



### Sistemas de Liberação Controlada de Crotoxina a Partir de Matriz Polimérica: uma Alternativa para o Tratamento de Câncer

Study of Controlled Release of Crotoxin from Polymer Matrix: an Alternative for the Treatment of Cancer

Rodrigo de Lima Nascimento<sup>1</sup>  
Álvaro Antônio A de Queiroz<sup>2</sup>  
Maria Teresa C. Ribela<sup>3</sup>  
Maria Aparecida Pires Camillo<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Licenciado em Matemática. Doutorando em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Professor de Introdução às Ciências dos Materiais e Física da Universidade do Vale do Sapucaí, MG

<sup>2</sup> Bacharel e Licenciado em Química. Doutor em Ciências/Tecnologia Nuclear. Professor Associado da Universidade Federal de Itajubá. Coordenador Científico do Centro de Estudos e Inovação em Materiais Biofuncionais Avançados da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

<sup>3</sup> Bacharel em Física. Mestre e doutora em Tecnologia Nuclear. Professora do Curso de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade de São Paulo e Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

<sup>4</sup> Farmacêutica-Bioquímica. Especialista em Ciências das Radiações na Universidade de Tóquio/Japão. Mestre e Doutora em Tecnologia Nuclear Nuclear pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo (IPEN-USP).

Este trabalho realizou-se durante o curso de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Itajubá, MG.

#### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o sistema de liberação controlada de Crotoxina, uma neurotoxina obtida do veneno de serpentes brasileiras e que apresenta atividade antitumoral para variados tipos de tratamentos oncológicos, mas que também apresenta efeitos colaterais quando aplicada de maneira convencional, a partir de matriz polimérica - PDMA-co-VP/crotoxina.

**Materiais e métodos:** A análise da liberação controlada do fármaco da crotoxina a partir do bioconjugado preparado foi feita através da determinação da taxa de emissão de radioatividade a partir das moléculas de crotoxina liberadas marcadas previamente com iodo-125. **Resultados e conclusão:** Pela análise da liberação controlada, foi possível observar que o sistema em questão mostrou-se capaz de manter sob controle as taxas de liberação do fármaco por um período de 42 horas e ainda, que as taxas de liberação foram influenciadas pela interação existente entre a crotoxina e o grupo vinilpirrolidona presente no copolímero.

**Palavras-chave:** Liberação controlada; PDMA-co-VP/Crotoxina; Tratamento de câncer.

#### ABSTRACT

**Objective:** Evaluate the controlled release system of crotoxin, a neurotoxin obtained from the venom of Brazilian snakes and has antitumor activity for use in the treatment of various cancers, but also has side effects when applied in a conventional manner, from PDMA-co-VP/crotoxin polymers.

**Materials and Methods:** The analysis of controlled release drug crotoxin from the bioconjugate was prepared by determining the rate of emission of radioactivity from the crotoxin released molecules arranged before and with iodine-125. **Results and conclusion:** By the analysis of controlled release it was observed that the system in question was able to keep under control the rate of drug release for a period of 42 hours and also that the release rates were influenced by the interaction between crotoxin and the group present in the vinylpyrrolidone copolymer.

**Key words:** Controlled release; PDMA-co-VP/Crotoxin; Treatment of cancer.

#### Correspondência:

Rodrigo de Lima Nascimento  
Rua Brasópolis, 160. Bairro: Primavera  
Pouso Alegre/MG Telefone: 9996-5380  
CEP: 37550-000  
E-mail: [profrodlima@yahoo.com.br](mailto:profrodlima@yahoo.com.br)

## INTRODUÇÃO

Apesar de toda a evolução da medicina, o crescimento do número de casos de câncer no mundo cria um quadro preocupante. De acordo com projeções divulgadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) são esperados aproximadamente 500 mil casos da doença no Brasil em 2011.<sup>1</sup> Ainda segundo o INCA, 12,7 milhões de novos diagnósticos indicando pacientes portadores de câncer são feitos no mundo e, por ano, em média, 7,6 milhões de pessoas morrem vítimas desta doença.<sup>1</sup> Mas, não é somente a evolução do câncer que é preocupante.

A indústria farmacêutica tem desenvolvido novos medicamentos gerando esperança para milhões de pacientes com novas técnicas para tratar a doença, através do bloqueio dos vasos sanguíneos que irrigam tumores, a exemplo de inúmeros medicamentos existentes no mercado, tais como, o Avastin, Erbitux, Herceptin, Rituxan, Tarceva, entre outros.<sup>2</sup> Porém, é fato também conhecido que os tratamentos quimioterápicos para o câncer são todos muito caros.<sup>3</sup>

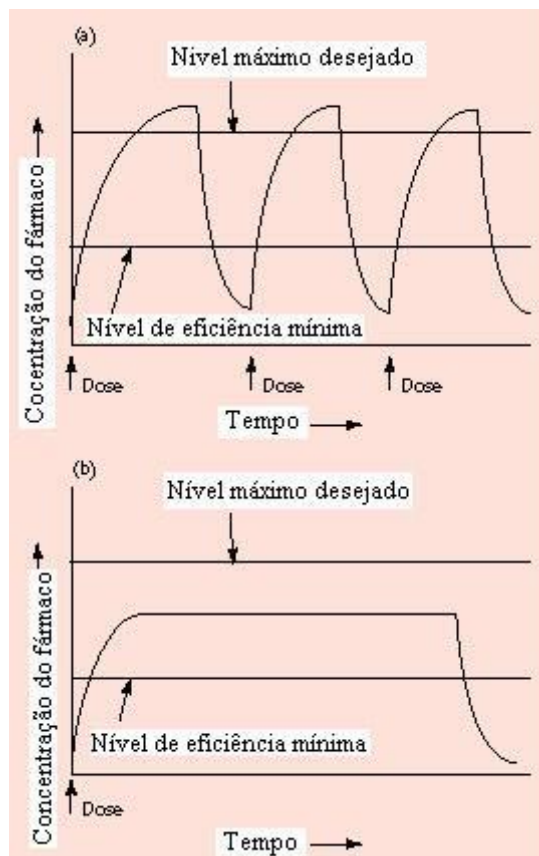
O Brasil, oitava economia mundial, com 8.511.864 km<sup>2</sup> de extensão e grande biodiversidade, tem segundo o censo de 2010, 192 milhões de habitantes, com um percentual considerável vivendo abaixo da linha de pobreza. Neste sentido, o desenvolvimento de fármacos economicamente acessíveis à população de baixa renda de nosso país deve se tornar uma premissa fundamental de nossas universidades e institutos de pesquisa.

A crotoxina, uma toxina produzida por serpentes brasileiras, parece despontar como uma

molécula promissora no tratamento do câncer. Contudo, como qualquer quimioterápico, possui uma toxicidade considerável para o ser humano.<sup>4-5</sup> Estudos da aplicação da crotoxina em pacientes para tratamento de Câncer Fase I, indicam que doses superiores a 0,21 mg/m<sup>2</sup> geram efeitos neurotóxicos farmacocinéticos desse fármaco, ao injetá-lo via intramuscular. No entanto, os parâmetros farmacológicos permitem concluir que 24 horas após a injeção, a toxina é virtualmente eliminada, pois os efeitos tóxicos residuais ou toxicidade cumulativa no curso do tratamento não podem ser notados. Aproximadamente, 3% da dose da toxina são eliminados nas três primeiras horas através da urina, o restante é desagregado e absorvido como aminoácidos.<sup>6</sup>

Quando as formulações orais ou injetáveis tradicionais do fármaco não puderem ser usadas devido à ação tóxica do componente bioativo, a utilização de um sistema de liberação controlada é o mais indicado. O sistema ideal de liberação de fármacos deve ser inerte, biologicamente compatível, mecanicamente adequado, confortável para o paciente, capaz de propiciar o transporte elevado da droga, seguro em relação à liberação acidental, simples de aplicação e remoção e de fácil fabricação e esterilização.<sup>7</sup>

Os sistemas de liberação controlada de fármacos são projetados para a administração de agentes ativos por longo tempo. A concentração do agente no sangue segue o perfil mostrado na Figura 1b, constante, entre o máximo e o mínimo, por um período de tempo prolongado. A Figura 1 representa a comparação da aplicação de fármacos por métodos tradicionais (Figura 1a), à administração através da liberação controlada (Figura 1b).



**Figura 1-** Nível do fármaco no sangue em função do tempo para dosagem tradicional (a) e sistema de liberação controlada (b).

A utilização de polímeros biocompatíveis, como transportadores de princípios bioativos para o projeto de sistemas de liberação controlada de fármacos, pode contribuir significativamente para diminuir a toxicidade de agentes antitumorais, uma vez que estes compostos são na sua maioria, desprovidos de seletividade.<sup>8</sup>

Este trabalho, portanto, é um estudo da liberação controlada da crotoxina incorporada à matriz do copolímero NN' dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona (PDMAm-co-VP), sintetizado pelo grupo de pesquisa em biomateriais da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI).

## MATERIAS E MÉTODOS

Com a finalidade de determinar a taxa de liberação controlada do fármaco, antes de ser inserida no copolímero, a crotoxina recebeu marcação com iodo-125 através de uma modificação da técnica clássica de marcação com cloraminaT.<sup>9</sup> A reação de marcação foi realizada a temperatura ambiente, adicionando os reagentes seguintes:

- 5 µg de crotoxina, dissolvida em 10 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4);
- 20 µL de tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH 7,4);
- 30 MBq (0,8 mCi) de radioisótopo;
- 0,8 µg de cloramina T em 12 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4);
- 5 minutos de espera;
- 1 µg de metabissulfito de sódio em 5 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4);
- 200 µg de iodeto de potássio em 200 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4) contendo 0,1% de soro albumina bovina.

A mistura de marcação foi purificada em coluna de exclusão molecular (Sephadex G- 100), sendo a crotoxina marcada eluída em tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo 0,1% de soro albumina bovina e 0,1% de azida sódica. O traçador foi armazenado a -20 °C.

Em uma segunda etapa, as pastilhas do bioconjugado Crotoxina-marcada/PDMAm-co-VP foram introduzidas em tubos contendo 10 mL de solução tampão PBS 7,4, a 37 °C. Alíquotas de 100 µL da solução tampão foram retiradas nos intervalos de tempo indicados no Quadro 1.

**Quadro 1** – Intervalos de tempo pré-determinados para a retirada das amostras da solução contendo o bioconjugado

Tempo (s)	5	10	20	40	60	600	1800	2400	7200
-----------	---	----	----	----	----	-----	------	------	------

A determinação quantitativa da massa de crotoxina liberada foi realizada em todas as alíquotas, através da determinação da radioatividade das amostras.

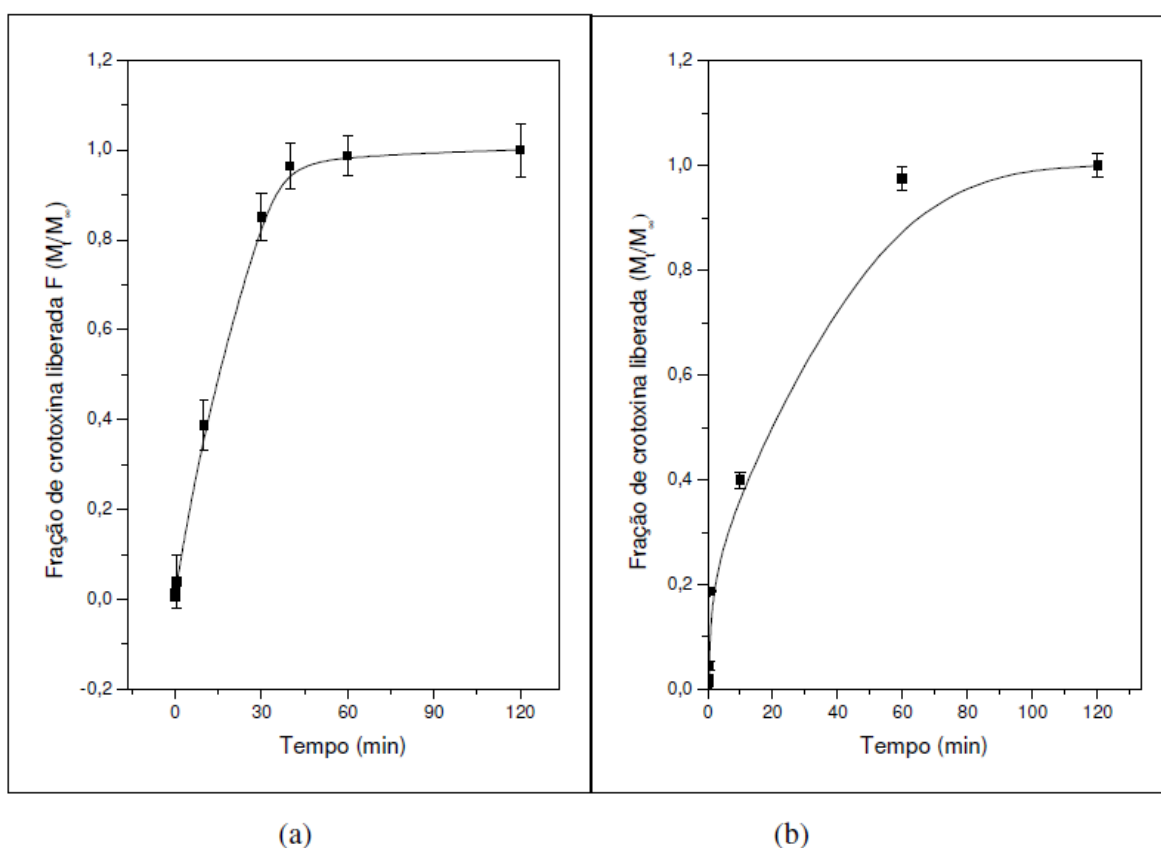
Todas as determinações foram realizadas em sistema automático de contagem de radiação gama tipo “poço” de cristal de NaI (T1), de 3x3 polegadas e dotado de analisador de impulsos. A janela foi ajustada para incluir a energia de 1 keV do <sup>125</sup>I. Todas as contagens foram prolongadas o suficiente para reduzir o erro estatístico a menos de 1 %.

## RESULTADOS

A Figura 2 ilustra a fração de liberação da crotoxina da matriz de PDMAm-co-VP em

função do tempo, à temperatura constante de 37°C para duas amostras de bioconjugado, com concentrações de CT 2,5 µg de crotoxina/g de PDMAm-co-VP e 1 µg de crotoxina/g de PDMAm-co-VP, respectivamente.

A taxa de liberação constante de crotoxina pode ser determinada a partir da inclinação da região das curvas 2 (a) e 2 (b) que apresenta cinética de primeira ordem. Os valores das taxas obtidos para o intervalo em que a liberação se deu de forma constante foram  $q_a = 4,55 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}/\text{min}$  e  $q_b = 1,441 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}/\text{min}$ . Foi possível notar que a pastilha com maior concentração de crotoxina apresentou maior taxa de liberação.



**Figura 2** – Fração de crotoxina liberada em função do tempo de dissolução do sistema. (a) Amostra com concentração de  $2,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}$  de crotoxina por g de DPMAm-co-VP. (b) Amostra com concentração de  $1,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}$  de crotoxina por g de DPMAmco-VP. % de VP no copolímero = 45%, temperatura = 37 °C, solução PBS, pH 7,4.

## DISCUSSÃO

Os sistemas poliméricos de liberação controlada por difusão são os mais comuns e dois

tipos são descritos. No primeiro, o agente bioativo (fármaco) forma uma partícula interna (caroço), envolvida por uma barreira de difusão inerte.

Estes sistemas incluem membranas, cápsulas, nanocápsulas, lipossomas e fibras ocas. O segundo tipo é um sólido monolítico no qual o agente ativo é disperso ou dissolvido em um polímero inerte e a difusão do fármaco é a etapa limitante, sendo a taxa de liberação dependente da escolha do polímero. Assim, para que ocorra a difusão, o polímero deve se intumescer no fluido fisiológico, o que leva ao abaixamento da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), tornando o material mais plástico. Deste modo, o fármaco contido na matriz pode se difundir para o meio externo.

O tipo de transporte da crotoxina do copolímero PDMAm-co-VP, calculado de acordo com a lei de Fick foram  $na = 0,76$  e  $nb = 0,71$ . Para ambos os casos, o tipo de transporte indicado pelo valor de  $n$  é anômalo, sugerindo uma interação entre o biopolímero (CT) e o copolímero PDMAm-co-VP.

O fato da taxa de liberação sofrer variação devido à diferença entre as concentrações iniciais do fármaco, ocorreu provavelmente, porque, no caso da menor taxa de liberação, o sistema PDMAm-co-VP/CT apresentava maior concentração de polímero e, portanto, de acordo com a teoria da reptação, as cadeias poliméricas precisaram percorrer uma distância maior dentro dos novelos (maiores) para se desentrelaçarem totalmente.<sup>10</sup> Além disso, para o bioconjugado com taxas mais elevadas, o sistema deve apresentar uma pressão interna mais acentuada, motivada por uma maior concentração, provocando, dessa forma, maior velocidade de dissolução do sistema e conseqüentemente, maior taxa de liberação do componente bioativo.

A liberação controlada de CT da matriz de PDMAm-co-VP parece estar associada à concentração de crotoxina presente na matriz polimérica. Esta observação gera suspeitas de presença de interações intermoleculares entre o copolímero PDMAm-co-VP e o princípio bioativo (CT).

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer. Dia Mundial do Câncer [Internet]. [Citado 2011 Jun 14]. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/dia\\_mundial\\_do\\_cancer/site/2011](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/dia_mundial_do_cancer/site/2011).
2. Nistla B. The future of oncology [Internet]. 2009. [Citado 2011 Jun 14]. Disponível em: [http://www.worldpharmaceuticals.net/editorials/016-sept09/WPF016\\_thefuture.pdf](http://www.worldpharmaceuticals.net/editorials/016-sept09/WPF016_thefuture.pdf).
3. Instituto Nacional do Câncer. Custo de tratamento do câncer aumentará oito vezes nos próximos dois anos e sairá sete vezes mais caro que ações de prevenção [Internet]. [Citado 2009 Dez 13]. Disponível em [HTTP://www.inca.gov.br/releases/press\\_real\\_se.view\\_.asp?ID=1600](http://www.inca.gov.br/releases/press_real_se.view_.asp?ID=1600).
4. Vidal JC. Crotoxin complex as cytotoxic agent. USPTO 5,164,196, Nov; 1992. p.11.
5. Vidal JC. Mixture of a non-covalent heterodimer complex and a basic amphiphatic peptide as a cytotoxic agent,

É fato conhecido da literatura que o PVP exibe uma série de interações com moléculas pequenas em solução e que formam complexos com variedades dessas moléculas. Estes estudos têm mostrado que ambas as interações hidrofóbicas e eletrostáticas do anel íon lactona podem existir em soluções aquosas. Na presença de doadores de hidrogênio, tais como a água, o mesomerismo na unidade métrica Vinilpirrolidona.<sup>11</sup>

Existindo o efeito mesomérico no copolímero PDMAm-co-VP poderia haver a formação de um complexo de transferência de carga com a proteína crotoxina<sup>12-13</sup>. Neste caso, um complexo entre o PDMAm-co-VP e a crotoxina poderia ser formado por associação entre a proteína e a macromolécula sintética, via complexos  $\pi$ - $\sigma$  ou  $\pi$ - $\pi$ , frequentemente chamados de interações de transferência de carga ou do tipo elétron doador – receptor.<sup>12-13</sup> As interações de transferência de carga dos aminoácidos aromáticos protéicos com polímeros sintéticos têm sido estudadas e vêm sendo apontadas como interações de transferência de cargas.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que o estudo da liberação controlada da matriz de poli (dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona) indicou taxa de liberação de crotoxina constante durante 42 minutos, governada pela dissolução da camada de gel. Dessa forma, o sistema PDMAm-co-VP/crotoxina mostrou-se capaz de evitar que doses de crotoxina administradas sejam totalmente absorvidas em curto intervalo de tempo, sendo assim, se revelou um material promissor para aplicação em sistema de liberação controlada erosível.

Além disso, foi possível notar interação entre a matriz polimérica, fator que interfere na taxa de liberação do fármaco.

- Inventor. USPTO 5,232,911, ago; 1993. p.10.
6. Cura JE, Blanzaco PD, Cura MA, Dinápoli HA, De Root AR, Vidal JC. Pharmacokinetics of crotoxin in human patients. Clin Cancer Res. 2002;8:1033-41.
  7. Vert M, Li S, Garreau H. More about the degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media. J Control Release. 1991;16:15-26.
  8. Benita S. Microencapsulation: methods and industrial applications. New York: Marcel Dekker; 1996.
  9. Tribela MTCP, Bianco AC, Bartolini P. The use of recombinant human thyrotropin produced by Chinese Hamster Ovary Cells for the preparation of immunoassay reagents. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81:249-56.
  10. Narasimhan B, Peppas NA. Disentanglement and reptation during dissolution of Rubbery Polymers: J Polymer Sci. 1996;34:947- 61.
  11. Kimeritici M, Gok E, Ates S. Protein adsorption behavior of ionogenic poly(HEMA) membranes: a fluorescence study. J Biomaterials Sci. 1994;6(5): 425-33.
  12. Jennissen HP, Demirelou A. Base-atom recognition in protein adsorption to alkyl agaroses. J chromatogr. 1992;597:93-100.
  14. Kiremitici M, Gok E, Ates S. Protein adsorption behavior of ionogenic poly(HEMA) membranes: a fluorescence study. J biomaterials Sci.1994; 6(5):425-33.

Este trabalho realizou-se durante o curso de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Itajubá sob orientação do professor Álvaro Antônio Alencar De Queiroz

**Correspondência:** Rodrigo de Lima Nascimento  
Rua Brasópolis, 160. Bairro: Primavera Pouso Alegre/MG Telefone: 9996-5380  
CEP: 37550-000 E-mail: profrodlima@yahoo.com.