

ESTRATÉGIAS, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DOSAGEM DE INSULINA POR HPLC



Falco, L.F.G.; Araújo, T.M.F.; Höehr, N. F.
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - FCM

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

PALAVRAS CHAVE: INSULINA, HPLC, DIABETES, NANOPARTÍCULAS

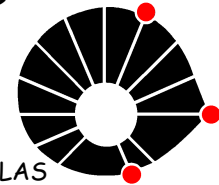
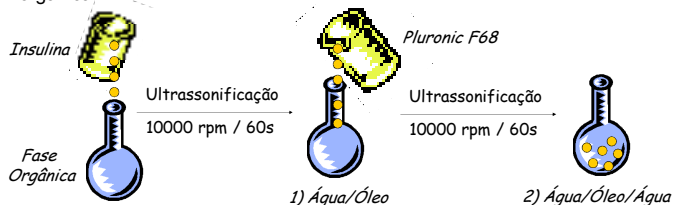
FINANCIAMENTO: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ

Introdução:

Descoberta em 1921, o tratamento com insulina permitiu a melhoria no prognóstico de pacientes com diabetes. Associado à glicose sanguínea, o hormônio também apresenta íntimas relações com a regulação de vias metabólicas do controle de gorduras e carboidratos. Este projeto propõe a elaboração de nanopartículas de insulina por dupla emulsificação de homopolímeros de poli ϵ -caprolactona (PCL). Através deste sistema de carreadores de fármacos com polímeros biodegradáveis, será possível o controle sobre fatores físico químicos responsáveis pela liberação do fármaco no organismo ou mesmo relacionados à meia vida do mesmo. Procedeu-se em seguida a caracterização das partículas obtidas após o processo de dupla emulsificação. Através de análise em CLAE, com metodologia desenvolvida e padronizada, com amostra biológica de animais diabéticos e a quantificação do hormônio em plasma sanguíneo, pode-se determinar a efetividade de encapsulamento. A morfologia das partículas foi verificada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e o tamanho médio assim como potencial ZETA determinado com o aparelho Zetasizer nano ZS.

Materiais e Métodos

As Nanopartículas de insulina foram obtidas através da adição de **100 μ L** a uma solução, contendo fase orgânica, com **diclorometano PA com policaprolactona PCL e SPAN 60**, seguido de ultrassonificação a **10000 rpm**. Tem-se a primeira emulsão água/óleo. Segue-se com adição de outra solução, contendo **Pluronic F68 em tampão fosfato pH 3,0** com nova ultrassonificação para obtenção da nova fase água/óleo/água, seguida de evaporação do solvente. A análise de efetividade de encapsulamento foi verificada em coluna C18 com fase móvel isocrática (H₂O / AcN 70:30 v/v). A amostra biológica coletada (sangue) foi coletada em **tubo heparinizado** e centrifugada a **12000 rpm, por 10min**, em temperatura ambiente. Através de extração líquido-líquido com adição de **3ml de solução diclorometano-n-hexano (1:1 v/v)** com nova centrifugação **3500rpm por 10min**, com evaporação da fase orgânica e adição ao sistema CLAE da fase orgânica



Caracterização de partículas

A morfologia das partículas foi verificada através de fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

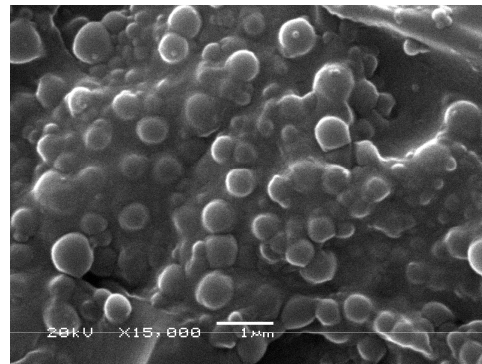


FIGURA 1: Fotomicrografia de nanopartículas de insulina obtida por M.E.V.

Método Analítico

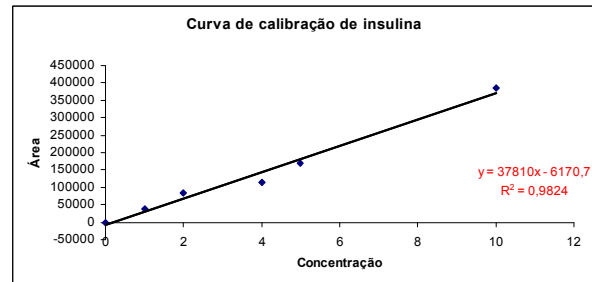


FIGURA 2: Curva de calibração, CLAE obtida para análise de insulina. Coluna C18, fase móvel isocrática (70% água deionizada acidificada com ácido ortofosfórico, 30% AcN)

Resultados e Conclusões

Através das técnicas empregadas, foram obtidas partículas com tamanho médio de 790nm verificados através do aparelho Zetasier Nano ZS assim como o potencial Zeta aferido deu-se em -39,2. A efetividade de encapsulamento da insulina ocorreu em torno de 89%, classificado como alta eficiência, o método analítico foi desenvolvido com sucesso e com boa reprodutibilidade.

