



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANNA EMMANUELA MEDEIROS DE BRITO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO-
CO-GLICÓLICO) PARA VEICULAÇÃO INTRAVENOSA DE L-
ASPARAGINASE**

Campina Grande, 17 de Fevereiro de 2017

Anna Emmanuela Medeiros de Brito

Desenvolvimento de nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) para veiculação intravenosa de L-asparaginase

Trabalho apresentado com objetivo de requerer título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba.

Aluna: Anna Emmanuela Medeiros de Brito

Orientador: José Alexsandro da Silva

Campina Grande, 17 de Fevereiro de 2017

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

B862d Brito, Anna Emmanuela Medeiros de.
Desenvolvimento de nanopartículas de poli (ácido lático-co-glicólico) para veiculação intravenosa de L-asparaginase [manuscrito] / Anna Emmanuela Medeiros de Brito. - 2017.
90 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. José Alexandre da Silva, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

1. L-asparaginase. 2. Nanobiotecnologia. 3. Quimioterapia.
4. Biofármacos. I. Título.

21. ed. CDD 615.329

ANNA EMMANUELA MEDEIROS DE BRITO

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO-CO-GLICÓLICO) PARA VEICULAÇÃO intravenosa de L-asparaginase

Trabalho apresentado com objetivo de requerer título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba.

Aprovada em: 17 / 02 / 2017


Prof. Dr. José Alexsandro da Silva

Presidente da banca/Orientador


Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira
Banca Examinadora – Membro Interno- UEPB - PB


Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
Banca Examinadora – Membro Externo – UFPE - PE

Aos meus pais (Beneildo e Luciene) e irmãs (Karol e Katharina), não há palavras para descrever o amor que sinto por vocês! Muito obrigada por me fazerem sentir tão amada, por me ensinarem os valores mais importantes da vida, por me apoiarem nas minhas escolhas e por vibrarem comigo em todas as conquistas. Muito obrigada por todos os esforços realizados para que eu chegasse até aqui! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus, pela força e amor;

Aos meus avós paternos Benedito e Naide, e maternos Cilo e Luíza (em memória) por todo amor a mim dedicado;

A todos os meus familiares pelo apoio, pela torcida e pelo carinho;

À Alexandra Apolinário, por me guiar, pelos MUITOS ensinamentos, pela confiança em mim depositada e por todo o apoio na realização deste trabalho. Obrigada por me mostrar, por meio de suas atitudes, que devo sempre buscar a excelência e também por todo carinho, atenção e amizade;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Aleksandro da Silva pela orientação neste trabalho, confiança e pelas oportunidades de conhecimento ao longo do mestrado;

À Universidade Estadual de São Paulo (USP), pela oportunidade de aprendizado e aperfeiçoamento;

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todo conhecimento adquirido;

Ao querido professor Adalberto Pessoa Júnior por me acolher de braços abertos, pela oportunidade, atenção, disponibilidade e carinho;

Aos Professores Carlota Rangel Yagui e Bolívar Damasceno pelas contribuições e por abrirem as portas de seus laboratórios;

Ao PROCAD por toda oportunidade de desenvolvimento da minha pesquisa;

Ao NanoBio (USP), LaBiotec (USP), LEC (USP), LDCPF (UEPB), CERTBIO (UFMG/UEPB) e a Fiocruz (professora Karina Saraiva) por todas as contribuições a este trabalho;

Aos meus companheiros do LDCPF, principalmente Thayse, Camila, Salete, Bruna, Karoll e Airlla pela força, ajuda e amizade;

Aos meus companheiros do NanoBio e LaBiotec, em especial Valker, Ju, Gi, Lu, Karin, João, Miusa, Alex, Larissa e Camila por todo apoio, contribuições e pelo afeto sempre demonstrado;

Ao meu namorado, Yargo, pelo companheirismo, carinho e atenção;

Aos meus amigos Rhaisa, Nayara, Priscilla, Eduardo, Sol, Cleice, Ana Luíza, Lu, Raquel, Kalline, Desireé, Luana, Isack, Elaine, Marty e Lívia pelo carinho e incentivo durante esse período;

Obrigada a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu trabalho.

LISTA DE ABREVIACES

L-ASNase- L-Asparaginase

Asn-Asparagina

DLS-*Dynamic light scattering*

DMSO-Dimetilsufido

FDA-Food and Drug Administration

LLA-Leucemia linfide aguda

MEV-Microscopia eletrnica de varredura

NPs- Nanopartulas

PLGA - Poli cido (ltico-co-glicico)

PVA- lcool polivinilico

RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é um tipo de câncer que compromete a maturação das células sanguíneas da linhagem linfoblástica, sendo prevalente em crianças, mas com boas chances de cura advinda da quimioterapia. O biofármaco L-asparaginase (L-ASNase) é um dos principais fármacos usados no tratamento desta neoplasia, porém a imunogenicidade advinda da origem bacteriana da enzima atualmente produzida e o consequente tempo de meia-vida curto são desafios a serem vencidos pela indústria farmacêutica. Neste sentido, a nanobiotecnologia é uma ampla plataforma para o desenvolvimento de *drug delivery* visando o carreamento de enzimas terapêuticas, podendo além de contornar estes problemas, ainda permitir melhor estabilidade das proteínas no que diz respeito à agregação e desnaturação que resultam em diminuição da atividade enzimática e consequentemente da ação farmacológica. Assim, o objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de nanopartículas do tipo nanoesferas de poli (ácido lático- co- glicólico) (PLGA) para encapsulação da L-ASNase. O método de dupla emulsificação por homogeneização com ultraturrax ou cavitação com sonda de ultrassom foi usado para obtenção dos sistemas, empregando diferentes tempos (30 ou 60 s) e a partir de dois tipos de PLGA 50:50 com diferentes pesos moleculares (30-60 KDa e 24-38 KDa) e álcool polivinílico (PVA) nas concentrações de 0,5;1;1,5 e 2%. O tamanho e polidispersão das nanopartículas foram avaliados por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A avaliação da encapsulação da L-ASNase foi realizada por meio da quantificação de proteínas totais através do método indireto (no sobrenadante) e direto (no sistema de nanopartículas rompido). Através da nesslerização foi possível observar que a enzima encapsulada apresentou maior atividade que a enzima livre. O estudo de liberação da enzima foi realizado por meio de diálise, onde foi liberada < 60% de proteína em 48 horas. O monitoramento da encapsulação da L-ASNase foi feito por meio de eletroforese com gel nativo e zimograma. Também foi empregado dicróismo circular para avaliação das alterações conformacionais da enzima encapsulada. A partir do PLGA 30-60 KDa foram obtidos sistemas com tamanhos predominantemente entre 400 nm e até mais de 1 µm, com grande variação de tamanhos entre eles, já para PLGA 24-38 KDa a faixa de tamanho é de 380 nm a 670 nm. A cavitação e maior concentração de PVA resultou na formação de sistemas sem coalescência. O sistema feito com PLGA 24-38 KDa obtido por cavitação com PVA 1% com tempo de homogeneização de 60 s foi escolhido para encapsulação da ASNase e apresentou eficiência de encapsulação pelo método direto de 86,67 % ($\pm 1,84$) e pelo método indireto de 95,35% ($\pm 0,06$). De acordo com o ensaio de hemólise, os sistemas com e sem a enzima se mostraram não hemolíticos.

Palavras-chave: L-asparaginase, nanobiotecnologia, quimioterapia, nanopartículas, PLGA.

ABSTRACT

Acute lymphocytic leukemia (ALL) is a type of cancer that compromises the maturation of blood cells of the lymphoblastic lineage, being prevalent in children, but with a good chance of cure due to chemotherapy. The biopharmaceutical L-asparaginase (L-ASNase) is one of the main drugs used in the treatment of this neoplasm, but the immunogenicity derived from the bacterial origin of the enzyme currently produced and the consequent short half-life are challenges to be overcome by the pharmaceutical industry. In this sense, nanobiotechnology is a broad platform for the development of drug delivery aimed at the transport of therapeutic enzymes, besides being able to overcome these problems, it still allows better protein stability with regard to aggregation and denaturation that result in a decrease in enzymatic activity and consequently the pharmacological action. Thus, the objective of this work was to obtain and characterize poly (lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles (PLGA) for L-ASNase encapsulation. The double emulsification method by homoturrizing with ultraturrax or cavitation with ultrasound probe was used to obtain the systems, using different times (30 or 60 s) and from two types of PLGA 50:50 with different molecular weights (30-60 KDa e 24-38 KDa) and polyvinyl alcohol (PVA) at concentrations of 0.5, 1, 1.5 and 2%. The size and polydispersity of the nanoparticles were evaluated by dynamic light scattering (DLS). The evaluation of the ASNase encapsulation was performed by quantification of total proteins by the indirect (in the supernatant) and direct method (in the ruptured nanoparticle system). By the nessler method, it was possible to observe that the encapsulated enzyme presented greater activity than the free enzyme. The enzyme release study was performed by dialysis, where < 60% of protein was released in 48 hours. The L-ASNase encapsulation monitoring was performed using native gel electrophoresis and zymogram. Circular dichroism was also used to evaluate the conformational changes of the encapsulated enzyme. From PLGA 30-60 KDa systems were obtained with sizes predominantly between 400 and up to more than 1 μm , with large variation in sizes between them, and for PLGA 24-38 KDa the size range is from 380 nm to 670 nm. Cavitation and higher concentration of PVA resulted in the formation of systems without coalescence. The system made with PLGA 24-38 KDa obtained by cavitation with 1% PVA with homogenization time of 60 s was chosen for ASNase encapsulation and presented encapsulation efficiency by the direct method of 86.67% (± 1.84) and by the method of 95.35% (± 0.06). According to the hemolysis essay, the systems with and without the enzyme were nonhemolytic.

Keywords: L-asparaginase, nanobiotechnology, chemotherapy, nanoparticles, PLGA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	13
2.2 L-Asparaginase (ASNase)	15
2.2.1 <i>Histórico</i>	15
2.2.2 <i>Mecanismo de ação</i>	16
2.2.3 <i>Biofármacos disponíveis no mercado</i>	17
2.2.4 <i>Estrutura da L-asparaginase</i>	17
2.2.5 <i>Limitações do uso</i>	18
2.3 Nanotecnologia	19
2.4 Nanopartículas	23
2.4.1 <i>PLGA (Poli (ácido láctico-co-glicólico))</i>	23
2.4.2 <i>Preparação de nanopartículas de PLGA pelo método de dupla emulsificação</i>	24
OBJETIVOS	26
CAPÍTULO I: Artigo I- Delineamento de diferentes composições e técnicas de produção de nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico): desafios nanobiotecnológicos para a encapsulação da L-asparaginase	27
CAPÍTULO II: Artigo II- Estabilização da L-Asparaginase em nanoesferas de PLGA resulta em melhor performance desta enzima	51
PESPECTIVAS FUTURAS	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE	88

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A L-Asparaginase (L-ASNase) é um agente antineoplásico amplamente usado no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA), considerado o tipo mais comum de câncer infantil que no entanto, possui bom prognóstico, com 95% de remissão completa em casos tratados com quimioterapia (NARTA et al., 2007; PEDROSA, 2002). É uma enzima homotetramérica, composta por quatro subunidades, com um sítio ativo em cada uma destas. A estabilidade limitada desta enzima em ambientes biológicos com diferentes níveis de pH, temperatura e força iônica (WOLF, 2003), como também a necessidade de administração repetida que provoca hipersensibilidade (reações alérgicas ligeiras a anafilaxia) e imunogenicidade, constituem desvantagens de sua utilização. Além disso, aspectos farmacológicos como a depleção sérica da enzima e o desenvolvimento de resistência acabam por reduzir a eficiência terapêutica da L-ASNase (AVRAMIS, 2012).

Apesar da L-ASNase fazer parte dos protocolos de tratamento da LLA, ainda há a necessidade de tecnologias que contornem alguns aspectos indesejáveis inerentes à enzima como meia-vida curta provocada pela imunogenicidade. A imunogenicidade é devido à produção de anticorpos que causam a rápida inativação da enzima e posterior resistência à mesma levando a uma variação no tempo de meia-vida que pode ir desde 1 (um) dia para L-ASNase nativa para até 14 (quatorze) dias nas formas peguiladas (NARTA et al., 2007; ASHRAFI et al., 2013; PIETERS et al., 2011).

Além disso, danos hepáticos e pancreáticos também podem acontecer e estão ligados à atividade glutaminásica (REINERT et al., 2006). Desta forma, existe a necessidade de desenvolvimento de tecnologias inovadoras que possam contornar esses problemas. Neste sentido, a literatura relata alguns sistemas de liberação ou mesmo modificações na molécula com objetivo de aumentar o tempo de circulação da L-ASNase e reduzir a hipersensibilidade (PIETERS et al., 2011). A utilização de polietilenoglicol (PEG) por conjugação à molécula é uma estratégia de sucesso na maioria dos estudos apresentados. Polissacarídeos como dextrana e inulina também já foram investigados para aumentar o tempo de meia-vida, diminuir a proteólise e imunogenicidade da L-ASNase (POZNANSKY et al., 1982; WILEMAN, 1991). A L-ASNase recentemente foi conjugada com ácido graxos, o que resultou em melhor estabilidade da enzima e maior afinidade pela L-asparagina (L-asp) (ASHRAFI et al., 2013).

O desenvolvimento de sistemas que encapsulem a enzima e sejam capazes de promover sua liberação na circulação representam uma alternativa para promover um maior tempo de circulação da mesma e reduzir a imunogenicidade. Neste aspecto, nanopartículas de poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) foram relatadas como carreadores para L-ASNase e apresentaram um aumento da meia-vida da enzima levando a uma distribuição contínua da proteína (MANUELA GASPAR et al., 1998; WOLF et al., 2003). A utilização de lipossomas também foi investigada e resultou em aumento da atividade anti-tumoral do fármaco e prevenção da formação de anticorpos (MANUELA GASPAR et al, 1996).

Apesar dos sistemas mencionados, ainda não há no mercado um veículo viável que permita contornar todos os problemas relatados especialmente quanto à farmacocinética da macromolécula, além disso, não basta apenas chegar a um sistema que encapsule a enzima, mas o mesmo deve apresentar-se estável, biodegradável, biocompatível e por assim dizer hemocompatível. A ideia de elaborar sistemas para tratamentos mais eficazes em escala nanométrica visa a destruição preferencial de células cancerosas sem danos as células normais. A nanotecnologia é uma ferramenta com possibilidades para detecção precoce e tratamento do câncer, estas incluem: lipossomas, nanopartículas (NPs), dendrímeros, micelas poliméricas, polimerossomos dentre outros. As NPs, por sua vez, oferecem muitos benefícios e novas oportunidades de abordagem diante da complexidade do câncer. Estas constituem partículas coloidais de tamanho sub-mícron com o agente terapêutico de interesse encapsulado dentro da sua matriz polimérica ou adsorvido ou conjugado sobre a superfície (SAHOO; LABHASETWAR, 2003). NPs poliméricas são amplamente utilizadas visando à administração de fármacos para alvos específicos (BHARALI et al, 2009; SPARREBOOM et al., 2005; ACHARYA et al., 2009). Um dos polímeros mais usados em sua produção é poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA), que apresenta vantagens como biodegradabilidade e biocompatibilidade.

Desenvolver sistemas de liberação para proteínas requer um sistema de encapsulação e liberação diferente daqueles comumente empregados para fármacos sintéticos, em razão, sobretudo, do maior tamanho e da hidrofília destas moléculas, além das mudanças conformacionais que estas biomoléculas estão sujeitas e que podem resultar em perda da atividade (LI et al., 2012). Para encapsulação de fármacos hidrofílicos ou mesmo de proteínas, NPs produzidas pelo método da dupla emulsificação constituem o sistema de escolha.

Diante da importância terapêutica da L-ASNase, dos problemas inerentes a este biofármaco, bem como das limitações no desenvolvimento de sistemas terapêuticos para encapsulação de proteínas, o que ainda representa um desafio a ser vencido pela tecnologia farmacêutica, este trabalho objetiva o desenvolvimento e caracterização de um sistema para liberação da L-ASNase que contorne os problemas que permeiam à terapêutica com esta enzima.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, cujos os mesmos estão apresentados em formato de artigo. O capítulo I aborda condições de formação de nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) para encapsulação da L-asparaginase em um breve estudo qualitativo da composição e das técnicas de elaboração e o capítulo II os desafios para a nanoencapsulação da L-Asparaginase e liberação desta enzima em nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Leucemia Linfóide aguda (LLA)*

A LLA corresponde a uma neoplasia maligna de linfócitos, a qual caracteriza-se pelo acúmulo de células sanguíneas imaturas na medula óssea, sangue periférico e outros órgãos hematopoiéticos. Sabe-se que alterações nos genes que controlam a homeostase da célula linfóide são responsáveis pela expansão clonal desregulada de células progenitoras imaturas, originando células leucêmicas chamadas de linfoblastos (BEKKER-MÉNDEZ et al., 2014; PAN et al., 2014; HAGAG;NOSAIR, 2015), e que apesar da alteração genética ser um fator importante no desenvolvimento da LLA, alguns fatores de risco ambiental também parecem estar associados a uma maior susceptibilidade à esta doença, como por exemplo a radiação ionizante, que está relacionado com a LLA principalmente quando a exposição ocorre durante a vida intra-uterina ou durante o início da infância. A relevância do risco causado por esta radiação depende da dose recebida, duração dessa exposição e a idade do indivíduo (NOSHCHENKO et al., 2001; BELSON *et al.*, 2007).

Estudos mostram que o pico de incidência de LLA, assim como da ocorrência de infecções, ocorre entre crianças de dois a cinco anos de idade, quando o sistema imunológico ainda está em desenvolvimento (BELSON et al., 2007), é mais frequentemente reportada em indivíduos do sexo masculino, além de ocorrer uma variação étnica indicando maior incidência em crianças brancas em relação às negras, como também em portadores de outras afecções, como distúrbios genéticos ou síndromes de imunodeficiência (LEITE et al., 2007; ONCIU, 2009). Sinais e sintomas da LLA são atribuídos à substituição das células hematopoiéticas normais pelas células leucêmicas (blastos), assim como pelo crescimento descontrolado destas. A sintomatologia mais típica está associada aos graus de anemia, neutropenia, trombocitopenia e alterações laboratoriais (PUI; THIEL, 2009). Manifestações secundárias podem aparecer a partir da proliferação de blastos e estão relacionadas a infiltração dos mesmos em diferentes órgãos do corpo como rins, amígdalas, pele, linfonodos, baço e outros. É importante salientar que várias outras doenças de menor gravidade podem apresentar sintomatologia semelhante, sendo essencial um diagnóstico rápido e preciso (NEHMY et al., 2011). Para isso, faz-se necessário a realização de um mielograma, o qual deverá ser complementado com exames de imunofenotipagem,

citogenética e biologia molecular, os quais também são importantes para a escolha do esquema terapêutico (CIUDAD et al., 1998; COUSTAN-SMITH et al., 2011).

O tratamento da LLA melhorou muito ao longo dos últimos anos, devido ao desenvolvimento de novos medicamentos e protocolos terapêuticos bem estabelecidos. Essa evolução pode ser representada através do aumento das taxas de sobrevivência em pacientes infantis que, em 1960, era de 10% e nos dias atuais, gira em torno de 75 a 80% (HENZE, 2008; PIETERS et al., 2011). O protocolo de tratamento da LLA utilizado atualmente combina drogas com diferentes mecanismos de ação e se divide em três fases importantes: indução, consolidação e manutenção, sendo necessário o entendimento e a distinção delas. Na fase da indução, o objetivo é o retorno da hematopoiese normal e levar os pacientes à remissão da doença. É realizada através da utilização de uma combinação de quatro agentes antineoplásicos, entre eles, a L-ASNase e tem duração de aproximadamente quatro semanas e as taxas de remissão atingidas giram em torno de 95% (ANDRADE et al, 2014; QUINTANILLA-FLORES et al., 2014). A segunda fase, consolidação, busca manter a remissão e prevenir infiltrações no Sistema Nervoso Central (SNC). Nesta fase ocorre administração de altas doses de metrotexato e sua duração varia de 2 a 8 meses de tratamento. Na última fase é realizada a terapia de manutenção propriamente dita com duração de, pelo menos, dois anos para o devido controle da doença. Nesta faz-se a utilização de doses baixas de metrotexato combinado na grande maioria dos esquemas com mercaptopurina (JEHA; PUI, 2009). Pacientes que não respondem bem a quimioterapia são direcionados a realização do transplante, procedimento este realizado com células extraídas da medula óssea, do sangue periférico ou do cordão umbilical de um doador compatível (JEHA; PUI, 2009).

Um dos grandes inconvenientes durante o tratamento da LLA ou qualquer outra neoplasia maligna, é o fato de serem requeridas doses altas da quimioterapia para destruição das células neoplásicas, acarretando em alta toxicidade para as normais. Este fato culmina na procura de tratamentos mais eficazes e específicos. Existe linhagens de células neoplásicas que não são capazes de produzir seus próprios aminoácidos, sendo dependentes daqueles presentes no plasma para realizar sua síntese protéica. Isso torna-se a base do aprimoramento do tratamento, considerado mais seletivo e que reduz os níveis plasmáticos de aminoácidos, induzindo a apoptose de células neoplásicas, sem, no entanto, comprometer as células saudáveis (FERNANDEZ et al., 2013; GUILLEME et al., 2013).

2.2 L-asparaginase (L-ASNase)

2.2.1 Histórico

A L-ASNase é um agente quimioterapêutico importante no tratamento da LLA. Em 1922, em um artigo publicado, Clementi afirmou que o soro de porquinho da índia apresentava altos níveis de L-ASNase (CLEMENTI, 1922). No início dos anos 1950, Kidd identificou que o soro de porquinhos da índia tinha a capacidade de controlar a progressão de linfomas em ratos. Durante experimento, ratos com linfomas foram transplantados e a estes foram administradas injeções intraperitoneais de soro normal (controle) e de soro de cobaias. Este tratamento conduziu a uma regressão dos linfomas e sobrevivência dos ratos tratados com o soro de cobaias, enquanto os tratados com o controle tiveram uma progressão no crescimento do linfoma e morreram dentro de 20--30 dias (KIDD, 1953). Em 1963, Broome correlacionou os resultados de Clementi e Kidd, afirmando que a atividade antitumoral se devia a atividade enzimática da L-ASNase (BROOME, 1963).

Estas observações também atraíram outros investigadores para a detecção do potencial anti-cancerígeno desta enzima, e verificou-se que apenas o soro de cobaias tinha essa atividade, enquanto os soros de outros animais, como cavalos e coelhos não mostraram atividade comparável (KIDD, 1953). Além disso, os mesmos soros foram testados contra vários tipos de câncer e verificou que ele é eficaz contra apenas alguns tipos e não todos. Apesar do conhecimento da teoria por detrás da utilização da enzima, houve alguns desafios em sua utilização clínica devido a baixa quantidade de L-ASNase obtida do soro de cobaias para a realização de mais testes clínicos.

Foi apenas em 1964 que Mashburn e Wriston investigaram uma fonte alternativa da enzima, L-ASNase de *Escherichia coli*, que se tornou de interesse primário. Dois tipos de asparaginases foram isoladas a partir de *E. coli*, ou seja, CE-1 (Periplasmático) e CE-2 (Citoplasmático) (MASHBURN; WRISTON, 1964). No entanto, apenas CE-2 exibiu atividade antitumoral. Estes resultados forneceram a base para a prática de produção da enzima em grandes quantidades para estudos pré-clínicos e clínicos. O primeiro ensaio clínico com L-ASNase foi realizado em 1966 por Dolowy (DOLOWY et al., 1966), que concluiu ser um importante agente quimioterapêutico devido à sua capacidade para a hidrólise de L-asparagina em L-aspártico e amônia.

2.2.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da L-ASNase foi elucidado por BROOME (1968), após evidenciar que a regressão de linfomas em ratos e camundongos em consequência do tratamento com soro de porcos cobaias, previamente observada por KIDD (1953), ocorria devido à ação hidrolítica da L-ASNase sobre o aminoácido não-essencial L-asparagina. A enzima catalisa no meio extracelular a hidrólise da L-asparagina (L-asp) em ácido aspártico e amônia. As células neoplásicas, especialmente os linfócitos, necessitam de uma enorme quantidade de asparagina devido seu rápido crescimento. Isto implica que estas células tumorais precisam utilizar a asparagina que é sintetizada pela própria célula, a qual é limitada, como também a presente no soro sanguíneo, oriunda da alimentação, para assim suprir sua demanda (NARTA et al., 2007). A reação enzimática de hidrólise realizada pela L-ASNase depleta rapidamente os níveis de asparagina presentes no corpo. Diante do fato de que algumas células tumorais são incapazes de garantir seu próprio fornecimento de asparagina, a resposta ao tratamento com a L-ASNase é positiva, visto que as células dependem da captação do aminoácido extracelular (MULLER;BOSS, 1998; BUSHMAN et al., 2000; DHALE;MOHAN-KUMARI, 2014). Desta forma, ocorre a inibição da produção de DNA e RNA, devido a carência de asparagina, com posterior deterioração da função celular e apoptose das células neoplásicas (FERNANDEZ et al., 2013; GUILLEME et al., 2013). Abaixo segue o mecanismo de ação da ASNase ilustrado na figura 1.

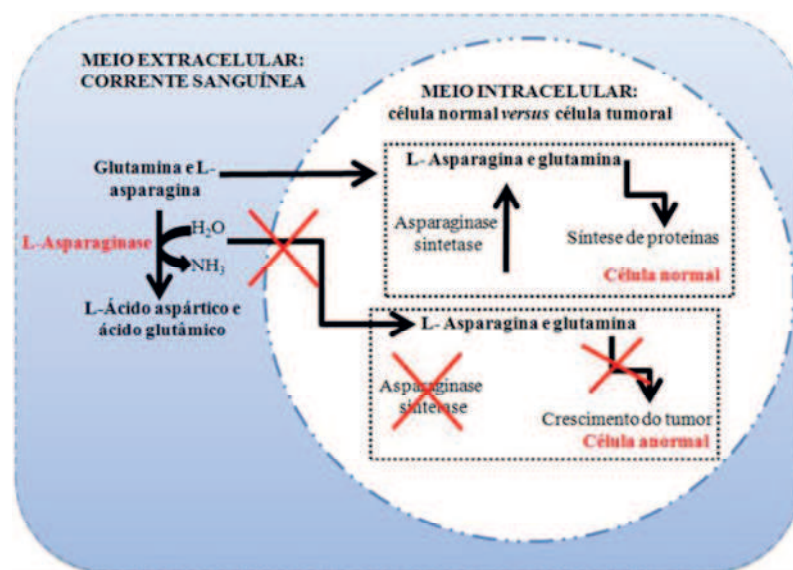


Figura 1 - Mecanismo de ação da L-asparaginase no meio extracelular evitando a entrada de L-asparagina na célula, uma vez que as células tumorais necessitam desse aminoácido do meio extracelular para síntese de proteínas, na sua ausência, ocorre inibição da síntese de RNA e DNA, causando subseqüente morte celular por apoptose das células leucêmicas. Fonte: Autor.

2.2.3 Biofármacos disponíveis no mercado

Atualmente, quatro formas de L-ASNase estão disponíveis no mercado: a L-Asparaginase nativa (Elspar[®]) de *Escherichia coli*, a L-Asparaginase peguilada (Oncaspar[®]), a qual possui ligação covalente com um grupo polietilenoglicol, sendo ambas obtidas de *Escherichia coli*, a L-Asparaginase obtida de *Erwinia chrysanthemi*, a Erwinase[®] e mais recentemente uma forma recombinante de *E. coli*, denominada *Spectrilla*. Essas quatro formas possuem o mesmo mecanismo de ação, porém diferem em suas propriedades farmacocinéticas (RIZZARI et al., 2013; KAWEDIA & RYTTING, 2014), o que implica que as mesmas não são intercambiáveis na mesma dose e frequência de administração (PIETERS et al., 2011). Suas propriedades químicas e farmacológicas podem ser vistas na tabela 1 abaixo. No Brasil apenas a Elspar é aprovada pela ANVISA e liberada para uso. Porém, em 2010 seu fornecimento no país foi suspenso. Em 2015, passou a ser produzida com exclusividade por uma parceria entre a Fiocruz e dois laboratórios privados NT Pharma e UnitecBiotec. Ao que tudo indica, até o final de 2017, este produto terá fabricação 100% nacional (Canal Saúde-FIOCRUZ, 2015).

Tabela 1: Propriedades químicas e farmacológicas das diferentes preparações de asparaginase. Fonte: Adaptada de MULLER & BOOS (1998).

Formas	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico (pH)	Meia-vida (dias)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	138000	8,7	0,65±0,13
<i>Escherichia coli</i>	141000	5,0	1,24±0,17
PEG- <i>Escherichia coli</i>	145000	5,0	5,73±3,24

2.2.4 Estrutura da L-Asparaginase

Do ponto de vista bioquímico a enzima é composta por quatro subunidades, sendo homotetramérica com um sítio ativo em cada uma delas (Figura 2). A massa molar varia entre 133-145 kDA e é formada por 300-350 resíduos de aminoácidos. As enzimas isoladas a partir de *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi* diferem no seu ponto isoelétrico e propriedades farmacocinéticas. Além disso, não apresentam reação de

hipersensibilidade cruzada, podendo assim ocorrer substituição de uma pela outra em caso do paciente desenvolver algum tipo de reação. No entanto ambas são capazes de induzir respostas imunes (MULLER & BOOS, 1998; RIZZARI et al., 2013).

Quando a proteína é oriunda do citoplasma do microrganismo é denominada L-ASNase I e apresenta alta afinidade com a L-asp e glutamina, e quando produzida no espaço periplasmático é chamada de L-ASNase II e tem menor afinidade por estes aminoácidos. Sabe-se que a D-asparagina e D-glutamina são metabolizadas no mesmo centro ativo da enzima que as formas L, com hidrólise das ligações éster e amida, daí a enzima ser considerada uma amidohidrolase (MULLER & BOOS, 1998).

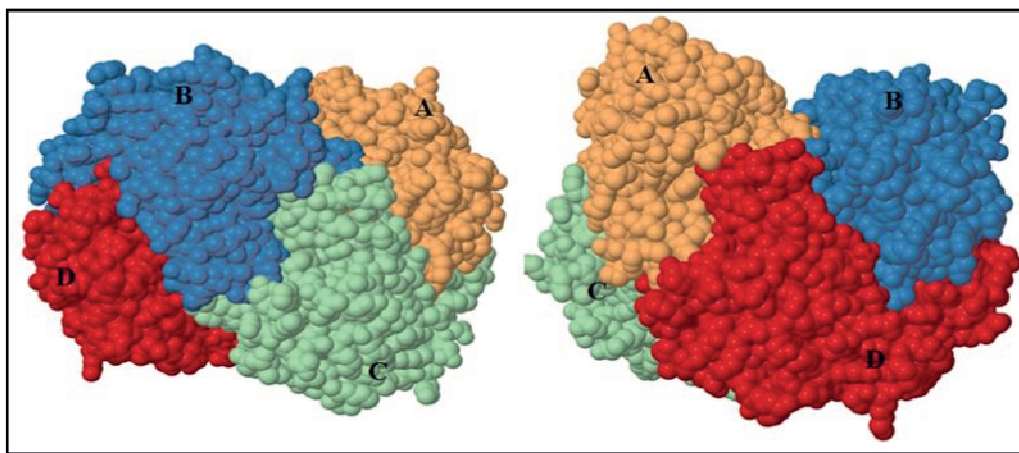


Figura 2- Estrutura tridimensional da L-Asparaginase de Escherichia coli. Fonte: Protein Data Bank.

2.2.5 Limitações do uso

Apesar de ser bastante usada nos protocolos para LLA, a L-ASNase apresenta limitações em seu uso devido aos desconfortos e inconvenientes terapêuticos causados. Dentre os eventos adversos mais frequentes estão reações de hipersensibilidade, com incidência que pode variar de 6 a 43%, podendo ocorrer em 10% dos casos, reações anafiláticas graves (CORTIJO-CASCAJARES et al, 2012). Reações de hipersensibilidade ficam entre 4% na fase de indução, até 80% para doses adicionais para aqueles pacientes que usam L-ASNase de *E. coli* (KURTZBERG et al., 2011). Estas reações são seguidas da produção de anticorpos (anti-LAsparaginase), que constituem a principal causa de resistência ao medicamento (TONG et al., 2014). Este fato reduz a atividade enzimática e, como consequência, a redução efetiva de L-Asparagina no plasma não ocorrerá (KAWEDIA; RYTTING, 2014). Assim, na indução de resposta imune pela L-ASNase, aparecem sintomas como edemas, febre, erupções na pele, hipotensão, urticaria, dentre outros (CORTIJO-CASCAJARES et al, 2012).

Ocorrência de encefalopatia e hepatotoxicidade está relacionada com a liberação de amônia na corrente sanguínea através da reação catalisada pela L-ASNase (LOUREIRO, 2010).

A L-ASNase pode ainda hidrolisar outro aminoácido, a glutamina, contudo com menor afinidade (GRAHAM, 2003; VAN DER SLUIS et al., 2013). Desta reação são derivados o glutamato e o aspartato, sendo estes associados a neurotoxicidade, que pode ocorrer em 25% dos indivíduos (LOUREIRO, 2010). Outros efeitos adversos podem ocorrer em tecidos normais como o fígado e o pâncreas (KURTZBERG et al., 2011). No fígado, pode ser observada a diminuição dos níveis séricos de albumina e de lipoproteínas (PIETERS et al., 2011; SAISON et al., 2014). No pâncreas, efeitos como pancreatite, redução da secreção de insulina e enzimas que atuam na digestão (QUINTANILLA-FLORES et al., 2014). Podem ocorrer também anormalidades no processo de coagulação devido a deficiência de fatores envolvidos neste processo (SHRIVASTAVA et al., 2015).

2.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um campo inovador das ciências farmacêuticas que pode ser aplicada para superar problemas relatados para alguns fármacos como instabilidade e baixa biodisponibilidade, assim como pode ser aplicada visando a terapia alvo ou de liberação controlada de fármacos (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Atualmente a nanotecnologia vem recebendo destaque considerável no tocante a terapia do câncer. Esta pode ser definida como a pesquisa de materiais em nanoescala, que estão em dimensões entre 1 e 100 nm ou exiba propriedades ou fenômenos, incluindo as propriedades físicas ou químicas ou efeitos biológicos, que sejam atribuíveis à sua dimensão (s), mesmo que essas dimensões estejam fora da nanoescala, até um micrômetro (1000 nm) (FDA,2014).

Existem vários tipos diferentes de sistemas de liberação de fármacos em escala nanométrica: lipossomas (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965) NPs poliméricas (KREUTER, 2007), micro e nanoemulsões (HOAR; SCHULMAN, 1943), polimerossomos (DISCHER et al., 1999). As técnicas de composição e preparação destes sistemas variam entre eles e foram melhorados ao longo do tempo, mas os métodos de caracterização quase sempre envolvem ensaios comuns para todos e incluem diferentes técnicas como a microscopia, espectroscopia, cromatografia e análise térmica, no entanto métodos devem ser padronizados de acordo com os tipos de amostras (composição, estado físico, a estabilidade entre outros aspectos) e

equipamentos (operação modelo de *software*, o volume de amostra necessária) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

As NPs são bastante utilizadas para veiculação de fármacos convencionais e uma alternativa às biomacromoléculas. O desenvolvimento de sistemas que encapsulem proteínas e sejam capazes de promover sua liberação na circulação representam uma possibilidade de reduzir a imunogenicidade. Como mencionando anteriormente a literatura relata vários casos de imobilização da enzima, embora não exista nenhum destes sistemas disponíveis para uso clínico. A tabela 2 abaixo relata alguns desses nanocarreadores. NPs poliméricas tem sido utilizada para entrega de drogas na terapia do câncer. Dentre os polímeros mais utilizados o copolímero PLGA é amplamente utilizado e aceito pela indústria farmacêutica em diferentes sistemas de liberação de fármacos especialmente por ser biodegradável e biocompatível (DANHIER *et al.*, 2012). O método amplamente usado visando o desenvolvimento NPs para o carregamento de proteínas, que são moléculas hidrofílicas, é o da dupla emulsificação, ideal para moléculas hidrofílicas

Tabela 2- Estratégias de nanoencapsulação para L-asparaginase. Fonte: Grupo de pesquisa do Laboratório de Nanobiotecnologia da USP.

Sistema	Polímero/metá/lipídio	Técnica	Caracterização dos sistemas	Eficiência de encapsulação ou recuperação de atividade	Referência
Nanopartículas contendo a enzima pegulada	Poli (ácido láctico-co-glicólico) 50:50 com massa molecular 10 kDa	Dupla emulsificação	Tamanho e morfologia por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	77,88 % para ASNase livre e 65,1 % pegulada	(SURI VASUDEV et al., 2011)
Nanopartículas	Quitosana e Tripolifosfato de sódio	Gelatinização ionotrópica	Tamanho e morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e DLS	59,1 -70,8 % dependendo das proporções dos polímeros usados	(BAHREINI et al., 2014)
Nanopartículas	Poli (ácido láctico-co-glicólico) 50:50 com massa molecular 30 kDa	Dupla emulsificação	Tamanho e morfologia por MET	5 %	(MANUELA GASPAPAR et al., 1998)
Nanopartículas	Poli- (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato	Dupla emulsificação	Tamanho e morfologia por MEV	23,7 % para enzima não pegulada e 27,9 % para enzima pegulada	(BARAN; AZURE, 2002)
Nanopartículas	Poli (ácido láctico-co-glicólico) 50:50	Dupla emulsificação	Tamanho por difração a Laser	26-70 % dependendo da fase aquosa usada	(WOLF et al., 2003)

Micropartículas	Sericina da seda com 50-200KDa	Reação <i>crosslinking</i> com glutaraldeído	Tamanho por difração a laser	Retenção de 62 % de atividade	(ZHANG et al., 2004)
Nanoesferas ocas	Alginate- <i>graft</i> -polietilenoglicol, α -ciclodextrina,	Auto-organização	Tamanho e morfologia por MET e DLS	37-80 % dependendo da concentração de polímero usado	(HA et al., 2010)
Nanopartículas magnéticas	Óxido de ferro, óxido de silício, poli (2-vinil-4,4-dimetil azalactona)	Formação em meio alcalino	Tamanho e morfologia por MET e DLS	318 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de enzima por nanopartícula	(MU et al., 2014)
Lipossomos	Fosfatidicolina, colesterol e outros lipídios	Reidratação do filme seguida ou não por extrusão	Tamanho por DLS	40 % para amostra extrudada e 80 % para amostra não-extrudada	(CRUZ; GASPARG, 1993)
Lipossomos	Fosfatidicolina, colesterol e outros lipídios com e sem carga	Reidratação do filme seguida de filtração	Tamanho e morfologia por DLS e MEV, potencial zeta	1,95% para lipídeos neutros 2,39 para positivos e 2,35 % para negativos	(ANINDITA; VENKATESH, 2012)
Nanovesículas lipídicas	Fosfolipídios de soja e colesterol	Evaporação em fase reversa	Tamanho e morfologia por MET e DLS, potencial zeta	66,47 %	(WAN et al., 2016)

MET-Microscopia eletrônica de transmissão, MEV-Microscopia eletrônica de varredura, DLS-Dynamic Light sca2.4

2.4 Nanopartículas (NPs)

NPs correspondem a porções de material de apenas alguns átomos de tamanho, podendo ser constituídas por polímeros ou materiais lipídicos capazes de transportar fármacos e controlar sua liberação. Seu tamanho varia de 10 a 1000 nm, podendo o fármaco estar dissolvido, encapsulado ou disperso em sua matriz. Estas podem ser classificadas em nanocápsulas ou nanoesferas, cuja diferença entre ambas está na composição e na organização estrutural. As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que a molécula pode estar inserida no interior de uma cavidade aquosa ou oleosa, a qual é circundada por uma membrana lipídica ou polimérica. As nanoesferas são sistemas matriciais em que a molécula se encontra dispersa fisicamente e uniformemente na matriz polimérica ou lipídica (ZHANG; WEBSTER, 2009).

São eficientes carreadores de macromoléculas, fármacos hidrofóbicos, vacinas, dentre outras substâncias. No entanto, devem ser biocompatíveis e biodegradáveis. NPs formadas por polímeros vem sendo bastante utilizadas como transportadores de fármacos na terapia do câncer. NPs poliméricas biodegradáveis administrados por via intravenosa têm sido utilizados com sucesso para carrear a droga ao local específico de ação como também controlar sua liberação (ACHARYA; SAHOO, 2011).

Dentre os polímeros utilizados para elaboração destas, o copolímero PLGA tem sido bastante requisitado, uma vez que apresenta biocompatibilidade e é excretado normalmente do corpo, tendo sido também aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e EMA (Agência Europeia de Medicamentos). E dentre as técnicas utilizadas para caracterização destacam-se: tamanho de partícula por meio da análise do raio hidrodinâmico através do espalhamento de luz dinâmico, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permite avaliar a forma e aparência das nanopartículas além de seu tamanho (BOOTZ et al., 2004).

2.4.1 PLGA (*Poli (ácido lático-co-glicólico)*)

O copolímero sintético PLGA é constituído por duas unidades monoméricas de poli ácido lático (PLA) e poli ácido glicólico (PGA) como pode ser visto na figura 3, considerado promissor para o transporte de fármacos, incluindo proteínas e até mesmo moléculas de DNA, pelo fato de ser biocompatível e biodegradável. Em relação aos seus componentes, o ácido lático apresenta maior hidrofobicidade que o ácido glicólico, desta forma, os copolímeros de PLGA com maior concentração de ácido lático são

menos hidrofílicos, ou seja, absorvem menos água e possuem degradação mais lenta (STEVANOVIC; USKOKOVIC, 2009).

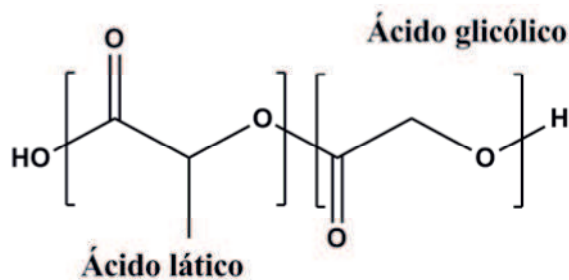


Figura 3: Estrutura química de copolímero PLGA. Fonte: Autor usando o programa *ChemBioDraw*

Como já discutido, NPs de PLGA têm sido utilizadas para o carregamento de proteínas. O interesse em se encapsular este tipo de molécula se deve ao fato de as NPs diminuírem a imunogenicidade das mesmas e conseqüentemente aumentar o seu tempo de meia-vida, uma vez, que estão protegidas em sistema de *drug delivery*. Independente da via de administração utilizada, algumas proteínas não apresentam propriedades físico-químicas adequadas para serem absorvidas e atingirem ou entrarem em contato com as células alvo, enfatizando a necessidade deste tipo de sistema para contornar essas limitações (ALMEIDA et al., 2007; LEE; YUK, 2007).

2.4.2 Preparação de nanopartículas de PLGA pelo método de Dupla Emulsificação

Dentre os métodos de preparação, a técnica de dupla emulsificação é bastante empregada, principalmente para proteínas, em razão da menor exposição a solventes orgânicos, o que também faz com que seja o método de escolha para moléculas hidrofílicas. Esta técnica consiste na formação de uma emulsão dupla do tipo água/óleo/água (A1/O/A2) com posterior evaporação do solvente e formação das NPs por precipitação. Desta forma, uma solução aquosa ou suspensão do fármaco (fase aquosa interna, A1) é emulsionada em uma solução do polímero em solvente orgânico. A emulsão primária resultante (A1/O) é então dispersa em uma segunda fase aquosa (fase aquosa externa, A2) contendo estabilizante (s) apropriado para formar emulsão dupla (A1/O/A2). A remoção do solvente orgânico volátil resulta na formação de NPs sólidas (GIRI et al., 2013).

É importante salientar que, algumas variáveis do processo, como velocidade de agitação, tempo de evaporação do solvente, bem como parâmetros da formulação, como

tipo de polímero e a concentração, tipo de tensoativo e a concentração e quantidade de fármaco, podem influenciar as características das NPs.

Entre os maiores obstáculos e limitações na produção de NPs estão: a instabilidade física causada pela agregação e fusão, e a instabilidade química pela hidrólise e armazenamento. Para melhorar a estabilidade durante a armazenagem o processo mais comumente utilizado é a liofilização, que consiste na remoção da água de uma amostra congelada pela sublimação sob vácuo, permitindo converter suspensões de NPs em sólidos que apresentam melhor estabilidade (ABDELWAHED et al., 2006).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral: encapsular a enzima a L-asparaginase em um sistema nanotecnológico (nanopartículas) estável visando o aumento da meia-vida e redução da agregação enzimática.

Objetivos Específicos:

- Obter um sistema de nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico);
- Encapsular a L-asparaginase em um sistema de nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico);
- Caracterizar os sistemas obtidos com e sem a L-asparaginase quanto aos principais parâmetros físico-químicos relacionados à estabilidade e morfologia destes;
- Avaliar a eficiência de encapsulação da enzima nas nanopartículas;
- Avaliar aspectos de hemocompatibilidade dos sistemas elaborados;
- Avaliar o perfil de liberação da L-ASNase encapsulada nas NPs.

CAPÍTULO I- Artigo a ser submetido para publicação na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

“A Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada está entre os quatro periódicos editados no Brasil, considerados estratégicos para a Área de Farmácia que foram classificados de forma independente aos critérios de indexação: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (ISSN 1984-8250 e 2175-9790): B2 - Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy (ISSN 1981-528X e 0102-695X): B2 - Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada (ISSN 1808-4532 e 2179-443X): B3 - Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde (ISSN 2179-5924): B5.”

Delineamento de diferentes composições e técnicas de produção de nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico): desafios nanobiotecnológicos para a encapsulação da L-asparaginase

TITLE PAGE**Delimitação de diferentes composições e técnicas de produção de nanopartículas de poli (ácido lático-co-glicólico): desafios nanobiotecnológicos para a encapsulação da L-asparaginase**

Anna Emmanuela Medeiros de Brito¹; Alexsandra Conceição Apolinário²; Thayse da Silva Medeiros³; Maria Salete da Silva Rodrigues³ Adalberto Pessoa Jr²; José Alexsandro da Silva^{1,3}

¹Universidade Estadual da Paraíba; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

²Universidade de São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

³Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil

Autor Correspondente:

Prof. Dr. José Alexsandro da Silva

Departamento de Farmácia da UEPB Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário CEP 58429-500 Campus I, Campina Grande-PB

Título-Curto:

Desafios para obtenção de nanopartículas de PLGA

RESUMO

Este trabalho abordou a comparação entre nanopartículas obtidas a partir de dois copolímeros de poli (ácido lático-co-glicólico) com a mesma proporção (50:50) mas com faixas de pesos moleculares diferentes, 24-38 KDa e 30-60 KDa objetivando encontrar um sistema para encapsulação da enzima L-Asparaginase usada no tratamento da Leucemia linfóide aguda. O método de elaboração das nanopartículas foi por dupla emulsificação com modificações nas técnicas de obtenção foram: cavitação ou agitação, nas concentrações do estabilizante álcool polivinílico: 0,5; 1;1,5 e 2,0 % e diferentes tempos de emulsificação (30-60 s). Foi possível compreender que a escolha de faixas menores de peso molecular para o PLGA resultou em partículas com menor índice de polidispersão e tamanhos em escala nanométrica independentemente do método utilizado, por outro lado ficou claro que a concentração de PVA acima de 0,5 % é requerida para emulsificação. Após a adição da enzima L-Asparaginase foi verificado que apenas os sistemas elaborados com PLGA 24-38 KDa mantinha-se estável enquanto que o sistema obtido com PLGA 30-60 KDa separava de fases após incorporação da proteína e a medição do pH deste sistema apontou para acidez do mesmo, indicando a hidrólise das cadeias do copolímero antes e após a adição da enzima sugerindo que em razão da acidez do sistema ocorreu a separação de fases com adição da proteína. Foi possível escolher o PLGA 24-38 KDa com 383,9 nm de diâmetro hidrodinâmico e IPD de 0,143 para encapsulação da L-asparaginase.

Palavras-chaves: poli (ácido lático-co-glicólico); dupla-emulsificação, cavitação; índice de polidispersão

Introdução

A nanobiotecnologia é um campo emergente nas ciências farmacêuticas que pode ser aplicada para superar problemas comuns aos biofármacos como instabilidade e meia-vida curta que são gargalos típicos da terapêutica com macromoléculas, especialmente proteínas. Nanocarreadores podem ser plataformas para encapsular proteínas e promover a terapia-alvo ou liberação modificada (1). No entanto, essas habilidades dependem de algumas características dos sistemas de liberação de fármacos como tamanho, polidispersidade, morfologia, topografia da superfície (2). Existem vários tipos diferentes de sistemas de liberação de fármacos no tocante a nanotecnologia: lipossomas (3) nanopartículas poliméricas (4), micro e nanoemulsões (5), polimerossomos (6).

Nanopartículas (NPs) formuladas com poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) constituem um sistema promissor de liberação de fármacos por ser biodegradável e biocompatível (7). PLGAs são poliésteres relativamente hidrofóbicos, instáveis na presença de umidade e biodegradáveis a subprodutos atóxicos, produzidos a partir de recursos renováveis (8). Estes copolímeros sofrem hidrólise e são degradados no meio fisiológico gerando metabólitos semelhantes aos que ocorrem naturalmente no organismo, por isso têm recebido muita atenção principalmente para os estudos de liberação por via parenteral (9).

Estudos prévios mostraram que ao alterar parâmetros de síntese, a liberação do composto encapsulado nas NPs são afetados diretamente, dentre os quais podemos citar, a composição do polímero e peso molecular, método de síntese e emulsionante utilizado(7).

O processo de dupla emulsificação corresponde a formação de emulsão seguido da evaporação do solvente orgânico a partir da fase dispersa que conduz à insolubilidade e,

consequentemente, a precipitação do polímero que encapsula o agente ativo. O solvente pode ser evaporado sob pressão reduzida através de evaporador rotativo ou por simples agitação a temperatura ambiente (10). Além disso, é um processo com capacidade de encapsular moléculas hidrofílicas e lipofílicas.

Para dispersão das emulsões são usados equipamentos como ultra-turrax, ultrassom, dentre outros. O ultra-turrax é um equipamento usado para homogeneização por meio da rotação em alta velocidade de um rotor em relação a um estado físico. Segundo Lopez *et al*, (2008) (11) e Kohler *et al*, (2010) (12) este equipamento não é tão eficiente para produção de NPs, uma vez que não seria capaz de reduzir gotículas a escala nanométrica, no entanto é excelente para proteína já que reduz as chances de desnaturação. Por outro lado, a sonda de ultrassom, também chamada sonicador, possui uma combinação de fenômenos acústicos que gera ondas de ultrassom que causam oscilações das moléculas do fluido nas proximidades do local de propagação das ondas. O sistema é mantido agitado, para garantir que todo o fluido passe na região de sonicação e ocorra a quebra de todas as gotículas da amostra, resultando em tamanho de partículas menores, na escala nanométrica (13).

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros e tem por vantagens à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa (14). A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse caso, a proteína é estabilizada por interações fracas com o suporte como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas), pontes de hidrogênio e ligações iônicas e tem por vantagens a facilidade e a

simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada (15).

Neste trabalho foi estudado diferentes métodos de produção de NPs por dupla emulsificação sendo possível escolher um sistema com PLGA o qual mostrou-se promissor para a encapsulação e/ou carregamento (*loading*) da enzima.

Materiais e métodos

Materiais

Foram usados dois copolímeros de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), denominado PLGA 1 e PLGA 2, com pesos moleculares de 24-38 KDa e 30-60 KDa, respectivamente, obtidos da *Sigma Aldrich*[®] (São Paulo, São Paulo, Brasil). O álcool polivinílico (PVA 31-50 KDa) foi comprado da *Sigma Aldrich*[®] (São Paulo, São Paulo, Brasil), e os demais reagentes todos de grau analítico, adquiridos da *Synth*[®] (São Paulo, São Paulo, Brasil) e a água ultrapurificada em purificador *Milli Q (Merck Millipore)*.

Preparação das Nanopartículas

Seleção dos copolímeros

A seleção dos copolímeros foi feita a partir das diferenças entre o peso molecular dos mesmos e foram escolhidas a proporção 50:50 das porções PLA e PGA, como referido na literatura. A Tabela 1 apresenta os dois copolímeros PLGA escolhidos para o estudo. Esta seleção foi feita de modo a avaliar o efeito do peso molecular dos polímeros na faixa de tamanho das NPs.

Tabela 1 - Características moleculares dos copolímeros usados.

Nomenclatura para identificação	Razão PLA: PGA	Peso molecular
PLGA 1	PLA 50: PGA 50	30-60 KDa
PLGA 2	PLA 50: PGA 50	24-38 KDa

Escolha de variáveis para emprego da técnica de dupla emulsificação

As variáveis estudadas na elaboração dos sistemas estão apresentadas na Tabela 2. O estabilizante escolhido foi o álcool polivinílico (PVA) em quatro concentrações (m/v): 0,5%, 1%, 1,5% e 2%. Para 1ª emulsão, 0,05 g de PLGA 1 ou PLGA 2 foram solubilizadas em 2,5 mL de clorofórmio e em seguida adicionou-se 250 µL de tampão PBS 7,4, a solução obtida foi submetida a três ciclos de sonicação em sonda ultrasson (750 Watt ultrasonic processor, modelo VC 750, *SONICS Vibra-Cell®*) com 50% de amplitude de sua potência total em banho de gelo ou agitação em ULTRA-TURRAX® T 18 basic *IKA®* a 4000 rpm por 30 ou 60 segundos. Para obter a 2ª emulsão, a 1ª emulsão foi vertida em 10 mL da solução aquosa de PVA nas concentrações pré-determinadas e levada novamente para sonicação ou agitação por três ciclos de 30 ou 60 segundos nas condições descritas acima. A emulsão formada foi levada para evaporação do solvente com agitação magnética por 24 horas a 450 rpm a uma temperatura ambiente.

Tabela 2: Variáveis analisadas durante a dupla emulsificação para obtenção de sistemas em escala nanométrica com menor índice de polidispersão.

Sistemas de nanopartículas (PLGA 1 e PLGA 2)	Concentração do de álcool polivinílico (%)	Técnica de obtenção	Tempo de homogeneização em segundos (s) com 3 ciclos para cada emulsão
Sistema A	0,5	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s
Sistema B	0,5	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s
Sistema C	1	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s
Sistema D	1	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s
Sistema E	1,5	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s
Sistema F	1,5	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s
Sistema G	2,0	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s
Sistema H	2,0	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s
Sistema I	0,5	Agitação com ultra-turrax	30 s
Sistema J	0,5	Agitação com ultra-turrax	60 s
Sistema K	1	Agitação com ultra-turrax	30 s
Sistema L	1	Agitação com ultra-turrax	60 s
Sistema M	1,5	Agitação com ultra-turrax	30 s
Sistema N	1,5	Agitação com ultra-turrax	60 s
Sistema O	2,0	Agitação com ultra-turrax	30 s
Sistema P	2,0	Agitação com ultra-turrax	60 s

Caracterização

Espalhamento de luz dinâmico

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi medido por espalhamento de luz dinâmico, do inglês, *dynamic scattering light (DLS)* no equipamento *Zetasizer Nano*

(Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) em cubeta de vidro com diluição da amostra 1:100 em PBS. As medidas foram feitas a uma temperatura de 25°C e com um ângulo do detector de 90°. As amostras foram equilibradas por 60s, com um ajuste automático de atenuador e foram realizadas 3 medidas para cada leitura. A viscosidade da água foi de 0,088 cP e o índice de refração de 1,330 e os valores de índice de refração de 1,55 do material PLGA (superfície externa das nanopartículas) foi adotado para as nanoestruturas. As partículas foram consideradas como esferas e a equação de *Stokes-Einstein* (Equação 1) foi utilizada para análise do decaimento de correlação entre a intensidade medida e o coeficiente de difusão. Eq. 1

$$Df = \frac{kBT}{6\eta R_h} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: D_f é o coeficiente de difusão, k_B é a constant de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico

Ensaio quantitativo de eficiência de encapsulação

Para avaliar a eficiência de encapsulação da L-ASNase nas NPs foi realizado o ensaio qualitativo direto, no qual o *pellet* resultante de centrifugação 3220 *g* por 15 min foi ressuspenso em 5 mL de PBS e procedeu-se à centrifugação novamente como do mesmo modo tendo esta etapa sido repetida mais duas vezes com o *pellet* suspenso em 5 mL de PBS para retirada de proteínas não-encapsuladas. O *pellet* final foi dissolvido em 1mL de solução DMSO 50% (DMSO + PBS) e foi utilizado para realização da eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Eletroforese

Foi realizada SDS-PAGE, com 10 % (m/v) de gel inferior e 5 % (m/v) de gel superior e com corrente de 130 mA no equipamento *Mine-PROTEAN Tetra System* Biorad® (Hercules, Califórnia, Estados Unidos) para confirmação de que o *pellet*

rompido continha a enzima. A banda foi detectada com uso do corante *Comassie Blue* (Biorad[®]).

Estabilidade da Enzima

Avaliação da estabilidade da enzima sob condições de estresse

De modo a avaliar a estabilidade da proteína L-ASNase (Elspar[®]) foi diluída a 1 mg. mL⁻¹ em água e em glicerol 40% (v/v). Para monitorar a agregação da proteína em condições de estresse (agitação *overnight* e sonicação por 20 min em banho de ultrassom), a análise por espalhamento de luz dinâmica em DLS foi realizada no equipamento Nanotrak Wave *Microtrac*[®] para isso, foram fornecidos ao equipamento a viscosidade e o índice de refração da água e do glicerol nas diferentes concentrações.

Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) no UV distante para a solução enzimática de L-ASNase e o *pellet* final obtido do processo de elaboração do sistema, foram medidos em um espectropolarímetro (Jasco J-1500 CD Spectrometer), com a faixa de 180-260 nm, em uma cubeta de caminho óptico de 10 mm, com 2 (duas) acumulações, velocidade de varredura de 10 nm·min⁻¹ e largura de banda de 5 nm, sem intervalo. A concentração de L-ASNase foi de 10 mg. mL⁻¹.

Análise Estatística

Análise de Variância (ANOVA) foi realizada no Programa Origin Pro-8.

Resultados e discussão

As Tabelas 3 e 4 listam os valores de diâmetro hidrodinâmico para as NPs obtidos a partir análise de DLS, dois tipos de distribuição estão descritos: por intensidade, que corresponde a medida primária do equipamento e por número que auxilia na compreensão da população predominante nos sistemas, indicando uma faixa de tamanho micrométrica para alguns dos sistemas que podem ser apenas traços correspondentes a alguma impureza presente na amostra durante a medição (16).

Tabela 3: Valores de tamanho de partícula por intensidade e número para nanopartículas preparadas com PLGA 1 (30-60 KDa).

Sistema de nanopartículas (PLGA 1)	Concentração de álcool polivinílico (%)	Técnica de obtenção	Tempo de homogeneização em segundos (s) com 3 ciclos para cada emulsão	Diâmetro hidrodinâmico por intensidade (nm)	Diâmetro hidrodinâmico por número (nm)
Sistema A	0,5	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s	Separação de fases	
Sistema B	0,5	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s	Separação de fases	
Sistema C	1,0	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s	Separação de fases	
Sistema D	1,0	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s	400 (100%)	414,5 (100%)
Sistema E	1,5	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s	807,8 (100%)	626,6 (100%)
Sistema F	1,5	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s	614,6 (99,1%), 146,8 (0,6%) e 5288 (0,3%)	131,2 (20,1%) e 486,4 (79,9%)
Sistema G	2,0	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s	696,8 (99,2%) e 5513 (0,8%)	619 (100%)
Sistema H	2,0	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s	608 (100%)	509,7 (100%)
Sistema I	0,5	Agitação com ultraturrax	30 s	Separação de fases	
Sistema J	0,5	Agitação com ultraturrax	60 s	Separação de fases	
Sistema k	1,0	Agitação com ultraturrax	30 s	Separação de fases	
Sistema L	1,0	Agitação com ultraturrax	60 s	1023 (89,5%), 5105 (8,4%), 277,5 (2,1%)	1173 (46%), 5390 (53,6%), 275,8 (0,4%)
Sistema M	1,5	Agitação com ultraturrax	30 s	Separação de fases	
Sistema N	1,5	Agitação com ultraturrax	60 s	1234 (78,3%), 5330 (19,1 %) e 324 (2,6 %)	1432 (30,5%), 5446 (45,6%), 350,8 (0,7%)
Sistema O	2,0	Agitação com ultraturrax	30 s	Separação de fases	
Sistema P	2,0	Agitação com ultraturrax	60 s	1350 (80,6 %), 5124 (14,7%), 345,4 (4,8%)	1251 (53,7%), 5326 (45,6%), 350,8 (0,7%)

Tabela 4: Valores de tamanho de partícula por intensidade e número para nanopartículas preparadas com PLGA 2 (24-38 KDa).

Sistema de nanopartículas (PLGA 1)	Concentração de álcool polivinílico (%)	Técnica de obtenção	Tempo de homogeneização em segundos (s) com 3 ciclos para cada emulsão	Diâmetro hidrodinâmico por intensidade (nm)	Diâmetro hidrodinâmico por número (nm)
Sistema A	0,5	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s	Separação de fases	
Sistema B	0,5	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s	Separação de fases	
Sistema C	1,0	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s	Separação de fases	
Sistema D	1,0	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s	389,5 (100%)	410,0 (100%)
Sistema E	1,5	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s	Separação de fases	
Sistema F	1,5	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s	484,8 (99,5%), 4831 (0,4%)	548,3 (92%), 5078 (8,0%)
Sistema G	2,0	Cavitação com sonda de ultrassom	30 s	Separação de fases	
Sistema H	2,0	Cavitação com sonda de ultrassom	60 s	593,2 (99,2%) 5262 (0,8%)	690,2 (85,9%) 154,4 (1,1%)
Sistema I	0,5	Agitação com ultraturrax	30 s	Separação de fases	
Sistema J	0,5	Agitação com ultraturrax	60 s	Separação de fases	
Sistema k	1,0	Agitação com ultraturrax	30 s	Separação de fases	
Sistema L	1,0	Agitação com ultraturrax	60 s	678,3 (100%)	647,9 (100%)
Sistema M	1,5	Agitação com ultraturrax	30 s	Separação de fases	
Sistema N	1,5	Agitação com ultraturrax	60 s	669,8 (72,7%) 1262 (27,3%)	645,9 (71,3%) 174,6 (28,7%)
Sistema O	2,0	Agitação com ultraturrax	30 s	Separação de fases	
Sistema P	2,0	Agitação com ultraturrax	60 s	562,5 (100%)	536,5 (100%)

Os sistemas preparados com tempo de homogeneização de 30 segundos apresentaram logo após a preparação, separação de fases, com exceção dos sistemas E e G elaborados com copolímero PLGA 1, os quais também foram preparados com concentração maior de PVA.

Para o PLGA 1 não vemos um padrão de aumento ou diminuição das NPs com aumento na concentração do PVA indicando que a massa do polímero seria um dos fatores determinantes, particularmente quando elaboradas na sonda de ultrassom, no caso do ultra-turrax observamos um aumento no tamanho nas maiores concentrações. Para o PLGA 2 é possível ver um aumento de cerca de 100 nm entre as nanopartículas com aumento da concentração de PVA que, no entanto, não implicou em mudanças da escala nanométrica.

Ao observar a influência do tempo de emulsificação nos sistemas obtidos para ambos os polímeros, pode-se inferir que para os sistemas elaborados com PLGA 1 a agitação em ultra-turrax a 60 s parece não ser um fator determinante para os tamanhos, que permaneceram na escala micrométrica, entre 1000 e 1350 nm. Com a utilização da cavitação, tanto com 30 s quanto com 60 s foi possível obter nanopartículas na escala nanométrica, mais uma vez sendo observado que o tempo também não exercia influência. Para PLGA 2 apenas com o tempo de 60 s foi possível completa emulsificação, no entanto é perceptível que os diâmetros hidrodinâmicos das NPs aumentaram em razão da técnica utilizada, sendo menores quando a emulsificação foi realizada com sonda de ultrassom.

A Figura 1 exibe os valores dos IPDs para os sistemas de NPs obtidos com ambos os copolímeros. A Análise de variância (anova) indicou diferença estatística significativa entre os valores para ambos os copolímeros com $p < 0,05$.

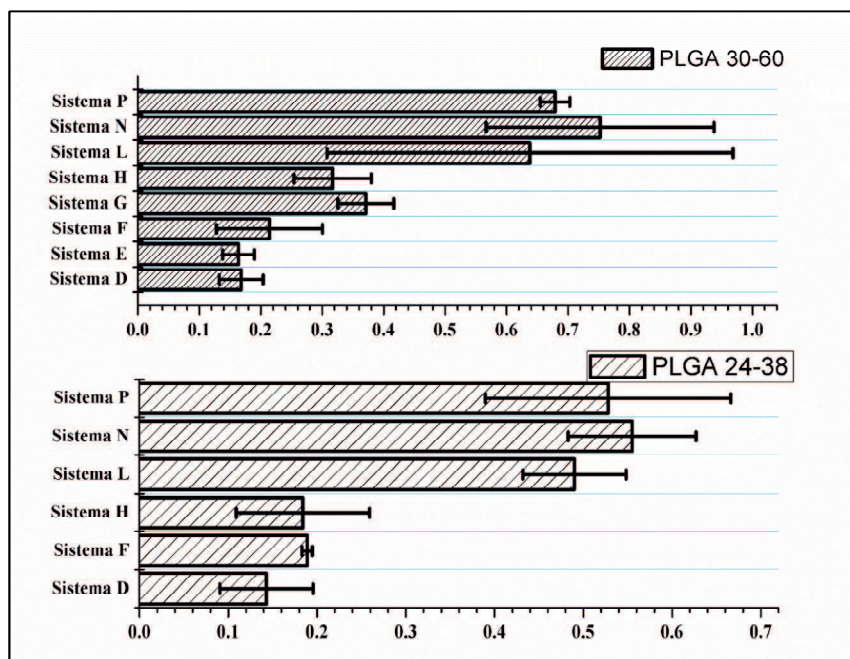


Figura 1: Valores de índice de polidispersão para nanopartículas preparadas com PLGA 1 (30-60 KDa) e PLGA 2 (24-38 KDa).

Posteriormente a estas análises foi adicionada a ASNase para possível encapsulação, para isso foram selecionados aqueles sistemas que tiveram menor tamanho de partícula e IPD. Estes sistemas foram: Sistema D (PLGA 1), com 400 nm e IPD de 0,168 e Sistema D (PLGA 2), com 389,5 nm e IPD de 0,143. Ao inserir a enzima nos sistemas foi observado que, de imediato ocorria separação de fases no sistema D (PLGA 1), como é observado na figura 2 abaixo.

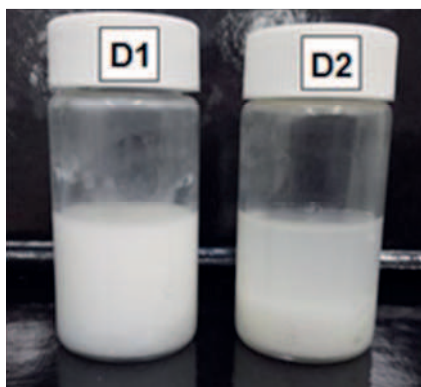


Figura 2: Sistema D (PLGA 1). D1- Sistema branco. D2- Sistema com ASNase

Para o sistema D (PLGA 2) a formação das NPs ocorreu de forma normal, como é visto na figura 3 abaixo. Esse processo foi acompanhado através de aferições do pH dos sistemas, que mostrou que para o sistema branco elaborado com PLGA 1 o pH foi de 3,08 e para o sistema com a enzima deste mesmo polímero foi de 3,41. Enquanto que para os sistemas do PLGA 2 o pH ficou na faixa de 6,8 a 7,0.

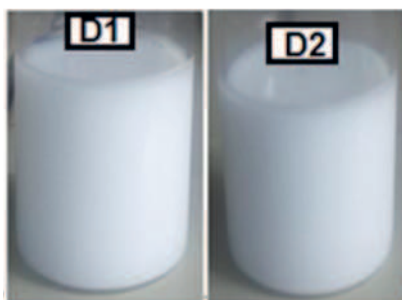


Figura 3: Sistema D (PLGA 2). D1- Sistema sem ASNase. D2- Sistema com ASNase.

A eletroforese feita após quebra do *pellet* com DMSO confirmou a presença de proteína encapsulada, como pode ser visto na Figura 4.

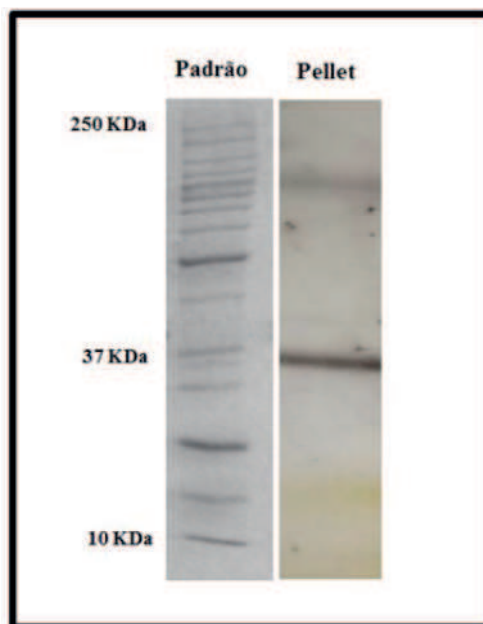


Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) da amostra resultante da quebra de nanoparticulas com DMSO revelado por prata com presença da banda de ASNase em 37 kDa, mas algum tipo de impureza também foi encontrado.

Avaliação da estabilidade da enzima sob condições de estresse

Na figura 5 (A) pode-se ver o diâmetro hidrodinâmico (D_h) da proteína antes de condições de estresse com com cerca de 10 nm para ambos os solventes. Na Figura 5 (B) é possível observar o primeiro sinal de agregação da L-ASNase em água quando agitada.

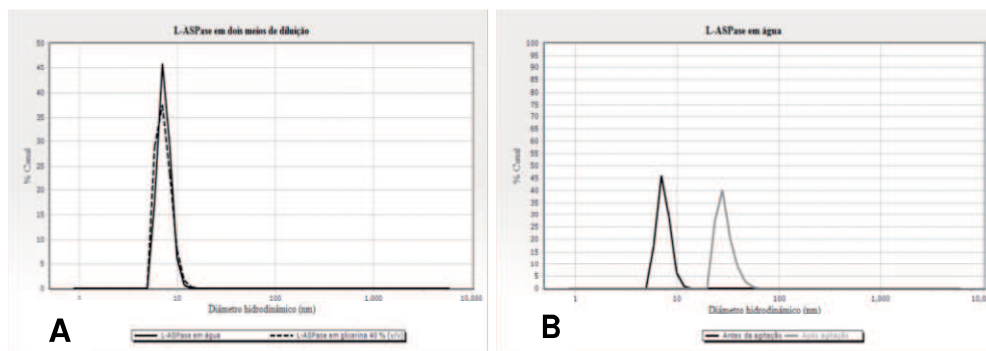


Figura 5- (A) L-ASNase em dois meios de diluição: água e glicerina 40 % (v/v) em água. (B) L-ASNase após agitação a 300 RPM *overnight* em água.

Nas figuras 6 (A) e 6 (B) são ilustrados que a L-ASNase mantida em glicerol 40 % (v/v) apresenta uma agregação bem menor quando comparada com a proteína diluída em água.

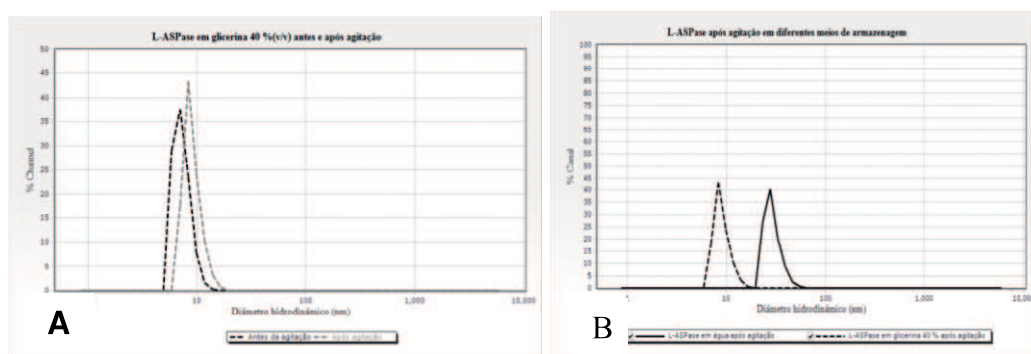


Figura 6- (A) L-ASNase após agitação a 300 RPM *overnight* em glicerina 40 % (v/v) em água. (B) L-ASNase após agitação a 300 RPM *overnight* em água e glicerina 40 % (v/v) em água.

Na figura 7 (A) é notável que em água quando a proteína foi duplamente estressada com agitação e sonicação ocorre uma maior agregação da L-ASNase. Já na

figura 7 (B) pode-se perceber que nesta condição de duplo estresse mesmo em glicerol ocorre agregação da proteína.

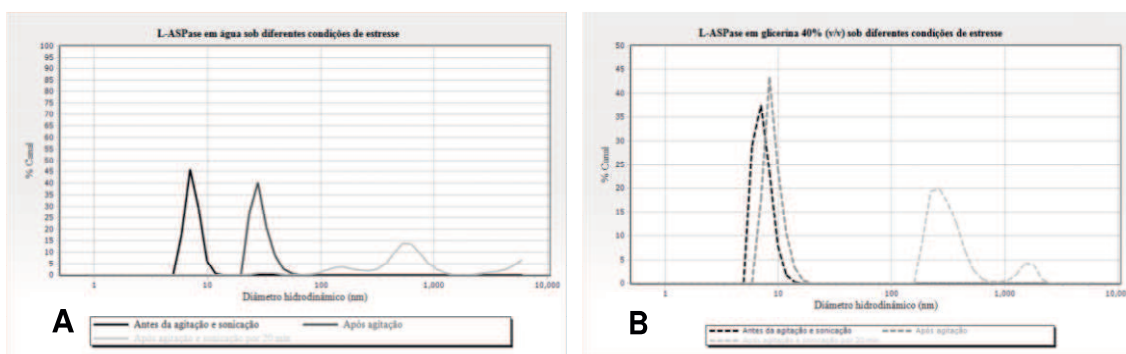


Figura 7- (A) L-ASNase após agitação a 300 RPM *overnight* e sonicação em banho de ultrassom por 20 min em água. (B) L-ASNase após agitação a 300 RPM *overnight* e sonicação em banho de ultrassom por 20 min em glicerina 40 % (v/v).

Quando comparada com água mesmo com duas condições de estresses a agregação parece ser de menor intensidade com o glicerol em relação água (Figura 8).

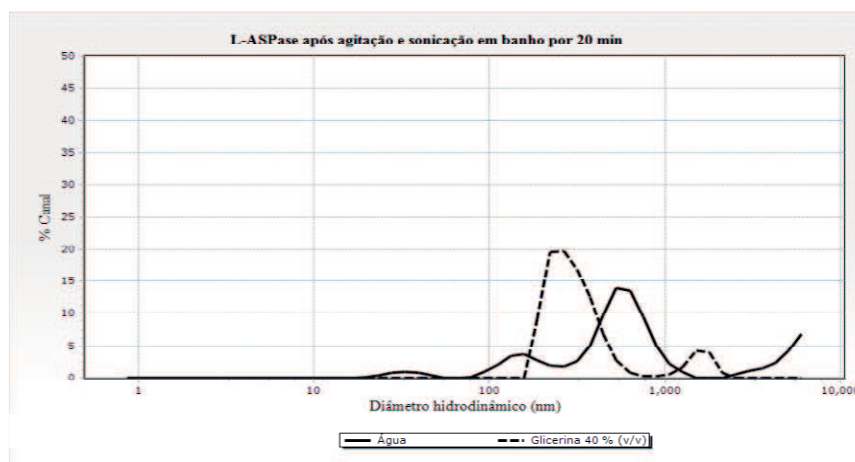


Figura 8- L-ASNase após agitação a 300 RPM *overnight* e sonicação em banho de ultrassom por 20 min em água e em glicerina 40 % (v/v) em água.

A L-ASNase também foi analisada por difração circular em dois meios diferentes: um aquoso, tampão PBS pH 7,4 e glicerina 40%, e em temperaturas de 25°C, 40°C e 50°C. Os dados obtidos por CD estão representados na figura 9.

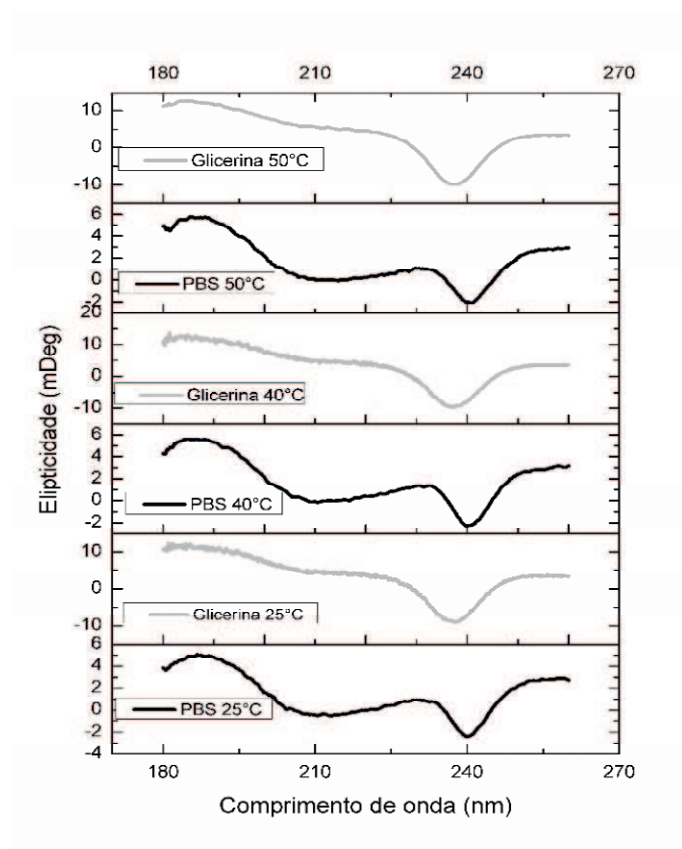


Figura 9- Dicroísmo circular L-Asparaginase em diferentes meios e temperaturas. PBS 25,40 e 50 °C e Glicerina 40% a 25,40 e 50°C.

Discussão

A pergunta inicial que direcionou este trabalho foi sobre quais condições permitiriam a obtenção de um sistema de NPs na escala nanométrica do ponto de vista microscópico e estável macroscopicamente (sem separação de fases após a dupla emulsificação) que pudessem ser usado como plataforma para encapsulação da enzima L-ASNase, para tanto, com base em algumas condições já relatadas na literatura, variáveis que são discutidas como possíveis fatores que podem interferir na obtenção de sistemas de NPs foram avaliadas: copolímeros com diferentes massas moleculares, concentração do estabilizante PVA, equipamentos e tempo de homogeneização.

A separação de fases de sistemas preparados com copolímero PLGA 1 no tempo de homogeneização de 30 segundos com exceção dos sistemas E e G elaborados com este

copolímero e com concentração maior de PVA (1 e 2%, respectivamente) indicou que o método de cavitação permitiu a emulsificação mais eficaz nas duas etapas mesmo em um menor tempo, conferindo a estabilização. Por outro lado, o estabilizante PVA usado na preparação dos sistemas tem como função reduzir a tensão interfacial e estabilizar as fases durante o processo de emulsificação(17). De acordo com Sharma et al., (2016)(18), a concentração de estabilizante usada para a preparação das NPs é de fundamental importância, porque em concentrações adequadas podem evitar a coalescência do sistema formado. O mesmo autor observou que em concentrações baixas de PVA a emulsão formada não era estável e a separação de fases ocorria depois de algumas horas do processo de emulsificação, resultando na formação de agregados de polímero.

Nos sistemas preparados com tempo de agitação de 60 segundos foi visto que, para aqueles com concentração de PVA a 0,5%, ocorreu separação de fases independente da técnica utilizada, assim foi possível inferir que seria necessária uma concentração de PVA superior a esta para permitir a estabilização do sistema. O aumento da concentração para 1%, 1,5% e 2%, resultou em maior estabilidade durante a preparação dos sistemas. Pode-se enfatizar ainda, que concentrações entre 1 e 2% já levam a uma maior estabilização dos sistemas formados por dupla-emulsificação.

Como pode ser visto nas tabelas 3 e 4, o tamanho médio das NPs preparadas utilizando PLGA 1 e PLGA 2 mostrou pequena diferença no tamanho, enfatizando que quanto menor a cadeia do polímero, menor o tamanho de partícula. Estudos apontam que o tamanho das NPs de PLGA aumentam proporcionalmente com o aumento do peso molecular deste polímero (19). A técnica de cavitação mostrou-se mais vantajosa por permitir uma emulsificação imediata das fases em relação ao uso do ultraturrax. A literatura corrobora com tal resultado, uma vez que a ultrasonicação proporciona menor

tamanho das gotículas, menos polidispersidade e com maior estabilidade do produto final (20) . A sonicação foi eficaz na redução do tamanho e polidispersidade das nanopartículas elaboradas por ambos PLGA, isso pode ser explicado pelo fato de que durante a cavitação ocorre a formação sequencial (aumento e diminuição) de milhões de bolhas de vapor no líquido. O colapso ou implosão destas bolhas gera altas temperaturas e pressões locais num período de tempo muito curto, que por sua vez geram forças de cisalhamento muito grandes (21).

Na Figura 1 pode-se observar os índices de polidispersão de cada sistema elaborado com o polímero 1 e 2. Apenas os sistemas D, E e F formulados com o PLGA 1 e os sistemas D, F e H formulados com o PLGA 2 estão compatíveis com índices encontrados na literatura para NPs e abaixo do índice (0,3) (22).

A separação de fases no sistema D (PLGA 1) em decorrência da adição da L-ASNase mostrada na figura 2 acima parece ser muito mais devido a uma instabilidade deste polímero do que em razão de propriedades da enzima, uma vez que o mesmo sistema sem a proteína apresentou pH ácido indicando hidrólise da cadeia do copolímero. A presença da enzima no sistema comprovada por eletroforese pode ser em razão da encapsulação da mesma ou da adsorção que promova o carregamento (*loading*) da L-ASNase através de interações com PVA da superfície neste sentido já foi descrito que pode haver imobilização de enzimas em microesferas de PVA (23).

É importante também acompanhar a estabilidade da enzima sob as condições de estresse do método de elaboração do sistema escolhido: sonicação e agitação. Foi possível ver na Figura 5 que o diâmetro hidrodinâmico da L-ASNase antes das condições de estresse está de acordo com a literatura na faixa de 10 nm (24). A agitação, que é a última etapa levou a um aumento deste tamanho (Figura 6), uma vez que este processo é uma das maiores causas de agregação de proteínas por aumentar a interface

da proteína com o ar, bem como a exposição dos sítio hidrofóbicos da mesma, o que já foi relatado para L-ASNase por meio da avaliação da diminuição da atividade (25). No entanto quando a enzima foi mantida em glicerol, a agregação foi bem menor que é explicado pelo fato de que este poliálcool interage preferencialmente com as porções hidrofóbicas agindo assim como composto anfifílico na interface entre a superfície hidrofóbica da proteína e o solvente polar evitando a agregação (26). A sonicação em sonda de ultrassom também levou a agregação. A análise de dicroísmo circular indicou tanto a água como glicerina apresentam um perfil muito parecido, configurando uma estrutura em α -hélice, porém é nítido que a proteína mantém mais sua estrutura em glicerina 40%. Nas três condições de temperatura o padrão de desenovelamento da proteína foi semelhante.

Pode-se assim concluir que foi possível obter sistemas de nanopartículas de PLGA pelo método da dupla emulsificação, sendo confirmado pela técnica de espalhamento de luz dinâmica. O polímero de menor cadeia resultou em nanopartículas de menor tamanho e IPD. A concentração PVA (0,5%) foi insuficiente para estabilização dos sistemas, sendo necessárias concentrações $\geq 1\%$ para evitar a coalescência dos mesmos. A técnica de agitação por cavitação permitiu a obtenção de sistemas com tamanho de partículas menores e IPD mais baixos quando comparados com a técnica de agitação com ultra-turrax. Dentre os sistemas formados dois foram escolhidos para encapsulação da L-asparaginase, onde foi observado que apenas o sistema elaborado com o PLGA 2 (24-38 KDa) manteve-se estável após o processo de emulsificação sendo possível a encapsulação da enzima, enquanto que o formado com o PLGA 1 (30-60 KDa) apresentou-se instável após tal processo, onde foi nítida a separação de fases, sendo este fato atribuído ao pH ácido do mesmo. O estudo resultou com a na encapsulação e/ou *loading* da enzima comprovada por eletroforese de modo

que serão realizados como uma etapa seguinte os ensaios qualitativos de eficiência de encapsulação, atividade enzimática e liberação da L-L-ASNase do sistema.

Agradecimentos:

Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de São Paulo (Professora Dra. Carlota Rangel-Yagui), Laboratório de Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Laboratório de Ensaio e Corrosão (LEC) da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, PROCAD, n. 552652/2011-3 (*Development of Processes and Pharmaceuticals and Biotechnological Processes Using the Sustainability Potential of Semiarid*), Projeto Universal 14/2014 - Processo: 454276/2014-1. Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo 2013/08617-7 (Projeto temático) e 2014/10456-4

References

1. Pachioni-Vasconcelos JDA, Lopes AM, Apolinário AC, Valenzuela-Oses JK, Costa JSR, Nascimento LDO, et al. Nanostructures for protein drug delivery. *Biomater Sci* [Internet]. 2016 Jan 26 [cited 2016 Apr 27];4(2):205–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26580477>
2. Xu R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology* [Internet]. 2008 Apr [cited 2014 Sep 2];6(2):112–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674200108000357>
3. Bangham a D, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* [Internet]. Academic Press Inc. (London)Ltd.;1965;13(1):238/52. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
4. Kreuter J. Nanoparticles-a historical perspective. *Int J Pharm*. 2007;331:1–10.
5. Hoar TP, Schulman JH. Transparent water-in-oil dispersions: The oleopathic hydro-micelle. *Nature*. 1943;
6. Discher BM, Won Y, Ege DS, Lee JC, Bates FS, Discher DE, et al. Polymersomes : Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. 1999;284(May):1143–7.
7. Panyam J, Zhou W-Z, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J* [Internet]. 2002;16(10):1217–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12153989>
8. Ramchandani M, Robinson D. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. *J Control Release*. 1998;54(2):167–75.
9. Mano JF, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: State of the art and recent developments. *Compos Sci Technol*. 2004;64(6):789–817.
10. Benichou A, Aserin A, Garti N. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Adv Colloid Interface Sci*. 2004;108–109:29–41.
11. López A, Chemtob A, Milton JL, Manea M, Paulis M, Barandiaran MJ, et al. Miniemulsification of monomer-resin hybrid systems. *Ind Eng Chem Res*.

- 2008;47(16):6289–97.
12. Köhler K, Santana AS, Braisch B, Preis R, Schuchmann HP. High pressure emulsification with nano-particles as stabilizing agents. *Chem Eng Sci*. 2010;65(10):2957–64.
 13. Loureiro A, Nogueira E, Azoia NG, Sárria MP, Abreu AS, Shimanovich U, et al. Size controlled protein nanoemulsions for active targeting of folate receptor positive cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015;135:90–8.
 14. Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc.Rev*[Internet].2009;38(2):453/68.Availablefrom:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169460>
 15. Jegannathan KR, Abang S, Poncelet D, Chan ES, Ravindra P. Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. *Crit Rev Biotechnol*. 2008;28(4):253–64.
 16. Dionzou M, Morère A, Roux C, Lonetti B, Marty J-D, Mingotaud C, et al. Comparison of methods for the fabrication and the characterization of polymer self-assemblies: what are the important parameters? *Soft Matter* [Internet]. 2016;12(7):2166/76.Availablefrom:<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2015/SM/C5SM01863C%5Cnhttp://xlink.rsc.org/?DOI=C5SM01863C>
 17. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2000 Dec 6;45(1):89–121. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104900>
 18. Sharma N, Madan P, Lin S. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;11(3):404–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2015.09.004>
 19. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MN V. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J Control Release*. 2007;119:77–85.
 20. Hashtjin AM, Abbasi S. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. *Food Hydrocoll* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;44:40–8.Availablefrom:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X14002938>
 21. Gilca IA, Popa VI, Crestini C. Obtaining lignin nanoparticles by sonication. *Ultrason Sonochem* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;23:369–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.021>
 22. Courant T, Roullin VG, Cadiou C, Delavoie F, Molinari M, Andry MC, et al. Development and physicochemical characterization of copper complexes-loaded PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*. 2009;379(2):226–34.
 23. Piacentini E, Yan M, Giorno L. Development of enzyme-loaded PVA microspheres by membrane emulsification. *J Memb Sci* [Internet]. Elsevier; 2017;524(October2016):79/86.Availablefrom:<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2016.11.008>
 24. Kurinomaru T, Shiraki K. Noncovalent PEGylation of L-asparaginase using PEGylated polyelectrolyte. *J Pharm Sci* [Internet]. 2015 Feb [cited 2015 Jun 11];104(2):587/92.Availablefrom:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25354692>
 25. Maruyama T, Izaki S, Kurinomaru T, Handa K, Kimoto T, Shiraki K. Protein-poly(amino acid) precipitation stabilizes a therapeutic protein l-asparaginase

- against physicochemical stress. *J Biosci Bioeng* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015 xx(xx). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172315001607>
26. Vagenende V, Yap MGS, Trout BL. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. 2009;48:11084–96.

CAPÍTULO II-Artigo a ser submetido ao periódico**International Journal of Pharmaceutics****Fator de impacto: 3,994****Estabilização da L-Asparaginase em nanoesferas de PLGA resulta em melhor performance desta enzima**

Estabilização da L-Asparaginase em nanoesferas de PLGA resulta em melhor performance desta enzima

BRITO, A.E.M¹; APOLINARIO, A.C²; PESSOA-JR, A²; SILVA, J.A¹

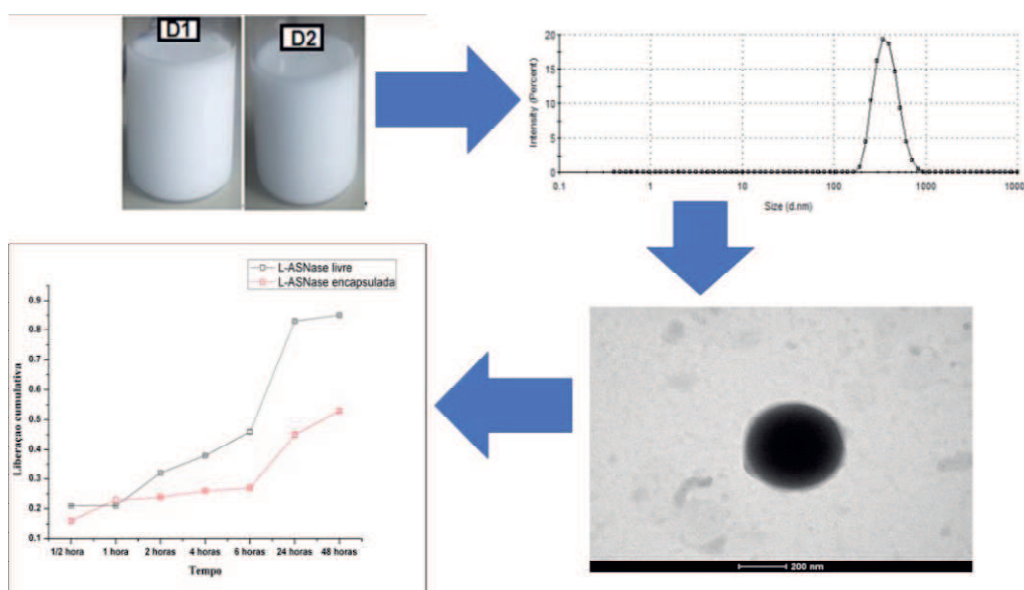
¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB, Brasil

² Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil

Highlights

- Nanoesferas de PLGA foram obtidas por dupla-emulsificação
- Foi possível obter alta eficiência de encapsulação da L-Asparaginase
- A enzima encapsulada apresentou melhor performance de atividade
- Os sistemas resultaram em um perfil de liberação da enzima mais lento

Graphical abstract



RESUMO

A L-asparaginase (L-ASNase) é um biofármaco largamente usado na quimioterapia sendo parte do esquema terapêutico do tratamento da leucemia linfóide aguda com ótimos prognósticos, mas com sérios episódios de toxicidade em razão da origem bacteriana, como também a manutenção da estrutura e estabilidade da proteína. A imobilização de enzimas é o confinamento de uma enzima em uma fase diferente do substrato ou produto e é uma alternativa para manter a estabilidade da enzima. Nanoesferas de PLGA com e sem L-ASNase foram preparadas pelo método da dupla emulsificação através da técnica de cavitação em sonda de ultrassom e utilizando como agentes estabilizante álcool polivinílico. O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética sendo respectivamente 383,9 nm, 0,143 e -16,4 mV. O sistema resultou em uma eficiência de encapsulação de $86,67 \pm 1,84$ %. A atividade da enzima encapsulada foi confirmada por zimograma e foi maior 22 % em relação a livre e a análise por dicroísmo circular confirmou que não houve alteração conformacional da enzima encapsulada. O estudo de liberação foi realizado por meio de diálise, sugerindo um sistema de liberação controlada com $< 60\%$ da enzima liberada do sistema em 48 horas. As nanopartículas não foram hemolíticas.

Palavras-chave: nanobiotecnologia, terapia antileucêmica, nanoesferas, PLGA, L-asparaginase.

Abreviações:

(ASNase) Asparaginase, (Asn) Asparagina, DLS (*Dynamic light scattering*), DMSO (Dimetilsufóxido), FDA (Food and Drug Administration), LLA (Leucemia linfóide aguda), MET-Microscopia eletrônica de transmissão, NP (Nanopartículas), PLGA (Poliácido (lático-co-glicólico), PVA (Álcool polivinílico).

INTRODUÇÃO

A L-asparaginase (L-ASNase) é um agente antineoplásico amplamente usado no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA), considerado o tipo mais comum de câncer infantil que, no entanto possui bom prognóstico, com 95% de remissão completa em casos tratados com quimioterapia (Shrivastava et al., 2015). Alguns aspectos indesejáveis à terapêutica inerentes à enzima são meia-vida curta e imunogenicidade. Por ser uma macromolécula hidrofílica de tamanho considerável (~140 kDa), a maioria das alternativas nanotecnológicas disponíveis como nanocápsulas e nanopartículas

poliméricas não constituem boas opções para a encapsulação dessa enzima. As nanopartículas produzidas pelo método de dupla emulsificação, por outro lado, são carreadores que poderiam manter a enzima encapsulada aumentando a meia-vida e diminuindo a sua imunogenicidade (Ashrafi et al., 2013; Manuela Gaspar et al., 1998; Wolf et al., 2003).

O mecanismo de ação da L-ASNase foi apresentado por Broome (1968), após evidenciar que a observação de Kidd (1953) de que havia regressão de linfomas em ratos e camundongos em consequência do tratamento com soro de porcos cobaias ocorria devido a ação hidrolítica da L-ASNase sob o aminoácido não-essencial L-asparagina (Asn), no entanto já em 1922 Clementi evidenciou que soro de cobaias era rico em L-ASPase. Até o momento as pesquisas que envolvem a L-ASNase abrangem especialmente a obtenção biotecnológica desta enzima a partir de diferentes fontes microbiológicas ou formas recombinantes bem como o desenvolvimento de métodos de peguilação ou imobilização através da nanoencapsulação que driblem os problemas imunogênicos e farmacocinéticos da mesma.

O desenvolvimento de sistemas que encapsulem a enzima e sejam capazes de promover sua liberação na circulação representam uma alternativa para promover um maior tempo de circulação da mesma, neste aspecto nanopartículas (NPs) de poli ácido (lactico-co-glicólico) (PLGA) foram relatadas como carreadores para L-ASNase e apresentaram um aumento da meia-vida da enzima levando a uma distribuição contínua da proteína (Ashrafi et al., 2013; Manuela Gaspar et al., 1998; Wolf et al., 2003). A utilização de lipossomas resultou em aumento da atividade anti-tumoral do fármaco e preveniu a indução da formação de anticorpos (Gaspar et al., 1996). O copolímero PLGA é amplamente utilizado e aceito pela indústria farmacêutica em diferentes sistemas de liberação de fármacos especialmente por ser biodegradável e biocompatível

(Danhier et al., 2012). Assim neste trabalho foram obtidas nanoesferas a partir de PLGA de cadeia média (24-38 kDa) pelo método de dupla-emulsificação que resultou em alta estabilização da L-ASNase expressa em um aumento da atividade enzimática bem como alta eficiência de encapsulação.

Material e métodos

Materials

Foi utilizado copolímero de poli (ácido láctico-co-glicólico) massa molecular de 24,000-38,000 obtidos da Sigma *Aldrich*[®] (São Paulo, São Paulo, Brasil). A enzima L-asparaginase de *E. coli* Elspar O reagente Nessler foi adquirido da *Merck Millipore*[®] (Barueri, São Paulo, Brasil). O kit de ácido biciniconínico, o PVA (31-50 KDa) e a asparagina foram comprados da *Sigma Aldrich*[®] (São Paulo, São Paulo, Brasil). Todos os demais reagentes foram de grau analítico, adquiridos da *Synth*[®] (São Paulo, São Paulo, Brasil) e a água ultrapurificada em purificador Milli Q (*Merck Millipore*).

Caracterização do polímero

Espectroscopia: Difração de raios X (DRX)

As informações sobre a cristalografia do polímero PLGA (24-38 KDa) foram obtidas através da análise por difração de raios X (DRX). Os dados foram adquiridos através de um difratômetro Shimadzu[®] (modelo XRD 6000) que utilizou radiação de Cu K α numa voltagem de 30 kV e corrente de 10 mA, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$. A varredura de raios X foi executada em ângulo aberto de 2θ entre 5 e 60°.

Identificação por espectrofotometria no infravermelho (FTIR)

Uma amostra do polímero puro foi dispersa em pastilhas de brometo de potássio (KBr) contendo 1% (p/p) da amostra. Em seguida, foi levada ao espectrofotômetro Spectrum 400 *Perkin Elmer*[®] FT-IR/FT-NIR *Spectrometer*, realizando-se varredura do espectro entre 400 e 4000 cm^{-1} . O espectro obtido da amostra foi comparado com

espectros vistos na literatura. As bandas observadas foram caracterizadas de acordo com os grupos funcionais que as representam.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foi utilizado um Calorímetro DSC- 8500 *Perkin Elmer*[®]. Foi pesado 5 mg da amostra e a mesma foi submetida a uma faixa de aquecimento de 20 a 80 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min em cadinho de alumínio com tampa hermética. O nitrogênio líquido foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 80 mL/min e um cadinho de alumínio vazio foi usado como referência. O termograma obtido foi comparado com os vistos na literatura.

Elaboração do sistema de nanopartículas contendo a enzima

Para 1ª emulsão, a massa de 0,05 g de PLGA, foi diluída em 2,5 mL de clorofórmio e 250 µL de tampão PBS 7,4 contendo ou não a L-ASNase na concentração de 10 mg/mL foi adicionada, o sistema de duas fases foi submetido a sonicação com sonda de ultrason (750 Watt ultrasonic processor, modelo VC 750, *SONICS Vibra-Cell*®) com três ciclos de 60 segundos com potência de 50%. Para obter a 2ª emulsão, a 1ª emulsão foi vertida em 10 mL da solução de PVA 1% e levada novamente para sonicação por três ciclos de 60 segundos com potência de 50%. A emulsão formada foi levada para evaporação do solvente (24 horas) sob agitação. Os sistemas foram centrifugados por 15 minutos a 3220 *g* a temperatura ambiente de 25 °C, sendo lavados duas vezes com 5 ml de tampão PBS 7,4 e ressuspensos. O *pellet* final obtido foi ressuspensão também em 5 ml de tampão PBS 7,4 e levado para leitura por espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta.

Caracterização das nanopartículas

Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico das NPs foi medido por espalhamento de luz dinâmico, do inglês, *dynamic scattering light* (DLS), assim como o potencial zeta das mesmas no equipamento *Zetasizer Nano* (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom). Para o tamanho de partícula foi usada uma cubeta de vidro e para o zeta uma cubeta de plástico com diluição da amostra (1:100) em tampão PBS. As medidas foram feitas a uma temperatura de 25°C e com um ângulo do detector de 90°. As amostras foram equilibradas por 60s, com um ajuste automático de atenuador e foram realizadas 3 medidas para cada leitura. A viscosidade da água foi de 0,088 cP e o índice de refração de 1,330 e os valores de índice de refração de 1,55 do material PLGA (superfície externa das NPs) foi adotado para as nanoestruturas. As partículas foram consideradas como esferas e a equação de Stokes-Einstein (Equação 1) foi utilizada para análise do decaimento de correlação entre a intensidade medida e o coeficiente de difusão. Eq. 2

$$D_f = \frac{kBT}{6\eta R_h} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: D_f é o coeficiente de difusão, kB é a constant de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico

Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens do TEM das NPs foram obtidas do microscópio eletrônico de transmissão (modelo Tecnai Spirit Biotwin G2, FEI, Oregon, Estados Unidos) operando a uma tensão de aceleração de 200 kV. Aliquotas de 5 μ L de cada amostra das NPs foram diluídas em água destilada e depositadas sobre placas de cobre.

Encapsulação da ASNase

Eletroforese

Foi realizada eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), com 10% (m/v) de gel inferior e 5% (m/v) de gel superior e com corrente de 130 mA no equipamento *Mine-PROTEAN Tetra System* Biorad[®] (Hercules, California, Estados Unidos) para confirmação de que o *pellet* rompido continha a enzima. A banda foi detectada com uso do corante *Comassie Blue* (Biorad[®]).

Zimograma

A atividade enzimática da enzima encapsulada foi analisada por zimograma em gel de poliacrilamida a 10%, foi realizada *pellet* obtido a partir de três ciclos de centrifugação 3220 g por 15 min e lavagem em tampão PBS 7.4 para retirada de proteínas não-encapsuladas e o pellet foi dissolvido em DMSO 50% em PBS. Para o zimograma não foi utilizado no gel o componente desnaturante (SDS). As amostras foram corridas em duplicata, sendo uma corada com *Comassie Blue* (Biorad[®]) e a outra submetida a análise enzimática pelo método de detecção do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (AHA). Este método utiliza o cloreto férrico que reage com o AHA derivado da hidrólise de L-asparagina pela enzima L-ASNase, formando o composto β -hidroxamato aspártico férrico que possui uma coloração marrom.

Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) no UV distante para a L-ASNase antes e após a encapsulação (no *pellet obtido como anteriormente descrito*) foram medidos em um espectropolarímetro (Jasco J-1500 CD Spectrometer), com a faixa de 180-260 nm, em uma cubeta de caminho óptico de 10 mm, com 2 (duas) acumulações, velocidade de varredura de 10 nm·min⁻¹ e largura de banda de 5 nm, sem intervalo. A concentração de L-ASNase foi de 10 mg. mL⁻¹

Quantificação da proteína

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada por BCA para a L-ASNase encapsulada no *pellet* após dissolução em DSMSO 50% e MBCA para os sobrenadantes. Para o reagente BCA, o ácido bicinonínico foi misturado com sulfato de cobre 4% na proporção de 50:1 (Reagente BCA), em seguida foram adicionados 25 µL de amostra em 200 µL do reagente BCA (proporção Amostra: Reagente 1:20). Por fim a placa foi incubada por 30 min a 37°C. As absorbâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro a 562 nm até 10 min. Para o MBCA, os reagentes QA (reagente composto carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em 0,2 M NaOH, pH 11,251), QB (ácido bicinonínico a 4% (p / v), pH 8,5, solução penta-hidratada Sulfato de cobre (II) a 4%) e QC (solução penta-hidratada de sulfato de cobre (II) a 4% (p / v) foram misturados na proporção de 25:25:1, em seguida foram adicionados 125 µl de amostra e 125 µl do reagente MBCA (proporção Amostra: Reagente 1:1), sendo incubados por 2 horas a 37°C, e posteriormente lidas em espectrofotômetro a 562 nm até 10 min. As curvas padrões para os dois métodos foram feitas com albumina padrão dos referidos kits e estão dispostas no material suplementar.

Determinação da atividade enzimática

A atividade específica foi realizada por reação de Nesslerização. A reação se deu em duas etapas. Na primeira, a mistura da reação foi constituída de 500 µL de tampão Tris-HCl (0,05 M), pH 8,6; 450 µL de água purificada e 50 µL de L-Asparagina (189 mM), sendo a mesma agitada por inversão. A mistura foi incubada a 37 °C por 5 minutos para equilibrar a temperatura e adicionou 50 µL de amostra. A mistura foi novamente incubada a 37 °C por 30 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) (1,5 M). Foi preparado o branco da amostra, que se diferencia do tubo teste pela adição da amostra apenas após a adição do TCA.

Após os 30 minutos de reação e adição do TCA, todas as amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 2000 RPM para clarificação. Na segunda etapa do teste, a mistura da reação foi constituída por 100 μL da mistura resultante da primeira etapa; 2150 μL de água purificada e 250 μL do reagente de Nessler. A reação entre a amônia formada na 1ª etapa do teste e o reagente de Nessler produz coloração amarelada, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro a 436 nm. A curva padrão foi realizada com sulfato de amônia como padrão. O cálculo de número de unidades de enzima por mL de amostra foi realizado considerando que uma unidade de ASNase corresponde a 1 μmol de amônia produzida por minuto a 37°C. Assim como disposto na equação 2:

$$U/\text{mL} = \frac{C_1 \times V_1}{V_t \times T_1 \times V_a} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: C_1 é a concentração em μmol de amônia encontrada na etapa 1, V_1 é o volume da etapa 1, V_t é o volume transferido da etapa 1 para etapa 2, T_1 é o tempo de incubação da etapa 1 e V_a é o volume da amostra de enzima ou padrão

A atividade específica é encontrada pela razão entre a atividade em U/mL e a concentração de proteínas totais em mg/mL, sendo encontrado um valor em U/mg de enzima.

Ensaio de eficiência de encapsulação

Para avaliar a eficiência de encapsulação da L-ASNase nas NPs foi realizado o ensaio direto no *pellet* resultante das etapas de centrifugação. O *pellet* final foi dissolvido em 1mL de solução DMSO 50 % (DMSO + PBS) e foi utilizado para quantificação de proteínas totais. No *pellet* foram doseadas proteínas totais e equação 3 foi aplicada para calcular a eficiência de encapsulação. Previamente a esse estudo, um ensaio de atividade enzimática da L-ASNase na presença de DMSO foi realizado para avaliar se haveria influência do tensoativo na atividade da enzima.

$$EE_{\%} = \frac{C_P \times V_P}{C_{SE} \times V_{SE}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: C_P é a concentração em mg.mL^{-1} de proteínas no pellet em DMSO 50% , V_P é o volume em mL do *pellet*, C_{SE} é a concentração em mg.mL^{-1} de proteínas na solução enzimática usada para encapsulação e V_{SE} é o volume da solução enzimática usada para encapsulação.

Foi realizado também o ensaio indireto no qual a enzima foi quantificada nos sobrenadantes, desta forma, o sistema foi centrifugado por $3200 \times g$ por 15 min e o sobrenadante retirado, sendo este processo repetido mais duas vezes para quantificação dos demais sobrenadantes. As quantificações feitas nas ressuspensões foram usadas como parâmetro de checagem de que não haveria ou seria mínima a quantidade de proteínas presentes ainda no sistema, mas não encapsulada. Nos três sobrenadantes foram doseadas proteínas totais e equação 4 foi aplicada para calcular a eficiência de encapsulação.

$$EE_{\%} = \frac{C_{sob} \times V_{sob}}{C_{SE} \times V_{SE}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que: C_{sob} é a concentração em mg.mL^{-1} de proteínas no sobrenadante encontrada após a primeira centrifugação, V_{sob} é o volume em mL do sobrenadante após a primeira centrifugação, C_{SE} é a concentração em mg.mL^{-1} de proteínas na solução enzimática e V_{SE} é o volume da solução enzimática.

Ensaio de liberação in vitro

O ensaio foi realizado para as NPs contendo a enzima, NPs brancas e a amostra controle que foi a enzima em solução de tampão fosfato salino (PBS, $\text{pH} = 7,4$). Essas amostras foram colocadas e seladas em sacos de diálise e incubadas em tampão PBS a 37°C sob agitação magnética suave, a 100 rpm, sendo utilizada a proporção 1:100 entre amostra e meio de liberação. Em intervalos de tempo pré-determinados, eram retirados

700 µl das amostras e substituídos por 700 µl do meio de liberação. As amostras recolhidas foram armazenadas a 4°C para a análise quantitativa. As mesmas foram analisadas utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA), o mesmo utilizado anteriormente para quantificação de proteínas e sob as mesmas condições operacionais descritas anteriormente. Os sistemas foram analisados em triplicata e a quantidade cumulativa de enzima liberada foi calculada nos intervalos de tempo estabelecidos (Adaptado de ASHJARI et al, 2012).

Determinação do potencial hemolítico

Foi realizado o ensaio de hemólise para as NPs sem L-ASNase e NPs contendo L-ASNase. Estas, previamente liofilizadas, foram ressuspensas em solução salina 0,9% NaCl (150 mM), pH = 7,4. Os sistemas foram preparados com hemácias de carneiro, sendo 1 ml da amostra e 50 µl das hemácias, foram mantidos em banho de água a 37 ° C durante 1 hora, sob agitação. Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm durante 3 min. A hemoglobina das amostras ($A_{amostra}$) foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. As absorbâncias das amostras foram comparadas ao controle negativo, solução salina (A_{branco}), e a um controle de hemólise positivo ($A_{água}$). O efeito hemolítico foi dado pela equação 5 abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_{amostra} - A_{branco}}{A_{água} - A_{branco}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Resultados e discussão

Caracterização do polímero

O DRX foi realizado para avaliar a cristalinidade do copolímero escolhido. De acordo com o difratograma obtido na Figura Suplementar 1 (S1) e com base nas informações do fabricante, o copolímero PLGA, ácido poli (D-L, láctico-co-glicólico) – 50:50) de peso molecular 24-38 KDa, apresenta estrutura amorfa, observada através de

uma banda larga entre 10° e 30°, o que está dentro da faixa relatada na literatura entre 10° e 40° (Seju et al., 2011).

O espectro no infravermelho (IV) foi obtido para confirmar os principais grupos químicos do polímero PLGA. A Figura S2 apresenta picos de absorção na região do infravermelho para o PLGA (24 -38 KDa). As principais bandas observadas para o copolímero PLGA foram em 3415 cm^{-1} a banda característica da ligação OH do grupo carboxila terminal do polímero, bandas em 3005 e 2953 cm^{-1} referentes a estiramentos de C-H nos grupos CH_2 e CH_3 , a banda a 1761 cm^{-1} é referente ao estiramento de C=O, as bandas entre 1433 a 1381 cm^{-1} referem-se a vibrações simétricas e assimétricas de deformação de C-H nos grupos CH_3 e CH_2 . A faixa de 1289 a 1094 cm^{-1} são bandas referentes a estiramentos de C-O e C-O-C, a faixa de 867 cm^{-1} vibrações de flexão de C-H dos grupos CH_3 e CH_2 e faixa de 765 a 713 e cm^{-1} estiramento de C-Cl de cloretos alifáticos (Fu et al., 2017).

O PLGA apresenta uma faixa temperatura de transição vítrea entre 40 e 60°C (Figura S3) (Lappe et al., 2017). Essa faixa se encontra acima da temperatura corporal (37° C), o que o mantém na forma vítrea. Desta forma, este polímero possui estrutura rígida, o que lhe proporciona resistência mecânica, permitindo ser usado como carreador de fármacos (Barbanti et al., 2005).

Caracterização das nanopartículas

Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta

Na Figura 1 (A) pode-se analisar o resultado da análise de espalhamento de luz dinâmico que aponta para NPs com $383,9 \pm 13,91$ nm e um baixo grau de polidispersão, com IPD de $0,143 \pm 0,03$. Outros autores encontraram tamanhos próximos a 400 nm para NPs poliméricas, o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo (Lara, 2008; Kullkamp, et.al., 2009). É importante ressaltar que mesmo que este

tamanho não seja propício ao efeito Permeação e retenção aumentados (do inglês *enhanced permeability and retention*, EPR) uma vez que nas paredes tumorais ocorra fenestras de 240 nm ao contrário dos vasos normais cujo o diâmetro de fenestração é mantido a 60 nm (Fullstone et al., 2015), a leucemia é um câncer não- sólido do sangue e da medula óssea, assim as abordagens para utilização de NPs dependem da circulação prolongada destes sistemas e direcionamento para populações de células específicas responsáveis pela progressão da doença e não do EPR (Blanco et al., 2015). Assim este tamanho de NP acima do tamanho das fenestras de células tumorais é aceitável. O resultado do índice de polidispersão para o sistema analisado está compatível com índices encontrados na literatura e abaixo do índice (0,3), confirmando homogeneidade na distribuição de tamanho do sistema produzido (Courant et al., 2009).

Na Figura 1 (B) é possível observar um tamanho de partícula de $332,07 \pm 17,66$ nm, mostrando que a incorporação da enzima não modifica o tamanho das NPs, porém o sistema apresentou um alto grau de polidispersão, com IPD $0,920 \pm 0,05$. Em 1 (C) a presença de agregados da proteína foi sugerida após análise de DLS que revelou um pico inicial que indica a presença da enzima não-agregada com diâmetro hidrodinâmico de $9,14 \pm 0,05$ nm (característico da enzima) e outro pico que pode ser atribuído a agregados, no entanto observando a distribuição por número é possível inferir que estes agregados representariam uma fração pequena do ponto de vista da composição total da amostra analisada, o que ocorre é que na distribuição gerada por intensidade mesmo poucas partículas com tamanho grande já são suficientes para gerar um sinal (Li et al., 2011; Malvern Instruments Limited, 2011).

O potencial zeta das NPs sem e com enzima apresentaram valores negativos, respectivamente $-16,9 \pm 0,15$ mV e $-16,7 \pm 0,22$ mV. Estes resultados são consistentes com estudos anteriores sobre as partículas poliméricas (Panyam et al., 2002).

Rodríguez-Nogales et al (2016) em um estudo com NPs de PLGA obtiveram valores semelhantes de potencial zeta (-16 ± 2 mV), o que foi atribuído aos resíduos ácido deste polímero na matriz polimérica. Outros trabalhos relatados na literatura com NPs mostraram que potenciais zeta próximos a -16 mV foram indicativos de formação de nanoesferas, enquanto que potenciais zeta próximo à -40 mV, nanocápsulas (Losa et al, 1993; Calvo et.al., 1996). Segundo Danhier et al. (2012) NPs elaboradas com PLGA apresentam uma carga negativa de superfície, que é característica desse polímero.

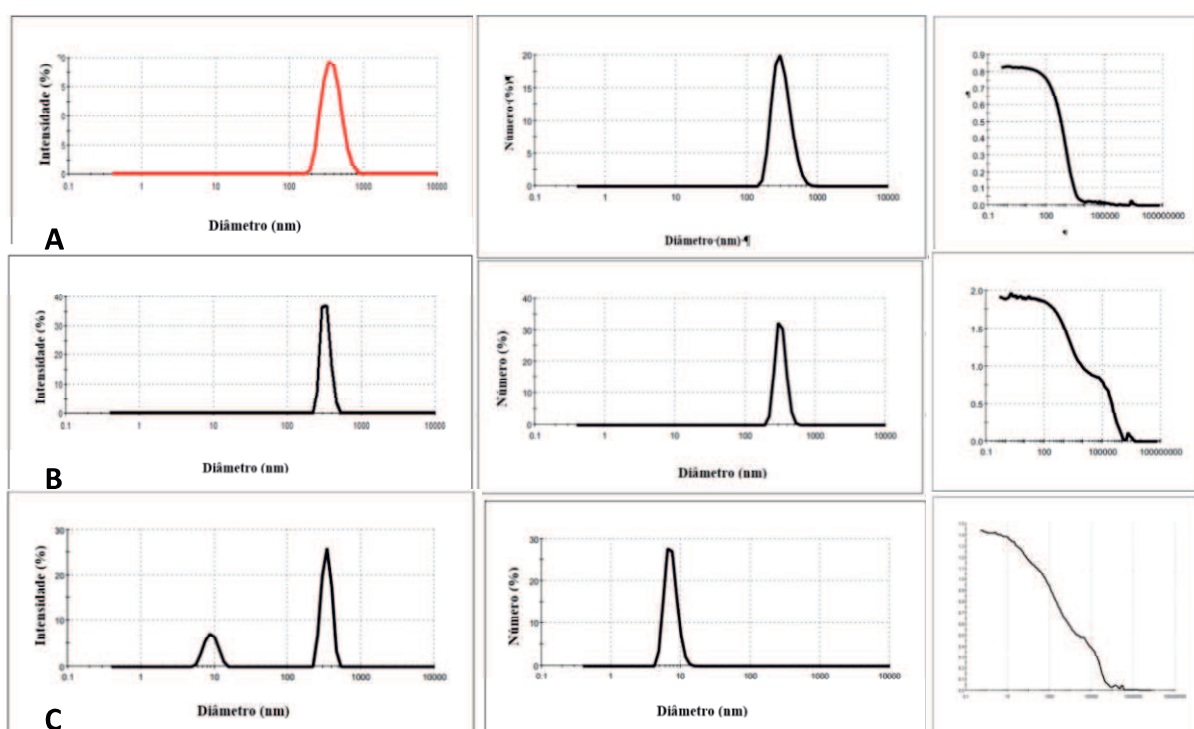


Figura 1: Análise por espalhamento de luz dinâmica. Em (A) Nanopartícula sem enzima por intensidade, número e correlograma; (B) Nanopartícula com ASNase por intensidade, número e correlograma; (C) Solução enzimática de L-Asparaginase em PBS 7,4 por intensidade, número e correlograma.

Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM)

A caracterização do sistema por TEM foi realizada para identificar a morfologia das NPs. Conforme ilustrado na Figura 2, foram observadas partículas individuais do tipo nanoesferas, dispersas, sem sinais de agregação. O tamanho das partículas foi medido com auxílio do programa Image J (Figura S3) e foram consistentes com os resultados obtidos a partir do DLS com tamanho de 390 ± 87 nm. Foi possível observar a

similaridade dessas NPs com outras NPs de PLGA desenvolvidas usando outros métodos de fabricação convencionais (Rodríguez-Nogales et al., 2016; Han et al., 2015; Jaidev et al., 2015).

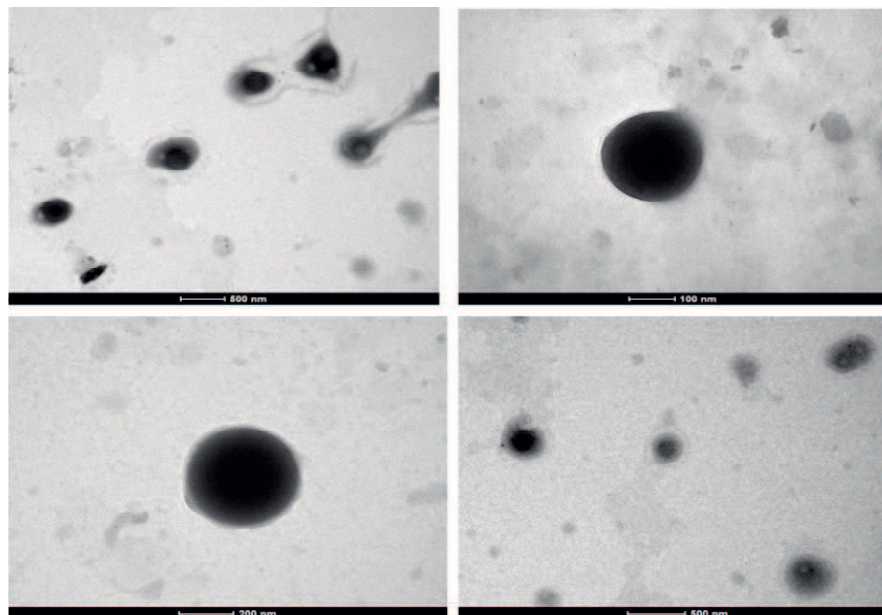


Figura 2-Microscopia eletrônica de transmissão das nanoesferas de PLGA

Avaliação da encapsulação da L-ASNase

Eletroforese e zimograma

A eletroforese feita após quebra do *pellet* com DMSO confirmou a presença de proteína encapsulada, como pode ser visto na Figura 3.

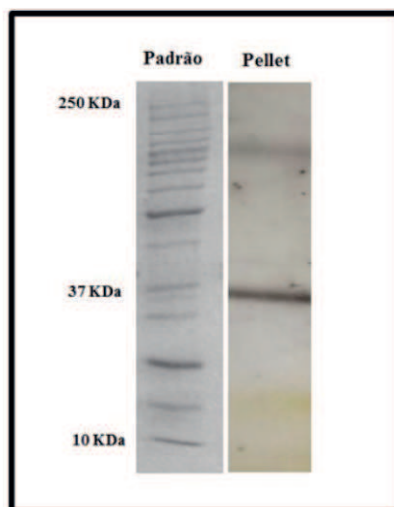


Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) da amostra resultante da quebra de nanopartículas com DMSO revelado por prata com presença da

banda de L-asparaginase em 37 kDa, mas algum tipo de impureza também foi encontrado.

No zimograma para a amostra resultante da quebra das NPs com DMSO 50% exibido na Figura 4 é possível observar uma banda de ASNase com atividade, indicando que mesmo com todo processo de estresse do método, como sonicação e exposição a solvente orgânico os quais podem alterar a estrutura da proteína (Fonte et al., 2015), foi possível encapsular a enzima com atividade.

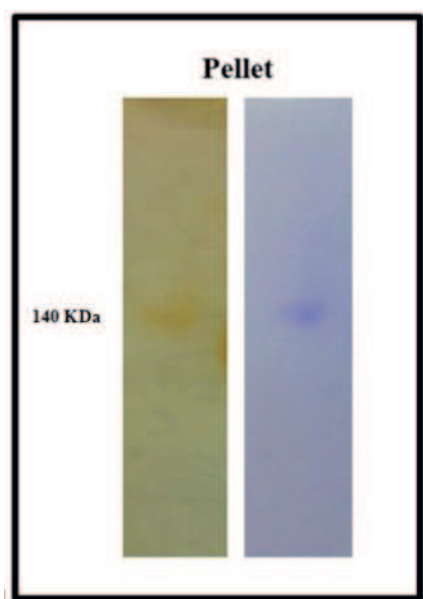


Figura 4— Zimograma da amostra resultante da quebra de nanopartículas com DMSO à esquerda onde pode ser vista uma banda corada por cloreto férrico indicando que a enzima encapsulada manteve atividade e gel não- desnaturante a direita indicando a presença da enzima L-ASNase.

Dicroísmo circular

De acordo com a Figura 5 pode-se observar uma pequena diminuição na intensidade dos espectros do *pellet*, porém sem quaisquer mudanças nos picos. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Mandal et al. (2013), para nanopartículas de carbono para encapsulação de BSA e HSA, que também são proteínas, eles observaram uma diminuição na intensidade dos espectros destas, sem mudanças dos picos, sugerindo possível interação destas NPs com as proteínas. Já Zhao

et al. (2011), em estudo com NPs de poliuretano para imobilização de hemoglobina, observou também uma pequena diminuição na intensidade dos picos, mas sem nenhuma mudança dos mesmos, o que foi atribuído a biocompatibilidade do sistema e da proteína, afirmando que essas nanoestruturas mantinham a conformação nativa da proteína.

A fim de analisar a estrutura de nanoesferas de BSA preparadas por irradiação, Espinoza et al. (2012) utilizou também a técnica de DC, e do mesmo modo foi também observado que todas as curvas possuem a mesma forma e não foi notado nenhum deslocamento, o que indica que o microambiente de aminoácidos aromáticos manteve as características conformacionais da proteína. Diante do exposto acima, nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura, e assim podemos sugerir que a conformação nativa da L-ASNase foi mantida, e que o sistema elaborado a partir de PLGA para encapsulação da mesma é satisfatório, indicando compatibilidade dos mesmos.

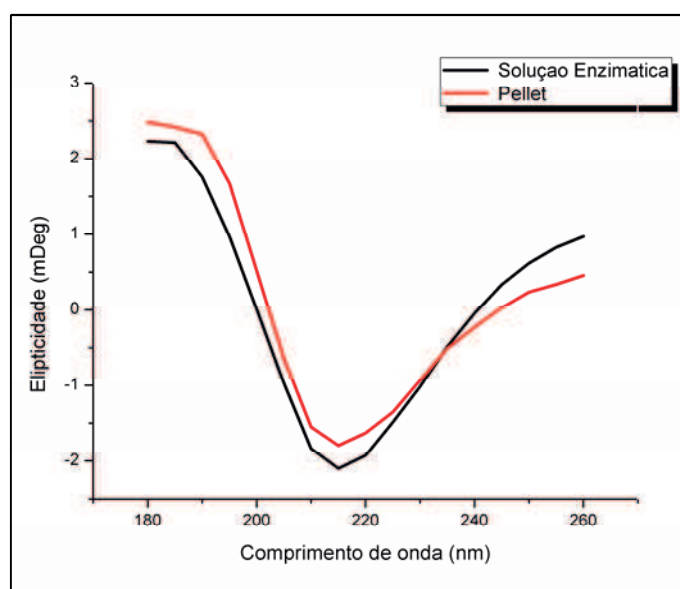


Figura 5- Dicroísmo circular da L-ASNase livre e encapsulada.

Eficiência de encapsulação

A Eficiência de encapsulação (EE%) pode ser observada na Tabela 1, onde nota-se uma EE% pelo método direto de $86,67 \pm 1,84\%$ e pelo método indireto de $95,35 \pm$

0,06%, essa diferença pode ser devido a utilização do micro BCA para realização do método indireto, o qual quantifica na faixa de 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$, sendo, portanto, mais sensível. Sendo considerado no presente estudo o valor de eficiência do método direto, uma vez que o ensaio indireto foi usado como parâmetro de checagem de que não haveria ou seria mínima a quantidade de proteínas presentes ainda no sistema, mas não encapsulada.

Tabela 1- Eficiência de encapsulação da L-Asparaginase nas nanoesferas de PLGA pelo método direto e indireto.

Métodos	Eficiência de encapsulação (%)
Direto	86,67 ($\pm 1,84$)
Indireto	95,35 ($\pm 0,06$)

Em um estudo com nanopartículas de PLGA (50:50) elaboradas por dupla emulsificação para estabilização da L-ASNase, Wolf et al (2003), produziram nanoesferas com eficiência de encapsulação entre 26-70% dependendo da fase aquosa utilizada (pluronic, trealose, glicerol, água, tampão Tris). Em um estudo de nanopartículas de PLGA para administração de insulina, foi observado que ao mudar o método de preparo das nanopartículas, antes emulsificação espontânea para o método de dupla emulsão, foi observado um aumento na eficiência de encapsulação de 30% para 65%, esse aumento foi atribuído ao fato de o método de dupla emulsificação favorecer a encapsulação de fármacos hidrofílicos, como a insulina, em razão da menor exposição a solventes orgânicos (Correia et al, 2014).

Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade específica da L-ASNase foi realizada por nesslerização (Equação 6) com a enzima na concentração em massa inicial de 10 mg. mL^{-1} , a medição foi feita com base na curva apresentada no Apêndice. Na Tabela 2 estão apresentados os valores da atividade e atividade enzimática da L-ASNase encapsulada.



Tabela 2- Determinação da atividade da enzima L-Asparaginase encapsulada e L-Asparaginase pura (n=3). O erro refere-se ao desvio padrão.

Ensaio	Enzima livre	Enzima encapsulada
Atividade	3,02 U.mL ⁻¹ ± 0,05	3,89 U.mL ⁻¹ ± 0,07
Atividade específica	427,33 U.mg ⁻¹ ± 8,84	530,44 U.mg ⁻¹ ± 9,23

É possível verificar que a enzima encapsulada apresentou maior atividade que a enzima livre, uma vez que, a encapsulação de compostos bioativos em estruturas de tamanho sub-micro como as nanopartículas, surge como uma solução ideal para promover a estabilização e proteger os mesmos de alterações e agentes que possam comprometer a sua função (Nagai, 2005; Tabata, 2006), ainda apresenta vantagens como possibilidade de recuperação da enzima, aumento da seletividade da mesma e proteção contra degradação mantendo a enzima na forma ativa enquanto circula no organismo (Cellesi; Tirelli, 2006).

Sendo assim, pode-se sugerir que esse aumento na atividade foi devido a imobilização da proteína dentro da estrutura porosa do polímero o que permitiu que a enzima não agregasse. Uma situação que pode justificar esse aumento de atividade é que a enzima livre tem certo grau de agregação e uma atividade "aumentada" é observada utilizando a enzima imobilizada em comparação com uma enzima "agregada" (Rodrigues et al., 2012). Desta forma, a enzima provavelmente exporia mais os seus sítios catalíticos onde ocorre a atividade enzimática (MATEO et al, 2007).

Ensaio de liberação in vitro

Como mostrado na Figura 6, foi realizada uma comparação do perfil de liberação *in vitro* entre a ASNase livre e nanopartículas de PLGA contendo ASNase. A liberação da enzima a partir das nanoesferas foi lenta, menos de 60% de ASNase foi liberada do sistema em 48 horas. Xie et al., (2008) observaram liberação lenta em micropartículas

de PLGA contendo as proteínas BSA e lisozima, onde apenas de 16 a 28% foram liberadas em até 144 h, sugerindo que este perfil de liberação era consequência do processo de degradação do polímero. Segundo Mundargi et al (2008), copolímeros de PLGA vem sendo bastante utilizados na encapsulação de fármacos devido à sua biocompatibilidade e também ao fato de que sua taxa de degradação e as propriedades mecânicas podem ser moduladas, de acordo com a razão ácido lático (PLA)/ácido glicólico (PGA). Como visto anteriormente, estes copolímeros são quebrados em PLA e PGA, que são facilmente eliminados na forma de CO₂ e água. A taxa em que ocorre a degradação é de fundamental importância para determinar o perfil de liberação de um ativo e depende do grau de cristalinidade, hidrofiliicidade e massa molar.

Manuela Gaspar et al (1998) em um estudo com NPs de PLGA para carreamento da L-asparaginase, mostrou um comportamento de liberação *in vitro* de NPs feitas com três copolímeros de PLGA com uma proporção de 50:50 (PLA:PGA) que diferem no seu peso molecular (12 e 34 KDa) e, também, na presença de grupos carboxílicos nas extremidades (sendo mais hidrofílicos) ou esterificados na cadeia do polímero. Após 14 dias de incubação, 81,9% da proteína foi liberada a partir das NPs feitas com PLGA de peso molecular de 12 kDa, enquanto que apenas 46,3% foi liberado a partir das NPs feitas com PLGA de 34 kDa. Os autores sugeriram que esses valores foram dependentes do peso molecular do polímero, indicando que NPs feitas de PLGA de baixo peso molecular fornecem a taxa de liberação mais rápida. Os mesmos ainda afirmam, que após uma liberação inicial da enzima, o restante da sua liberação é controlada pela taxa de degradação do polímero e que ocorre uma taxa de liberação mais lenta da L-ASNase.

Em comparação ao presente estudo, no qual foi utilizado PLGA de peso molecular entre 24-38 KDa, pode-se inferir que o peso molecular do polímero e consequentemente a sua taxa de degradação influenciou no perfil de liberação da enzima, culminando em

liberação lenta, o que é viável levando em consideração que um dos obstáculos da terapêutica com L-ASNase é sua rápida degradação por proteases no sangue ou eliminação através do sistema imunológico. De acordo com nossos resultados e os relatados na literatura, a escolha do copolímero PLGA (50:50) culminou em resultados satisfatórios com a liberação lenta da L-ASNase, sugerindo um possível perfil de liberação controlada.

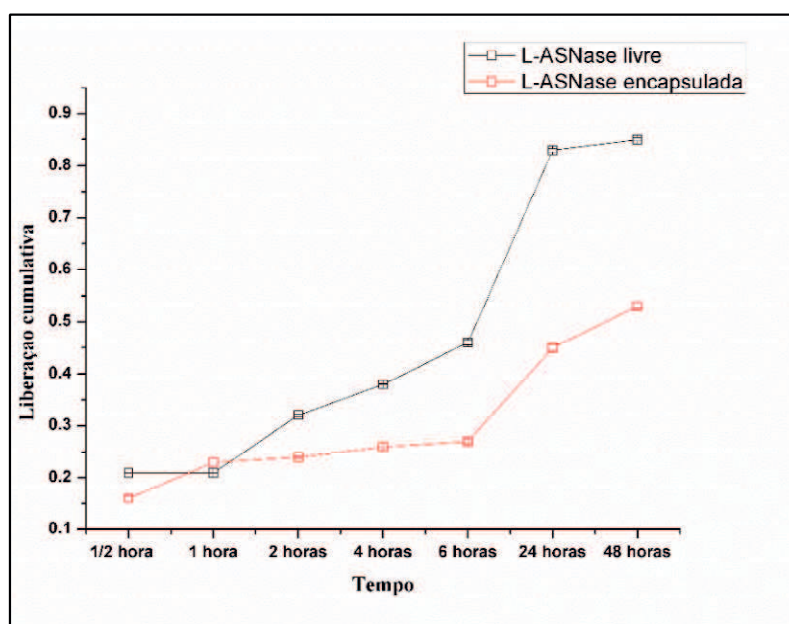


Figura 6: Perfil de liberação da L-Asparaginase livre e encapsulada.

Determinação do potencial hemolítico

Segundo Cótica *et al.* (2012), O ensaio de hemólise constitui um procedimento eficiente, simples, rápido e de baixo custo para investigar a citotoxicidade de micro/nanopartículas na membrana de eritrócitos por quantificação espectrofotométrica da hemoglobina liberada. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Figura 7. Como grande parte dos quimioterápicos utilizados na clínica são de administração intravenosa, por esta razão procedeu a análise da toxicidade do sistema com e sem enzima em um ensaio preliminar. Na Figura 7 está ilustrado a comparação

entre o controle positivo, o controle negativo, o sistema branco (sem enzima) e o sistema contendo ASNase. Wang et al (2014), em um estudo com NPs de PLGA e NPs de PLGA modificadas com protamina para melhorar o carreamento de doxorubicina, observou que as NPs também se mostraram biocompatíveis, sem apresentar efeitos hemolíticos. NPs de PLGA para carreamento de paclitaxel também se mostraram não hemolíticas quando comparadas com os controles positivo e negativo (GUPTA et al, 2014).

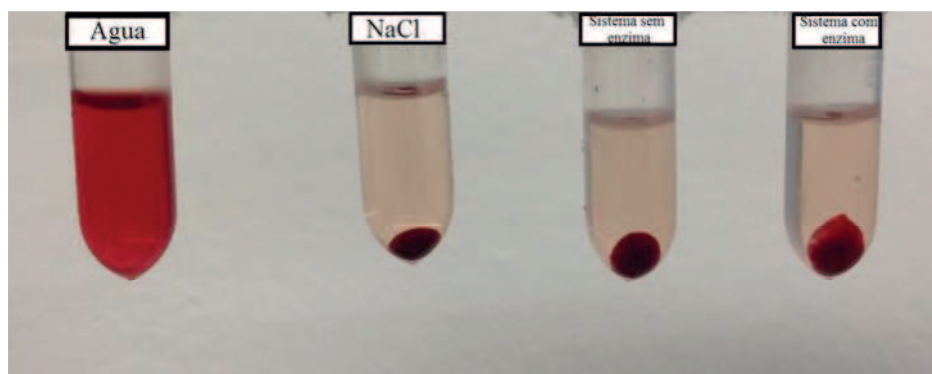


Figura 7: Determinação do potencial hemolítico para as amostras de água (controle positivo), NaCl (controle negativo), sistema sem enzima e sistema com enzima.

Conclusões

De acordo com os resultados descritos podemos concluir que foi possível a encapsulação da L-ASNase em NPs de PLGA. O sistema apresentou alta eficiência de encapsulação, monitorada por eletroforese com gel nativo, mostrando a presença da enzima encapsulada e zimograma, onde foi possível observar que a enzima encapsulada manteve a atividade. A nesslerização demonstrou maior atividade da enzima encapsulada em relação a livre. Não houve alteração conformacional da enzima encapsulada. O sistema nanopartícula-enzima pode sugerir um perfil de liberação controlada e de acordo com o ensaio do potencial hemolítico foi possível observar que tanto as NPs com enzima quanto as sem, apresentaram-se não hemolíticas.

Agradecimentos:

Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de São Paulo (Professora Dra. Carlota Rangel-Yagui), Laboratório de Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Laboratório de Ensaio e Corrosão (LEC) da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, PROCAD, n. 552652/2011-3 (*Development of Processes and Pharmaceuticals and Biotechnological Processes Using the Sustainability Potential of Semiarid*), Projeto Universal 14/2014 - Processo: 454276/2014-1. Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo 2013/08617-7 (Projeto temático) e 2014/10456-4

REFERÊNCIAS

- Ashrafi, H., Amini, M., Mohammadi-Samani, S., Ghasemi, Y., Azadi, A., Tabandeh, M. R., & Daneshamouz, S. (2013). Nanostructure l-asparaginase-fatty acid bioconjugate: Synthesis, preformulation study and biological assessment. *International journal of biological macromolecules*, *62*, 180-187.
- Ashjari, M., Khoei, S., Mahdavian, A. R., Rahmatolahzadeh, R. (2012). Self-assembled nanomicelles using PLGA-PEG amphiphilic block copolymer for insulin delivery: a physicochemical investigation and determination of CMC values. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *23*(4), 943-953.
- Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A., Duek, E. A. (2005). Bioresorbable polymers in tissue engineering. *Polímeros*, *15*(1), 13-21.
- Bootz, A., Vogel, V., Schubert, D., Kreuter, J. (2004). Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *57*(2), 369-375.
- Broome, J. D. (1968). Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase: effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and-resistant lymphoma cells. *The Journal of experimental medicine*, *127*(6), 1055.
- Calvo, P., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J. (1996). Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of pharmaceutical sciences*, *85*(5), 530-536.
- Cellesi, F. Tirelli, N. (2006). Sol-gel synthesis at neutral pH in W/O microemulsion: A method for enzyme nanoencapsulation in silica gel nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *288*, 52, 52-61.
- Correia, C. J., Rijo, P., Ascensão, L., Nicolai, M. H. F., Matias, D., Reis, C. P. (2014). Optimization of the encapsulation efficiency of a novel oral insulin delivery nanosystem.
- Cótica, L. F., Freitas, V. F., Dias, G. S., Santos, I. A., Vendrame, S. C., Khalil, N. M., Jain, M. (2012). Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and

assessment of their effects on blood cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(4), 559-563.

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., Pr at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*, 161(2), 505-522.

Erbetta, C. D. C. ; Alves, R. A. ; Resende, J. M. ; Freitas, R. F. S. ; Sousa, Ricardo Geraldo . Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v. 03, p. 208-225, 2012.

Espinoza, S. L. S., Sánchez, M. L., Risso, V., Smolko, E. E., Grasselli, M. (2012). Radiation synthesis of seroalbumin nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(9), 1417-1421.

Fonte, P., Araújo, F., Seabra, V., Reis, S., van de Weert, M., Sarmiento, B. (2015). Co-encapsulation of lyoprotectants improves the stability of protein-loaded PLGA nanoparticles upon lyophilization. *International journal of pharmaceutics*, 496(2), 850-862.

Formariz, T. P., Chiavacci, L. A., Sarmiento, V. H. V., Franzini, C. M., Scarpa, M. V., Santilli, C. V., Oliveira, A. G. (2008). Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63(2), 287-295.

Gaspar, M. M., Blanco, D., Cruz, M. E. M., Alonso, M. J. (1998). Formulation of L-asparaginase-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *Journal of controlled release*, 52(1), 53-62.

Gorman, A., Killoran, J., O'Shea, C., Kenna, T., Gallagher, W. M., O'Shea, D. F. (2004). In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 126(34), 10619-10631.

Gupta, P. N., Jain, S., Nehate, C., Alam, N., Khare, V., Dubey, R. D., Singh, S. K. (2014). Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA: poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy. *International journal of biological macromolecules*, 69, 393-399.

Han, J., Michel, A.R., Lee, H.S., Kalscheuer, S., Wohl, A., Hoye, T.R., McCormick, A.V., Panyam, J., Macosko, C.W., 2015. Nanoparticles containing high loads of paclitaxel-Silicate prodrugs: formulation, drug release, and anticancer efficacy. *Molecular Pharmaceutics*, 12, 4329-4335.

Jaidev, L.R., Krishnan, U.M., Sethuraman, S., 2015. Gemcitabine loaded biodegradable PLGA nanospheres for in vitro pancreatic cancer therapy. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological*, 47, 40-47.

Jeon, H. J., Jeong, Y. I., Jang, M. K., Park, Y. H., Nah, J. W. (2000). Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *International journal of pharmaceutics*, 207(1), 99-108.

- Kidd, JG (1953). Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *Journal Experimental Medicine*, v. 98, n., p. 565-581, 1953.
- Külkamp, I. C., Burin, G. D., Souza, M. H. M., Silva, P. D., Piovezan, A. P. (2007). Aceitação de práticas não-convencionais em saúde por estudantes de medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Educação Médica*, 31(3), 229-235.
- Kurinomaru, T., Shiraki, K. (2015). Noncovalent PEGylation of L-Asparaginase Using PEGylated Polyelectrolyte. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(2), 587-592.
- Lara, V. C. D. (2008). Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 103 p., 2008.
- Li, Y. P., Pei, Y. Y., Zhang, X. Y., Gu, Z. H., Zhou, Z. H., Yuan, W. F., Gao, X. J. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *Journal of controlled release*, 71(2), 203-211.
- Li, S., Meng, F., Wang, Z., Zhong, Y., Zheng, M., Liu, H., Zhong, Z. (2012). Biodegradable polymersomes with an ionizable membrane: facile preparation, superior protein loading, and endosomal pH-responsive protein release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(1), 103-111.
- Losa, C., Marchal-Heussler, L., Orallo, F., Jato, J. L. V., Alonso, M. J. (1993). Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharmaceutical research*, 10(1), 80-87.
- Maruyama, T., Izaki, S., Kurinomaru, T., Handa, K., Kimoto, T., Shiraki, K. (2015). Protein-poly (amino acid) precipitation stabilizes a therapeutic protein L-asparaginase against physicochemical stress. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(6), 720-724.
- Malvern instruments limited. Dynamic Light Scattering Common Terms Defined. *Inform White Paper*, p. 1-6, 2011.
- Mandal, S., Hossain, M., Devi, P. S., Kumar, G. S., Chaudhuri, K. (2013). Interaction of carbon nanoparticles to serum albumin: elucidation of the extent of perturbation of serum albumin conformations and thermodynamical parameters. *Journal of hazardous materials*, 248, 238-245.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 385(1), 113-142.
- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, L. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451-1463.
- Motta, A. C., Duek, E. A. R. (2006). Síntese, Caracterização e Degradação in vitro do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Matéria (Rio de Janeiro)*.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T. M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-

lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125(3), 193-209.

Nagai, T. (2005). Drug discovery and innovative drug delivery research in new drug development. *Pharmaceutical Technology in Japan*, 21, pp. 1949-1951.

Panyam, J., Zhou, W. Z., Prabha, S., Sahoo, S. K., Labhasetwar, V. (2002). Rapid endo-lysosomal escape of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *The FASEB Journal*, 16(10), 1217-1226.

Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torresd, R., Fernandez-Lafuente, R. (2013). *Chemical Society Reviews*, 42, 6290-6307.

Rodríguez-Nogales, C., Garbayo, E., Martínez-Valbuena, I., Sebastián, V., Luquin, M. R., Blanco-Prieto, M. J. (2016). Development and characterization of polo-like kinase 2 loaded nanoparticles-A novel strategy for (serine-129) phosphorylation of alpha-synuclein. *International Journal of Pharmaceutics*, 514(1), 142-149.

Shrivastava, A., Khan, A. A., Khurshid, M., Kalam, M. A., Jain, S. K., Singhal, P. K. (2016). Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical reviews in oncology/hematology*, 100, 1-10.

Singhal, A., Morris, V. B., Labhasetwar, V., Ghorpade, A. (2013). Nanoparticle-mediated catalase delivery protects human neurons from oxidative stress. *Cell death & disease*, 4(11), e903.

Tabata, T. (2006). Drug delivery system: basic technology for biomedical research, medical treatment and health care. *Biotechnology Journal*, 6, pp. 553-555.

Vagenende, V., Yap, M. G., Trout, B. L. (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 48(46), 11084-11096.

Wang, H., Zhao, Y., Wang, H., Gong, J., He, H., Shin, M. C., Huang, Y. (2014). Low-molecular-weight protamine-modified PLGA nanoparticles for overcoming drug-resistant breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 192, 47-56.

Wolf, M., Wirth, M., Pittner, F., Gabor, F. (2003). Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanospheres. *International journal of pharmaceutics*, 256(1), 141-152.

Xie, F., Yu, L., Chen, L., Li, L. (2008). A new study of starch gelatinization under shear stress using dynamic mechanical analysis. *Carbohydrate Polymers*, 72(2), 229-234.

Yang, J., Hou, Y., Ji, G., Song, Z., Liu, Y., Dai, G, Zhang, Y., Chen, J. (2014). Targeted delivery of the RGD-labeled biodegradable polymersomes loaded with the hydrophilic drug oxymatrine on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 52, 180– 90.

Zhao, W., Zhang, G., Jiang, L., Lu, T., Huang, X., Shen, J. (2011). Novel polyurethane ionomer nanoparticles displayed a good biosensor effect. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88(1), 78-84.

Material Suplementar

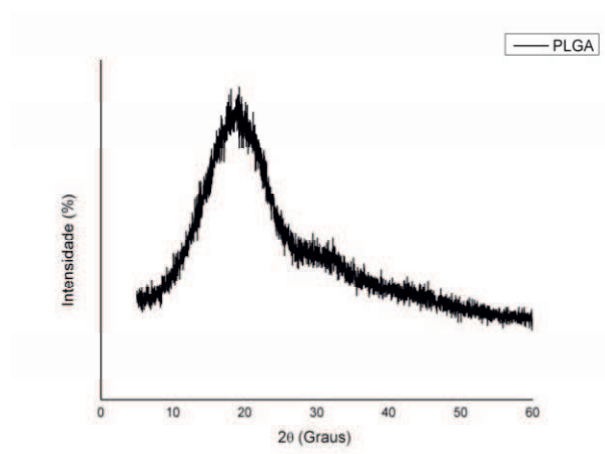


Figura S1- DRX do polímero PLGA (24-38 KDa).

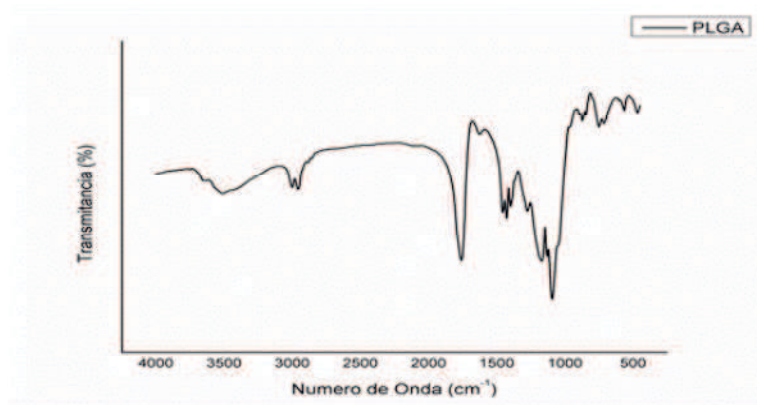


Figura S2- FTIR do polímero PLGA (24-38 KDa).

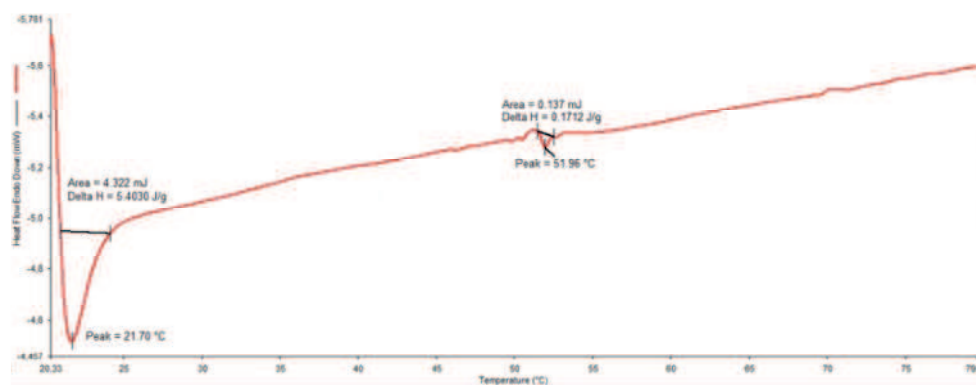


Figura S3 - DSC do polímero PLGA (24-38 KDa).

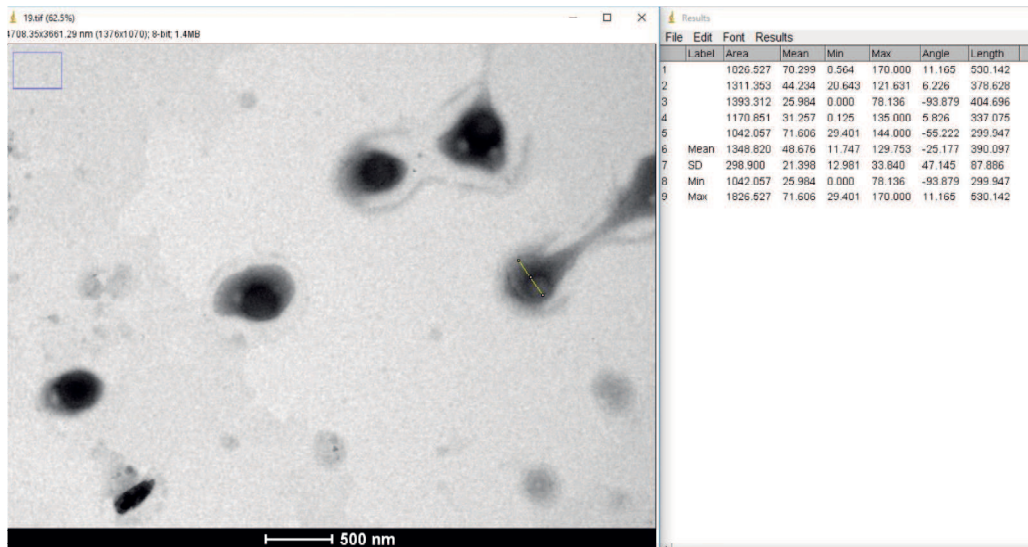


Figura S3- Uso do *Image j*[®] na determinação do tamanho das nanoesferas.

4 PESPECTIVAS FUTURAS

- Aprofundar-se no estudo de liberação da enzima L-asparaginase, aumentando o tempo de estudo e elaboração da cinética de liberação;
- Realizar testes em células leucêmicas com os sistemas de nanopartículas desenvolvidos;
- Realizar testes de hemocompatibilidade em seres humanos.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688–1713, 2006.

ACHARYA, S. et al. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 30, p. 5737–5750, 2009.

ACHARYA S.; SAHOO S.K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, p.170–183, 2011.

ADMINISTRATION, D. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology, 2014.

ANDRADE, A. et al. Update on the use of l-Asparaginase in Infants and Adolescent Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Medicine Insights Oncology**, v. 8, n., p. 95-100, 2014.

ANINDITA, D.; VENKATESH, N. Design and evaluation of liposomal delivery system for L-Asparaginase. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 08427105346, p. 112–117, 2012.

ASHRAFI, H. et al. Nanostructure L-asparaginase-fatty acid bioconjugate: synthesis, preformulation study and biological assessment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 180–7, 2013.

AVRAMIS, V.I. et al. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**, v. 99, p.1986–1994, 2012.

BANGHAM, A D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 238–252, 1965.

BAHREINI, E. et al. Preparation and nanoencapsulation of l-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 340, 2014.

BARAN, E. T.; AZURE, C. DE. In vivo half life of nanoencapsulated. v. 3, p. 1113–1121, 2002.

BEKKER-MÉNDEZ, V. et al. Prevalence of gene rearrangements in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia: a population study-report from the Mexican Interinstitutional Group for the identification of the causes of childhood leukemia. **Biomed Research International**, v. 2014, n., p. 1-8, 2014.

BELSON, M. et al. Risk factors for acute leukemia in children: a review.

Environmental Health Perspectives, v. 115, n. 1, p. 138-145, 2007.

BHARALI, D.J. et al. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with

emphasis on dendrimers. **International Journal Nanomedicine**, v. 4, p. 1–7, 2009.

BOOTZ, A. et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light

scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 369–375, 2004.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible

for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 118, n. 1, p. 121–148, 1963.

BROOME, J. D. Studies on the mechanism of tumor inhibition by l-asparaginase (

Received for publication 10 January 1968) The identification of L-asparaginase as the constituent of guinea pig serum responsible for its tumor-inhibitory properties is now generally accept. **Journal of Experimental Medicine**, v. 127, n. 6, p. 1055–1072, 1968.

BUSHMAN, J. et al. Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of

antithrombin III in treatment of childhood acute lymphoblastic leucemia. **Leukemia Research**, v. 24, n. 7, p. 559-565, 2000.

CIUDAD, J. et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual

disease in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 12, p. 3774-3781, 1998.

CORTIJO-CASCAJARES, S. et al. Revisión de las reacciones de hipersensibilidad a

antineoplásicos. **Farmacia Hospitalaria**, v. 36, n. 3, p. 148-158, 2012.

COUSTAN-SMITH, E.; et al. New markers for minimal residual disease detection in

acute lymphoblastic leukemia. **Blood** v. 117, n. 23, p. 6267-6276, 2011.

CRUZ, M. E. M.; GASPAR, M. M. Liposomal L-asparaginase : in vitro evaluation. v. 96, 1993.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical

applications. **Journal of Controlled Release**, v.161, p. 505-522, 2012.

DOLOWY, W.C., *et al.* Effects of. **Cancer**, v. 19, n. 12, p. 1813–1819, 1966.

DHALE, M. A.; MOHAN-KUMARI, H. P. A comparative rapid and sensitive method to screen L-asparaginase producing fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 102, n., p. 66-68, 2014.

DISCHER, B. M. et al. Polymersomes : Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. v. 284, n. May, p. 1143–1147, 1999.

FERNANDEZ, C. et al. High-throughput asparaginase activity assay in serum of children with leukemia. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n. 7, p. 478-487, 2013.

GIRI, T. K. et al. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 125–141, abr. 2013.

GRAHAM, M. Pegaspargase: a review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 10, p. 1293-1302, 2003.

GUILLEME, C. et al . Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. **Anales de Pediatría (Barcelona)**, v. 79, n. 5, p. 329e321-329e311, 2013.

HA, W. et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation. **Soft Matter**, v. 6, n. 7, p. 1405, 2010.

HAGAG, A.; NOSAIR, N. Prognostic Impact of Neuropilin-1 Expression in Egyptian Children with B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mediterranean Journal Hematology Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2015.

HENZE, G. Early postinduction intensification therapy is essential in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nature clinical practice oncology**, v. 5, n. 9, p. 502-503, 2008.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: The oleopathic hydro-micelle. **Nature**, 1943.

JEHA, S.; PUI, C. Risk-adapted Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology Oncology Clinics North America**, v. 23, n. 5, p. 973-990, 2009.

KAWEDIA, J. D.; RYTTING, M. Asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia. Clinical Lymphoma, **Myeloma & Leukemia**, v. 14, n. S3, p. S14-S17, 2014.

KIDD, J. G. Cells in vitro: discussion*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 583–606, 1953.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **Journal Experimental Medicine**, v. 98, n., p. 565-581, 1953.

KREUTER, J. Nanoparticles-a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 1-10, 2007.

KURTZBERG, J. et al. Polyethylene Glycol-conjugated L-asparaginase versus native Lasparaginase in combination with standard agents for children with acute lymphoblastic leukemia in second bone marrow relapse: a Children's Oncology Group Study (POG 8866). **Journal Pediatric Hematology Oncology**, v. 33, n. 8, p. 610-616, 2011.

LEE, S. et al. Cultivation of Entomopathogenic Fungi for the Search of Antibacterial Compounds. **Mycopathologia**, v. 160, n., p. 321-325, 2005.

LEITE, E. et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**, v. 7, n. 4, p. 413-421, 2007.

LI, S. et al. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. **Journal of Controlled Release**, Netherland, v. 71, n. 2, p.203-211, 2001.

LI, S. et al. Biodegradable polymersomes with an ionizable membrane: facile preparation, superior protein loading, and endosomal pH-responsive protein release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 82, n. 1, p. 103-11, set. 2012.

LOUREIRO, C. B. Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC1.7.A). 67 p. (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

MANUELA GASPAR, M. et al. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 373-7, jan. 1996.

MANUELA GASPAR, M. et al. Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. **Journal of Controlled Release**, v. 52, p. 53-62, 1998.

MASHBURN, L.T.; WRISTON, Jr., J.C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochem and Biophysics**, v.105, p. 450, 1964.

- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. v. 385, p. 113–142, 2010.
- MU, X. et al. Poly (2-Vinyl-4 , 4-dimethylazlactone) -Functionalized Magnetic Nanoparticles as Carriers for Enzyme Immobilization and Its Application. 2014.
- MULLER, H.; BOSS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, n. 2, p. 97-113, 1998.
- NARTA, U. K. et al. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, n. 3, p. 208–21, mar. 2007.
- NEHMY, R. et al. A perspectiva dos pais sobre a obtenção do diagnóstico de leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes: uma experiência no Brasil. **Rev Bras Saúde Matern Infant**, v. 11, n. 3, p. 293-299, 2011.
- NOSHCHENKO, A. et al. Patterns of acute leukaemia occurrence among children in the Chernobyl region. **International Journal of Epidemiology**, v. 30, n. 1, p. 125-129, 2001.
- ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am** v. 23, n. 4, p. 655– 674, 2009.
- PAN, Y. et al. Meta-analysis of the association between CCAAT/enhancer binding protein-ε polymorphism and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 12, p. 5553-5557, 2014.
- PEDROSA, F. Acute lymphoblastic leukemia : a curable disease. **Revista Brasileira Saúde Materna Infantil**, v. 2, n. 1, p. 63–68, 2002.
- PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-249, 2011.
- POZNANSKY, M. J. et al. Advantages in the Use of l-Asparaginase-Albumin Polymer as an Antitumor Agent Advantages in the Use of L-AsparaginaseAlbumin Polymeras an Antitumor Agent1. **Cancer Research**, v. 42, p. 1020–1025, 1982.
- PUI, C.; THIEL, E. Central Nervous System Disease in Hematological Malignancies: Historical Perspective and Practical Applications. **Semin Oncol**, v. 36, n. 4, p. S2-S16, 2009.

QUINTANILLA-FLORES, D. et al. Acute Pancreatitis and Diabetic Ketoacidosis following L-Asparaginase/Prednisone Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Case Rep Oncol Med**, v. 2014, n., p. 1-3, 2014.

REINERT, R. B. et al. Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31222–33, 2006.

RIZZARI, C. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Oncol**, v. 25, n. 1, p. S1–S9, 2013.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1112–1120, 2003.

SAISON, J. et al. Hepatomegaly and fever at the time of neutrophil recovery revealing L-asparaginase toxicity in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Am J Case Rep**, v. 15, n. 1, p. 13-17, 2014.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v., n., p. 2015.

SILVA, M. S. et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

STEVANOVIC, M.; USKOKOVIC, D. Poly(lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. **Current Nanoscience**, V. 5, P.1-15,2009.

SPARREBOOM, A. et al. Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor-free, nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in Cremophor (Taxol). **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 4136–4143, 2005.

SURI VASUDEV, S. et al. Formulation of PEG-ylated L-asparaginase loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of PEGylation on enzyme loading, activity and in vitro release. **Pharmazie**, v. 66, p. 956–960, 2011.

TONG, W. et al. Should we use a desensitization protocol in acute lymphoblastic leukemia patients with silent inactivation of PEGasparaginase? **Haematologica**, v. 99, n. 1, p. 1-32, 2014.

VAN DER SLUIS, I. et al. Efficacy and safety of recombinant E. coli-asparaginase in infants (less than one year of age) with acute lymphoblastic leukemia. **Hematologica**, v. 98, n. 11, p. 1697-1701, 2013.

WAN, S. et al. Chitosan-modified lipid nanovesicles for efficient systemic delivery of l-asparaginase. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 143, p. 278–84, 1 jul. 2016.

WILEMAN, T. E. Properties of asparaginase-dextran conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 6, n. 2, p. 167–180, 1991.

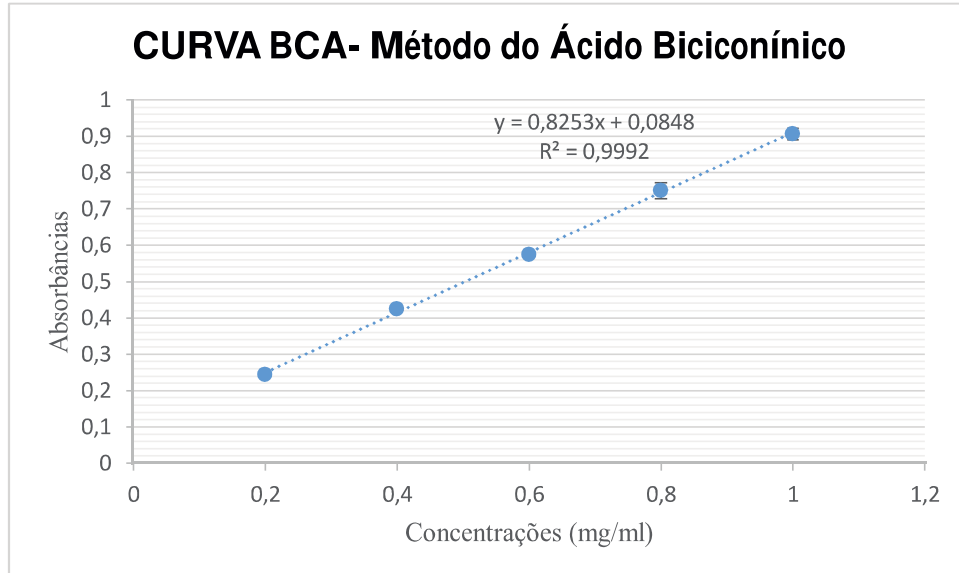
WOLF, M. et al. Stabilisation and determination of the biological activity of l-asparaginase in poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, n. 1-2, p. 141–152, abr. 2003.

ZHANG, Y. Q. et al. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v. 25, p. 3751–3759, 2004.

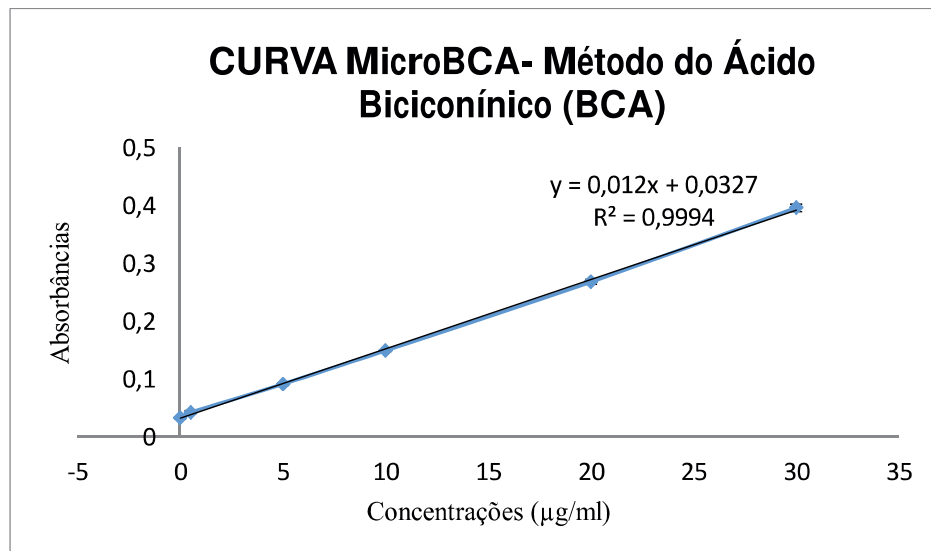
APÊNDICE

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

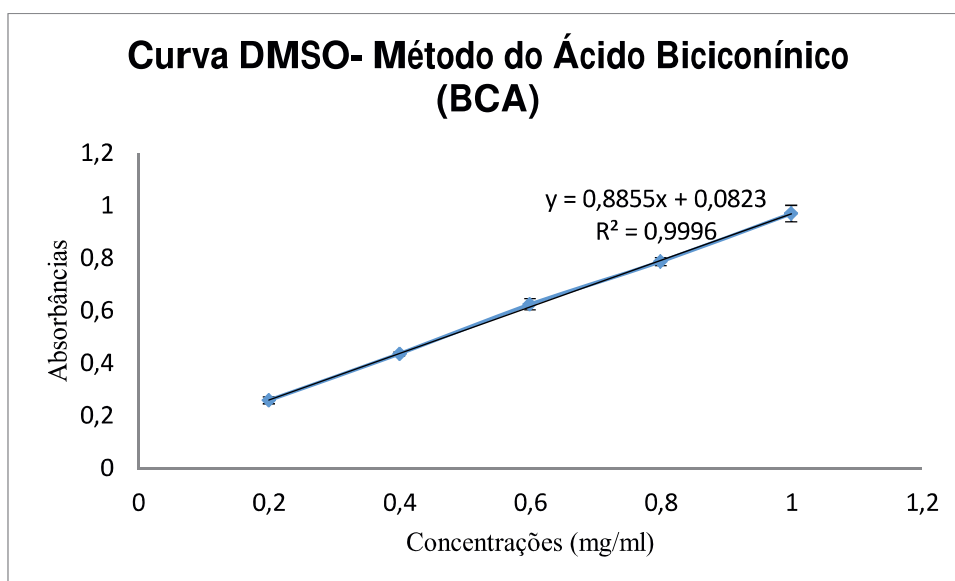
Determinação de proteínas totais pelo método do ácido biciconínico (BCA)



Determinação de proteínas totais pelo método do ácido biciconínico (MBCA)



Curva DMSO- Método do ácido biconínico (BCA)



Determinação da atividade enzimática da L-asparaginase pelo método de Nessler

