

Universidade de São Paulo
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS
Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica

Desenvolvimento de vesículas poliméricas de poli(etileno glicol)-*b*-poli(ϵ -caprolactona) (PEG-PCL) para veiculação de L-asparaginase

Juliana de Almeida Pachioni Vasconcelos

Tese para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Prof. Dr. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa

São Paulo

2018

Universidade de São Paulo
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS
Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica

Desenvolvimento de vesículas poliméricas de poli(etileno glicol)-*b*-poli(ϵ -caprolactona) (PEG-PCL) para veiculação de L-Asparaginase

Juliana de Almeida Pachioni Vasconcelos

Versão original

Tese de doutorado apresentada ao programa de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof. Dr. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa

São Paulo

2018

Juliana de Almeida Pachioni Vasconcelos

Desenvolvimento de vesículas poliméricas de poli (etileno glicol)-*b*-poli(ϵ -caprolactona) (PEG-PCL) para veiculação de L-Asparaginase

Banca examinadora

Professora Dr. Carlota de Oliveira Rangel Yagui
(Presidente)

1° examinador

2° examinador

3° examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2018

Agradecimentos

À professora Carlota de Oliveira Rangel Yagui pela oportunidade de fazer parte de sua equipe. Agradeço ainda por todos ensinamentos e pela compreensão durante todos esses anos. Acima de tudo, agradeço pelo exemplo de mulher, de mãe, de professora e de profissional. A professora Carlota é uma mulher que motiva, que incentiva e que me leva a acreditar que nós, mulheres, somos capazes de vencer.

Ao professor Leandro Ramos de Souza Barbosa, uma das pessoas mais incríveis que já conheci. Não só pela sua inteligência, que é de deixar qualquer pessoa admirada, mas, pela sua capacidade de sempre olhar com carinho ao próximo e tentar, de alguma maneira, transmitir um pouco do que sabe.

A todos meus colegas de laboratório que contribuíram de maneira significativa para o sucesso do meu trabalho. Em especial à minha amiga, Alexsandra Conceição Apolinário, meu alicerce durante essa longa e tortuosa caminhada. Com muito carinho também agradeço a tantos outros que com incentivo e amor me conduziram à conclusão desse trabalho: Giovanna Meneguetti, Tales Costa e Silva, Camila Areias, Valker Feitosa, André Moreni Lopes.

À professora Gisele Monteiro de Souza pelo carinho e pelas palavras de incentivo.

Ao professor Adalberto Pessoa Júnior, por me pertimir integrar esse time de tantas culturas e diversidades e principalmente pela oportunidade em poder, de alguma forma, contribuir nesse projeto de tamanha relevância científica e de grande importância para a nossa população.

À minha família por entender esse momento tão complicado, por compartilhar a felicidade das minhas conquistas e por me incentivar. Sempre. Ao meu esposo, Daniel Vasconcelos, companheiro de jornada. Sem seu incentivo emocional e

financeiro, isso jamais seria possível. E por ultimo, mas não menos especial, agradeço a meus pais, por acreditarem no estudo acima de tudo.

A minha mãe, que durante anos abriu mão de todo seu salário, para proporcionar a mim e a meu irmão a oportunidade de estudar em um bom colégio. A todo apoio financeiro para que pudessémos concluir o ensino superior. E em meios a tantas, tantas dificuldades, por permitir que esse sonho não terminasse. Meu eterno obrigada, vocês formaram uma DOUTORA.

RESUMO

PACHIONI-VASCONCELOS, J. A. Desenvolvimento de vesículas poliméricas de polietilenoglicol-policaprolactona (PEG-PCL) para veiculação de L-Asparaginase. 2017. 81 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2015.

A L-Asparaginase (ASNase) é um importante agente quimioterapêutico utilizado para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (ALL) há mais de 40 anos. No entanto, devido à origem biológica da ASNase, enzima produzida por *Escherichia coli*, problemas como a imunogenicidade e baixa meia vida-plasmática devem ser considerados. Com o objetivo de minimizar essas desvantagens, várias ASNases homólogas bem como formulações de ASNase de *E. coli* foram investigadas. Nenhuma das formulações desenvolvidas, entretanto, foi capaz de resolver definitivamente esses problemas associados à sua origem. Nesse sentido, considerando os recentes avanços na ciência de polímeros com a possibilidade do obtenção de vesículas poliméricas usando copolímeros, este trabalho concentrou-se no desenvolvimento de polimerossomos de poli(etileno glicol)-*b*-poli(ϵ -caprolactona) (PEG-PCL) para encapsular a ASNase. Diversas condições experimentais foram investigadas e, ao final, os polimerossomos foram produzidos pela técnica de hidratação do filme polimérico utilizando a centrifugação como técnica de pós-filme para remoção de copolímero precipitado, produzindo assim vesículas poliméricas de 120 a 200nm com PDI de aproximadamente 0,250. A eficiência de encapsulação da ASNase, utilizando as metodologias de centrifugação ou cromatografia de exclusão molecular, revelou taxas de encapsulação de 20-25% e 1 a 7%, respectivamente. Esses resultados apontam a importância de se determinar a eficiência de encapsulação por cromatografia de exclusão molecular ou método direto no caso de nanoestruturas auto-agregadas formadas por copolímeros, devido a valores superestimados com o emprego da centrifugação. Ainda que estudos complementares se façam necessários para liberação da enzima encapsulada ou penetração da L-asparagina nas vesículas, nossos resultados demonstram o potencial de polimerossomos para veiculação de ASNase, bem como de outras proteínas terapêuticas.

Palavras-chaves: vesículas poliméricas, polimerossomos, nanoencapsulação, L-Asparaginase, copolímeros anfifílicos.

ABSTRACT

PACHIONI-VASCONCELOS, J. A. Development of polyethylene glycol-polycaprolactone polymer vesicles for L-Asparaginase. 2017. 81 pages. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2015.

L-Asparaginase (ASNase) is an important chemotherapeutic agent used for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) for more than 40 years. However, due to the biological origin of ASNase (produced by *Escherichia coli*) some drawbacks such as immunogenicity and low plasma half life are present. In order to minimize the disadvantages, several ASNases proteoforms and formulations of *E. coli* ASNase were investigated. However, none of this formulations completely solved the main drawbacks of ASNase. In this sense, considering the recent advances in polymers science with the possibility to develop polymeric vesicles using copolymers, this work aimed at the development of poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) (PEG-PCL) vesicles to encapsulate ASNase. Different experimental conditions were investigated and, the final polymersomes formulation was prepared by film hydration using centrifugation as a post-film technique to remove the bulky copolymer. Polymeric vesicles of 120 to 200nm with PDI of approximately, 0.250 were obtained. The encapsulation efficiency of ASNase was determined indirectly by centrifugation and directly by size exclusion chromatography, resulting in encapsulation rates of 20-25% and 1 to 7%, respectively. These results indicate the importance of determining the efficiency of encapsulation by size exclusion chromatography or direct method in the case of self-aggregated nanostructures formed by copolymers, due to values overestimated with the use of centrifugation. Our results point to the potential of polymersomes for ASNase delivery, as well as other therapeutic proteins. Nonetheless, complimentary studies are still necessary for ASNase release or L-asparagine penetration into the vesicles.

Keywords: polymer vesicles, polymersomes, nanoencapsulation, L-Asparaginase, amphiphilic copolymer.

Lista de figuras

Figura 1. Esquema geral da hematopoiese (Adaptada de National Institute of Health, 2015).

Figura 2. Representação esquemática do cristal de L-Asparaginase de *E. Coli*. (Extraída de Protein Data Bank, código PDB 3ECA).

Figura 3. Mecanismo de ação da L-asparaginase. (Fonte: autor)

Figura 4. Organização dos polimerossomos. (Fonte: Apolinário, 2017)

Figura 5. Classificação de nanoestruturas vesiculares formadas por moléculas anfífilas de acordo com o tamanho LUV (large unilamellar vesicles), SUV (small unilamellar vesicles) e MLV (multilamellar vesicles). (Adaptado de Lopes, 2013).

Figura 6. Estrutura geral de um copolímero de polietilenoglicol-policaprolactona PEG-PCL (Fonte: autor).

Figura 7. Estrutura química do Pireno (C₆ H₁₀).

Figura 8. Representação tridimensional dos cristais de BSA (Código PDB 3VO3) e L-Asparaginase (Código PDB 3ECA) e suas respectivas dimensões máximas (linha amarela) calculados com o auxílio do programa Pymol.

Figura 9. Intensidade de fluorescência (I₃₇₃/I₃₉₃) em função da concentração de copolímero PEG-PCL (2000:5000), em água ultrapura

Figura 10. Intensidade de fluorescência (I₃₇₃/I₃₉₃) em função da concentração de copolímero PEG-PCL (5000:11000), em água ultrapura.

Figura 11. Intensidade de fluorescência (I₃₇₃/I₃₉₃) em função da concentração de copolímero PEG-PCL (5000:13500), em água ultrapura

Figura 12. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após obtenção dos polimerossomos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

Figura 13. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após centrifugação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

Figura 14. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após extrusão dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

Figura 15. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após filtração dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

Figura 16. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após sonicação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

Figura 17. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após obtenção dos polimerossomos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

Figura 18. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após centrifugação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

Figura 19. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após extrusão dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

Figura 20. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após filtração dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

Figura 21. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após sonicação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

Figura 22. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após obtenção dos polimerossomos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG- PCL 5000:13000)

Figura 23. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após centrifugação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG-PCL 5000:13000)

Figura 24. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após extrusão dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG-PCL 5000:13000)

Figura 25. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após filtração dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG-PCL 5000:13000)

Figura 26. Análise de DLS realizada após filtração dos polimerossomos obtidos pela técnica de sonicação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG – PECL 5000:13000)

Figura 27. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão correspondente à seção transversal de um polimerossomo. **A** - polimerossomos formados pelo copolímero 1 (PEG-PCL - 2.000:5.000). **B** - polimerossomos formados pelo copolímero 2 (PE-PCL - 5.000:11.000). **C** - polimerossomos formados pelo copolímero 3 (PEG-PCL - 5.000:13.000).

Figura 28. Análise de DLS realizada após concentração das frações de 1 a 18 obtidas da análise de FPLC (PEG – PECL 3000:5000)

Figura 29. Cromatograma de uma solução de BSA (1mg/mL). Pico 1, com área correspondente a 64,5405. Pico 2, com área correspondente a 108,0611. Pico 3, com área correspondente a 398,3230.

Figura 30. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 1 (PEG:PCL 2.000:5.000) e BSA encapsulada. Pico 1, com área correspondente a 49,3722. Pico 2, com área correspondente a 93.6455. Pico 3, com área correspondente a 385,1128.

Figura 31. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 2 (PEG:PCL 5.000:11.000) e BSA encapsulada. Pico 1, com área correspondente a 48,7354. Pico 2, com área correspondente a 102,4419. Pico 3, com área correspondente a 390,6244.

Figura 32. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 3 (PEG:PCL 5.000:13.000) e BSA encapsulada. Pico 1, com área correspondente a 31,7216. Pico 2, com área correspondente a 87,1552. Pico 3, com área correspondente a 369,3707.

Figura 33. Cromatograma de uma solução de ASNase (1mg/L). Pico 1, com área correspondente a 95,2450.

Figura 34. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 1 (PEG:PCL 2.000:5.000) e ASNase encapsulada. Pico 1, com área correspondente a 94,1793.

Figura 35. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 2 (PEG:PCL 2.000:13.000) e ASNase encapsulada

Figura 36. A. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação da enzima L-Asparaginase não encapsulada, em ensaio de diálise. **B.** Relação a porcentagem de enzima que permeou a membrana de diálise em função do tempo (horas). Proporção de dialisado:volume de diálise 1:25mL

Figura 37. A. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação da enzima L-Asparaginase não encapsulada, em ensaio de diálise. **B.** Relação a porcentagem de enzima que permeou a membrana de diálise em função do tempo (horas). Proporção de dialisado:volume de diálise Proporção 1:100mL

Figura 38. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação em ensaio de diálise da enzima L-Asparaginase encapsulada em vesículas poliméricas de **copolímero 1** em pH 7,4 (**A**) e pH 5,5 (**B**).

Figura 39. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação em ensaio de diálise da enzima L-Asparaginase encapsulada em vesículas poliméricas de **copolímero 2** em pH 7,4 (**A**) e pH 5,5 (**B**).

Figura 40. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação em ensaio de diálise da enzima L-Asparaginase encapsulada em vesículas poliméricas de **copolímero 3** em pH 7,4 (**A**) e pH 5,5 (**B**).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Propriedades dos copolímeros empregados

Tabela 2 – Resumo das análises de DLS das amostras dos sistemas de polimerossomos de PEG-PCL obtidos sem técnica pós-filme (picos em função da intensidade de espalhamento)

Tabela 3 – Resumo das análises de DLS das amostras dos sistemas de polimerossomos de PEG-PCL (picos em função da intensidade de espalhamento)

Tabela 4 – Porcentagem de encapsulação de BSA e ASNase determinadas nos ensaios de encapsulação por método indireto empregando-se os copolímeros 1 (PEG-PCL - 2.000: 5.000), copolímero 2 (PEG-PCL - 5.000: 11.000) e copolímero 3 (PEG-PCL - 5.000: 13.000).

Tabela 5 – Porcentagem de encapsulação de BSA e ASNase determinadas nos ensaios de encapsulação por método indireto por cromatografia de exclusão molecular empregando-se os copolímeros 1 (PEG-PCL - 2.000: 5.000), copolímero 2 (PEG-PCL - 5.000: 11.000) e copolímero 3 (PEG-PCL - 5.000: 13.000).

Sumário

1. Introdução	14
2.Revisão Bibliográfica	17
2.1. Leucemias.....	17
2.2. L-Asparaginase	19
2.3. Vesículas poliméricas ou polimerossomos.....	25
2.4. Copolímeros anfifílicos e sua auto-agregação.....	29
2.5. Escolha dos copolímeros	32
3. Objetivos.....	34
4.Material e Métodos	34
4.1. Material.....	34
4.2. Métodos.....	35
4.2.1. Determinação da concentração de agregação crítica (CAC)	35
4.2.2. Desenvolvimento do protocolo de obtenção dos polimerossomos	36
4.2.3. Encapsulação de proteínas nos polimerossomos.....	38
4.2.4. Eficiência de encapsulação	39
4.2.5. Ensaio de liberação.....	40
4.2.6. Caracterização dos sistemas: Análise de morfologia através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	41
4.2.7. Caracterização dos sistemas: Espalhamento de luz dinâmico (<i>Dynamic light scattering</i> - DLS).....	42
5.Resultados e discussão	43
5.1. Determinação da concentração de agregação crítica (CAC)	43
5.2. Desenvolvimento do protocolo de obtenção dos polimerossomos.....	45
4.3. Encapsulação de proteínas nos polimerossomos.....	58
5.6. Ensaio de liberação.....	66
6.Conclusão.....	70
7. Referências.....	72

1. Introdução

A utilização de nanoestruturas auto-agregadas em *drug delivery* tem recebido considerável atenção. A organização espontânea e reversível de moléculas anfifílicas em estruturas supramoleculares é certamente um dos campos mais desafiadores da nanotecnologia farmacêutica, uma vez que pode dar origem a vários perfis de agregação com diferentes propriedades e aplicações (micelas esféricas, cilíndricas, vesículas e etc.) (Smart et al, 2008). As nanoestruturas de auto-agregação mais estudadas para *drug-delivery* são os lipossomos (vesículas de origem lipídica), entretanto, apresentam uma série de limitações, associadas à natureza lábil dos fosfolipídios que incluem degradação química e baixa estabilidade físico-química, resultando em liberação rápida do fármaco encapsulado na corrente sanguínea (Apolinário et al, 2017). Por muitos anos, pesquisadores tentaram desenvolver alternativas para os lipossomos e vários componentes sintéticos foram desenvolvidos (Guan et al, 2015), por exemplo, os copolímeros anfifílicos que podem autoagregar em meio aquoso, dando origem a estruturas vesiculares conhecidas como polimerossomos (PL). Os PL apresentam excelente potencial como carreadores de fármacos e proteínas por apresentarem estabilidade mecânica e química dentro de uma ampla faixa de pH e temperatura. Além disso, os PL são capazes de transportar fármacos hidrofóbicos, incorporados à sua membrana hidrofóbica, e fármacos hidrofílicos no seu interior aquoso e/ou aderidos à superfície. Nos últimos anos, diferentes moléculas foram incorporadas com sucesso em polimerossomos (Ortac et al, 2014; O'Neil et al, 2009).

Por outro lado, a enzima L-Asparaginase de *E coli* (ASNase) é um importante agente quimioterápico utilizado para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e outras malignidades hematopoiéticas. Apesar de atualmente seu uso estar limitado a

esses tratamentos, existem estudos pré-clínicos que demonstram a atividade antitumoral da ASNase em outros tipos de câncer e estudos *in vitro* que demonstram a capacidade da ASNase em induzir apoptose em sarcomas e suprimir a angiogênese em casos de cancer de ovário. (Tardito et al, 2007). Recentemente, em fevereiro deste ano, Knott e colaboradores (2018) publicaram um artigo que sugere a utilização da ASNase no tratamento de câncer de mama após a observação de que a biodisponibilidade de asparagina pode interferir de maneira significativa na capacidade metastática dos tumores, sugerindo que a supressão desse aminoácido pela diminuição da ingestão e através da utilização da ASNase pode auxiliar no controle de tumores primários da doença (Knott et al, 2018). ASNase apresenta atividade antitumoral baseada na depleção da L-Asparagina (L-Asn) circulante. Ao contrário do que acontece com as células normais, as células tumorais não são capazes de produzir as quantidades de L-Asn necessárias para sua manutenção e sobrevivência devido à ausência ou baixa expressão de L-Asparagina sintetase, enzima responsável pela produção da L-Asn (Fung and Chan 2017), deste modo a depleção de L-Asn circulante leva à morte das células tumorais.

Assim como outras biomoléculas, L-Asparaginase apresenta uma baixa meia vida plasmática e alta imunogenicidade (Cairo, 1982; Evans et al, 1982; Shrivastava et al, 2016). A formação de anticorpos em consequência de sua origem está intimamente ligada aos mecanismos de resistência à ASNase, pois leva à diminuição da atividade enzimática e, conseqüentemente, aumento dos níveis séricos de L-asparagina. Reações de hipersensibilidade, devido à produção de anticorpos, foram observadas em 60% dos pacientes que utilizam a enzima derivada de *E. coli* (Panetta et al, 2009; Fung e Chang, 2017). Várias alternativas nanotecnológicas foram empregadas para aumentar a meia-vida de ASNase e diminuir seu potencial

imunogênico. Por exemplo, por encapsulação em lipossomos (Neerunjun e Gregoriadis, 1976) ou microcápsulas (Chang, 1984) e por ligação covalente a macromoléculas, como a dextrana (Wileman et al, 1986), albumina (Poznansky et al, 1982) ou monometoxipoli(etileno glicol) (mPEG) (Kamisaki et al, 1982). Entre essas alternativas nanotecnológicas propostas, apenas a PEG-asparaginase, que consiste na enzima ligada covalentemente a moléculas de monometoxipoli(etileno glicol), está no mercado. No entanto, a encapsulação de ASNase em nanoestruturas poderia não somente diminuir a imunogenicidade e aumentar a meia-vida de forma semelhante à pegilação, mas também proporcionar maior penetração de fármaco na medula óssea e em locais secundários de acumulação de células leucêmicas devido ao efeito de permeação e retenção aumentadas (EPR, do inglês *enhanced permeation and retention*).

Tendo em vista o exposto, nesse trabalho investigamos diferentes protocolos de obtenção de polimerossomos formados por copolímeros anfifílicos do tipo PEG-PCL e a encapsulação da ASNase nos polimerossomos obtidos. Cabe ressaltar que, ao nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo envolvendo a encapsulação de biomoléculas em polimerossomos no Brasil.

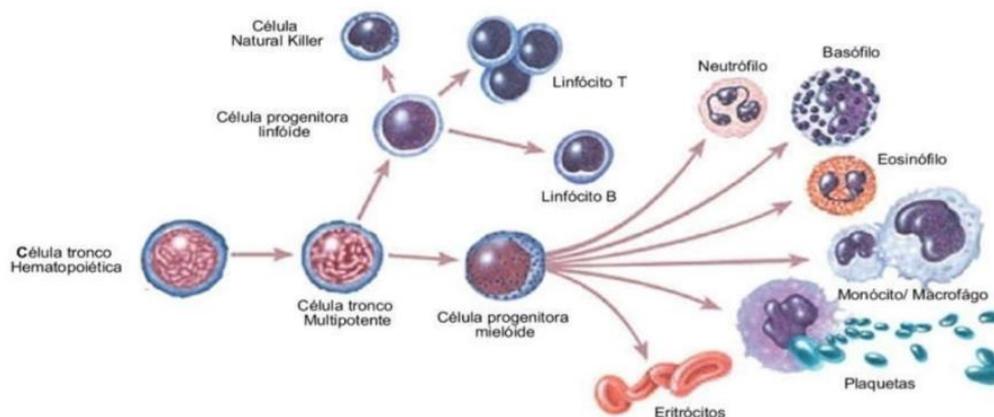
2.Revisão Bibliográfica

2.1. Leucemias

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos, geralmente de origem desconhecida, que tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, as quais substituem as células sanguíneas normais (Inca, 2018). Apesar das estimativas apontarem para um crescimento no número de novos casos principalmente em crianças que vivem em regiões menos favorecidas como a África subsaariana (Odusote et al, 2016), a leucemia apresenta bom prognóstico e, com os atuais protocolos de tratamento, o tempo de sobrevivência dos acometidos vem aumentando e o índice de mortes diminuindo.

A medula óssea é o local de formação das células sanguíneas e ocupa a cavidade dos ossos. Nela são encontradas as células que dão origem aos glóbulos brancos, aos glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e às plaquetas, como mostra a figura 1.

Figura 1. Esquema geral da hematopoiese (Adaptada de National Institute of Health, 2015).



As leucemias podem ser divididas em Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Leucemia Mielóide Aguda (LMC) e Leucemia Mielóide Crônica (LMC). Particularmente, em virtude dos objetivos desse trabalho, concentraremos nossos estudos na Leucemia Linfóide Aguda, um tipo específico de leucemia que atinge principalmente crianças, correspondendo a cerca de 80% dos casos de leucemia infantil e 20% dos casos de leucemia em adultos (Shrivastava e 2016). A LLA se caracteriza por crescimento descontrolado e consequente acúmulo de linfoblastos que perdem a capacidade de funcionar como células sanguíneas normais (Abrale, 2018; Woo, 2014). O acúmulo de linfoblastos na medula óssea leva a um bloqueio da produção normal de outras células (como hemácias, plaquetas e outros glóbulos brancos) diminuindo, por exemplo, a capacidade de proteção contra infecções e a eficiência dos processos de cicatrização.

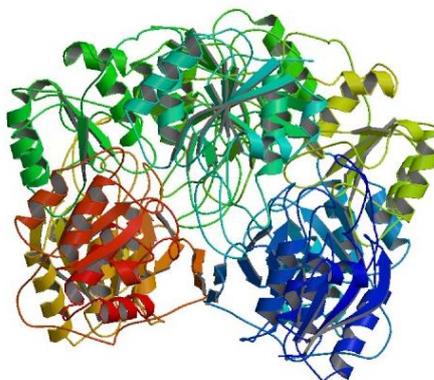
O tratamento da LLA é prolongado, variando de dois a três anos. Embora os esquemas terapêuticos possam mudar de centro para centro, geralmente são constituídos de cinco grandes fases: indução da remissão, intensificação, consolidação, reindução, prevenção da leucemia no sistema nervoso central (SNC) e continuação ou manutenção da remissão (Lorenzi, 2006). De acordo com a Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (a ABHH) os atuais protocolos apresentam uma chance de cura de 90% para crianças e de 50% para adultos (ABHH, 2018; Lorenzi, 2006). O avanço no suporte hematológico (com a utilização de fatores de crescimento de neutrófilos, por exemplo), no conhecimento da doença e no número de opções terapêuticas permitiu que a LLA evoluísse de uma doença mal definida e intratável na metade do século passado para uma doença que está entre as de maior compreensão e chances de cura no início deste século (Pedrosa e Lins, 2002). Entre os diferentes fármacos utilizados com perspectiva de

cura da LLA, podemos citar a L-Asparaginase, geralmente empregada na fase de indução da remissão da doença (Lorenzi, 2006) e durante a sua manutenção (ABRALE, 2018)

2.2. L-Asparaginase

A L-asparaginase de *Escherichia coli* (ASNase, figura 2), quimicamente conhecida como *E. coli* L-asparagina amidohidrolase, é a principal isoforma da enzima empregada terapêuticamente. A ASNase é uma enzima tetramérica de 136 kDa formada por subunidades idênticas e com ponto isoelétrico 5,65 (Lorenzi, 2006; Shrivastava et al, 2016).

Figura 2. Representação esquemática do cristal de L-Asparaginase de *E. coli* (Extraída de Protein Data Bank, código PDB 3ECA).

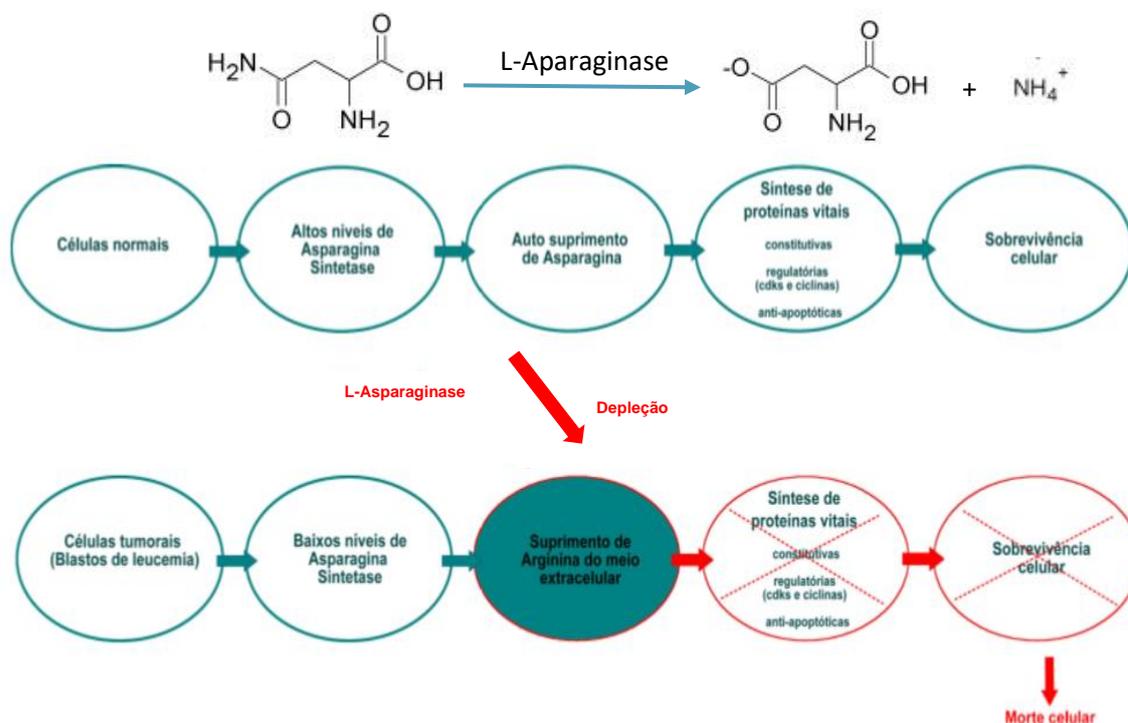


A primeira observação importante *in vitro* para o desenvolvimento da ASNase como fármaco antineoplásico foi feita por Clementi em 1922, mas somente em 1961 Broome confirmou a atividade antineoplásica da ASNase em cobaias (Narta et al, 2007; Broome 1961). Em 1967, Oettgen demonstrou pela primeira vez a eficácia da ASNase em células humanas de leucemia e hoje, a enzima representa um dos pilares para o tratamento da LLA.

A atividade antineoplásica da ASNase baseia-se na depleção de asparagina circulante (Shrivastava et al, 2016): Sabe-se que as células tumorais, mais especificamente as células de tumores linfáticos, apresentam uma quantidade reduzida da enzima asparagina sintetase se comparadas às células normais. Por esse motivo, essas células utilizam asparagina do meio extracelular para síntese de proteínas essenciais à sua sobrevivência, como as proteínas do ciclo celular (quinases dependentes de ciclinas), proteínas anti-apoptóticas e proteínas constitutivas (Avramis, 2012; Nomme et al, 2012). Krall e colaboradores (2016), sugerem que a asparagina também pode coordenar a síntese de proteínas e nucleotídeos através da regulação da atividade de mTOR. Além disso, estudos relacionam a asparagina com a capacidade de suprimir o estresse do retículo endoplasmático e regular a apoptose dependente de translocação, sugerindo que a asparagina pode ser um supressor da apoptose no câncer (Zhang et al, 2011).

Nesse sentido, a ideia de diminuir a quantidade de asparagina circulante apresenta-se como uma boa alternativa e, de acordo com Fung e Chan (2017), a ASNase representa o único agente capaz de interferir no metabolismo da asparagina disponível para uso clínico no mundo. O consumo de asparagina pela ASNase leva à diminuição dos seus níveis séricos na medida em que proporciona a conversão da asparagina em aspartato e amônia (figura 3), diminuindo assim o suprimento de asparagina às células cancerígenas. Como mostra a figura 3, com baixos níveis de asparagina, as células cancerígenas tornam-se incapazes de manter a síntese de proteínas vitais, acarretando em morte celular.

Figura 3. Mecanismo de ação da L-asparaginase. (Fonte: autor)



As células normais, no entanto, por não dependerem das concentrações séricas de asparagina, não sofrem efeito significativo da utilização da L-Asparaginase, o que garante a seletividade do fármaco (Narta et al, 2007).

Estão disponíveis para o uso clínico, quatro diferentes formas de L-asparaginase: L-asparaginase nativa obtida de *Escherichia coli* (ASNase) – Medac® (Kyoma Hakko, Kogyo, Japan), Crasnitin® (Bayer AG, Leverkusen, Germany), Elsapar® (Merck & Co., Inc., West Point, PA, USA), Leunase®, Paronal®, Kidrolase®, entre outros; L-asparaginase peguilada (pegaspargase) formulação obtida através da peguilação da enzima nativa obtida de *Escherichia coli* - Oncaspar® (Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc, Gaithersburg, MD, USA); a recentemente aprovada: L-asparaginase recombinante de *Escherichia coli*. - *Spectrila*® (Medac Pharma, Scion House, Stirling University Innovation Park, Stirling); e a L-asparaginase nativa de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspase) - Erwinase® (EUSA Pharma, International

division of Jazz Pharmaceuticals). A formulação peguilada de L-asparaginase nativa de *Erwinia chrysanthemi* já foi desenvolvida, entretanto, ainda não está aprovada pelos órgãos governamentais para uso clínico. Atualmente, todas as formas são aprovadas pela EMA (Agência europeia de Medicamentos). No Brasil, utilizamos a ASNase como primeira linha, a pegaspargase em casos de hipersensibilidade e, em último caso a crisantaspase. Porém, o único medicamento que obteve registro junto à Anvisa, em 2017, é a Oncaspar® (pegaspargase).

Apesar das quatro formulações disponíveis para uso clínico possuírem o mesmo mecanismo de ação, elas diferem nas suas propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas, imunogênicas e toxicidade (Fung e Chang, 2017), o que gera grandes discussões sobre quando utilizar cada uma dessas formas e dificulta a intercambiabilidade com a mesma dose e frequência entre os agentes (Rizzari et al, 2012). A primeira forma desenvolvida, a L-Asparaginase nativa de *Escherichia Coli*, apesar de amplamente utilizada está intimamente relacionada ao desenvolvimento de anticorpos e reações de hipersensibilidade. A imunogenicidade é bastante comum na terapia com fármacos protéicos e representa, em muitos casos, uma limitação à sua utilização. Entre os vários problemas associados à imunogenicidade, a hipersensibilidade pode ser considerada como a principal toxidade da ASNase (Cairo, 1982; Evans et al, 1982). Isso porque a enzima, expressa em bactéria, quando utilizada com finalidade terapêutica, pode ativar o sistema imunológico do hospedeiro originando reações alérgicas como urticária e eritema (Raetz e Salzer, 2010) e levar à formação de anticorpos anti-asparaginase (Panetta et al, 2009). A formação dos anticorpos está intimamente ligada aos mecanismos de resistência à ASNase uma vez que leva à diminuição da atividade enzimática e, conseqüentemente, aumento dos níveis séricos de asparagina. Reações de hipersensibilidade, devido à produção

de anticorpos, têm sido observadas em 60% dos pacientes que fazem uso da enzima derivada de *E. coli* (Panetta et al, 2009).

Com o objetivo de solucionar esse problema sem prejudicar a atividade catalítica da enzima, desenvolveu-se a pegaspargase (forma conjugada com polietilenoglicol) que apresenta vantagem de ter um período de meia-vida biológica aproximadamente 5 vezes maior que ASNase (Fu e Sakamoto, 2007; Shrivastava et al, 2016). No entanto, é comprovada a existência de reação cruzada entre anticorpos desenvolvidos nos pacientes previamente tratados com ASNase nativa e pegaspargase, dificultando a mudança de uma para outra. Além disso, devido ao fato da ASNase ter sido uma das primeiras enzimas submetidas ao processo de peguilação, esta é realizada de maneira aleatória levando a um alto grau de polidispersão nas preparações resultantes (Soares et al, 2002). A crisantaspase, desenvolvida com o objetivo de diminuir os problemas associados à existência dos anticorpos cruzados entre a forma nativa de ASNase de *E. Coli* e sua forma peguilada, apresenta menor incidência de imunogenicidade (Fung e Chan, 2017). Essa formulação, entretanto, apresenta uma meia vida plasmática muito inferior às observadas para as formas nativa e peguilada de *E. Coli* (1,24 dias para ASNase e 0,65 dias para crisantaspase). Aprovada em 2016, a forma recombinante de *E. Coli*, apresenta baixa concentração de proteína agregada, associada a baixas taxas de reações alérgicas (Hospital Pharmacy Europe, 2018).

Apesar da utilização de ASNase estar limitada ao tratamento da leucemia linfoblástica aguda e outras malignidades hematopoiéticas, estudos pré-clínicos demonstram a atividade anti-tumoral da ASNase em vários tipos de câncer e estudos *in vitro* demonstram a capacidade da ASNase em induzir apoptose em sarcomas e suprimir a angiogênese em casos de câncer de ovário (Tardito et al, 2007).

Recentemente, Knott e colaboradores (2018) demonstraram que a biodisponibilidade de asparagina pode interferir de maneira significativa na capacidade metastática de câncer de mama, sugerindo que a supressão desse aminoácido pela diminuição da ingestão e/ou utilização da ASNase pode auxiliar no controle de tumores primários da doença. Panosyan e colaboradores (2014) demonstraram que a utilização de ASNase combinada com doxorubicina levou a um significativo aumento de apoptose, *in vitro*, de células de câncer de mama com tratados com essa combinação em comparação com células tratadas somente com doxorubicina (Panosyan et al, 2014). O aumento das pesquisas envolvendo a utilização da ASNase para diferentes tipos de câncer, demonstram a necessidade em se desenvolver formas da enzima que apresentem menos efeitos tóxicos, menos efeitos imunogênicos e que sejam capazes de aumentar a aderência do paciente ao tratamento (diminuindo, por exemplo, o número de doses do fármaco). Muitos estudos têm proposto modificações que possam melhorar essas características, alguns deles se baseiam na encapsulação da ASNase em lipossomos (Neerunjun e Gregoriadis, 1976) e combinações da ASNase com polímeros. Em 1996, Gaspar e colaboradores desenvolveram uma formulação lipossomal composta por fosfatidilcolina e colesterol para veiculação da ASNase, que apresentou boas taxas de encapsulação (35% a 73%) e que mostraram-se menos imunogênicas quando comparadas à forma nativa da enzima. No entanto, o estudo não foi continuado o que pode ser justificado, como já anteriormente discutido, pelo fato dessas preparações apresentarem baixa estabilidade. Em 2012, Anidita e Venkatesh, desenvolveram lipossomos compostos de lecitina de soja e colesterol para veiculação da ASNase. Apesar das diversas preparações produzidas que variaram a composição (balanço de lecitina de soja e colesterol) a taxa de encapsulação encontrada para ASNase foi muito baixa (2 a 2,4%)

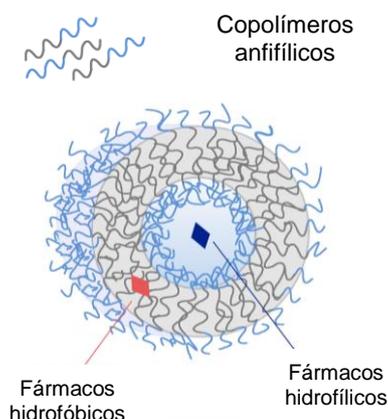
o que juntamente com fatores relacionados à instabilidade, desencorajaram a continuidade dos estudos realizados. Contudo, nenhum dos estudos foi capaz de desenvolver uma melhora significativa na enzima empregada clinicamente, por esse motivo, o desenvolvimento de novas alternativas se faz tão necessário. Considerando que sistemas obtidos por partículas poliméricas biodegradáveis têm sido amplamente utilizados para transporte de pequenas moléculas sintéticas, proteínas e peptídeos (Nomani et al, 2017) o estudo com esses compostos pode ser promissor para o desenvolvimento de uma alternativa para melhorar as propriedades farmacodinâmicas e imunogênicas da ASNase.

2.3. Vesículas poliméricas ou polimerossomos

Os polimerossomos, também conhecidos como vesículas poliméricas, têm atraído o interesse de muitos pesquisadores nas duas últimas décadas (Zhao et al, 2017). A obtenção de estruturas vesiculares através da utilização de copolímeros anfifílicos foi inicialmente descrita por Eisenberg e Discher que denominaram de polimerossomos a nova estrutura desenvolvida (Parmenter et al, 2013). Os polimerossomos (Figura 4) apresentam-se como homólogos de lipossomos em estruturas vesiculares, geralmente esféricas, com compartimento aquoso interno protegido por uma bicamada formada por copolímeros anfifílicos. Os polimerossomos são comumente comparados aos lipossomos, pois de forma análoga a essas estruturas, que são formadas espontaneamente por auto-associação dos fosfolípidos, os polimerossomos são formados por auto-associação de copolímeros anfifílicos (Lee et al, 2006). Porém, exibem estabilidade química e física superior aos lipossomos devido à possibilidade de controle da degradação química e à alta massa molecular dos copolímeros sintéticos empregados em sua constituição, resultando em

agregados mais estáveis e que variam de 10nm a 5 µm (Lee et al, 2012; Tanner et al, 2011). Também apresentam maior elasticidade e são menos permeáveis (Discher et al, 2007). Os polimerossomos apresentam também versatilidade de estruturas macromoleculares pela variedade dos copolímeros empregados, os quais podem apresentar, estrutura dibloco, tribloco, dentritica, e copolímeros enxertados (*graft copolymer*) (Zhao et al, 2017).

Figura 4. Organização dos polimerossomos. (Fonte: Apolinário, 2017)



O crescente interesse por essas estruturas pode ser justificado por essa capacidade em produzir, através da utilização de diferentes tipos de polímeros, inúmeras estruturas com características peculiares (como polimerossomos pH responsivos, termo responsivos) e de vasta aplicação na medicina, farmácia e biotecnologia (Meng et al, 2009; Blackman et al, 2017). Outra característica importante dos polimerossomos refere-se à facilidade de controle das propriedades dessas nanoestruturas, como volume interior e espessura da membrana polimérica, permitindo encapsulação de biomoléculas de tamanho considerável (Hocine et al, 2013). Além disso, apresentam baixa acumulação sistêmica (devido ao fato de que os copolímeros são facilmente excretados pela urina pois são menores do que o limiar

da filtração glomerular). A aplicação dessas nanoestruturas para liberação controlada e sítio-específica de agentes antitumorais, proteínas e genes é, sem dúvida, o maior destaque (Meng et al, 2009).

A utilização de polimerossomos como carreadores de fármacos tem sido amplamente investigada, principalmente porque a cavidade interior pode ser utilizada para encapsulação de moléculas hidrofílicas, enquanto a membrana pode acomodar fármacos hidrofóbicos (Lee et al, 2012; Lee et al, 2010; Antonietti, 2013; Discher p 2007). O'Neil e colaboradores (2009) desenvolveram um eficiente método de encapsulação de ovalbumina e BSA em vesículas de PEG-*b*-PPS (poli(etilenoglicol)-poli(sulfeto de p-fenileno)) com taxas de encapsulação de aproximadamente 25%. Lee (2011) comprovou a possibilidade de encapsular proteínas como mioglobina, hemoglobina e albumina de soro bovino (BSA) em polimerossomos constituídos por poli (óxido de etileno)-*b*-polietileno (PEO-*b*-PEE). Já Wang e colaboradores (2012) estudaram a eletroporação como técnica de incorporação de BSA, mioglobina, imunoglobulina G e lisozima em vesículas pré-formadas de PMPC-*b*-PDPA (poli (2-(metacrilóxi) etil fosforilcolina)-*b*-poli(2-(diisopropilamino) etil metacrilato)). Atualmente, vários estudos de encapsulação envolvendo proteínas e polimerossomos estão sendo conduzidos (Wang, 2012). Normani e colaboradores (2017) publicaram recentemente um trabalho em que demonstram a encapsulação de BSA em polimerossomos de PEG-PCL. Blackman e colaboradores (2017) publicaram recentemente um trabalho de produção de nanoreatores desenvolvidos através da utilização da técnica de photo PISA, uma técnica de produção de polimerossomos através da auto-agregação de polímeros induzida por luz visível. Além disso, podemos destacar os trabalhos sobre polimerossomos obtidos através da autoagregação de copolímeros assimétricos, como os desenvolvidos por Zhao e colaboradores (2017)

que buscam aumentar a permeabilidade das robustas membranas dos polimerossomos.

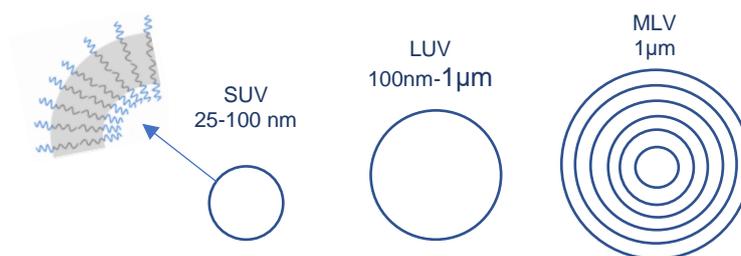
Muitas técnicas podem ser empregadas para obter os polimerossomos através da auto-agregação de copolímeros anfifílicos. Os métodos comumente utilizados podem ser classificados em dois grupos: métodos que empregam solventes, como método de inversão de fases ou injeção de solventes, e métodos livres de solvente, como hidratação de filmes; hidratação de sólidos e eletroformação (Du e O'Reilly, 2009).

Na técnica que emprega a utilização de co-solventes, os polimerossomos são obtidos através da dissolução dos copolímeros em um solvente orgânico (geralmente clorofórmio ou tetraidrofurano) seguido de hidratação do meio. Essa hidratação pode ocorrer tanto com a adição de água ao sistema como com a adição do sistema em água.

Já a técnica de hidratação do filme baseia-se na hidratação de um filme polimérico, previamente obtido através da dissolução do copolímero em um solvente orgânico com posterior remoção do solvente sob pressão reduzida. Esse tipo de técnica, entretanto, necessita de um grande tempo de agitação do sistema para hidratar o polímero e reduzir o grau de polidispersão da preparação. Ainda assim, é a técnica mais indicada para a produção de polimerossomos com finalidade terapêutica, principalmente quando o fármaco que se deseja encapsular é uma biomolécula que pode ter sua atividade comprometida após o contato com o solvente orgânico (Du e O'Reilly, 2009). A técnica de hidratação do filme foi a primeira utilizada para a produção de lipossomos (método de Bangham) e é empregada até hoje para essa finalidade (Laouini, 2012). Para a obtenção de lipossomos, Zawada (2004) descreve que a técnica é capaz de produzir amostras que apresentam uma fração dominante

de vesículas com membrana única (LUV – *large unilamellar vesicles* ou SUV – *small unilamellar vesicles*) e uma fração, menor de vesículas com multi-membranas (MLV – *multilamellar vesicles*). Essas vesículas têm composição igual, entretanto, apresentam significativa variação de tamanho, como mostra a figura 5. Por esse motivo, apesar de simples, a técnica de hidratação do filme apresenta um alto índice de polidispersão que exige a aplicação de técnicas subsequentes como sonicação ou extrusão para diminuir e uniformizar o tamanho das estruturas obtidas.

Figura 5. Classificação de nanoestruturas vesiculares formadas por moléculas anfífilas de acordo com o tamanho LUV (*large unilamellar vesicles*), SUV (*small unilamellar vesicles*) e MLV (*multilamellar vesicles*). (Fonte: Autor).



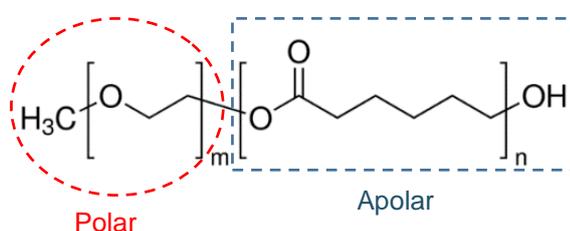
Ainda que os polimerossomos sejam ótimos candidatos para a encapsulação de fármacos proteicos, muitos fatores como a técnica empregada para a sua preparação ou o tipo de proteína que se deseja encapsular podem interferir na capacidade de encapsulação.

2.4. Copolímeros anfífilos e sua auto-agregação

O termo anfífilo é utilizado para designar moléculas orgânicas (figura 6) que são compostas por uma porção hidrofílica (cabeça polar) e uma porção hidrofóbica (cauda apolar) como tensoativos, fosfolípidios e sabões, por exemplo (Smart et al,

2008). A parte hidróbica dessas moléculas, em contato com a água, atraindo umas as outras tende a minimizar seu contato com água, enquanto a parte hidrofílica de suas cadeias preferem interagir com a água. Isso acontece, pois, para a região hidrofóbica da molécula é entropicamente mais favorável manter-se agregada do que manter-se em solução interagindo com a água (Smart et al, 2008). No entanto, para que os monómeros se agreguem, o efeito hidrofóbico deve ser maior do que a força de repulsão (eletrostática ou estérica) entre as cabeças hidrofílicas. Em concentrações muito baixas, a compatibilidade da parte hidrofílica com a água é suficiente para manter copolímero solubilizado em solução. No entanto, a partir de uma determinada concentração (chamada de concentração de agregação crítica), essas moléculas passam a se agregar (Smart et al, 2008). A esse efeito dá-se o nome de efeito hidrofóbico da água e as estruturas assim formadas, são conhecidas como estruturas de auto-agregação. Assim como os tensoativos clássicos, os copolímeros anfifílicos podem se auto-organizar em meio aquoso e assumir diferentes conformações como micelas e vesículas. Sabe-se que a forma da estrutura resultante da autoagregação de moléculas anfifílicas, pode variar de acordo com vários parâmetros, entre eles, o valor do parâmetro crítico de agregação, a razão entre a porção hidrofílica/hidrofóbica, o volume da fração hidrofílica, a estrutura do copolímero, bem como a metodologia aplicada para sua obtenção (Naolou et al, 2013; Du e O'Reilly, 2009; Lee et al, 2006).

Figura 6. Estrutura geral de um copolímero de polietilenoglicol-policaprolactona PEG-PCL (Fonte: autor)



A determinação da estrutura de autoagregação que será obtida em cada um dos casos, depende da curvatura da estrutura resultante da interação das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (Smart et al, 2008). Uma das maneiras de prever a curvatura dessa estrutura formada e, conseqüentemente determinar o tipo da estrutura que será obtido é utilizar o “parâmetro crítico de empacotamento” ou *critical packing parameter*. O parâmetro crítico de empacotamento (p), desenvolvido por Israelachvili em 1976 para pequenas moléculas hidrofílicas em água (Israelachvili, 1994) e atualmente amplamente utilizado para diferentes tipos de moléculas anfifílicas, é definido por:

$$P = \frac{V}{a_0 l} \quad \text{Eq. 1}$$

em que V é definido como o volume do bloco hidrofóbico, l corresponde ao comprimento da cadeia hidrofóbica e a_0 é a área da seção transversal da porção polar do copolímero. De acordo com Smart (2008), estruturas formadas por moléculas anfifílicas com valores de parâmetro de empacotamento baixo ($< 1/3$) apresentam alta interface de curvatura e portanto devem ser do tipo micelas, já estruturas formadas por moléculas anfifílicas com valores de parâmetro de empacotamento entre $1/3$ e $1/2$ devem ser micelas cilíndricas e estruturas formadas por moléculas anfifílicas com altos valores de parâmetro de empacotamento ($> 1/2$) e que portanto, devem apresentar baixas curvaturas, serão vesículas.

O perfil de agregação também pode ser descrito em função do volume da fração hidrofílica, que neste caso relaciona a parte polar da molécula com a molécula inteira (parte apolar + polar). Copolímeros com uma fração hidrofílica menor do que 20%

geralmente precipitam em solução, quando essa fração está entre 20 e 42% vesículas são predominantemente formadas e quando essa fração for superior a 42% a forma de agregação predominante é a micelar (Ahmed e Discher, 2004).

2.5. Escolha dos copolímeros

Segundo Brinkhuis (1981), mais de uma década de pesquisa foi realizada com o objetivo de entender melhor as estruturas de copolímeros anfifílicos, sua auto-agregação e emprego em nanoestruturas. Como resultado disso, observa-se atualmente uma extensiva biblioteca de copolímeros que podem ser empregados nas mais variadas áreas do conhecimento.

Considerando a natureza do presente trabalho, que visa a obtenção de polimerossomos com finalidade terapêutica, uma pesquisa foi realizada no sentido de selecionar copolímeros adequados. A escolha de copolímeros para produção de polimerossomos com finalidade terapêutica nem sempre é fácil, mas exemplos podem ser encontrados na literatura (Brinkhuis 1981). Para a obtenção dos polimerossomos (ou de outras formas de agregados) com finalidade terapêutica, os polímeros empregados para construção dos copolímeros (ou blocos poliméricos) devem ser preferencialmente biodegradáveis ou, pelo menos, biocompatíveis.

O PEG é um polímero sintético muito empregado no domínio da farmácia e medicina devido à algumas de suas propriedades, como por exemplo baixo custo, solubilidade em água, biocompatibilidade e excelente comportamento de eliminação *in vivo* (Naolou et al, 2013). Por esse motivo, é vastamente empregado para construção da parte polar dos copolímeros dibloco. Além disso, a peguilação de lipossomos já é bastante estabelecida, o que confere confiança frente à utilização de PEG em humanos. Sabe-se ainda que a utilização do PEG em lipossomos pode

reduzir a adsorção superficial de proteínas e levar a um aumento do tempo de circulação dessas estruturas no sangue (Woodle et al,1992).

Nesse sentido, o PEG foi selecionado para compor a parte hidrofílica do copolímero dibloco empregado no presente estudo. Para a parte hidrofóbica, a policaprolactona (PCL), um outro polímero com características bem estabelecidas, biodegradável e biocompatível, foi selecionado (Naolou et al, 2013). Ahmed e Discher (2004) descrevem copolímeros de PEG-PCL (figura 6) como sendo de grande interesse e ressalta a necessidade de novos estudos para avaliação de sua caracterização, liberação e degregação.

Baseando-se em trabalhos anteriores como o de Riley et al (2011) e de Du e Discher (2009) e nas premissas anteriormente mencionadas sobre as formas de agregação dos copolímeros, os copolímeros de PEG-PCL foram selecionados respeitando valores de razão entre a porção hidrofóbica/hidrofílica menor que 1:2 e com volume da fração hidrofílica entre 0,20 e 0,42 para aumentar a probabilidade de obtenção de vesículas. Além disso, foram selecionados copolímeros com diferentes valores de massa molecular, a fim de verificar a influência desse parâmetro nos agregados formados.

3. Objetivos

Objetivos gerais

Desenvolvimento nanotecnológico da enzima L-Asparaginase, por meio da encapsulação em vesículas poliméricas de poli(etileno glycol)-*b*-poli(ε-caprolactona) (PEG-PCL). Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes passos foram estabelecidos:

- Desenvolvimento de protocolo de obtenção dos polimerossomos de PEG-PECL;
- Encapsulação da ASNase em polimerossomos;
- Caracterização dos polimerossomos contendo ou não a ASNase encapsulada;
- Estudos *in vitro* de liberação da ASNase encapsulada nos polimerossomos.

4. Material e Métodos

4.1. Material

Os copolímeros de poli(etileno glicol)-poli(ε-caprolactona), PEG-PCL, foram obtidos da empresa Polymer Source Inc[®] (Montreal, Quebec, Canada). Um resumo das propriedades dos copolímeros é apresentado na tabela 1. O ácido fosfotúngstico foi obtido da Sigma-Aldrich[®] (Saint. Louis, MO, USA) e a L-asparaginase foi obtida da ProSpec-Tany Technogene (Rehovot, Israel). Todos os outros reagentes, em grau analítico, foram obtidos da Synth[®] (São Paulo, São Paulo, Brasil). Todos os experimentos foram realizados utilizando água ultra pura, por meio do sistema Milli-Q, Merck Millipore[®] (Bedford, MA, USA).

Tabela 1. Propriedades dos copolímeros empregados

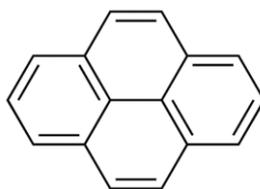
Copolímeros de PEG-PCL	Razão hidrofóbica/hidrofílica ($M_n\text{PEG}/M_n\text{PCL}$)	Fração hidrofílica ($M_n\text{PEG}/[M_n\text{PCL}+M_n\text{PEG}]$)	Massa Molecular (Da)
Copolímero 1	2.000:5.000 (0,40)	0,29	7.000
Copolímero 2	5.000:11.000 (0,45)	0,31	16.000
Copolímero 3	5.000:13.000 (0,38)	0,28	18.000

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação da concentração de agregação crítica (CAC)

Tendo em vista que os valores de concentração de agregação crítica (CAC) para os copolímeros de PEG-PCL empregados nesse trabalho ainda não estão disponíveis na literatura, um ensaio foi realizado com o objetivo de determiná-los. A sonda mais comumente empregada com a finalidade de determinar a CAC de compostos anfifílicos por solubilização de moléculas fluorescentes é o pireno (figura 7), uma molécula altamente hidrofóbica e, por esse motivo, muito sensível às variações de polaridade do meio (Casero, 1997).

Figura 7. Estrutura química do Pireno ($C_{20}H_{12}$).



Estudos envolvendo essa molécula revelaram que sua solubilidade em água é praticamente a mesma quando as variações de concentração de polímero na solução se alteram abaixo da CMC ou CAC. No entanto, acima da CAC, quando a formação de agregados passa a acontecer, sua solubilidade é abruptamente aumentada pois o

núcleo hidrofóbico das micelas passa a interagir com as moléculas de pireno caracterizando-o como uma excelente sonda para determinação da CAC (Topel et al, 2013).

O protocolo de determinação da CAC foi realizado utilizando como referência trabalhos como o de Normani et al (2017) que demonstra, que a CAC para copolímeros anfifílicos (nesse caso, especificamente os copolímeros de PEG-PCL) é muito menor do que a determinada para tensoativos de baixa massa molecular e de Zhang et al (2011) e Deng et al (2012) que descrevem protocolos para a determinação de CAC de copolímeros anfifílicos semelhantes aos empregados no presente trabalho. Uma solução estoque de pireno em acetona foi preparada e, em cada frasco de cintilografia, foram adicionados 10 μ L de solução de pireno. Em seguida, uma solução estoque de copolímero em clorofórmio foi adicionada em diferentes volumes aos frascos de cintilografia e, após a completa evaporação do solvente, cada uma das amostras recebeu 10mL de água miliQ ultra pura de forma que as concentrações de copolímeros variaram de 0,1 a 0,00005 mg/mL e a concentração de pireno (0,6 mM) permaneceu fixa em todas as amostras. Os sistemas foram submetidos à agitação magnética a 11.500 rpm à temperatura ambiente por 24h. As amostras foram então analisadas em fluorímetro (Shimatsu/RF5301PC): excitadas a 330 nm com quantificação da emissão em 373 nm e 383 nm, a 25°C.

4.2.2. Desenvolvimento do protocolo de obtenção dos polimerossomos

Os sistemas foram preparados através da técnica de hidratação do filme polimérico. Diversos protocolos de variação de massa inicial de copolímero, temperatura e condições de agitação foram testados até que se determinasse que para a obtenção dos polimerossomos, as massas de copolímero deveriam ser solubilizadas

em um volume de clorofórmio e, após evaporação do solvente, hidratadas com um volume de tampão ou água que mantivesse a mesma proporção. Dessa forma, uma massa de 5 mg de copolímero foi adicionada a um balão de fundo redondo e dissolvida em 15 mL de clorofórmio. O solvente foi então evaporado sob pressão reduzida por 3 horas a 30 mBar para obtenção do filme polimérico. O filme polimérico foi hidratado à temperatura ambiente com 15 mL de tampão fosfato pH 7,4 durante 24 h sob agitação magnética a 11.500 rpm. Em seguida, baseando-se nos estudos de Zawada (2004), Laouini *et al* (2012), diferentes técnicas de pós-filme como sonicação, centrifugação, filtração e extrusão foram estudadas.

Sonicação: As amostras foram sonicadas em banho de ultrassom Qsonica® (Columbiana County, Ohio, United States) a 50 W por 1 hora a temperatura ambiente.

Centrifugação: a centrifugação foi realizada utilizando 2000 xg por 5 minutos, empregando-se uma centrífuga Eppendorf (modelo 5810 R® Eppendorf, Hamburger, Germany) sendo que o precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante foi então considerado como sistema purificado.

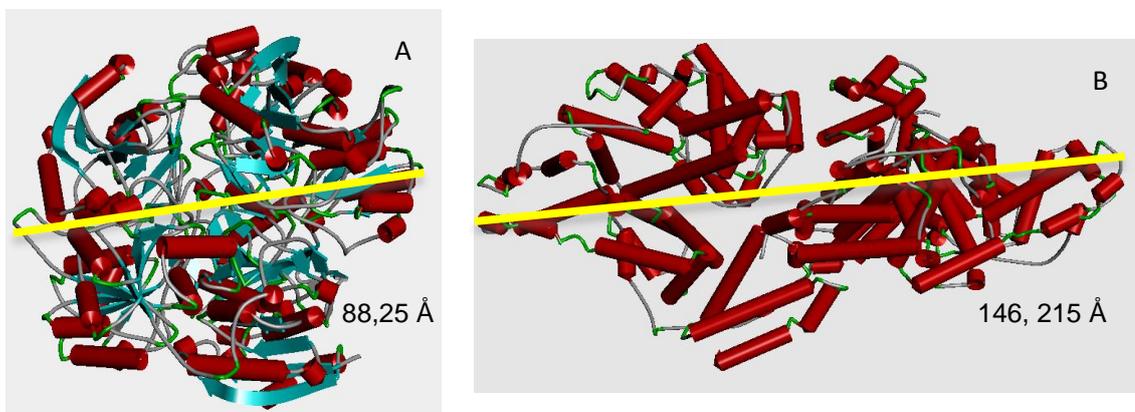
Extrusão: a técnica de extrusão foi realizada utilizando o extrusor Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, United States). As amostras foram extrusadas 31 vezes por uma membrana de policarbonato com poros de 400 nm. Todas as amostras obtidas foram submetidas a análise de espalhamento de luz dinâmico.

Filtração: As amostras foram submetidas a filtração, utilizando-se filtro de seringa com membrana hidrofílica de PVDF e com tamanho de 0,22 µm.

4.2.3. Encapsulação de proteínas nos polimerossomos

Para os ensaios de encapsulação, empregou-se a melhor metodologia determinada para a preparação dos polimerossomos, que consiste na realização da hidratação do filme polimérico com posterior centrifugação. Neste caso, a proteína de interesse foi incorporada ao volume de tampão utilizado para a hidratação do filme. Os ensaios de encapsulação foram inicialmente realizados empregando-se a albumina de soro bovino (BSA), como proteína modelo. A escolha por essa proteína deu-se pelo fato da BSA ser amplamente utilizada como proteína modelo e, além disso, o maior eixo obtido para as duas proteínas, de acordo com o programa ViewerLite (ViewerLite 5.0 - accelrys) empregando os cristais disponíveis no *Protein Data Bank* (código PDB 3VO3 para BSA e 3 ECA para ASNase) revelou valores de 88,25 Å e 146,21 Å (Figura 8) para a ASNase a BSA. Portanto, considerando-se que a encapsulação em vesículas de PEG-PLA não envolve interações específicas e/ou eletrostáticas e depende majoritariamente do tamanho da proteína, teoricamente a encapsulação da BSA seria mais difícil do que a da ASNase.

Figura 8. Representação tridimensional dos cristais de BSA (Código PDB 3VO3) e L-Asparaginase (Código PDB 3ECA) e suas respectivas dimensões máximas (linha amarela) calculados com o auxílio do programa Pymol.



O protocolo de encapsulação consistiu na adição de uma massa de 5 mg de copolímero em um balão de fundo redondo, posteriormente solubilizada em 15 mL de clorofórmio. O solvente foi então evaporado sob pressão reduzida por 3 horas a 30 mBar para obtenção do filme polimérico. O filme polimérico foi hidratado com 15 mL de solução de 1 mg/mL de proteína (BSA ou ASNase) por 24 h com agitação magnética a 11.500 rpm à temperatura ambiente. Finalmente, a solução foi centrifugada a 2000 xg por 5 minutos para remoção de copolímero precipitado (*bulk*) e o sobrenadante foi considerado a amostra.

4.2.4. Eficiência de encapsulação

Para determinar a eficiência de encapsulação, foram empregadas duas metodologias. A primeira metodologia, determina a eficiência de encapsulação de maneira indireta. Para tanto, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg por 30 min para precipitação dos polimerossomos e separação das proteínas não encapsuladas no sobrenadante. A concentração de proteínas foi determinada, no sobrenadante, através do método do ácido bicinconínico (BCA). O método baseia-se na formação de um complexo de Cu^{2+} e proteína em condições alcalinas seguido por uma redução de Cu^{2+} para Cu^{1+} . O ácido bicinconínico leva a formação de um complexo roxo azulado com Cu^{1+} em ambiente alcalino, configurando-se como um bom método para monitorar a redução de Cu^{2+} pelas proteínas. A quantidade de Cu^{2+} reduzido é proporcional a quantidade de proteína presente na amostra. A eficiência de encapsulação foi determinada através da diferença entre a quantidade de proteína presente na solução inicial e a quantidade de proteína encontrada no sobrenadante. Para tanto, uma curva de calibração da concentração em função dos valores de absorbância a 280 nm foi construída empregando-se a proteína BSA. Para as leituras

de absorvância utilizou-se espectrofotômetro SpectraMax plus 384 - Molecular Devices com auxílio do software Soft Max Pro.

A segunda metodologia baseia-se na quantificação indireta da taxa de encapsulação empregando-se cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) por exclusão de tamanho (SEC) utilizando uma coluna Superdex 200 (GE Life Sciences) foi utilizada para separar os polimerossomos obtidos da proteína que não foi encapsulada. As frações correspondentes aos polimerossomos foram concentradas utilizando (MICROKROS 20cm 100K MPES). Na sequência os sistemas foram submetidos a análise por espalhamento de luz dinâmico. Após a análise, as vesículas foram rompidas com clorofórmio. Para tanto, 1mL do sistema foi colocado em contato com 1mL de clorofórmio por 5 minutos. Durante esse tempo o sistema foi homogeneizado manualmente para permitir maior contato entre as fases orgânica e aquosa e consequente partição das moléculas de copolímeros para a fase orgânica, com recuperação da proteína na fase aquosa. Após o tempo descrito as fases foram separadas com o auxílio de um pipetador automático. A fase orgânica foi descartada e a quantidade de proteína encapsulada foi determinada na fase aquosa através do método de BCA anteriormente descrito.

4.2.5. Ensaio de liberação

Para realização dos ensaios de liberação foi utilizada a membrana de diálise (Biotech CE Tubing MWCO 300kD). Inicialmente para padronização da técnica, realizamos ensaios de permeação da enzima não encapsulada. Para tanto, realizou-se tratamento prévio da membrana seguindo as instruções do fabricante e, em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de ASNase 2,25 mg/mL ao saco de diálise). A maioria dos estudos cita volumes de solução de diálise 100 vezes maiores que o

volume dialisado (1:100), entretanto, como as nossas amostras têm concentração muito baixa de proteína, a condição de 1mL de dialisado para 25 mL (1:25) de solução de diálise foi inicialmente testada.

Os sistemas preparados foram centrifugados a 10,000 xg por 30 min para precipitação dos polimerossomos e remoção de proteínas não encapsuladas no sobrenadante. Os polimerossomos, obtidos com os copolímeros 1, 2, e 3, foram lavados com 5mL de solução tampão fosfato 7,4 e foram novamente centrifugados a 10.000 xg por 30 min para precipitação dos polimerossomos e remoção de proteínas não encapsuladas no sobrenadante. A fração correspondente aos polimerossomos foi separada e recebeu 1mL de solução tampão. Essa amostra constituiu a amostra utilizada para o ensaio de liberação. As amostras foram realizadas em duas condições, utilizando tampão fosfato pH 7,4 e tampão fosfato pH 5,5. As amostras foram mantidas a 37°C por 36 horas em contato com a solução de diálise e alíquotas de 200 µL de solução foram coletadas nos tempos de 0,5; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 24 e 36 horas. A concentração de proteínas nas alíquotas recolhidas foi determinada através do método de BCA (descrito na Seção 3.5).

4.2.6. Caracterização dos sistemas: Análise de morfologia através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A morfologia dos polimerossomos foi determinada através de microscopia de transmissão eletrônica, em microscópio Tecnai FEI G20 (Hillsboro, Oregon) na central analítica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. As amostras foram depositadas em suportes de cobre revestidos com carbono, com mesh de 300nm e receberam solução de ácido fosfotúngstico a 2% (w/v).

4.2.7. Caracterização dos sistemas: Espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic light scattering* - DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons (PCS), é uma importante técnica para medir o tamanho das nanopartículas que tem a vantagem de ser não invasiva, rápida e precisa. Em geral, é aplicada na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido. O movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão faz com que a luz seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho de partícula pode ser calculado pela relação Stokes-Einstein (Malvern, 2018)

Nesse trabalho, a distribuição de tamanho dos polimerossomos foi determinada por DLS utilizando o Zetasizer[®] Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), equipamento multi-usuário disponível no Laboratório de Eletroquímica e Corrosão, sob responsabilidade da Profa. Idalina Vieira Aoki. As análises foram realizadas com um ângulo de dispersão de 90° a 25°C e os resultados foram expressos empregando-se o tamanho médio \pm o desvio padrão (SD) para três análises realizadas de maneira independente. Para comparação entre as amostras, foram considerados os valores de espalhamento de luz dinâmico por intensidade.

5. Resultados e discussão

5.1. Determinação da concentração de agregação crítica (CAC)

De acordo com a IUPAC (2018), a concentração micelar crítica (CMC) ou concentração de agregação crítica (CAC) deve ser entendida como a concentração em que passa a ser mais favorável para as moléculas anfifílicas, do ponto de vista energético, permanecer em solução de maneira agregada, já que dessa maneira o contato das caudas hidrofóbicas com a água é minimizado pelas cabeças polares. Em outras palavras, CAC pode ser entendida como a concentração a partir da qual todas as interfaces água-óleo ou água-ar estão saturadas e todos os monômeros adicionados a partir dessa concentração passam a agregar-se. Para determinar a CAC dos copolímeros, inicialmente, uma varredura no espectro de emissão do pireno (de 300 a 500 nm, com excitação em 334nm) foi realizada e verificou-se máxima emissão em 373 e 383 nm.

Utilizando a metodologia proposta, os valores encontrados no presente trabalho de $0,6 \text{ mg/L}^{-1}$; $0,4 \text{ mg/L}^{-1}$ e $1,26 \text{ mg/L}^{-1}$ para os copolímeros 1, 2 e 3 respectivamente são muito parecidos com os valores encontrado no estudo de Yoon e colaboradores (2015), os quais variaram de $0,3$ a $1,8 \text{ mg/L}^{-1}$ para outros copolímeros de PEG-PCL. Os gráficos correspondentes a esses ensaios são apresentados abaixo nas figuras 9, 10 e 11 para os copolímeros 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 9. Intensidade de fluorescência (I_{373}/I_{393}) em função da concentração de copolímero PEG-PCL (2000:5000), em água ultrapura.

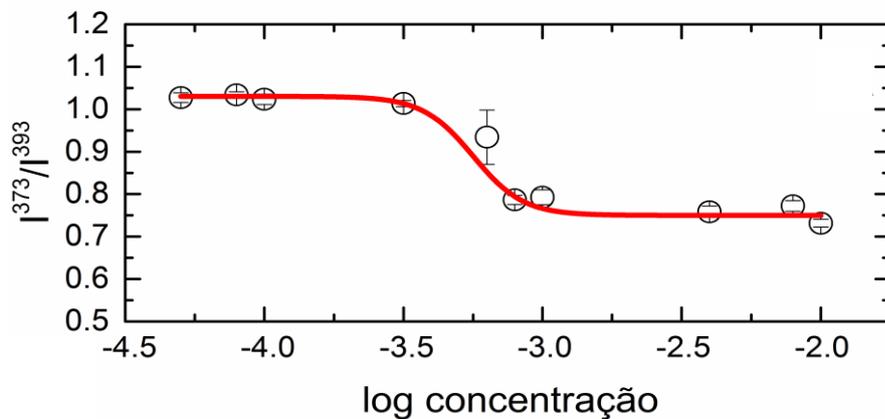


Figura 10. Intensidade de fluorescência (I_{373}/I_{393}) em função da concentração de copolímero PEG-PCL (5000:11000), em água ultrapura.

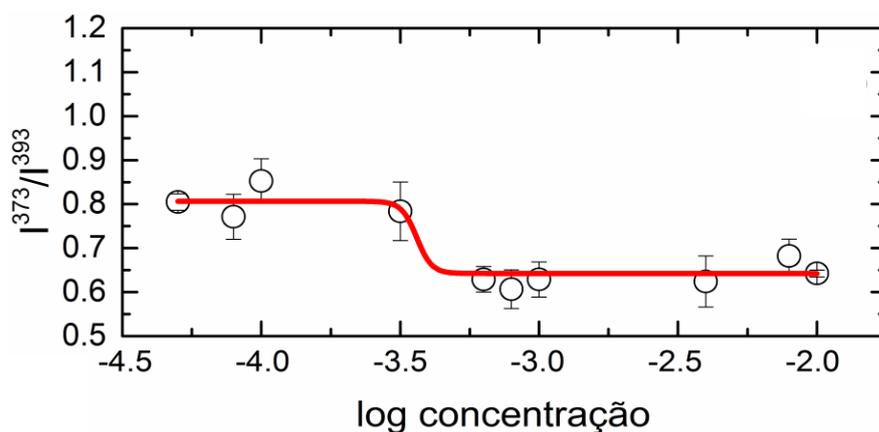
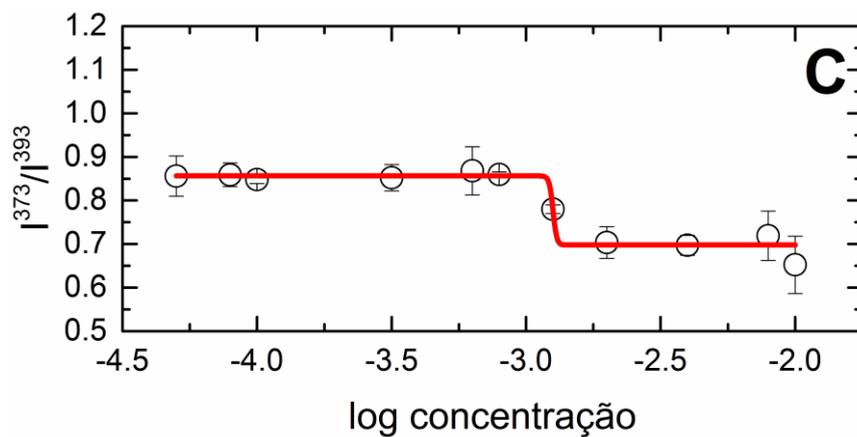


Figura 11. Intensidade de fluorescência (I_{373}/I_{393}) em função da concentração de copolímero PEG-PCL (5000:13500), em água ultrapura.



5.2. Desenvolvimento do protocolo de obtenção dos polimerossomos

A técnica de DLS, principalmente para nanoestruturas de interesse farmacêutico, requer uma estreita análise e muitos parâmetros devem ser levados em consideração. Uma das maiores discussões envolvendo essas análises diz respeito aos valores de PDI (índice de polidispersão). Esse parâmetro, adimensional, corresponde à amplitude de distribuição de tamanho calculada a partir da análise de cumulantes, expressa em função da variação entre a menor e a maior partícula encontrada durante a leitura da amostra (Malvern, 2018). Os valores de PDI podem variar de 0 a 1. Do ponto de vista da aplicação da técnica de DLS, sistemas monodispersos que apresentem valores de PDI inferior a 0,7 correspondem àqueles para os quais melhor se aplicam os parâmetros do de ajuste no qual a metodologia se baseia. Por outro lado, valores maiores do 0,70 indicam sistemas muito polidispersos para os quais a análise através da técnica de DLS não deve ser realizada (Malvern, 2018). No entanto, para nanoestruturas de aplicação farmacêutica são desejados sistemas com valores de PDI igual ou inferior a 0,3 exatamente por considerar que para finalidade terapêutica essa variação entre a menor e a maior estrutura devem ser ainda mais estrita já que os efeitos no organismo podem deixar de ser benéficos caso uma ou duas dessas estruturas de tamanho diferente e maior do que a média, por exemplo, esteja circulando no organismo. Ainda no contexto de obtenção de nanoestruturas com aplicação farmacêutica outro parâmetro importante a ser considerado é o tamanho das nanoestruturas obtidas. As propriedades dependentes do tamanho e a proximidade das dimensões de macromoléculas biológicas levaram a uma aproximação entre nanotecnologia e biologia, trazendo grandes avanços em diagnósticos médicos, terapias específicas, bem como para a biologia molecular e celular (Fontanive, 2014). Avanços em estudos envolvendo tumores sólidos

revelaram, por exemplo, que esses tumores desenvolvem uma vasculatura não organizada e descontínua com “gaps” de 100nm a 2 μ m e que nanoestruturas com tamanho inferior a 200nm são capazes de penetrar por esses “gaps” acumulando-se nessas regiões, através de um processo conhecido como efeito de permeabilidade aumentada (Anajafi e Mallik, 2015). Descrito pela primeira vez 30 anos atrás, o efeito de permeabilidade aumentada, pode ajudar a explicar o entusiasmo que envolve o desenvolvimento de nanoestruturas para a terapia antitumoral (Whang, 2015).

Inicialmente, quando o presente trabalho foi proposto, o objetivo era desenvolver vesículas poliméricas contendo ASNase que apresentassem diâmetro superior a 200nm, pois o mecanismo de ação enzima consiste na depleção dos níveis séricos de asparagina e, portanto, garantir que essas estruturas permanecessem circulando por mais tempo na corrente sanguínea poderia colaborar para o aumento da atividade anti tumoral. Entretanto, pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda podem desenvolver sítios tumorais secundários e nesse sentido a encapsulação da enzima em estruturas com tamanho aproximado de 200nm poderia colaborar no controle desses sítios secundários, em geral de difícil tratamento. Além disso, o recente artigo de Knott e colaboradores (2018) apresenta a potencial utilização de ASNase para o tratamento de câncer de mama e nesse caso polimerossomos de aproximadamente 200nm de diâmetro, que por consequência apresentem efeito de permeabilidade aumentada, também seriam uma abordagem interessante. Os resultados das diversas condições testadas foram analisados em função dos valores obtidos nos ensaios de DLS e são apresentados na tabela 2. Como pode ser observado, para os sistemas sem aplicação de técnicas pós-filme, ou seja, imediatamente após o término da hidratação do filme polimérico, altos valores de PDI foram obtidos. Esses valores justificam-se pela técnica empregada para obtenção das

vesículas poliméricas, a qual não é capaz de produzir sistemas homogêneos (Lee e Feijen, 2012). Com base nos resultados obtidos, foram investigadas diferentes técnicas pós-filme que permitissem a obtenção de um sistema de vesículas poliméricas com PDI compatível com o desejado para essas vesículas, considerando a aplicação farmacêutica. Os resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 2 – Resumo das análises de DLS das amostras dos sistemas de polimerossomos de PEG-PCL obtidos sem técnica pós-filme (Amostras analisadas imediatamente após o término da hidratação do filme polimérico, picos em função da intensidade de espalhamento).

Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
PDI 0,773	PDI 0,810	PDI 0,830
Pico 1 - 449,1 nm (100%)	Pico 1 - 552,1 nm (100%)	Pico 1 – 650 nm (100%)

Tabela 3 – Resumo das análises de DLS das amostras dos sistemas de polimerossomos de PEG-PCL (picos em função da intensidade de espalhamento)

Amostras analisadas após a realização da centrifugação		
Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
PDI 0,314	PDI 0,358	PDI 0,214
Pico 1 - 380,5 nm (94,8%)	Pico 1 - 421,9 nm (95,4%)	Pico 1 - 242,7 nm (98,1%)
Pico 2 – 5138 nm (5,2%)	Pico 2 – 5361 nm (4,6%)	Pico 2 - 5341 nm (1,1%)
Amostras analisadas após a realização da extrusão		
Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
PDI 0,371	PDI 0,259	PDI 0,589
Pico 1 - 264,5 nm (97,2%)	Pico 1 - 204,3 nm (97,8%)	Pico 1 - 201,9 nm (98,2%)
Pico 2 – 4988 nm (2,8%)	Pico 2 – 5160 nm (2,2%)	Pico 2 – 4885 nm (2,2%)
		Pico 3 - 6,066 nm (10,2%)
Amostras analisadas após a realização de filtração		
Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
PDI 0,201	PDI 0,194	PDI 0,345
Pico 1 - 171,5 nm (97,2%)	Pico 1 - 180,1 nm (97,8%)	Pico 1 - 180,2 nm (93,6%)
Pico 2 - 5049 nm (1,4%)	Pico 2 – 5831 nm (0,5%)	Pico 2 – 5084 nm (3,6%)
		Pico 3 - 42,55 nm (2,8%)

Amostras analisadas após a realização de sonicação		
Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
PDI 0,701	PDI 0,600	PDI 0,912
Pico 1 – 244,9 nm (70,7%)	Pico 1 – 212,3 nm (89 %)	Pico 1 - 967 nm (55,6%)
Pico 2 - 620,6 nm (27,1%)	Pico 2 – 5,531 nm (9,7%)	Pico 2 - 225,8 nm (31,8%)
Pico 3 – 5446 nm (2,2%)	Pico 3 – 5033 nm (1,3%)	Pico 3 - 4,793 nm (10,7%)

Os resultados obtidos demonstram que a técnica de sonicação, apesar de resultar em diminuição no tamanho das vesículas obtidas para os copolímeros 1 e 2 (de 449.1 nm para 244,9 nm e de 552 nm para 212, 3 nm, respectivamente) não apresentou a mesma capacidade para o copolímero 3 para o qual a realização da técnica levou a um aumento no tamanho das estruturas de maior prevalência. Além disso, observa-se que as variações de PDI não foram significativas para o copolímero 1 (diminuindo de 0,773 nm para 0,701) e para o copolímero 3 (aumento de 0,830 para 0,912). Para o copolímero 2, a redução foi um pouco mais significativa, mas os valores ainda se mantiveram elevados (alterando de 0,810 para 0,600). Provavelmente, a energia envolvida no processo de sonicação favoreceu a interação entre as moléculas de PEG, aumentando as interações entre as vesículas poliméricas, levando à formação de grandes agregados (como é possível verificar nos gráficos de DLS, figuras 16 e 26), contribuindo para observação dos altos valores de PDI. Por esse motivo, essa técnica não foi selecionada para ser utilizada após a hidratação do filme polimérico.

As técnicas de centrifugação, extrusão e filtração mostraram-se eficientes em reduzir o tamanho das vesículas obtidas após a hidratação do filme polimérico. A técnica de filtração, entretanto, foi descartada uma vez que não leva a uma diminuição real do tamanho das nanoestruturas obtidas. O emprego da técnica de filtração apenas seleciona estruturas dentro do tamanho de interesse, através do tamanho do

poro da membrana de filtração empregada. Por esse motivo, considerando que a quantidade de estruturas obtidas com tamanho inferior a 300nm corresponde a uma pequena porcentagem dentro do sistema obtido, a aplicação dessa técnica nas amostras levou a uma considerável diluição dos sistemas, impossibilitando assim a sua utilização.

Considerando que a centrifugação e a extrusão apresentaram o mesmo perfil de estruturas obtidas, analisando-se o tamanho das nanoestruturas e os valores de PDI, a centrifugação foi escolhida como a técnica a ser utilizada após a obtenção do filme polimérico pois é uma técnica mais rápida, e escalonável. O emprego da centrifugação nos sistemas permitiu a remoção de nanoestruturas maiores e moléculas de polímero que precipitam antes da agregação (*bulky copolymer*), contribuindo assim para a homogeneidade do sistema com consequente diminuição dos valores de PDI. Apesar da diminuição observada com o emprego da centrifugação, os valores de PDI obtidos para os copolímeros 1 e 2 (0,314 e 0,358, respectivamente) ainda encontram-se relativamente altos para emprego em formulações intravenosas. A diminuição no PDI também foi observada nas amostras submetidas à extrusão. Ainda que os valores de PDI estejam acima dos valores desejáveis para aplicação farmacêutica, pode-se dizer que, em comparação aos valores de PDI obtidos na amostra obtida sem nenhuma técnica pós-filme, há considerável diminuição nos valores observados. Desta forma, é possível afirmar que empregando-se a técnica de centrifugação é possível atender às expectativas de nanoestruturas com tamanho próximo a 200 nm com o copolímero 3 ($D_h = 242,7$ nm) enquanto que os copolímeros 1 e 2 resultam em polimerossomos maiores ($D_h = 380,5$ e $421,9$ nm para os copolímeros 1 e 2, respectivamente).

Figura 12. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após obtenção dos polimerossomos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 950,7	Peak 1: 449,1	100,0	72,16
Pdl: 0,773	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,981	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Refer to quality report

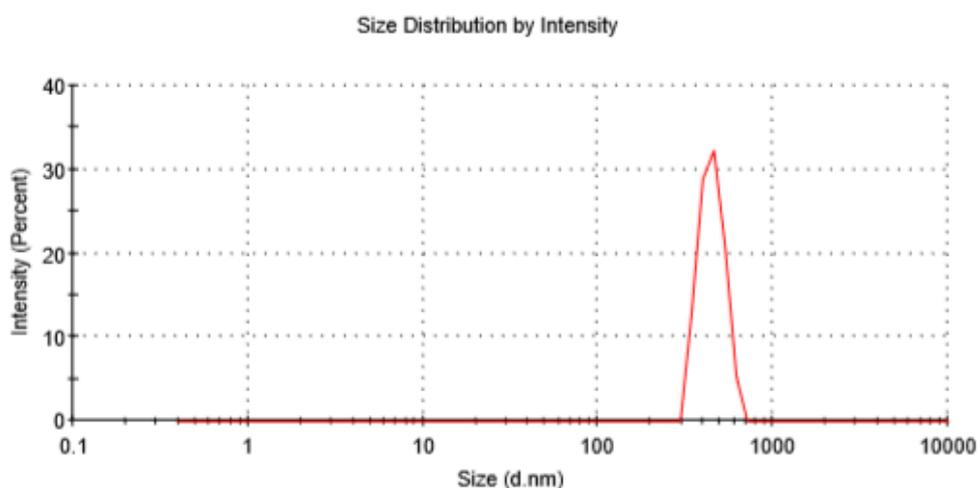


Figura 13. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após centrifugação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 389,6	Peak 1: 380,5	94,8	156,3
Pdl: 0,314	Peak 2: 5138	5,2	520,6
Intercept: 0,892	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good

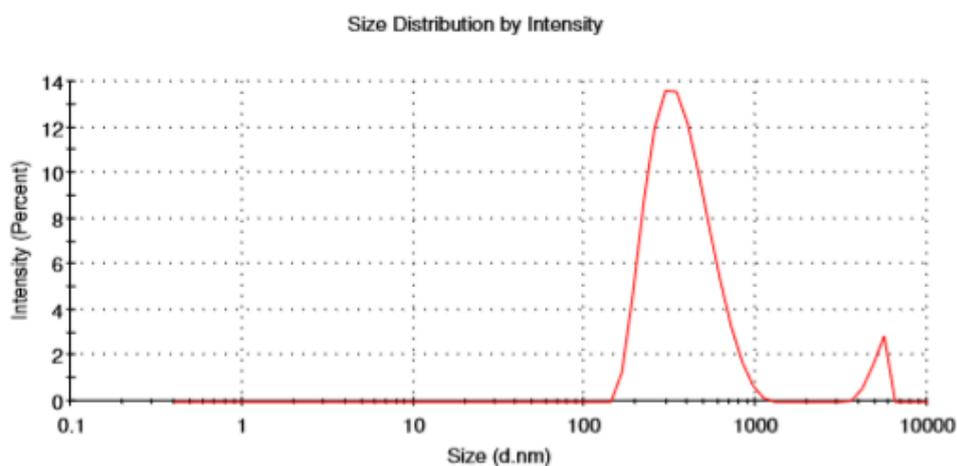


Figura 14. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após extrusão dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 265,1	Peak 1: 264,5	97,2	113,1
Pdl: 0,371	Peak 2: 4988	2,8	614,8
Intercept: 0,901	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result **Refer to quality report**

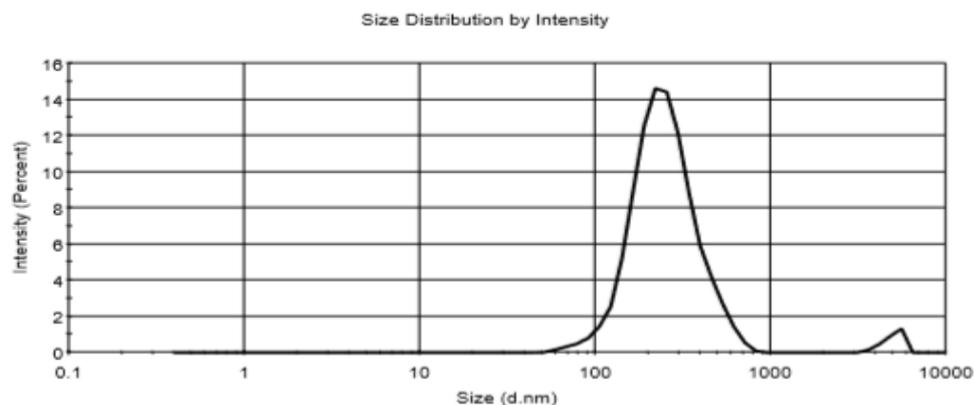


Figura 15. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após filtração dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 151,2	Peak 1: 171,5	98,6	69,85
Pdl: 0,201	Peak 2: 5049	1,4	586,4
Intercept: 0,867	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Refer to quality report**

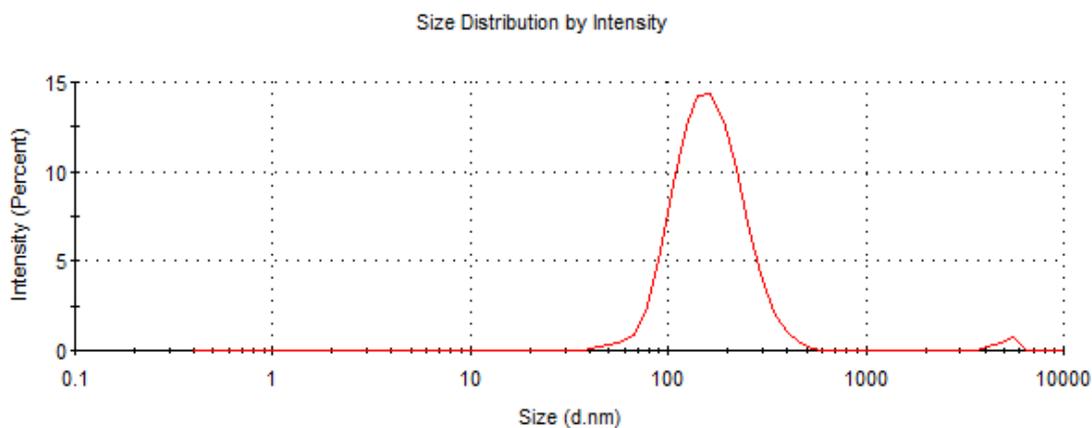


Figura 16. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após sonicação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 1 (PEG-PCL 2000:5000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 437,3	Peak 1: 244,9	70,7	73,51
Pdl: 0,701	Peak 2: 620,6	27,1	177,8
Intercept: 0,985	Peak 3: 5446	2,2	271,1

Result **Refer to quality report**

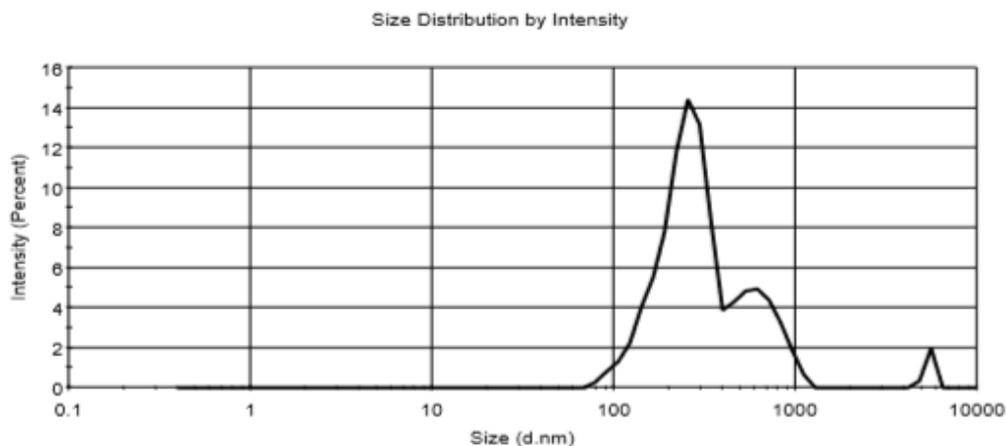


Figura 17. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após obtenção dos polimerossomos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 1113	Peak 1: 552,1	100,0	75,24
Pdl: 0,810	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,983	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality **Refer to quality report**

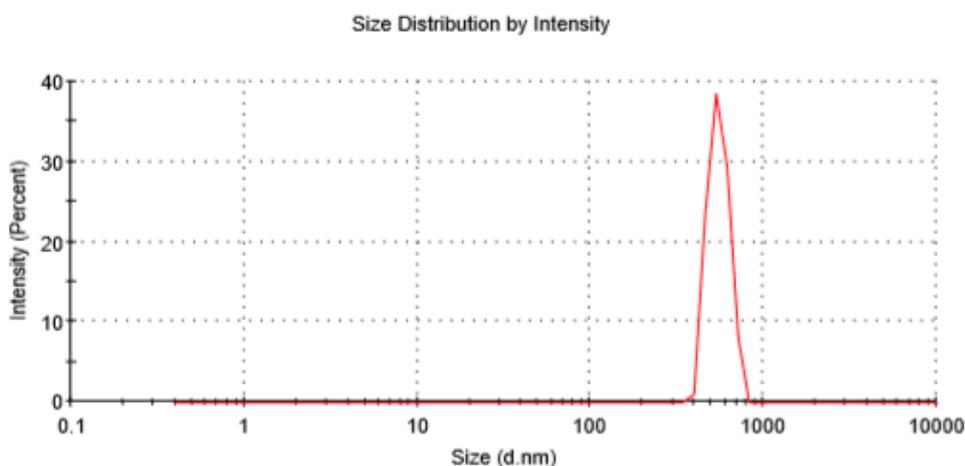


Figura 18. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após centrifugação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 485,3	Peak 1: 421,9	95,4	98,83
Pdl: 0,358	Peak 2: 5361	4,6	333,5
Intercept: 0,851	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality	Refer to quality report		

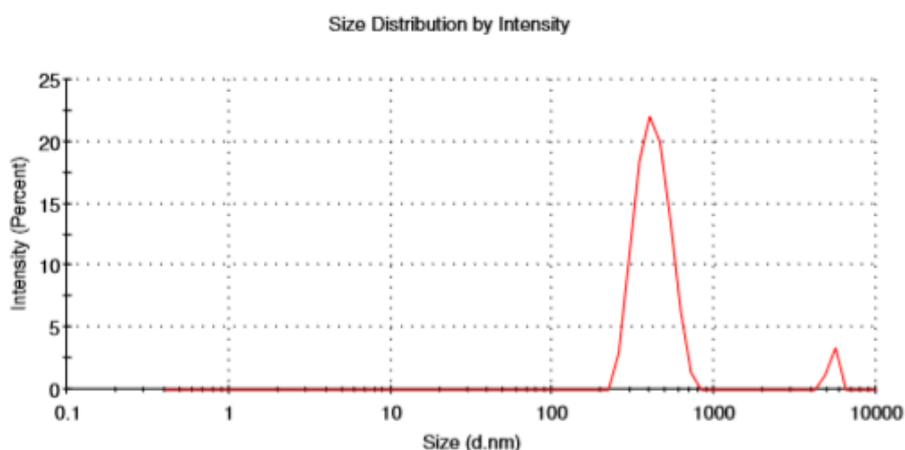


Figura 19. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após extrusão dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 198,7	Peak 1: 204,3	97,8	76,24
Pdl: 0,259	Peak 2: 5160	2,2	555,5
Intercept: 0,882	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result	Refer to quality report		

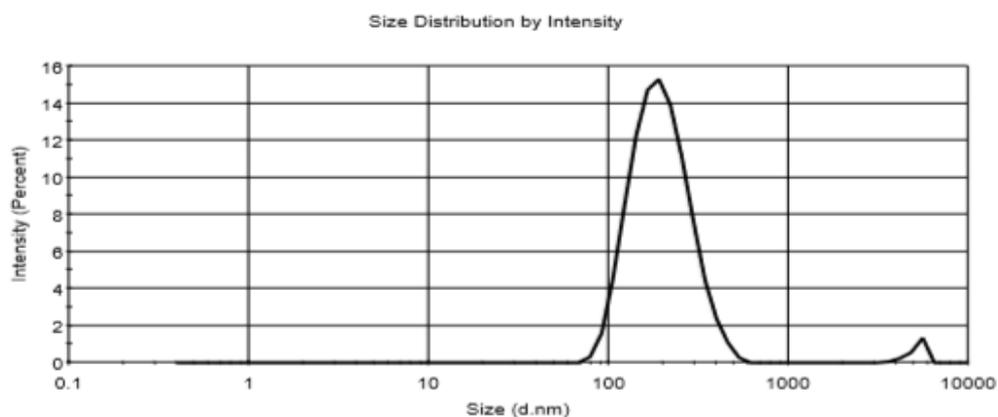


Figura 20. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após filtração dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 165,9	Peak 1: 180,1	99,5	59,85
Pdl: 0,194	Peak 2: 5381	0,5	321,8
Intercept: 0,872	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result **Refer to quality report**

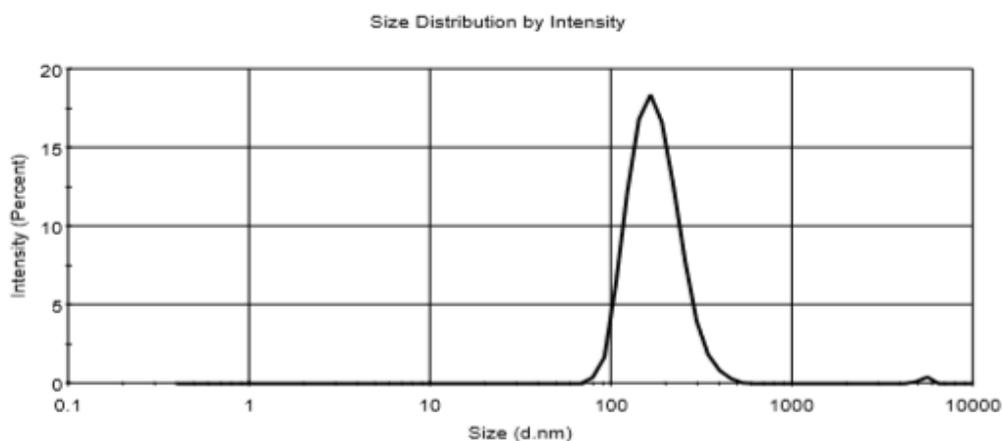


Figura 21. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após sonicação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 2 (PEG-PCL 5000:11000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 123,4	Peak 1: 212,3	89,0	81,17
Pdl: 0,600	Peak 2: 5,531	9,7	0,8856
Intercept: 0,873	Peak 3: 5033	1,3	614,0

Result **Refer to quality report**

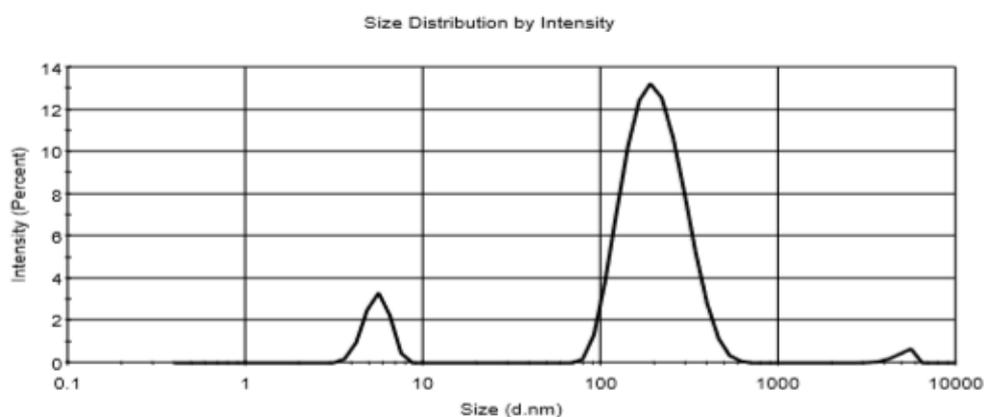


Figura 22. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após obtenção dos polimerossomos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG-PCL 5000:13000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 1466	Peak 1: 650,0	100,0	81,72
Pdl: 0,830	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 1,04	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Refer to quality report

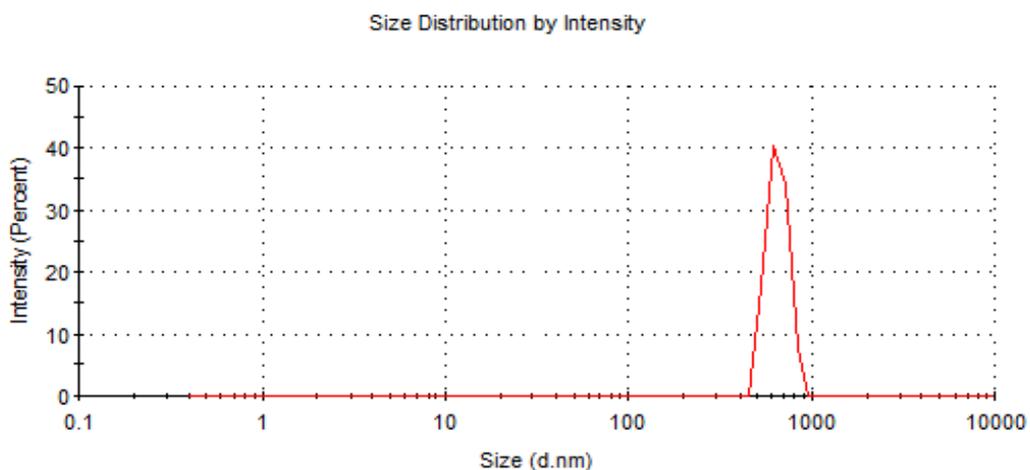


Figura 23. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após centrifugação dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG-PCL 5000:13000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 221,0	Peak 1: 242,7	98,9	85,73
Pdl: 0,214	Peak 2: 5341	1,1	359,4
Intercept: 0,854	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

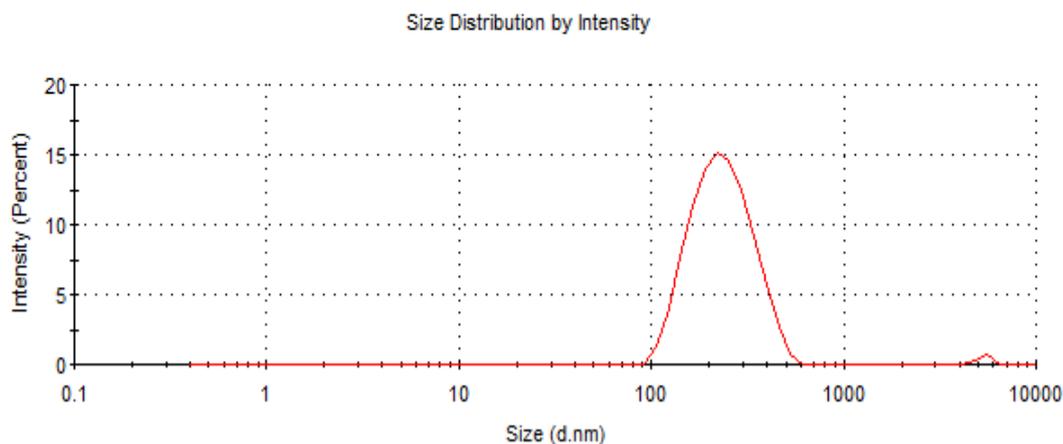


Figura 24. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) realizada após extrusão dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG-PCL 5000:13000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 118,4	Peak 1: 201,7	87,7	72,27
Pdl: 0,589	Peak 2: 6,066	10,2	0,8078
Intercept: 0,862	Peak 3: 4885	2,2	678,6

Result **Refer to quality report**

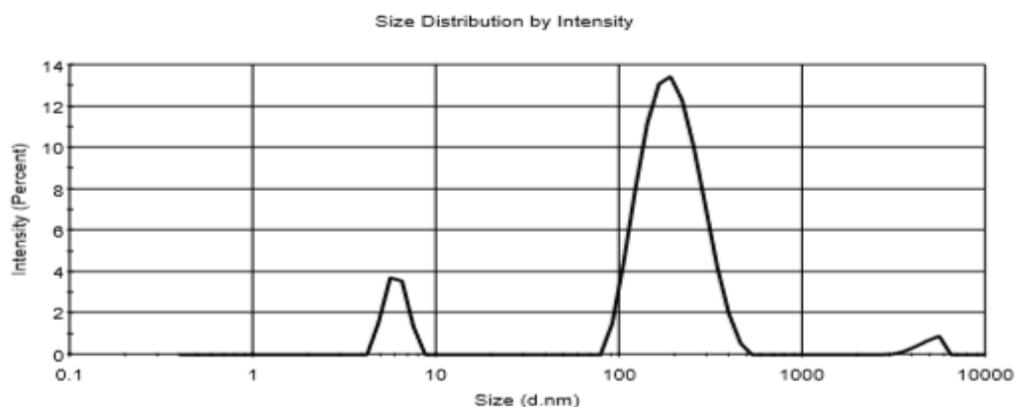


Figura 25. Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS realizada após filtração dos polimerossomos obtidos pela técnica de hidratação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG-PCL 5000:13000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 174,4	Peak 1: 180,2	93,6	52,43
Pdl: 0,345	Peak 2: 5084	3,6	622,1
Intercept: 0,826	Peak 3: 45,95	2,8	8,240

Result **Refer to quality report**

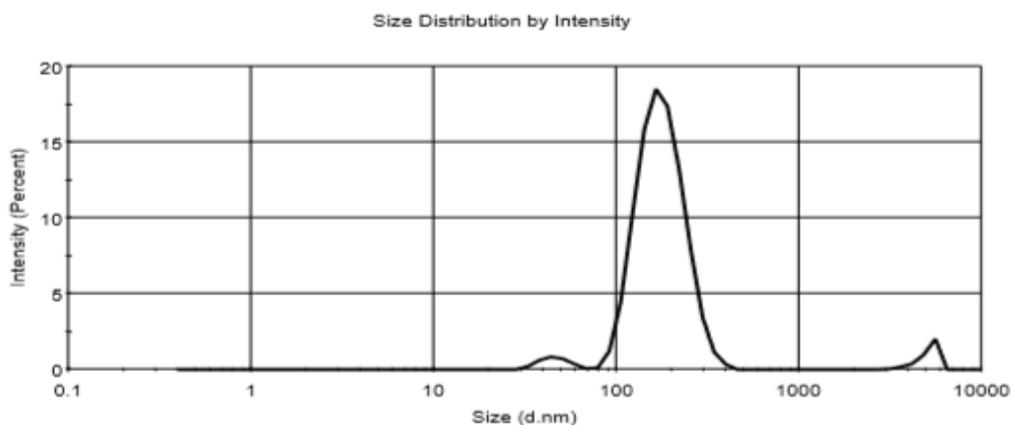
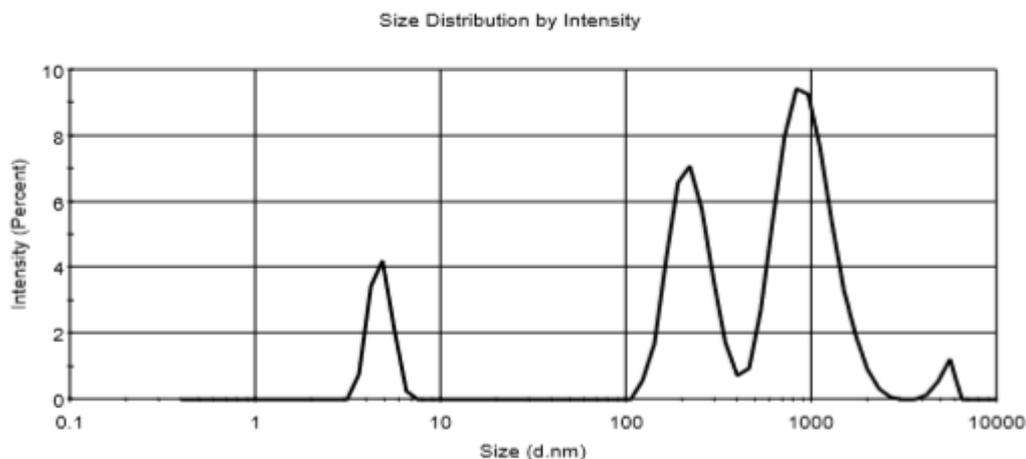


Figura 26. Análise de DLS realizada após filtração dos polimerossomos obtidos pela técnica de sonicação do filme polimérico empregando-se o copolímero 3 (PEG – PECL 5000:13000)

	Size	% Intensity	St Dev
Z-Average (d.nm): 329,7	Peak 1: 967,0	55,6	348,3
Pdl: 0,912	Peak 2: 225,8	31,8	58,53
Intercept: 0,884	Peak 3: 4,739	10,7	0,6462

Result **Refer to quality report**



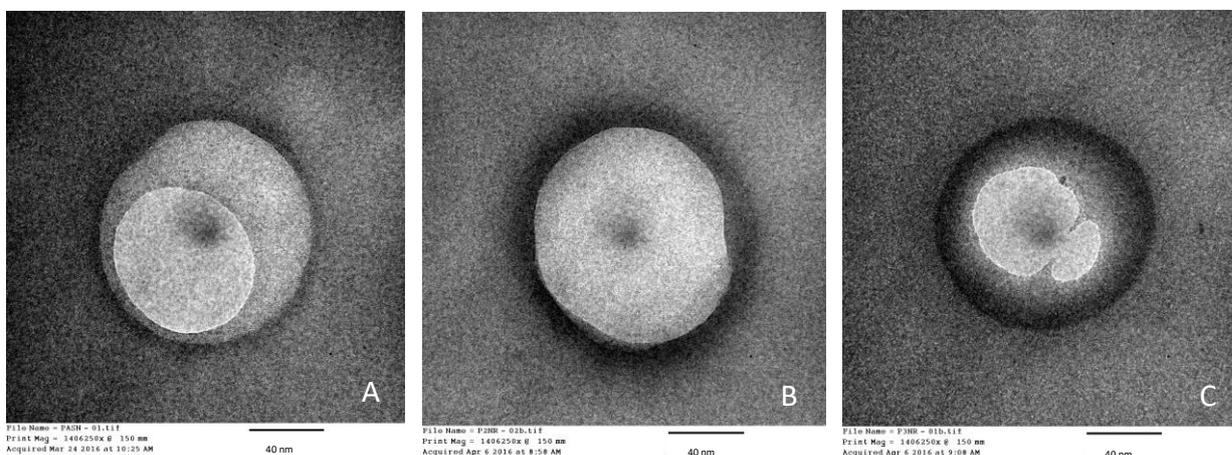
A estrutura vesicular dos polimerossomos foi confirmada através de microscopia eletrônica de transmissão. Na figura 27 é possível observar uma estrutura de formato arredondado com a presença da membrana hidrofóbica apresentando-se em maior destaque ao redor do núcleo aquoso, devido à presença do corante hidrofóbico utilizado (vermelho do nilo) e em cinza o seu interior aquoso. O tamanho observado através da análise microscópica (aproximadamente 120nm, 200nm e 120nm para os copolímeros 1, 2 e 3) foi relativamente menor do que os os valores obtidos quando comparados às amostras analisadas por DLS após a centrifugação dos sistemas que apresentaram tamanhos aproximados de 380, 422 e 243 nm para os copolímeros 1, 2 e 3, respectivamente.

A variação observada entre os valores obtidos por análise de DLS e análise por microscopia é considerada normal pois sabe-se que a técnica de DLS fornece o diâmetro hidrodinâmico da partícula, o que consiste na representação da interação

das moléculas de água com a superfície hidrofílica das vesículas formadas. Considerando a grande porção de poli(etileno glicol) nas superfícies de nossas vesículas podemos dizer que o raio hidrodinâmico pode estar colaborando de maneira significativo para o tamanho dos polimerossomos observados por DLS, técnica mais adequada portanto para estimativa de tamanho de nanoestruturas dessa natureza.

Além disso, como discutido anteriormente, a análise por DLS aplicada aos sistemas corresponde a uma média de tamanho das estruturas analisadas e, embora os sistemas sejam monomodais, ainda existe variação no tamanho das estruturas e a análise de microscopia pode ter revelado uma das estruturas menores considerando-se a variação de tamanho apresentada no sistema.

Figura 27. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão correspondente à seção transversal de um polimerossomo. **A** - polimerossomos formados pelo copolímero 1 (PEG-PCL - 2.000:5.000). **B** - polimerossomos formados pelo copolímero 2 (PE-PCL - 5.000:11.000). **C** - polimerossomos formados pelo copolímero 3 (PEG-PCL - 5.000:13.000).



4.3. Encapsulação de proteínas nos polimerossomos

Os valores de eficiência de encapsulação obtidos quando a técnica de determinação indireta de proteínas foi empregada para BSA e ASNase são descritos na tabela abaixo.

Tabela 4 – Porcentagem de encapsulação de BSA e ASNase determinadas nos ensaios de encapsulação por método indireto empregando-se os copolímeros 1 (PEG-PCL - 2.000: 5.000), copolímero 2 (PEG-PCL - 5.000: 11.000) e copolímero 3 (PEG-PCL - 5.000: 13.000).

Proteína	Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
BSA	21%	22%	25%
ASNase	20%	22%	23%

Os resultados permitem inferir que não existe diferença nos valores de encapsulação encontrados para BSA e ASNase nas condições empregadas. Além disso, estudos anteriores envolvendo polimerossomos obtidos a partir diferentes copolímeros mostraram a possibilidade de encapsulação de proteínas. O’Neil et al (2013) mostrou que a hidratação de filmes poliméricos de poli(etileno glicol)-b-poli(sulfato de polipropileno) resultaram em polimerossomos com taxas de encapsulação de 37% para ovalbumina, 19% para BSA e 15% para γ -globulina bovina o que corrobora com os valores de taxa de encapsulação obtidos nesse trabalho pela técnica indireta. A maioria dos estudos publicados determina a eficiência de encapsulação através da técnica indireta. No entanto, acreditamos que essa metodologia pode superestimar o valor de proteína encapsulada, principalmente considerando-se que a centrifugação compõe uma das etapas empregadas.

Durante a centrifugação as cadeias de PEG podem interagir entre si formando uma malha polimérica capaz de aprisionar a proteína livre, não encapsulada. Dessa maneira, a quantidade de proteína remanescente no sobrenadante seria inferior à real quantidade de proteína não encapsulada e não representaria exatamente a diferença entre a massa inicial de proteína e a massa de proteína encapsulada.

Para comprovarmos se esse fenômeno estava ocorrendo, uma nova análise foi realizada empregando-se a técnica de cromatografia de exclusão molecular para separação dos polimerossomos obtidos das proteínas não encapsuladas. Para tanto,

o protocolo de obtenção e encapsulação de proteínas foi repetido empregando-se os copolímeros 1, 2 e 3. Em seguida, a purificação dos polimerossomos foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (FPLC) e a quantidade de proteína nas frações não correspondentes aos polimerossomos foi determinada utilizando o método de BCA. Os cromatogramas são apresentados nas figuras 29, 30, 31, e 32 (para as análises de encapsulação de BSA) e nas figuras 33, 34 e 35 (para as análises de encapsulação de ASNase). A partir da integração do pico correspondente à proteína livre (desconsiderando a fração agregada), e da solução de proteína inicial (utilizada durante a hidratação do filme polimérico, obtivemos as taxas de encapsulação descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagem de encapsulação de BSA e ASNase determinadas nos ensaios de encapsulação por método indireto por cromatografia de exclusão molecular empregando-se os copolímeros 1 (PEG-PCL - 2.000: 5.000), copolímero 2 (PEG-PCL - 5.000: 11.000) e copolímero 3 (PEG-PCL - 5.000: 13.000).

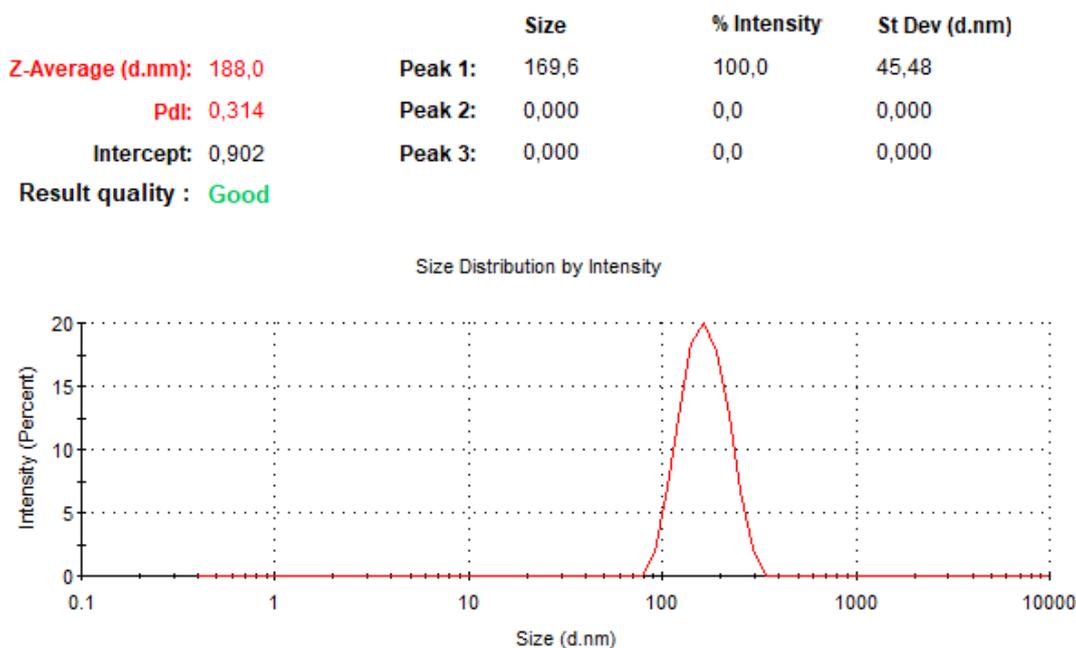
Proteína	Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
BSA	3,3%	1,9%	7,2%
ASNase	1,1%	5,4%	-

Na cromatografia de exclusão molecular, a ordem de eluição segue tipicamente a massa molecular, sendo que as moléculas com maior massa molecular eluem primeiro. A análise dos cromatogramas de BSA revelam que, para essa proteína há uma maior agregação proteica pois além do pico correspondente a BSA, observamos nos 4 cromatogramas a existência de picos que aparecem em um volume menor de eluição, e que, portanto, apresentam maior peso molecular, podendo ser associada a formação de agregados. A porcentagem de proteína agregada variou de 20% a 27% nas amostras avaliadas indicando que maiores concentrações de proteína poderiam dificultar a encapsulação nos polimerossomos já que uma maior porcentagem de

proteína estaria agregada. A análise dos cromatogramas de ASNase, no entanto, revelaram pouca agregação, uma vez que somente um pico foi observado em volume de eluição menor do que aquele correspondente a proteína tetramérica e com porcentagem (em área) insignificante. Nesse sentido, para os sistemas contendo ASNase, novos ensaios poderiam ser realizados considerando concentrações maiores de proteína na solução de hidratação do filme polimérico.

Não é possível observar nos cromatogramas apresentados um pico correspondente aos polimerossomos, isso acontece, pois, as vesículas poliméricas não absorvem em 280nm, comprimento de onda empregado no ensaio. Entretanto, as frações iniciais coletadas antes que se observasse pico correspondente à proteína livre foram agrupadas e analisadas por DLS. Um pico correspondente aos polimerossomos foi observado no DLS, confirmando a eluição da nanoestrutura já no volume morto da coluna, devido ao tamanho desses (Figura 28).

Figura 28. Análise de DLS realizada após concentração das frações de 1 a 18 obtidas da análise de FPLC (PEG-PCL 3000:5000)



A fração das amostras correspondentes aos polimerossomos, concentrada, foi rompida com clorofórmio com objetivo de determinar a quantidade real de proteína encapsulada, entretanto essa quantificação não foi possível. Acreditamos que a baixa quantidade de proteína nas vesículas justifique essa dificuldade, provavelmente a concentração de proteína está abaixo dos valores de detecção pela técnica de BCA.

Tais achados reforçam a teoria descrita anteriormente de que, durante a centrifugação, as cadeias de PEG podem interagir entre si formando uma malha polimérica capaz de aprisionar a proteína livre, não encapsulada. Dessa forma, quando o sistema é submetido a cromatografia, há a separação da proteína livre e quantificação mais precisa da proteína não encapsulada.

Figura 29. Cromatograma de uma solução de BSA (1mg/mL). Pico 1, com área correspondente a 64,5405. Pico 2, com área correspondente a 108,0611. Pico 3, com área correspondente a 398,3230.

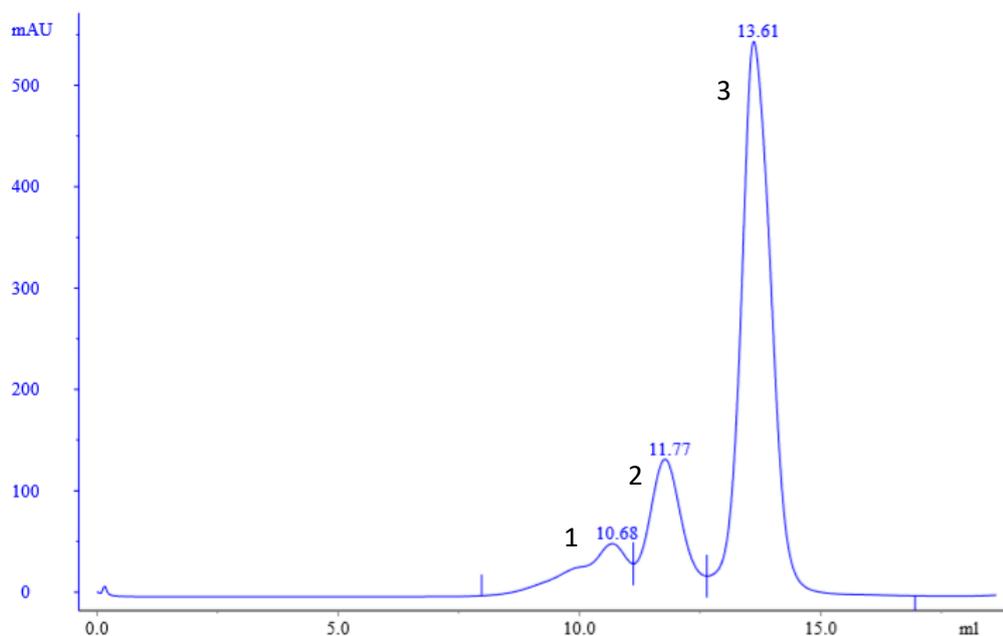


Figura 30. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 1 (PEG:PCL 2.000:5.000) e BSA encapsulada. Pico 1, com área correspondente a 49,3722. Pico 2, com área correspondente a 93.6455. Pico 3, com área correspondente a 385,1128.

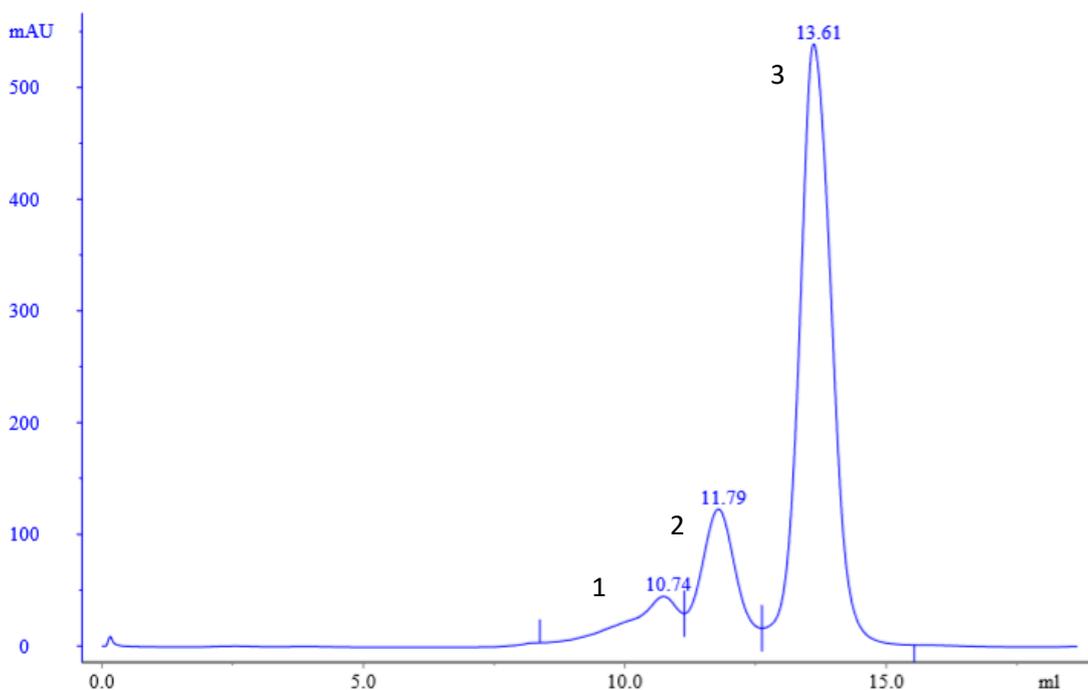


Figura 31. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 2 (PEG:PCL 5.000:11.000) e BSA encapsulada. Pico 1, com área correspondente a 48,7354. Pico 2, com área correspondente a 102,4419. Pico 3, com área correspondente a 390,6244.

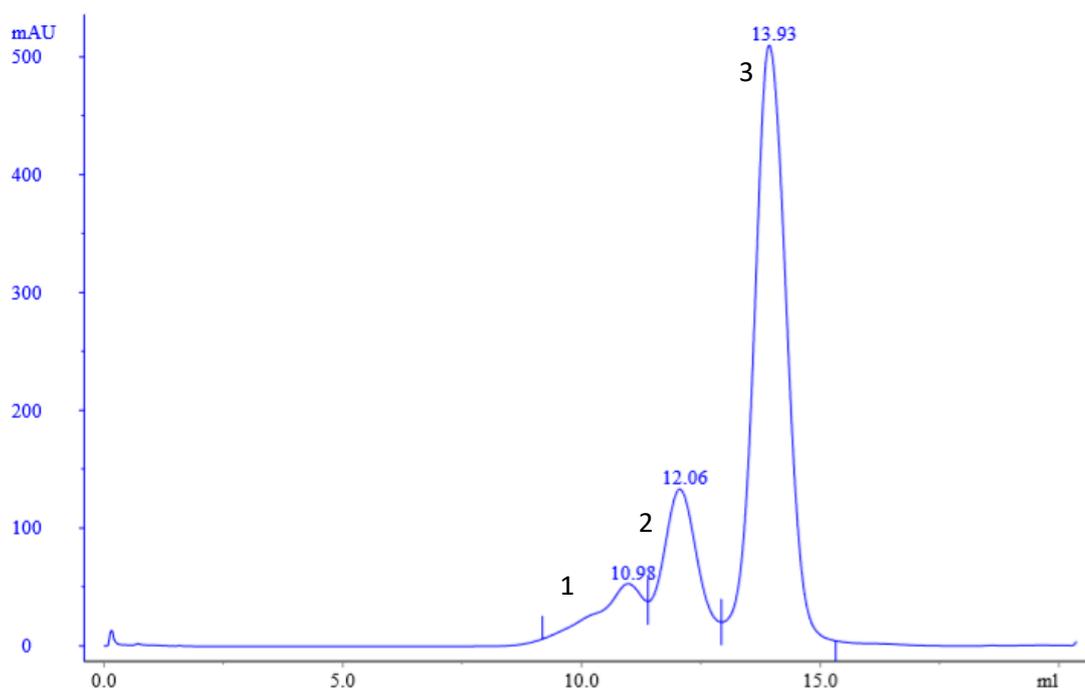


Figura 32. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 3 (PEG:PCL 5.000:13.000) e BSA encapsulada. Pico 1, com área correspondente a 31,7216. Pico 2, com área correspondente a 87,1552. Pico 3, com área correspondente a 369,3707.

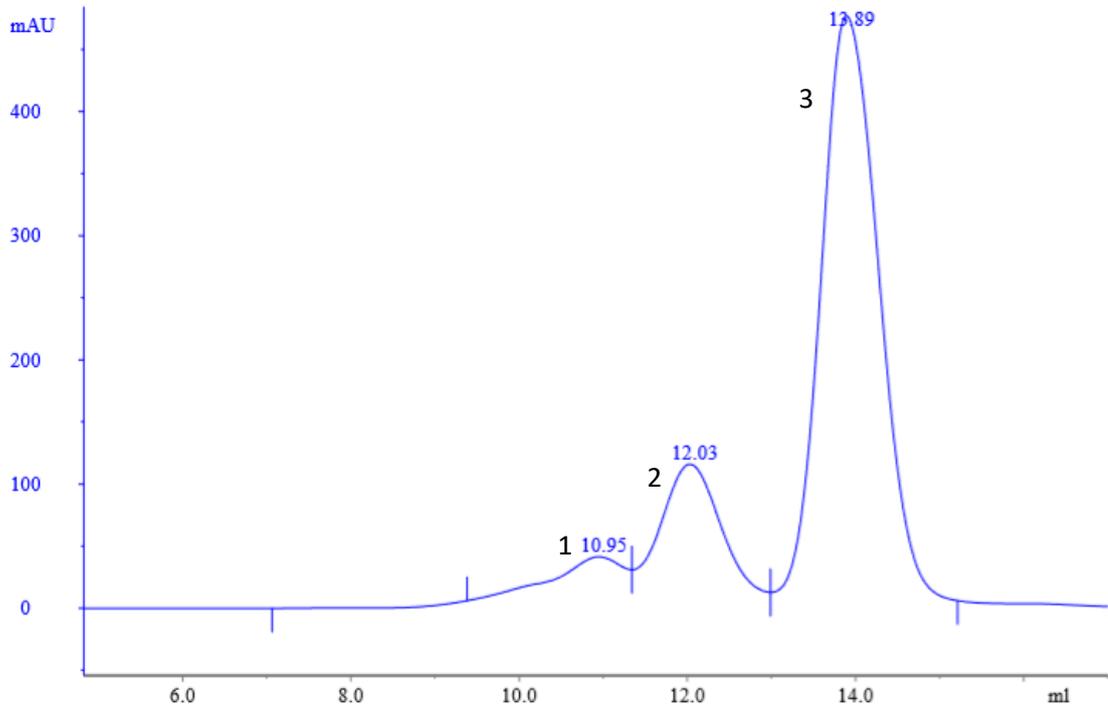


Figura 33. Cromatograma de uma solução de ASNase (1mg/L). Pico 1, com área correspondente a 95,2450.

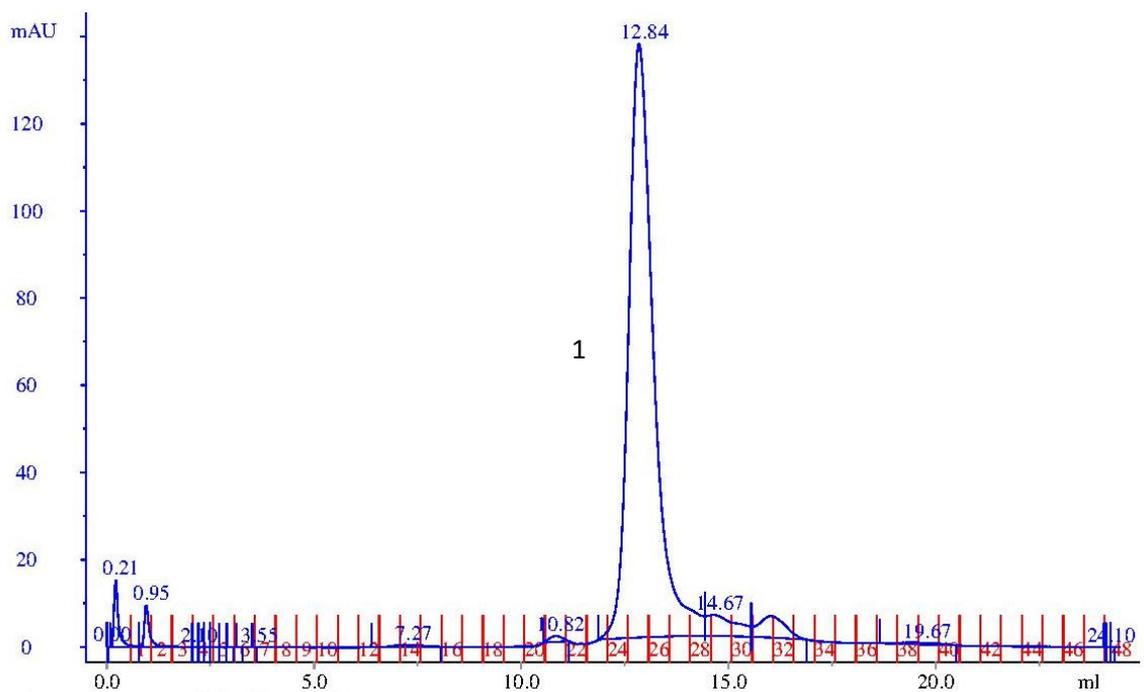


Figura 34. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 1 (PEG:PCL 2.000:5.000) e ASNase encapsulada. Pico 1, com área correspondente a 94,1793.

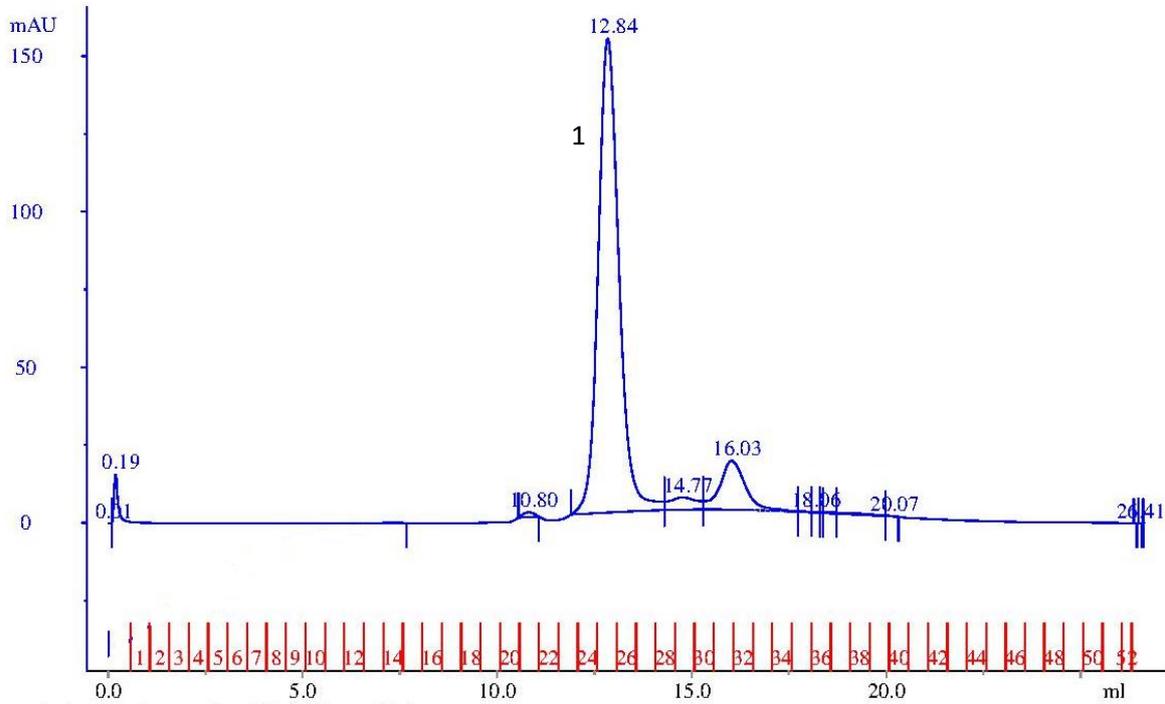
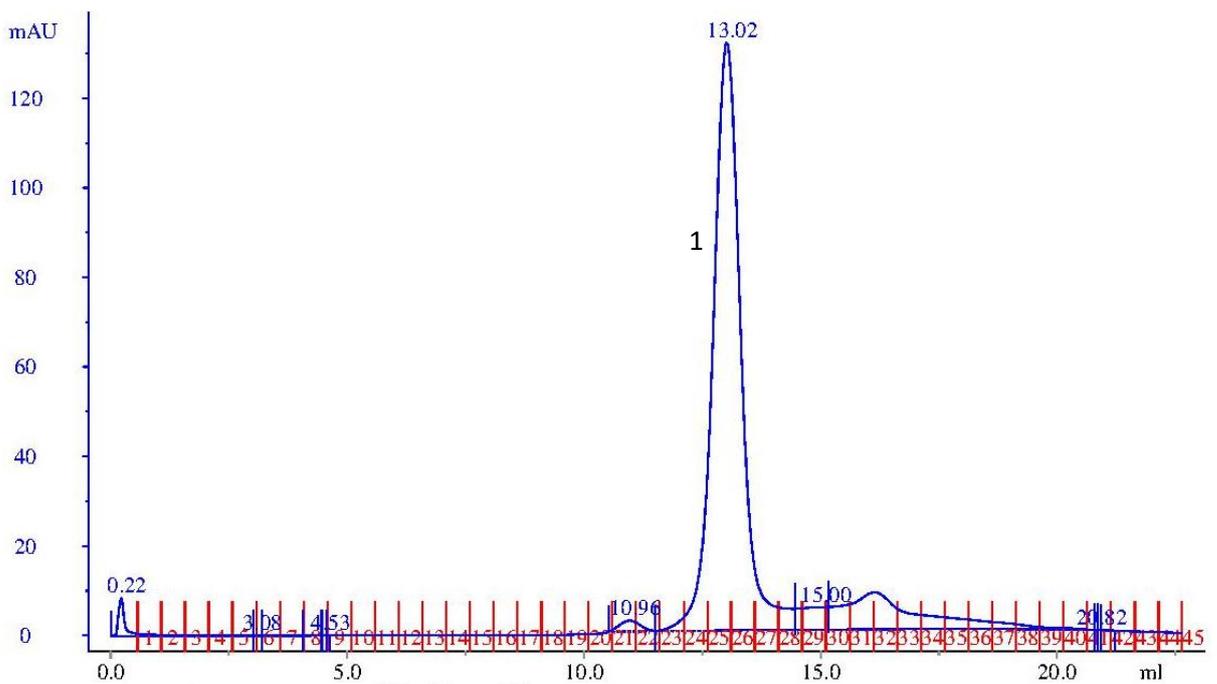


Figura 35. Cromatograma de purificação dos sistemas contendo polimerossomos formados pelo copolímero 2 (PEG:PCL 2.000:13.000) e ASNase encapsulada



A encapsulação de proteínas consiste em desafio considerável. Zhao *et al* (2017), discute sobre a necessidade de concentrar esforços no desenvolvimento de novas metodologias de encapsulação de moléculas hidrofílicas (incluindo proteínas e agentes quimioterápicos) pois apesar das inúmeras vantagens associadas aos polimerossomos, a baixa taxa de encapsulação pode ser uma limitação à sua utilização clínica. No entanto, várias metodologias estão sendo avaliadas para melhorar a capacidade de encapsulação dos polimerossomos como, por exemplo, a eletroporação e a técnica de photo-PISA anteriormente descrita (Blackman *et al*, 2017).

5.6. Ensaio de liberação

Os ensaios realizados com a enzima não encapsulada (permeação através da membrana de diálise) mostram que a enzima é capaz de permear a membrana de diálise e não foram observadas diferenças significativas entre as relações de 1:25 e 1:100 para dialisado e volume de diálise. Diante do exposto, para todos os ensaios realizados com a ASNase empregou-se a relação de 1:25.

Figura 36. A. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação da enzima L-Asparaginase não encapsulada, em ensaio de diálise. **B.** Relação a porcentagem de enzima que permeou a membrana de diálise em função do tempo (horas). Proporção de dialisado:volume de diálise 1:25mL.

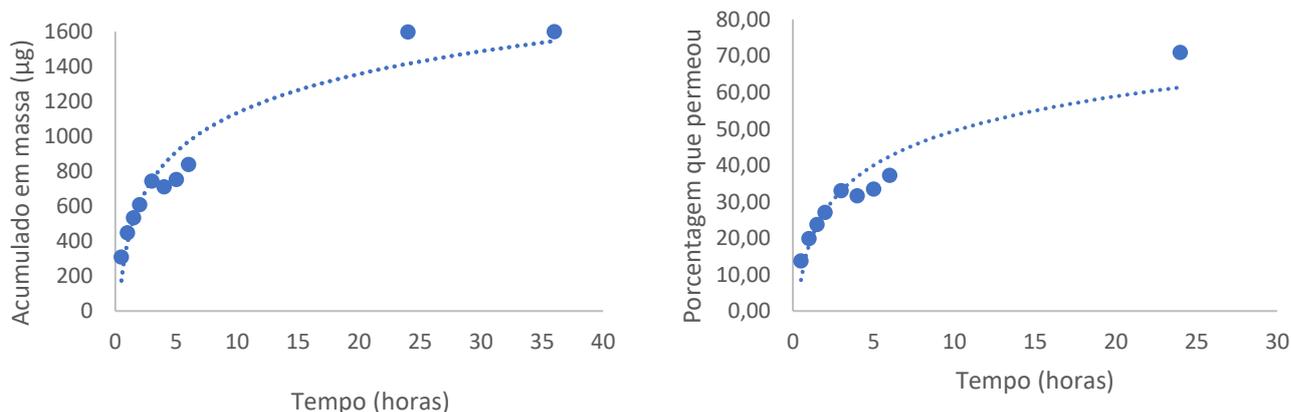
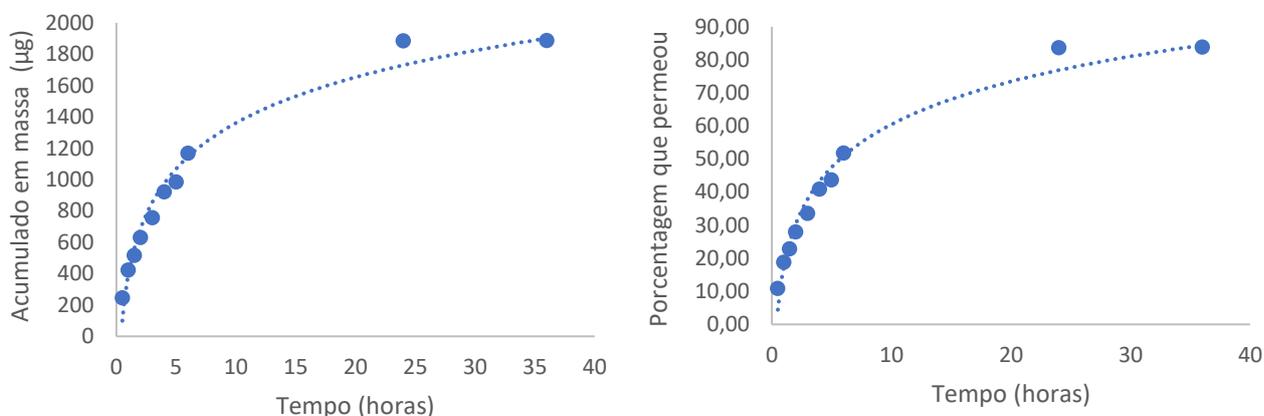


Figura 37. A. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação da enzima L-Asparaginase não encapsulada, em ensaio de diálise. **B.** Relação a porcentagem de enzima que permeou a membrana de diálise em função do tempo (horas). Proporção de dialisado:volume de diálise Proporção 1:100mL.



Os ensaios de liberação da proteína encapsulada indicam que não houve boa correlação entre o tempo de ensaio e liberação de enzima encapsulada. Inicialmente, todos os ensaios foram realizados em pH 7,4, entretanto, após a realização dos primeiros ensaios e a verificação de que não estava sendo possível observar a liberação da enzima para o meio, novos ensaios foram realizados empregando-se pH 5,5. A justificativa para a redução do pH baseia-se no fato da acidificação do meio teoricamente facilitar a hidrólise das ligações ésteres das cadeias de poli(caprolactona) dos copolímeros, levando à ruptura das estruturas obtidas e a consequente liberação da enzima. Entretanto, o que se pode verificar pela análise das figuras 38, 39 e 40 é que a alteração no pH não foi suficiente para observar a liberação da enzima. Uma possível explicação seria a lenta taxa de hidrólise do PCL devido à espessa camada de PEG ao redor da bicamada de PCL dos polimerossomos. Uma segunda possibilidade que justificaria a falta de correlação entre o tempo de liberação e a quantidade de enzima liberada seria a baixa concentração da enzima encapsulada, que ao ser liberada estaria a baixo da concentração de detecção do método.

Figura 38. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação em ensaio de diálise da enzima L-Asparaginase encapsulada em vesículas poliméricas de **copolímero 1** em pH 7,4 (A) e pH 5,5 (B).

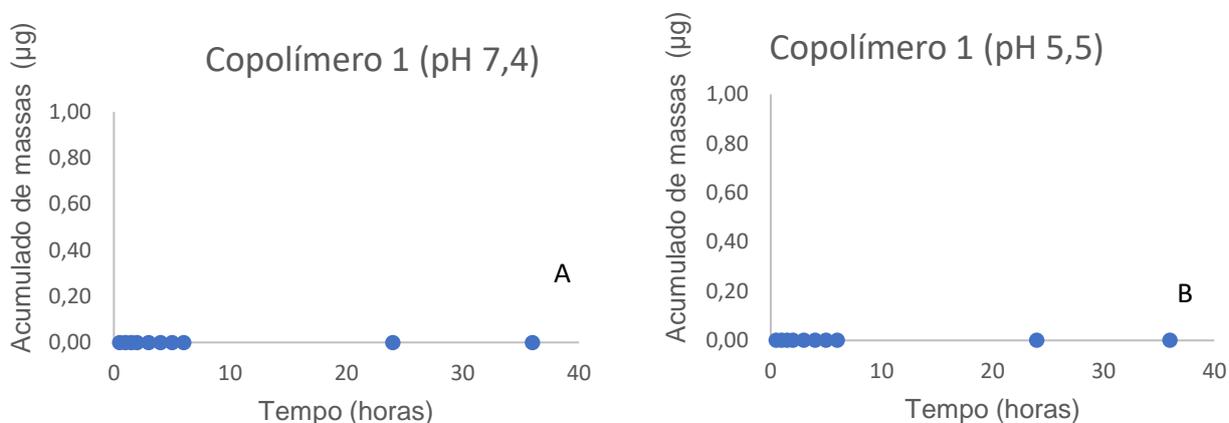


Figura 39. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação em ensaio de diálise da enzima L-Asparaginase encapsulada em vesículas poliméricas de **copolímero 2** em pH 7,4 (A) e pH 5,5 (B).

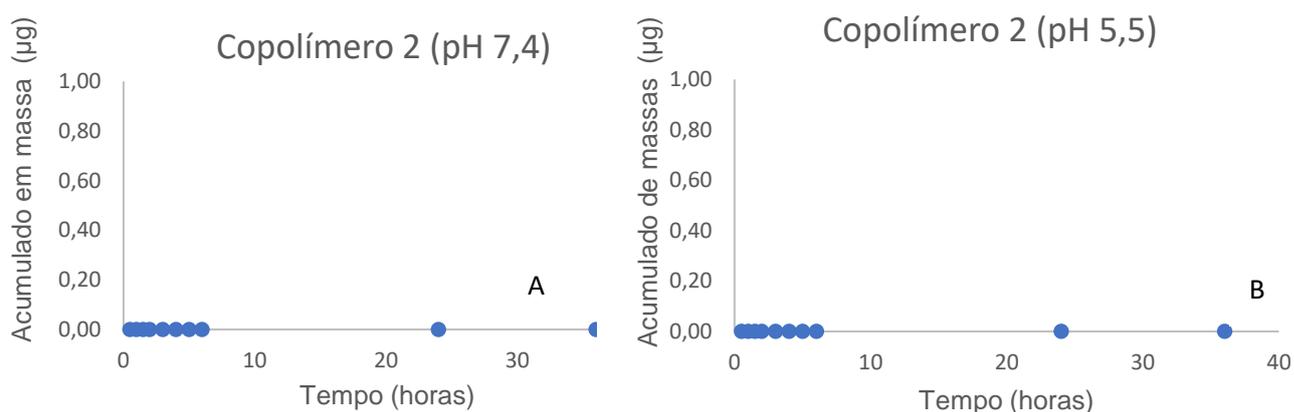
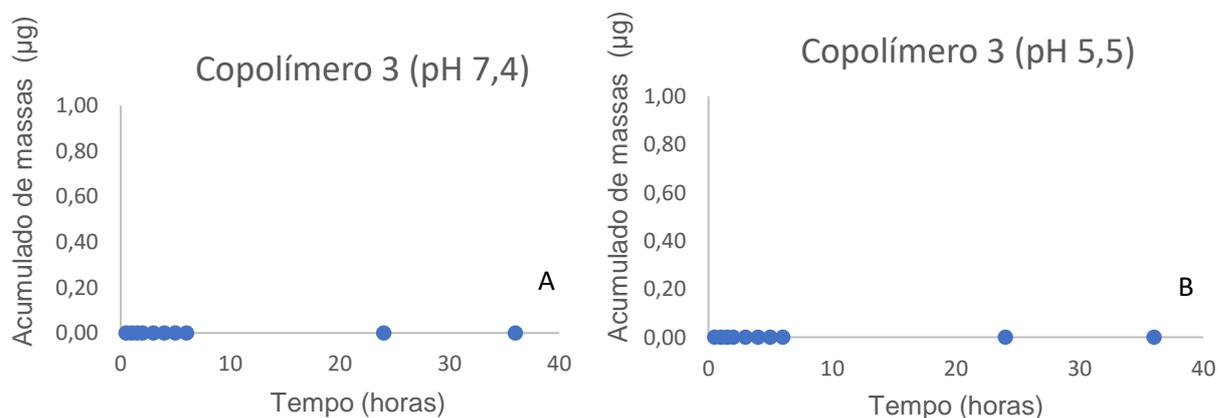


Figura 40. Relação entre o acumulado em massas (μg) e o tempo (horas) de liberação em ensaio de diálise da enzima L-Asparaginase encapsulada em vesículas poliméricas de **copolímero 3** em pH 7,4 (A) e pH 5,5 (B).



Uma abordagem interessante a ser explorada no futuro consiste no desenvolvimento de polimerossomos permeáveis à L-asparagina, substrato da ASNase. Os polimerossomos permeáveis poderiam permanecer circulando no sistema sem necessidade de liberação da enzima e atuariam como nanoreatores, permitindo a penetração do substrato e sua hidrólise enzimática no interior das vesículas. Nesse sentido, acreditamos que vesículas mistas compostas por PEG-PCL, que devido à suas características químicas confere robustez aos sistemas, associado a um outro copolímero que resulte em regiões mais permeáveis devido ao padrão de empacotamento da bicamada, como é o caso dos Pluronic (poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)), poderiam resultar em nanoreatores.

6. Conclusão

Nesse trabalho desenvolvemos uma metodologia de obtenção de vesículas poliméricas, denominadas polimerossomos, para encapsulação da enzima ASNase. Utilizando a técnica de autoagregação por hidratação do filme polimérico com posterior centrifugação dos sistemas, obtivemos polimerossomos com tamanhos que variaram de 200 a 380 nm compostos por copolímeros de PEG-PCL de diferentes massas moleculares e proporções de PEG e PCL.

Os sistemas obtidos, entretanto, apresentaram baixa taxa de encapsulação e, nesse sentido, assim como discutem outros autores, outras técnicas de encapsulação devem ser melhor estudadas e novas alternativas devem ser propostas como, por exemplo, a técnica de eletroporação que vem ganhando destaque entre as técnicas de encapsulação por apresentarem taxas de encapsulação superiores. Não obstante, nossos resultados mostram-se promissores pois demonstram a possibilidade de obtenção das estruturas propostas e a encapsulação da proteína nos polimerossomos, entretanto a encapsulação ainda precisa ser melhor compreendida e investigada.

Com relação às técnicas de determinação da taxa de encapsulação observamos que a técnica de determinação por centrifugação pode superestimar a quantidade de proteína encapsulada e nesse sentido, a quantificação indireta empregando-se cromatografia de exclusão molecular ou ainda a quantificação direta das proteínas no interior dos polimerossomos devem ser preconizada. Esse resultado tem considerável importância dado que a maioria dos trabalhos sobre encapsulação de proteínas em polimerossomos apresenta resultados de taxa de encapsulação obtidos por método indireto.

Os ensaios de liberação apresentaram-se inconclusivos pois, provavelmente, a quantidade de proteína encapsulada estava abaixo dos limites de detecção da técnica de BCA. No entanto, a liberação da pouca quantidade de proteína pode estar acontecendo sem que seja possível quantificar.

Sem dúvidas, considerando que o desenvolvimento de vesículas poliméricas é uma abordagem relativamente nova, muitos estudos ainda precisam ser realizados para melhor compreensão desses sistemas, entretanto, acreditamos que comparado aos lipossomos, os polimerossomos apresentam alternativa interessante devido à maior estabilidade química, o que pode permitir a utilização em diversas situações em os lipossomos falharam por serem pouco estáveis.

7. Referências

Ahmed F, Discher D E. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL:hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *J Controll Release* 2004; 96:37-53.

Anajafi T e Mallik S. Polymersome-based drug delivery strategies for cancer therapeutics. *Therapy Delivery* 2015; 6(4): 521-534

Anindita D, Venkatesh D N. Design and evaluation of liposomal delivery system for L-asparaginase. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2012. 2(08):112-17.

Antoniet M, Foster S. Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids. *Adv Matter* 2003;15(16):1323-33.

Apolinário A C, Pachioni-Vasconcelos J A, Pessoa-Júnior A, Rangel-Yagui C O. Polimerossomos versus lipossomos: a evolução da bala mágica. *Química Nova* 2017/ 40(7):810-817.

Arifin D R, Palmer A F. Polymersome Encapsulated Hemoglobin: A Novel Type of Oxygen Carrier. *Biomacromolecules* 2005; 6:2172-81.

Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (Abrale). Leucemias. Disponível em: www.abrale.org.br. Acesso em Abril de 2018.

Associação Brasileira de hematologia, hemoterapia e terapia celular. Asparaginase desdobramentos. Disponível em: www.abhh.org.br/noticia/l-asparaginasedesdobramentos. Acesso em Abri de 2018.

Avramis V I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. *Anticancer Res* 2012; 32:2423-2437.

Birdi K S, *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, CRC Press, Boca Raton, New York, 1997.

Blackman L D, varlas S, Arno M C, Fayter-Gilson M I, O'Reilly R K. Permeable Protein-loaded polymersome cascade. Nanoreactors by polymerization induced self-assembly. ACS Macro Letters 2017; 6: 1263-1267

Brinkhuis, Pascal René. Polymeric vesicles for drug delivery over the blood-brain barrier and in vivo imaging. Radboud University Nijmegen, 2012:10.

Broome J D. Evidence that the L-Asparaginase activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma effects. Nature 1961; 191: 1114-15.

Caia L B, Gochinb M, Liua K. A facile surfactant critical micelle concentration determination. Chem Commun 2011 47(19): 5527–5529.

Cairo M S. Adverse reactions of L-Asparaginase. Am J Pediatric Hematol Ocol 1982; 4(3): 35-3339.

Casero I, Sicilia D, Rubio S. Perezbendito D. Study of the formation of dye-induced premicellar aggregates and its application to the determination of quaternary ammonium surfactants. Talanta 1997; 1(45): 167-80.

Chang T M. Artificial cells in medicine and biotechnology. Applied Biochemistry and Biotechnology 1984; 10: 5-24

Cheng R, Meng F, Ma S, Xu H, Liu H, Jing X, Zhong Z. Reduction and temperature dual-responsive crosslinked polymersomes for targeted intracellular protein delivery. J Mater Chem 2011; 21(47):19013-20.

Cleiner N, Martin F, Riaz M. Liposomes as a drug delivery system. Drug Delivery Indian Pharmacy. 1989, 15 (10): 1523.

Dante A, Schettini R R, Cynthia D, Olguita G F, Rocha M, Melo N, Marilene S M, Frederic F. Improve targeting of Antimony to the bone marrow of dogs using liposomes and reduce size. International Journal of pharmaceutics. 2006, 315: 140-47.

Discher E D, Ortiz V, Srinivas G, Klein M L, Kim Y, Christian D, Cai S, Photos P, Ahmed F. Emerging applications of polymerosomes in delivery: from molecular dynamics to shrinkage of tumors. Prog Poly Sci 2007; 32: 838-857.

Dominguez A, Fernandez A, Gonzalez N, Iglesias E, Montenegro L. Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. *Journal of Chemical Education* 1997; 74(10):1227-31.

Du J, O'Reilly R K. Advances in smart and functional polymer vesicle. *Soft Matter* 2009; 5:35-44.

Deng L, Wang G, Ren J, Zhang B, Yan J, Li W, Niveen M K. Enzymatically triggered multifunctional delivery system based on hyaluronic acid micelles. *RSC Advances* 2012; 2: 12909-12914

Evans W E, Tsiatis A, Rivera G, Murphy S B, Dahl G V, Denison M, Crom W R, Barker L F, Mauer A M. Anaphylactoid reactions to *Escherichia coli* and *Erwinia asparaginase* in children with leukemia and lymphoma. *Cancer* 1982; 49(7):1378-1383.

Fu C H, Sakamoto K M. PEG-asparaginase. *Exp Opin Pharmacotherapy* 2007; 8(12): 1977-1984.

Fung M K L, Chan G C F. Drug-induced amino acid deprivation as strategy for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 2017; 10:144.

Gaspar M M, Perez-Soler R, Cruz M E M. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996, 38:373-377.

Guan L, Rizzello L, Battaglia G. Polymersomes and their applications in cancer delivery and therapy. *Nanomedicine* 2015, 10(17): 2757-2780

Hocine S, Cui Di, Rager M, Cicco A Di, Liu J, Wdzieczak-Bakala J, Brulet A, Li M. Polymersomes with PEG Corona: Structural Changes and Controlled Release Induced by Temperature Variation. *Langmuir* 2013; 29:1356–1369.

Hospital Pharmacy Europe. Disponível em <http://www.hospitalpharmacyeurope.com/editors-pick/spectrila-enters-uk-market-treatment-acute-lymphoblastic-leukaemia>. Acesso em Abril de 2018.

Instituto Brasileiro do Câncer (INCA). Estatísticas do Câncer. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/vigilancia>. Acesso em Abril de 2018.

Israelachvili J. The science and applications of emulsions - an overview. *Colloids Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 1994; 91:1-8.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology - critical micelle concentration, cmc. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/C01395.html>. Último acesso em Abri 2018.

Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *J Gen Microbiol* 1973; 76(1):85-99.

Kamisaki Y, Wada H, Yagura T, Nishimura H, Matsushima A, Inada Y. Increased antitumor activity of *Escherichia coli*. L-asparaginase by modification with monomethoxypolyethylene glycol. *Gann* 1982; 73: 470-474.

Krall A S, Xu S, Graber T G, Braas D, Christofk H R. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as a amino acid exchange fator. *Nat Commun* 2016 7: 11457

Knott S R V, WAgenblast E, Khan S, Kim S Y, Soto M, Wagner M, Turgeon M O, Fish L, Erard N, Gable A L, Maceli A R, Dickopf S, Papachristou E K, D'Santos C S, Carey L A, Wilkinson J E, Harrell J C, Perou C M, Goodarzi H, Poulogiannis G, Hannon G. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast câncer. *Nature* 2018; 554: 378–381

Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayerm-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, characterization and applications of liposome: State of the art. *J Colloid Sci Biotechnol* 2012; 1(2): 147-68.

Lee Y, Chang J, Kim H K, Park T G. Stability studies of biodegradable polymersomes prepared bu emulsion solvent evaporation method. *Macromolecular research* 2006; 14(3): 359-64.

Lee J S, Feijen J. Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *J Control Release* 2012; 161:473–483.

Lee J S, Zhou W, Meng F, Zhang D, Otto C, Feijen J. Thermosensitive hydrogel-containing polymersomes for controlled drug delivery. *J Control Release* 2010; 146: 400-08.

Lee J C M, Bermudez H, Discher B M, Sheehan M A, Won Y Y, Battes F S, Discher D E. Preparation, stability and in vitro performance of vesicles made with diblock copolymers. *Biotechnol Bioeng* 2001; 73:135-45.

Letchford K, Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; (65):259-269.

Li S, Meng F, Wang Z, Zhong Y, Zheng M, Liu H, Zhong Z. Biodegradable polymersomes with an ionizable membrane: Facile preparation, superior protein loading, and endosomal pH-responsive protein release. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 82: 103-111.

Liu G, Ma S, Li S, Cheng R, Meng F, Liu H, Zhong Z. The highly efficient delivery of exogenous proteins into cells mediated by biodegradable chimaeric polymersomes. *Biomaterials* 2010; 2010:1-11.

Lorenzi T F. *Manual de Hematologia – Propedêutica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara koogan 4ed, 2006.

Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Contr Rel* 2000; 65: 271–284.

Malvern. Disponível em:
<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>. Acesso em Abril de 2018.

Meng F, Zhong Z, Feijen J. Stimuli-responsive polymersomes for programmed drug delivery. *Biomacromolecules* 2009; 10(2):197-209.

Naolou T, Meister A, Schops R, Pietzsch M, Kressler J. Synthesis and characterization of graft copolymers able to form polyomesomes and worm-like aggregates. *Soft Mater* 2013, 9: 10364-72.

Narrainen A P, Pascual S, Haddleton D M. Amphiphilic diblock, triblock, and star block copolymer by living radical polymerization synthesis and aggregation behavior. *J Polym Sci Pol Chem* 2002; 40:439-450.

Narta U, Kanwar, S S, Azmi, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit Rev Onc Hemat* 2007; 61(3): 208-221.

National Institute of Health. What are adult stem cells? Disponível em: stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics4.aspx. Acesso em Abril de 2018.

Neerunjun, E D, Gregoriadis G. Tumour regression with liposome-entrapped asparaginase: Some immunological advantages. *Biochemical Society* 1976; 4: 133-134

Nomme J, Su Y, Konrad M, Lavie, A. Structures of Apo and Product-Bound Human LAsparaginase: Insights into the Mechanism of Autoproteolysis and Substrate Hydrolysis. *Biochem* 2012; 51(34): 6816-6826.

Nomani A, Norsati H, Manjei H K, Khesalpour L, Danafar H. Preparation and characterization of copolymeric polymersomes for protein drug delivery. *Drug Research* 2017; 67(8): 458-465

Odusote O, Davidson A, Eyssen A V, Hendric-Levin M E, Reaction to chemotherapy: a focus on asparaginase. *Current Allergy and clinical Immunology* 2016; 29(4): 232-234

Oettgen H F, Old L J, Boyse E A, Campbell H A, Philips F S, Clarkson B D, Tallal L, Leeper R D, Schwartz M K, Kim J H. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 1967; 27(12):2619–2631.

O'Neil C P, Suzuki T, Demurtas D, Finka A, Hubbell J A, Andrija Finka, A novel method for the encapsulation of biomolecules into polymersomes via direct hydration. *Langmuir* 2009; 25: 9025 -29

Ortac I, Simberg D, Yeh Y S, Yang J, Messmer B, Trogler W C, Tsien R Y, Esener. Dual-Porosity hollow nano particles for the immunoprotection and delivery of nonhuman enzymes. *Nano Letters* 2014; 14: 3028:3032

Panetta J C, Gajjar A, Hijiya N, Hak L J, Cheng C, Liu W, Pui C H, Relling M V. Comparison of native *E. coli* and PEG asparaginase pharmacokinetics and

pharmacodynamics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86(6): 651-658.

Panosyan E H, Wag Y, Xia P, Lee W N, Pak Y, Laks D R, Lin H J, Moore T B, Cloughesy T F, Kornblum H I. Asparagine depletion potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors. *Molecular Cancer Research* 2014; 12(5): 694-702.

Parmenter C D J, Chen R, Cheung D L, Bon S A F. Morphological transitions in polymer vesicle upon bilayer swelling with small hydrophobic molecules in water. *Soft Mater* 2013; 9:6890-96.

Parnell A J, Tzokova N, Topham P D, Adams D J, Adama S, Fernyhough C M, Ryan A J, Jones R A L. The efficiency of encapsulation within surface rehydrated polymersomes.

Pedrosa F, Lins M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. *Rev bras saúde matern infantil* 2002; 2(1): 63-68.

Poznansky M J, Shandling M, Salkie M A, Elliott J F, Lau E. Advantages in the use of L-asparaginase-albumin polymer as an antitumor agent. *Cancer Research* 1982; 42: 1020-1025.

Raetz E A, Salzer W L. Tolerability and Efficacy of L-Asparaginase Therapy in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Ped Hematol Oncol* 2010; 32(7):554-563.

Rameez S, Alostha H, Palmer, A F. Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: a potential oxygen carrier. *Bioconj Chem* 2008; 9: v.19,1025-32.

Rizzari C, Conter V, Stary J, Colombini A, Moericke A, Schrappe M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2012; 25(1):1-9.

Riley T, Stolnik S, Heald R, Xiong C D, Garnett M C, Illum L, Davis S S. Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from Poly (lactic acid) -Poly

(ethylene glycol) (PLA-PEG) Block copolymers as drug delivery vehicles. *Langmuir* 2011; 17: 3168-74.

Salim M, Minamikawa H, Sugimura A, Hashim R. Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics. *Med Chem Commun* 2014; 5: 1602-18.

Santos F K G, Alves J V A, Dantas T N C, Neto A A D, Dutra T V, Neto E L B. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. 4o PDPETRO, Campinas, outubro de 2007.

Shrivastava A, Khan A A, Khurshid M, Kalan M A Jain S K, Singhal P K. Recent developments in L-Asparaginase Discovery and its potential as anticancer agente. *Critical Reviews in Oncology and Hematology* 2016; 100: 1-10.

Smart T, Lomas H, Massignani, Flores-Merino M V, Perez L R, Battaglia G. Block copolymer nanostructures. *Nanotoday* 2008; 3: 3-4.

Soares A L, Guimarães G M, Polakiewicz B, Pitombo R N M, Abrahão-Neto J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of E. coli L-asparaginase. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 237:163–170.

Souza C A. O que está ocorrendo com o suprimento de drogas oncológicas no brasil e no mundo. *Rev Bras Hemat Hemoter* 2012; 34.

Surovtseya E V, Jonhston A H, Zhang W, Zhank Y, Kim A Murakoshi M, Wada H, Newman T A, Zou J, Pyykko I. Prestin binding peptides as ligands for targeted polymersome mediated drug delivery to outer hair cells in the inner ear. *Int J Pharma* 2012; 424(1) 121-127.

Tanner P, Baumann P, Enea R, Onaca O, Palivan C, Meier, W. Polymeric Vesicles: From Drug Carriers to Nanoreactors and artificial organelles. *Accounts of Chemical Research*. 2011; 44(10): 1039–1049.

Tardito S, Uggeri J, Bozzetti, Bianch M G, Rotoli B M, Franchi-Gazzola R, Gazzola G C, Bussolati O. The inhibition of glutamine synthetase sensitizes human sarcoma cells to L-asparaginase. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2007; 60(5): 751-8.tt

Topel O, Burçin A C, Budama L, Hoda N. Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. *Journal of Molecular Liquids* 2013; 177:40-43.

Van den Berg H. Asparaginase Revisited. *Leukemia & Lymphoma* 2011; 52(2): 168-178.

Veronese F M, Pasut G. PEGylation: successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 2005, 10(21):1451-1458.

Wang L, Chierico L, Little D, Patikarnmonthon N, Yang Z, Azzouz M, Madsen J, Armes S P, Battaglia G. Encapsulation of biomacromolecules within polymersomes by electroporation. *Angew Chem Int Ed* 2012; 51:11122-25.

Wang A Z. EPR or no EPR? The billion dolar question. *Nanomedicine* 2015; 7: 294

Wileman T E, Foster R L, Elliott P N C. Soluble asparaginase-dextran conjugates show increased circulatory persistence and lowered antigen reactivity. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 1986; 38: 264-271

Woo J S, Alberi M O, Tirado C A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Experimental Hematology & Oncology* 2014; 3:16.

Woodle M C, Matthay K K, Newman M S, Hidayat J E, Collins L R, Redemann C, Martin F J and Papahadjopoulos D. Versatility in lipid composition showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1105: 193-200.

Zawada Z H. A single-step method of liposome preparation. *Celular & Molecular Biology Letters* 2004; 9:603-15.

Zhang J, Wu L, Meng F, Wang Z, Deng C, Liu H, Zhong Z. pH and reduction dual-bioresponsive polymersomes for efficient intracellular protein delivery. *Langmuir* 2011; 28(4):2056-65.

Zhang, Z H. A single-step method of liposome preparation. *Cellular e molecular biology letters*. 2004, 9: 603-15.

Zhao Y, Xiaoming L, Zhao X, Yang Y, Li H, Zhou X, Yuan W. Asymmetrical Polymer vesicles for drug delivery applications. *Frontiers in Pharmacology* 2017; 8: 374