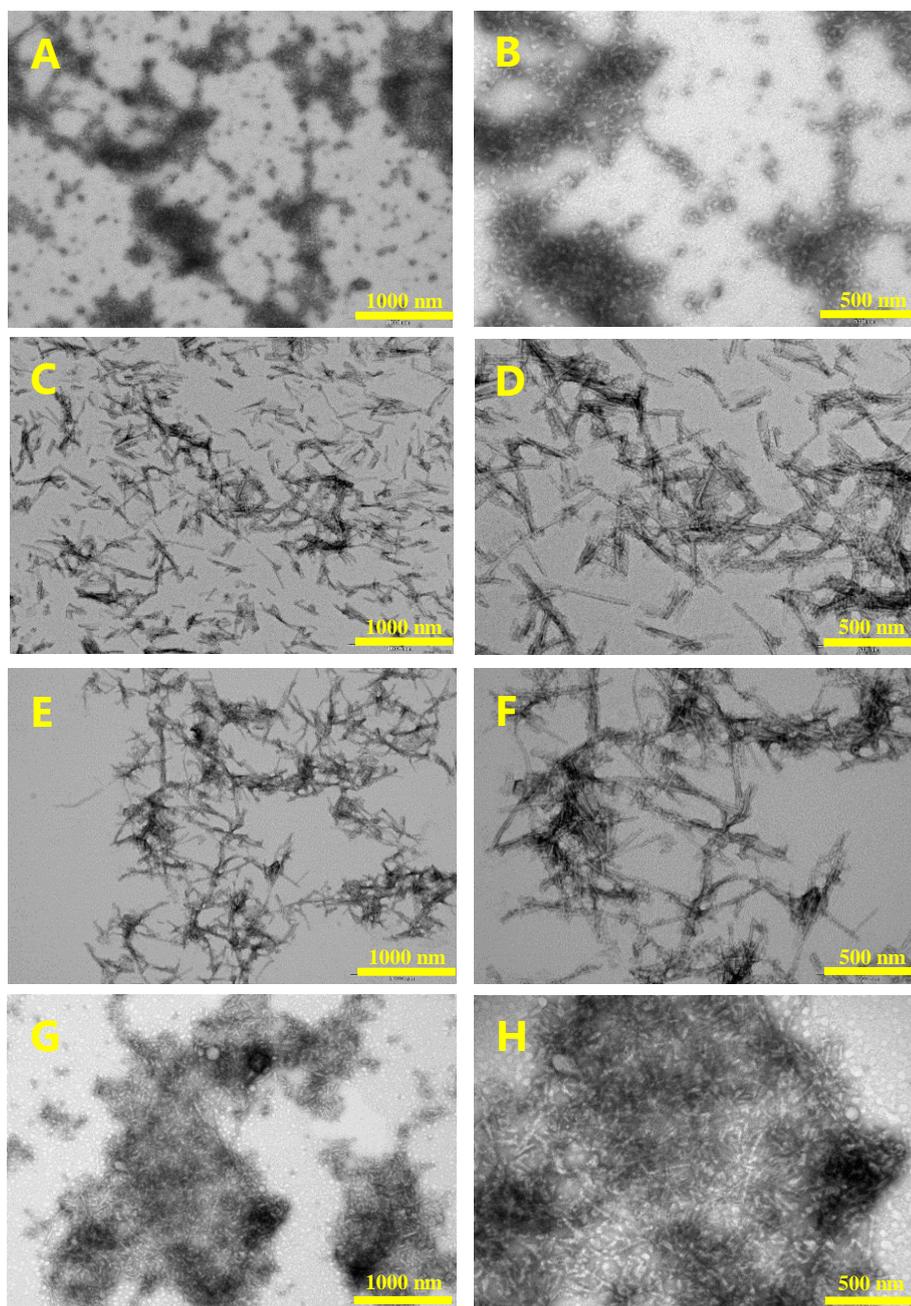


Figura 35: Imagens de MET da cinética de agregação da formulação de insulina regular na presença de polifenóis (0,3% em 24 h), (aumento de 25.000 e 50.000 cada):
(A) e (B) controle de insulina 0 h; (C) e (D) controle de insulina 24 h;
(E) e (F) curcumina; (G) e (H) quercetina; (I) e (J) rutina.

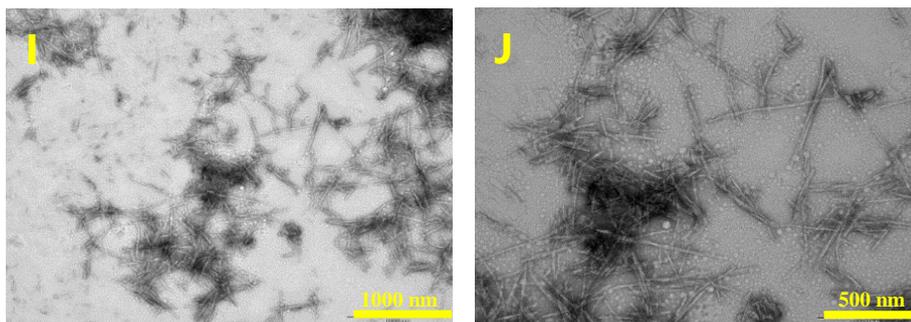


Figura 35. Continuação.

Após a realização do MET podemos observar que a quercetina não apresentou resultado tão satisfatório como inibidor amiloide, pois conseguimos presenciar a grande quantidade de fibras amiloides formadas, sendo o ensaio de VC mais confiável neste caso.

5.5. Formulação de Insulina Regular com Adição de Vitaminas como Antiamiloidogênicos

O uso de vitaminas como inibidores de agregação teve início primeiramente com a realização de cinéticas de 48 h e além da concentração de 1 % foi utilizado 0,03 e 10%. A concentração de 0,03 % mostrou baixo poder anti agregação. 10 % inibindo à formação de agregado, mas tornou-se inviável devido à grande quantidade de inibidor adicionado à amostra de insulina, o que dificultava até mesmo na solubilização da amostra. Então foi padronizado para a concentração mais adequada ao procedimento (1 %).

Se compararmos os resultados obtidos entre as técnicas de VC e ThT (Figuras 36 e 37) para o monitoramento das amostras de formulação de insulina com adição de vitaminas, têm-se que apenas as amostras contendo ácido ascórbico apresentaram diferenciação. A amostra contendo ácido ascórbico quando analisada por espectrofotometria de VC apresentou um aumento significativo da intensidade chegando a se igualar ao controle, mostrando uma baixa eficácia da ação antiamiloidogênica na formulação de insulina regular. Já quando analisada por fluorescência mostrou uma situação oposta, onde agora a curva com ácido ascórbico apresentou baixa de intensidade, chegando rapidamente ao equilíbrio, demonstrando neste caso ser uma substância com potencial antiamiloidogênico expressivo.

A amostra contendo α – tocoferol apresentou aumento significativo da intensidade apenas após 48 h de cinética em ambas as técnicas, porém mais expressivamente no uso da técnica de VC. Ao final da análise em 72 h o ponto obtido foi aproximado ao do controle da formulação. Já a adição de retinol se apresentou estável no VC e ThT, mostrando uma maior estabilização da formulação do medicamento contra a formação de agregados.

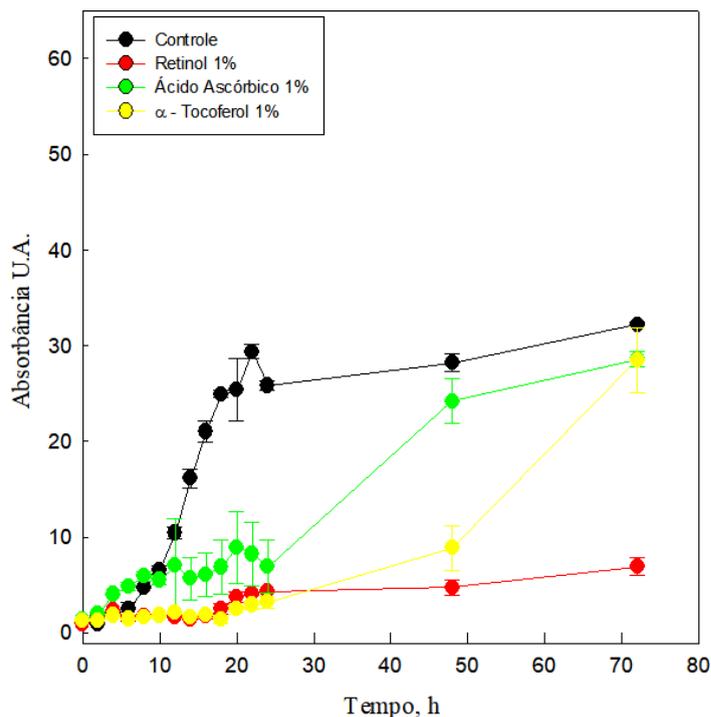


Figura 36: Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial com a adição de vitaminas à 37°C por 72 h, acompanhado por espectrofotometria de VC.

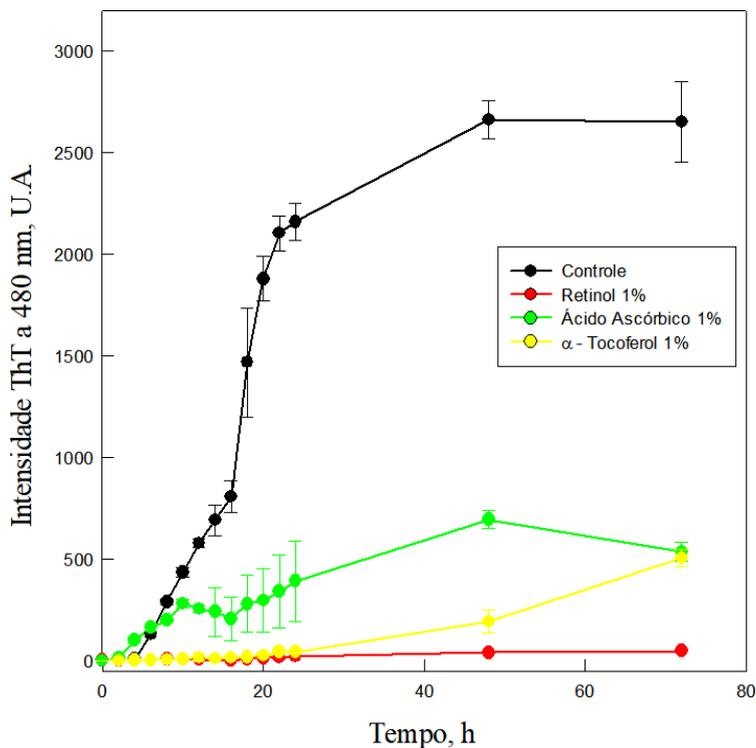


Figura 37: Cinética de agregação amiloide de insulina regular comercial com a adição de vitaminas à 37°C por 72 h, acompanhado por fluorescência de ThT.

Nas microscopias das amostras com adição de vitaminas (Figura 38) observa-se que tais substâncias após 24 horas de cinética apresentaram características morfológicas bem distintas. A amostra de insulina contendo retinol apresentou um formato arredondado com tendência a formar pequenos aglomerados, sem qualquer presença de estruturas fibrosas. Já as amostras

contendo ácido ascórbico e α – tocoferol indicam que houve formação de fibras. Contudo a amostra de insulina contendo ácido ascórbico apresentou uma alta densidade de fibras geradas, porém na presença de α – tocoferol repara-se que as estruturas fibrilares ainda estão em desenvolvimento.

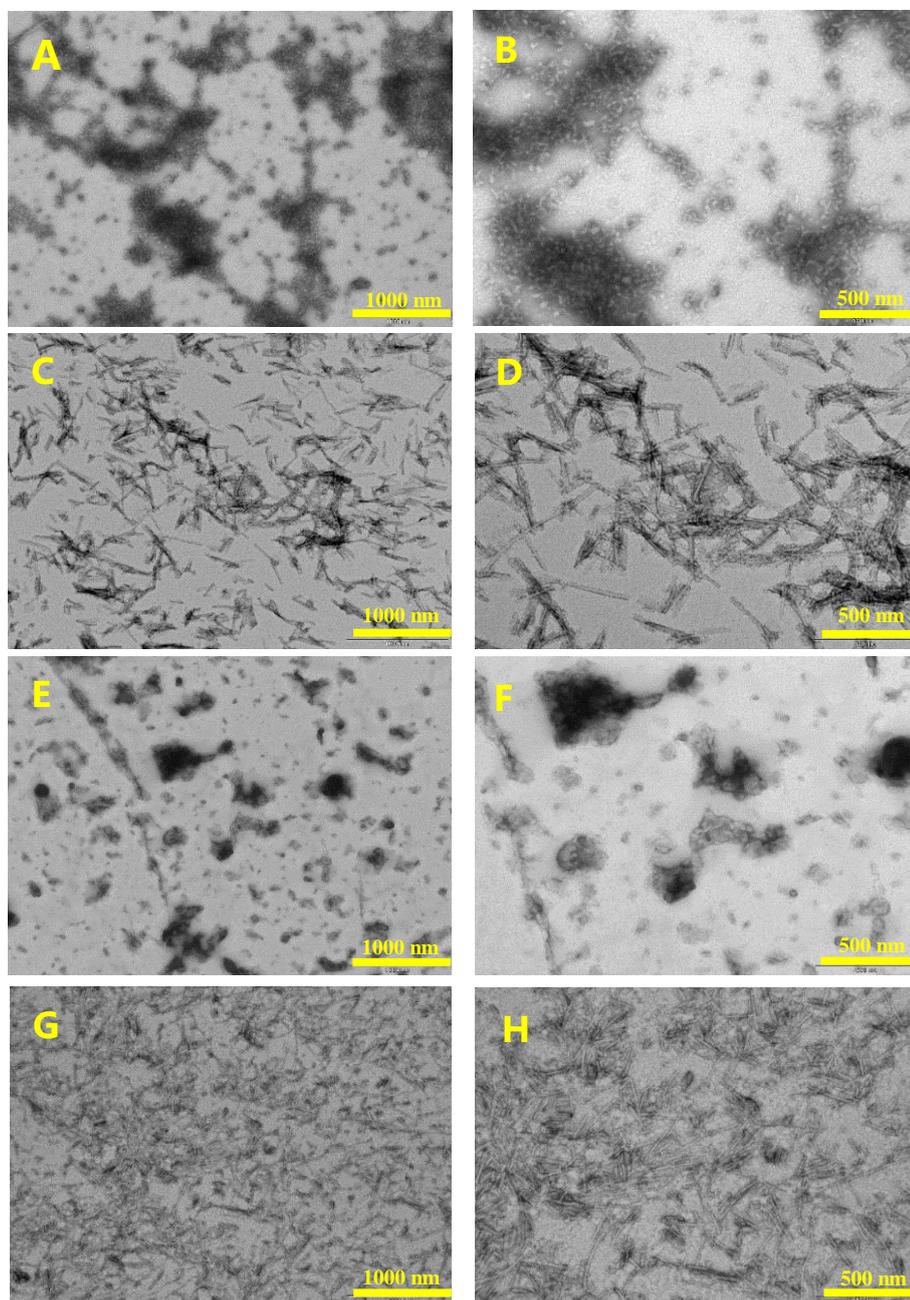


Figura 38: Imagens de MET da cinética de agregação da formulação de insulina regular na presença de vitaminas (1% em 24 h), (aumento de 25.000 e 50.000 cada): (A) e (B) controle de insulina 0 h; (C) e (D) controle de insulina 24 h; (E) e (F) retinol; (G) e (H) ácido ascórbico; (I) e (J) α – tocoferol (continua).

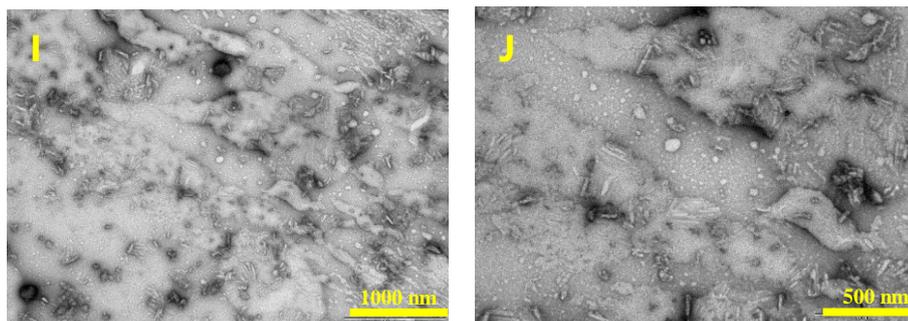


Figura 38. Continuação.

A maioria dos trabalhos relacionados ao estudo de inibição de agregados amiloides mencionam o uso de antioxidantes como substâncias que apresentam grande potencial contra a formação de agregados. Porém, neste trabalho foram utilizadas substâncias inibidoras que apresentavam ação antioxidante, e a partir dos resultados obtidos pode-se especular que a inibição não esteja relacionada ao poder antioxidante destas substâncias. Por exemplo, foi utilizado o ácido ascórbico que é um importante antioxidante, todavia não demonstrou ser um bom inibidor contra formação de agregados amiloides. Porém é dito que agentes antioxidantes altamente potentes possam aumentar o alongamento da estrutura, sendo assim, as substâncias antioxidantes possuem a capacidade de determinar se a fibrilação será reduzida ou aumentada (SHOVAL, et. al. 2007).

No presente trabalho, tem-se o uso de substâncias como excipientes para o aumento da estabilidade da insulina através da inibição de agregados amiloides, que possuem em suas estruturas anéis aromáticos passíveis de ressonância, como é o caso do α – tocoferol que apresentou um resultado interessante. Pois após 24 horas de cinética pode-se verificar o início da formação de agregados, ou seja, ainda no processo de organização estrutural entre estruturas monoméricas e fibrilares. Sendo assim, a adição desta substância demonstrou retardar bem a formação de fibras amiloides maduras se comparada ao ácido ascórbico e aos polifenóis.

Já o uso de retinol como inibidor de agregação proteica apresentou o melhor resultado dentre todos os inibidores testados. A estrutura do retinol apresenta cinco ligações duplas, aumentando a quantidade de estruturas de ressonância que podem ser formadas, aumentando assim sua planaridade para uma infiltração com maior facilidade no sulco hidrofóbico das proteínas agregadas.

A partir dos resultados obtidos é possível observar que o modelo funciona apenas para determinadas substâncias, visto que a literatura descreve a alta funcionalidade dos polifenóis como inibidores amiloides (CHENG, et. al. 2013), porém não apresentaram aplicabilidade quando usados no modelo proposto.

Por outro lado, o uso de retinol e α – tocoferol foram promissores, além de possuírem a vantagem de serem substâncias que podem ser injetadas no corpo, ao contrário dos polifenóis que devem ser administrados através de via oral, o que dificultaria o uso como excipiente na formulação de insulina, todavia este medicamento não pode ser administrado por esta via, pois a insulina sofre destruição enzimática no trato gastrointestinal (SILVA, et. al. 2003).

Devemos também estar cientes de que algumas substâncias interagem para inibição da formação dos intermediários oligoméricos, porém podem promover a formação das fibras, outras conseguem inibir a formação das fibras, mas não a geração dos oligômeros, e também

existem as substâncias com potencial inibitório de ambas as estruturas, fibrosas e oligoméricas (KOTORMÁN, et. al. 2017). No entanto os métodos aqui estudados avaliam apenas a presença de fibras.

5.6. Análise Estatística – Teste t Student

A partir do teste t de student para análise estatística (Tabela 7) é observado que para a técnica de ThT. Fase lag (tempo de latência): onde quanto maior for essa fase, mais tempo demorará para dar início à formação de agregados e quanto menor, mais rapidamente ocorrerá a agregação. E (T ½) trata-se do tempo que demora para metade da quantidade de proteína sofrer agregação.

Devido ao fato dos resultados dos polifenóis como inibidores contra agregação amiloide ser negativa, não houve necessidade de se realizar análise estatística com o uso de tais substâncias, sendo assim, foram realizadas análise apenas das amostras com adição de vitaminas como excipientes.

Para a técnica de fluorescência de ThT (fase lag): apenas o uso de α – tocoferol gerou uma fase lag maior, demorando a agregar mais tempo do que a adição de ácido ascórbico e retinol, que não se apresentaram estatisticamente diferentes no início da formação de agregados comparados ao controle utilizado.

Para a técnica de fluorescência de ThT (T ½): porém foram as amostras de retinil e α – tocoferol que apresentaram um maior tempo de inibição de 50% da proteína.

Para o método de VC (fase lag): o ácido ascórbico e o α – tocoferol não apresentaram diferença significativa se comparado ao início de formação de agregados no controle, e apenas com o uso do retinol houve uma diferença significativa, sendo assim, o retinol demonstrou estabilizar por mais tempo.

Para o método de VC (T ½): todas as amostras de insulina com adição de vitaminas não apresentaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas, ou seja, metade da quantidade de proteína em solução sofreu agregação aproximadamente no mesmo período de tempo que o controle.

Tabela 7: Teste t de Student para a fase lag e T½.

Inibidor	ThT (fase lag)	VC (fase lag)	ThT (T ½)	VC (T ½)
Ácido ascórbico	0,887	1,000	0,947	0,200
Retinol	0,906	*0,012	** < 0,001	0,200
α - Tocoferol	** < 0,001	0,200	** < 0,001	0,200

Obs.: **P > 0,05** e **P < 0,05**.

De acordo com o gráfico (Figura 37, pág. 63) o uso de retinol como inibidor de agregação amiloide mostrou ser estável durante toda a cinética, todavia a análise estatística para o retinol na fase lag da ThT não apresentou diferença significativa. Além de que o tempo T ½ para o VC mostrou que não há diferença significativa em nenhuma amostra, o que diverge do gráfico (Figura 36, pág. 63) em que novamente o retinol apresenta um aspecto de estabilidade frente ao método.

Embora os dados gráficos apontem para um resultado onde há uma variação significativa dos dados, após a aplicação do teste estatístico de hipóteses, considerando um nível de confiança de 95%, algumas das variáveis não apresentaram diferença significativa.

Uma provável causa para essa ocorrência pode ser devido à qualidade dos dados de saída observados apresentarem ruído e dificuldades de medição, e outro motivo pode ser a necessidade da produção de novas réplicas para aumentar o número de graus de liberdade da amostra e reduzir a variância experimental.

6. CONCLUSÃO

O modelo de agregação proposto mostrou ser eficiente e reprodutível para formação de agregados amiloides em formulação de insulina comercial, deste modo pode ser empregado em estudos sobre substâncias com potencial antiamiloidogênico, como um modelo para aprimoramento de formulações mais estáveis, e além disso ser usado como controle de qualidade na indústria de medicamentos.

Com base na avaliação do uso de inibidores contra a formação de agregados amiloides em formulação de insulina têm-se duas possíveis substâncias com potencial antiamiloidogênico, o retinol e o α – tocoferol que são substâncias seguras para uso farmacológico e que podem ser injetadas, sendo assim demonstram ser excipientes propícios para a melhora da estabilidade do medicamento.

E para continuação deste estudo propõem-se testes utilizando novas moléculas com potencial antiamiloidogênico e também testes *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

ALAM, P.; SIDDIQI, K.; CHATURVEDI, S. K.; KHAN, R. H. Protein aggregation: from background to inhibition strategies. **International Journal of Biological Macromolecules, Aligarh, India**, v. 103, p. 208-219, 2017.

ALAM, P.; BEG, A. Z.; SIDDIQI, M. K.; CHATURVEDI, S. K.; RAJPOOT, R. K.; AJMAL, M. R.; ZAMAN, M.; ABDELHAMEED, A. S.; KHAN, R. H. Ascorbic acid inhibits human insulin aggregation and protects against amyloid induced cytotoxicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 621, p. 54-62, 2017.

ALAM, P.; SIDDIQI, M. K.; MALIK, S.; CHATURVEDI, S. K.; UDDIN, M.; KHAN, R. H. Elucidating the inhibitory potential of Vitamin A against fibrillation and amyloid associated cytotoxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 333-338, 2019.

ALMEIDA, Z.C. L. **Cinética de Agregação da Proteína Transtirretina: Contribuição para a Compreensão dos Processos de Formação de Amilóide**. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, Supplement 1, p. S13-S61, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, Supplement 1, p. S81-S90, 2014.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**, 5ª Ed. Brasília, 2016.

ARORA, A.; HA, C.; PARK, C. B. Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. **FEBS Letters**, v. 564, n. 1-2, p. 121-125, 2004.

ARORA, A.; HA, C.; PARK, C. B. Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. **Protein Science**, v. 13, n. 9, p. 2429-2436, 2004.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. *The Lancet*, v. 383, n. 9911, p. 69-82, 2014.

BANCROFT, J. D.; SUVARNA, S. K.; LAYTON, M. **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**. 7. Ed. Nottingham: Churchill Livingstone, 2013.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BELO, P. R. N. **Formação de Placas Amilóides em Doenças Neurodegenerativas**. 2014. 31 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

BERNISON, D.; MECINOVIC, A.; ABED, M. T.; LIMÉ, F.; JAGELAND, P.; PALMLÖF, M.; ESBJÖRNER, E. K. Amyloid formation of bovine insulin is retarded in moderately acidic pH and by addition of short-chain alcohols. **European Biophysics Journal**, 2020.

BIANCALANA, M.; KOIDE, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, n. 7, p. 1405-1412, 2010.

BRANGE, J.; ANDERSEN, L.; LAURSEN, E. D.; MEYN, G.; RASMUSSEN, E. Toward Understanding Insulin Fibrillation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 5, p. 517-525, 1997.

BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; LI, J. J.; VLASSARA, H.; MARTIN, T. R.; MCADAM, K. P. W. J. Association of insulin pump therapy with raised serum amyloid a in type I diabetes mellitus. **The Lancet**, v. 323, n. 8374, p. 411-413, 1984.

CHENG, B.; GONG, H.; XIAO, H.; PETERSEN, R. B.; ZHENG, L.; HUANG, K. Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: A therapeutic strategy for protein misfolding diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 10, p. 4860-4871, 2013.

CHITI, F.; DOBSON, C.M. Protein Misfolding, Functional Amyloid and Human Disease. **Rev. Biochem. United Kingdom**. p. 333 – 366, 2016.

DHOUAFI, Z.; CUANALO-CONTRERAS, K.; HAYOUNIM E. A.; MAYS, C. E.; SOTO, C.; MORENO-GONZALEZ, I. Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 19, p. 3521-3538, 2018.

EVALUATE PHARMA. World Preview 2015, Outlook to 2020. **Evaluate**, 8 ed., 2015.

FALCÃO, A. S. **Agregação e formação de amilóides por proteínas neuroinflamatórias S100A8 e S100A9 e implicações em processos neurodegenerativos**. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2015.

FINK, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. **Folding and Design**, v. 3, n. 1, p. R9-R23, 1998.

FODERÀ, V.; LIBRIZZI, F. GROENNING, M.; WEERT, M. V.; LEONE, M. Secondary nucleation and accessible surface in insulin amyloid fibril formation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 12, p. 3853-3858, 2008.

FROKJAER, S.; OTZEN, D. E. Protein drug stability: A formulation challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 4, p. 298-306, 2005.

GARRIQUES, L. N.; FROKJAER, S.; CARPENTER, J. F.; BRANGE, J. The effect of mutations on the structure of insulin fibrils studied by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 12, p. 2473-2480, 2002.

GIBSON, T. J.; MURPHY, R. M. Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides. **Protein Science**, v. 15, n. 5, p. 1133-1141, 2006.

GIRYCH, M.; GORBENKO, G.; MALIYOV, I.; TRUSOVA, V.; MIZUGUCHI, C.; SAITO, H.; KINNUNEN, P. Combined Thioflavin T – Congo red fluorescence assay for amyloid fibril detection. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 4, n. 3, 2016.

GRAS, S. L.; WADDINGTON, L. J.; GOLDIE, K. N. Transmission electron microscopy of amyloid fibrils. *In*: HILL, A. F.; BARNHAM, K. J.; BOTTOMLEY, S. P.; CAPPAL, R. **Protein Folding, Misfolding, and Disease: Methods and Protocols**. Humana Press, 2011. p. 197 – 214.

GUALANDI-SIGNORINI, A. M.; GIORGI, G. Insulin formulations – a review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 73-83, 2001.

GUIMARÃES, L.; LAZZARETTI, C. Doença de Alzheimer e Diabetes Mellitus tipo 2: Relações metabólicas e neurodegenerativas. **Rev. Perspectiva: Ciência e Saúde**, v. 2, n. 1, p. 113-123, 2017.

GUPTA, Y.; SINGLA, G.; SINGLA, R. Insulin-derived amyloidosis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 174-177, 2015.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5 Ed. Artmed, 2011.

HASANBAŠIĆ, S.; JAHIĆ, A.; BERBIĆ, S.; ŽNIDARIĆ, M. T.; ŽEROVNIK, E. Inhibition of Protein Aggregation by Several Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-12, 2018.

HIRSCH, I. B. Insulin Analogues. *The New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 2, p. 174-183, 2005.

HONG, Y.; MENG, L.; CHEN, S.; LEUNG, C. W. T.; DA, L.; FAISAL, M.; SILVA, D.; LIU, J.; LAM, J. W. Y.; HUANG, X.; TANG, B. Z. Monitoring and inhibition of insulin

fibrillation by a small organic fluorogen with aggregation-induced emission characteristics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 3, p. 1680-1689, 2012.

HOWIE, A.J. "Green (or apple-green) birefringence" of congo red-stained amyloid. **The Journal of Protein Folding Disorders**, v. 22, n. 3, p. 205-206, 2015.

HUDSON, S. A.; ECROYD, H.; KEE, T. W.; CARVER, J. A. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 20, p. 5960-5972, 2009.

IWAYA, K.; ZAKO, T.; FUKUNAGA, J.; SÖRGJERD, K. M.; OGATA, K.; KOGURE, K.; KOSANO, H.; NORITAKE, M.; MAEDA, M.; ANDO, Y.; KATSURA, Y.; NAGASE, T. Toxicity of insulin-derived amyloidosis: a case report. **BMC Endocrine Disorders**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2019.

JAMESON, L. P.; SMITH, N. W.; DZYUBA, S. V. Dye-binding assays for evaluation of the effects of small molecule inhibitors on amyloid (A β) self-assembly. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 807-819, 2012.

JHA, N. N.; GHOSH, D.; DAS, S.; ANOOP, A.; JACOB, R. S.; SINGH, P. K.; AYYAGARI, N.; NAMBOOTHIRI, I. N. N.; MAJI, S. K. Effect of curcumin analogs on α -synuclein aggregation and cytotoxicity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

JIMENEZ, J. L.; NETTLETON, E. J.; BOUCHARD, M.; ROBINSON, C. V.; DOBSON, C. M.; SAIBIL, H. R. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 14, p. 9196-9201, 2002.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. Basic & Clinical Pharmacology. 12. Ed. McGraw-Hill, 2012.

KHAN, M. S.; TABREZ, S.; RABBANI, N.; OVES, M.; SHAH, A.; ALSENAIDY, M. A.; AL-SENAIDY, A. M. Physico-chemical stress induced amyloid formation in insulin: amyloid characterization, cytotoxicity analysis against human neuroblastoma cell lines and its prevention using black seeds (*Nigella sativa*). **Chinese Journal of Integrative Medicine**, p. 1-8, 2015.

KHODABANDEHLOO, A.; CHEN, D. D. Y. Particle sizing methods for the detection of protein aggregates in biopharmaceuticals. **Bioanalysis**, v. 9, n. 3, p. 313-326, 2017.

KHURANA, R.; COLEMAN, C.; IONESCU-ZANETTI, C.; CARTER, S. A.; KRISHNA, V.; GROVER, R. K.; ROY, R.; SINGH, S. Mechanism of Thioflavin T binding to amyloid fibrils. **Journal of Structural Biology**, v. 151, n. 3, p. 229-238, 2005.

KLUNK, W. E.; PETTEGREW, J. W.; ABRAHAM, D. J. Two simple methods for quantifying low-affinity dye-substrate binding. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 37, n. 8, p. 1293-1297, 1989.

KOTORMÁN, M.; KASI, P. B.; HALÁSZ, L.; BORICS, A. Inhibition of Amyloid-like fibril formation of trypsin by red wines. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 5, p. 1-5, 2017.

KYLE, R.A. Amyloidosis: A Convoluted Story. **Rev. British Journal of Haematology**, v. 114, n. 3, p. 529 – 538, 2001.

LADISCH, M. R.; KOHLMANN, K. L. Recombinant human insulin. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 6, p. 469 – 478, 1992.

LAKEY-BEITIA, J.; BERROCAL, R.; RAO, K. S.; DURANT, A. A. Polyphenols as therapeutic molecules in Alzheimer's disease through modulating amyloid pathways. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 2, p. 466 – 479, 2014.

LANDGRAF, W.; SANDOW, J. Recombinant human insulins – Clinical efficacy and safety in diabetes therapy. **European Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 12 – 17, 2016.

LASAGNA-REEVES, C. A.; CLOS, A. L.; MIDORO-HIRIUTI, T.; GOLDBLUM, R. M.; JACKSON, G. R.; KAYED, R. Inhaled Insulin Forms Toxic Pulmonary Amyloid Aggregates. **Endocrinology**, v. 151, n. 10, p. 4717 – 4724, 2010.

- LIBRIZZI, F.; RISCHER, C. The kinetic behavior of insulin fibrillation is determined by heterogeneous nucleation pathways. **Protein Science**, v. 14, n. 12, p. 3129 – 3134, 2005.
- LI, H.; RAHIMI, F.; SINHA, S.; MAITI, P.; BITAN, G. Amyloids and protein aggregation – analytical methods. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2009.
- LOUGHEED, W. D.; ALBISSER, A. M.; MARTINDALE, H. M.; CHOW, J. C.; CLEMENT, J. R. Physical Stability of Insulin Formulations. **Diabetes, Toronto, Canada**, v. 32, p. 424-432, 1983.
- MAHLER, H.; FRIESS, W.; GRAUSCHOPF, U.; KIESE, S. Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences. Basel, Switzerland**, v. 98, n. 9, p. 2909-2934, 2009.
- MAKOWSKI, G. S. *Advances in clinical chemistry*. Vol. 47. Newington: Elsevier, 2009.
- MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1546-1549, 1997.
- MONTERO-LOMELÍ, M.; RUMJANEK, F. D. Técnicas em Biociências – Protocolos Comentados para o Laboratório. Vol. 1. Med Book, 2013.
- NIELSEN, L.; FROKJAER, S.; BRANGE, J.; UVERSKY, V. N.; FINK, A. L. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. **Biochemistry**, v. 40, n. 28, p. 8397-8409, 2001.
- NILSSON, M. R. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes. **Amyloid The Journal of Protein Folding Disorders**, v. 23, n. 3, p. 139-147, 2016.
- ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. Sistema Digestório – Integração básico-clínica. 1. Ed. Blucher, 2016.
- PAIVA, M. C. O papel fisiológico da insulina e dos hormônios contrarregulatórios na homeostase glicêmica. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica Funcional**, v. 14, n. 61, p. 34-42, 2014.
- PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. A Evolução da Insulinoterapia no Diabetes Melito Tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 268-278, 2008.
- PONTES, C. E. C.; BARROSO, W. B. G.; RITO, P. N. Market for biotechnology drugs: market analysis of insulin. **Journal of Pharmaceutical Health Services Research**, v. 10, n. 2, p. 1-8, 2018.
- PORAT, Y.; ABRAMOWITZ, A.; GAZIT, E. Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 67, n. 1, p. 27-37, 2006.
- PORZOOR, A.; ALFORD, B.; HÜGEL, H. M.; GRANDO, D.; CAINE, J.; MACREADIE, I. Anti-amyloidogenic properties of some phenolic compounds. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 505-527, 2015.
- RABIEE, A.; EBRAHIM-HABIBI, A.; GHASEMI, A.; NEMAT-GORGANI, M. How curcumin affords effective protection against amyloid fibrillation in insulin. **Food & Function**, v. 4, n. 10, p. 1474-1480, 2013.
- RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.
- SCHLEIN, M. Insulin formulation characterization – the Thioflavin T assays. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 19, n. 2, p. 397-408, 2017.
- SHOVAL, H.; LICHTENBERG, D.; GAZIT, E. The molecular mechanisms of the anti-amyloid effects of phenols. **Informa Healthcare**, v. 14, n. 1, p. 73-87, 2007.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.

SINÉZIA, C.; LIMA, L. M. T. R. Heterotropic modulation of amylin fibrillation by small molecules: Implications for formulative designs. **The Protein Journal**, p. 1-11, 2019.

SINGH, S. M.; HUTCHINGS, R. L.; MALLELA, K. M. G. Mechanisms of m-cresol-induced protein aggregation studies using a model protein cytochrome c. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 5, p. 1679-1689, 2011.

SPÍNOLA, V.A.R. **Novas Metodologias para a Determinação do Conteúdo de Ácido Ascórbico em Alimentos Frescos**. 2011. 152 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade da Madeira, Funchal, 2011.

TAMIZI, E.; JOUYBAN, AL. Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 98, p. 26-46, 2016.

VALENTE, C.M.V.P. **Aplicações Clínicas e Estratégias de Formulação da Insulina Intranasal Experiência Profissionalizante na vertente de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Investigação**. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2015.

WANG, Y.; PAN, M.; CHENG, A.; LIN, L.; HO, Y.; HSIEH, C.; LIN, J. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867-1876, 1997.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**. Berkeley, USA, n. 185, p. 129-188, 1999.

WANG, W.; NEMA, S.; TEAGARDEN, D. Protein aggregation – Pathways and influencing factors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 89-99, 2010.

WANG, J.; WANG, Y.; ZENG, C. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 4, p. 675-679, 2011.

WANG, B.; HU, L.; SIAHAAN, T. J. Drug Delivery. Principles and Applications. 2^a ed. Hoboken, New Jersey (USA): Ed. Wiley, 2016.

XUE, C.; LIN, T. Y.; CHANG, D.; GUO, Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. **Royal Society Open Science**. Los Angeles, USA, v. 4, p. 1 – 12, 2017.

YAKUPOVA, E.I.; BOBYLEVA, L.G.; VIKHLYANTSEV, I.M.; BOBYLEV, A.G. Congo red and amyloids: History and relationship. **Rev. Bioscience Reports**. Moscow, Russia. Vol. 39.

YOSHIHARA, H.; SAITO, J.; TANABE, A.; AMADA, T.; ASAKURA, T.; KITAGAWA, K.; ASADA, S. Characterization of novel insulin fibrils that show Strong cytotoxicity under physiological pH. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 4, p. 1419-1426, 2016.

YU, X. L.; LI, Y. N.; ZHANG, H.; SU, Y. J.; ZHOU, W. W.; ZHANG, Z. P.; WANG, S. W.; XU, P. X.; WANG, Y. J.; LIU, R. T. Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. **Food & Function**, v. 6, n. 10, p. 3296-3306, 2015.

ZAPADKA, K. L.; BECHER, F. J.; SANTOS, A. L. G.; JACKSON, S. E. Factores affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. **Interface Focus**, v. 7, n. 6, p. 1-18, 2017.

ZAYKOV, A. N.; MAYER, J. P.; DIMARCHI, R. D.; Pursuit of a perfect insulin. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 6, p. 425-439, 2016.