

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Desenvolvimento e caracterização de polimerossomos para veiculação de
L-asparaginase**

Alexsandra Conceição Apolinário

Tese para obtenção do Título de doutora
Orientadora: Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo, 2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Desenvolvimento e caracterização de polimerossomos para veiculação de
L-asparaginase**

Alexsandra Conceição Apolinário

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de doutora em Ciências

Orientadora: Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo, 2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A 643 Apolinário, Alexandra
d Desenvolvimento e caracterização de
polimerossomos para veiculação de L-asparaginase /
Alexandra Apolinário. - São Paulo, 2018.
170 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Rangel-Yagui, Carlota

1. L-Asparaginase. 2. polimerossomos. 3.
autoagregação. 4. copolímeros anfifílicos. I. T. II.
Rangel-Yagui, Carlota, orientador.

Alexsandra Conceição Apolinário

**Desenvolvimento e caracterização de polimerossomos para veiculação de
L-asparaginase**

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR**

Presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

EPÍGRAFE

Eu teria que nascer e viver muitas vezes para compreender as complexidades e contradições inerentes a cada um dos tópicos do campo da minha pesquisa de doutorado, por exemplo só para o termo “*self-assembled nanostructures*” o *google* acadêmico me mostrou 490.000 resultados em junho de 2018, se o faço o mesmo exercício para o descritor “*protein encapsulation*”, o resultado é ainda maior e 329.000 artigos aparecem na mesma data, ou seja, fazendo um cálculo grosseiro, se eu quisesse ter acesso a todas estas publicações ao longo dos 04 anos de doutorado, eu deveria ter lido até 300 *papers* por dia para cada tópico.

Mas óbvio que isso é uma extrapolação, nenhum doutor precisou de tal aprofundamento e isso não tira o mérito do esforço empreendido para se ter uma tese em mãos, mas deveria pelo menos alertar que há uma lacuna gigante, seja lá qual for nosso campo de doutoramento e ela permanecerá lá e isso torna a ciência imortal. Na verdade, nossas respostas serão sempre incompletas e as perguntas como disse Voltaire me parecem mais importantes que as repostas, pois provocam, impulsionam, tiram do conforto os cientistas que não se conformarão e irão buscar entendimento para um fenômeno.

No entanto, pior do que a consciência socrática de que nada sabemos é a nossa alienação ao fato de que temos cerca de 200 mil doutores no Brasil segundo dados de 2017, que são muitas vezes brilhantes como futuros professores universitários e pesquisadores, mas que foram formados dentro de uma “bolha”. Se fazemos doutorado porque queremos ser professores e pesquisadores no Brasil, precisamos saber que mesmo com as políticas de cotas, muitos brasileiros ainda não chegam à universidade e pasmem, temos cerca de 12 milhões de analfabetos no Brasil segundo o censo de 2017 do IBGE e mesmo com uma população que se autodeclara em sua maioria negra, os negros ainda são minoria na universidade. Segundo os dados mais recentes, que são de 2017, 10% dos

brasileiros detinha 43,3% da renda total do país, na outra ponta, os 10% mais pobres detinham apenas 0,7% da renda total, mesmo assim houve financiamento público para alguns como eu fazer um doutorado. Somos doutores em um país que este ano correu o risco de voltar ao mapa da fome, ou seja, há parte significativa da população ingerindo uma quantidade diária de calorias inferior ao recomendado. Mas não para por aí, somos doutores em um país onde a violência urbana tem matado mais que as guerras e o feminicídio no Brasil é real, uma mulher é assassinada a cada duas horas no Brasil.

Enfim se somos doutores no Brasil, o que faremos além das preciosas contribuições científicas nos *papers*? Ou onde estaremos, além de nos incríveis laboratórios e universidades? Bom, eu espero muito ser necessária e poder estar em uma boa universidade e produzido ciência de qualidade, mas também em tantos outros lugares e junto a tantas outras pessoas do meu país que não tiveram os privilégios que eu tive e para as quais meu trabalho poderá impactar tanto quanto que na comunidade formada por doutores e grandes cientistas.

Alexsandra Apolinário (2018)

“Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação.”

Carl Sagan (1934-1996)

Dedicatória

Aos meus pais, Maria e Francisco por terem investido na minha educação traduzida em diplomas, mas especialmente por terem estimulado meu crescimento como ser humano, me fazendo acreditar que eu seria maior que qualquer título acadêmico que viesse a conquistar seja lá onde fosse. Cada passo que eu dei sempre foi tranquilo, mesmo com dificuldades, havia paz e isso graças as conversas que sempre tivemos: não havia medo de errar, não havia medo de arriscar, não havia medo de fracassos, havia a convicção de que mesmo que nem tudo fosse sempre possível, alguma coisa boa surgiria depois de uma atitude tomada com coragem e dignidade, havia um sentimento de gratidão por cada conquista, a certeza de que eu fiz uma escolha para estar onde estava e isso não me fazia especial no mundo, uma sensação de que onde quer que eu estivesse, eu seria digna e o meu trabalho capaz de transformar e impactar. Entendi desde muito nova que minha presença não se traduziria em status, mas em ser útil, em colaborar, em saber entrar e sair dos lugares com mais do que simples etiqueta, mas com laços construídos fundamentados em respeito, verdade e honestidade. Hoje eu sei, graças ao exemplo de meus pais, que mais importante que qualquer título acadêmico é o bom exemplo e a mão estendida para ajudar que podemos ser para o próximo e isso apesar de ter muito do intelecto de um indivíduo, transcende às letras e equações, isso se concretiza em nobreza que não se aprende em nenhuma academia e só quem tem pais como os meus sabe, sente e quer propagar...

A vocês, todo o meu amor, minha gratidão e meu respeito...

AGRADECIMENTOS

Processo nº 2014/10456-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

A toda minha família, especialmente minha tia Sílvia (*In memoriam*), minha avó Dulce (*In memoriam*) e minha prima Shirley

À Universidade de São Paulo pela infraestrutura assegurada

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Aos funcionários da USP ou terceirizados que de algum modo contribuíram através de seu trabalho durante o período do meu doutoramento, incluindo os da FCF, ICB, Restaurante Universitário, Biblioteca entre outros.

Ao professor Adalberto Pessoa Jr., por ter sempre confiado em meu trabalho e ter me feito o convite para fazer o doutorado na USP e fazer parte de seu projeto Temático quando eu ainda estava na Universidade Estadual da Paraíba, mas sobretudo por ter sempre me estimulado a ir mais além, acreditando no potencial científico meu e do grupo no qual eu estava no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB, sem dúvidas sem sua contribuição muitas das minhas conquistas não teriam sido possíveis, terá sempre minha gratidão

À professora Carlota por ter aceito me orientar, ter dividido seu projeto novo de trabalho comigo, ter me inserido como parte de seu grupo de pesquisa no Laboratório de Nanobiotecnologia (NANOBIO) da USP e sobretudo pela sua imensa contribuição na minha formação como doutora e pelo exemplo de profissional que é

Ao professor Atílio Converti, por ter tido sempre confiança no meu trabalho e ter me estimulado dia após dia, “comprando” minhas ideias e me ensinando muito com sua experiência, dedicando horas de seu trabalho mesmo que a distância aos nossos projetos que nos renderam boas publicações e sem dúvida um aprendizado enorme para mim

Ao professor Giuseppe Battaglia por ter confiado em mim durante todo meu estágio na *University College London* e ter me tratado de igual para igual aos seus brilhantes alunos, foi inesquecível ter ficado em seu grupo de pesquisa e ver mais que um grande cientista, ele era um grande ser humano

A Dra. Monika Magon, por ter me recebido durante seu Pós-doc e me supervisionado no meu estágio na UCL, pela paciência, boa vontade e amizade, é admirável o seu preciosismo no com o trabalho laboratorial e sem dúvidas foi de um grande aprendizado para mim sua colaboração

A professora Gisele Monteiro por ter em várias situações me dado palavras de incentivo

Ao Laboratório de Ensaios de Corrosão da Escola Politécnica da USP, em especial à professora Idalina, Bruna e Fernando por todo apoio para realização dos ensaios de DLS

A todos os professores do curso de Farmácia da UEPB, sempre soube do valor que cada um tinha, mas agora ficou mais claro que antes, o quanto eu tive uma boa formação

Ao professor e amigo Alex que sempre foi um grande incentivador na minha vida acadêmica, que me apresentou a algumas das grandes inovações das ciências farmacêuticas entre 2007 e 2014, por seu exemplo de rigor com a ciência que até hoje tento imitar

A professora e amiga Clésia Pachú que me inseriu na vida acadêmica na UEPB e sobretudo me mostrou como é o funcionamento administrativo de uma universidade

A minha amiga Sallett Rocha, a qual conheci na iniciação científica, mesmo distantes nossa amizade permanece e sempre estamos nos ajudando

A minha amiga Gabriela Muniz, que torce pelo meu sucesso de modo tão verdadeiro e presente

Ao meu amigo Valker Feitosa, que desde a Graduação está comigo nos momentos mais importantes da minha vida, os quais quase sempre foram os mesmos para nós dois e juntos vivenciamos quase que ao mesmo tempo diferentes conquistas

Ao meu amigo Tales Costa e Silva, que é um grande companheiro diariamente em São Paulo e está ao meu lado quando mais preciso, também é um exemplo para mim de ser humano e profissional brilhante

A minha amiga Luciana Bueno, a qual me recebeu de braços abertos no Nanobio e durante quase dois anos enquanto estive em São Paulo, sempre foi alguém que eu sabia que poderia contar

A minha amiga Miusa, que nos anos que foi funcionária terceirizada no laboratório foi uma grande companheira de conversas diárias nas minhas manhãs quando ninguém ainda havia chegado ao prédio

A minha amiga Célia Vargas, sempre contei com suas palavras de apoio e experiência, é exemplo de empresária e farmacêutica

Ao meu amigo Júlio César, um dos profissionais mais brilhantes que já conheci, por todo acolhimento sempre que vou a Belo Horizonte e por todas as vezes que me dividiu comigo os seus amplos conhecimentos

Aos meus companheiros de casa em São Paulo nestes quatro anos, Bia, Zé, Milson, Daniel, Igor, em especial a Livia e Flávia pela amizade e colaboração diária dentro e fora de casa

A todos os meus colegas da graduação na UEPB, com os quais mantenho uma relação carinho e respeito mesmo que por um grupo em aplicativo, são certamente pessoas muito especiais para mim

A meus colegas de mestrado na UEPB entre 2012 e 2014, especialmente Paulo César

A todos os colegas de laboratório que conheci e convivi durante o doutorado pela companhia dentro e fora do laboratório, em especial a Juliana Pachioni, Rominne, Camila, Edu, Letícia, João Santos, Samarina, Luciana Lário, Laura Feitas, Marcela, Larissa

Bentim, Larissa Brumano, Nabeel, Rafael, Amanda Turno, Bárbara Manffeï, Bárbara Malheiros, Beatriz Miranda, Alex, Gledson, Talita, Juan, Ignácio e Francisco

A Anna Emmanuela, Thayse e Salete, alunas da UEPB que recebi em 2016 na USP e tive a oportunidade de contribuir com o trabalho delas

A todos os colegas de laboratório que conheci e convivi durante o estágio na UCL por terem tornado meus dias tão bons, em especial a Cecília, Virginia, Azzurra, Gabrielle, Loris e Laura

Sumário

Lista de figuras	10
Lista de tabelas	13
Lista de equações.....	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
REFERÊNCIAS	23
2. OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO I- REFERENCIAL TEÓRICO	27
I.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA): UMA BREVE APRESENTAÇÃO DA PATOLOGIA OBJETO DO TRATAMENTO.....	27
I.2 -L-ASPARAGINASE E UM POUCO DA HISTÓRIA: 60 ANOS DE ESTUDOS	29
I.2.1 Aspectos farmacológicos e bioquímicos da L-Asparaginase.....	31
I.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E NANOENCAPSULAÇÃO: CASO DA L- ASPARAGINASE.....	35
I.4 POLIMEROSSOMOS: UMA BREVE CONTEXTUALIZAÇÃO.....	40
I.4.1 Princípios físico-químicos de formação dos polimerossomos.....	42
I.4.1.2 Copolímeros anfífilos: Autoagregação em estruturas supramoleculares como vesículas poliméricas.....	43
I.4.2 Métodos de preparo.....	48
REFERÊNCIAS	51
Capítulo II- Obtenção de nanoestruturas supramoleculares formadas pela autoagregação de poli (óxido de etileno-b-ácido láctico).....	60
II.1 INTRODUÇÃO	60
II.2 MATERIAIS E MÉTODOS	61
II.2.1 Materiais	61
II.2.1 Seleção dos copolímeros anfífilos.....	62
II.2.2 Formação das nanoestruturas.....	62
II.2.3 Caracterização das nanoestruturas por espalhamento de luz dinâmico	63
II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
II.3.1 Ensaio piloto para obtenção de polimerossomos a partir de poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) PEG ₄₅ PLA ₆₉	64

II.3.2 Obtenção de polimerossomos a partir de poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃ e PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀	73
II.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS	79
Capítulo III- Desafios da autoagregação do copolímero poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) em polimerossomos: <i>Além dos paradigmas teóricos</i>	83
III.1 INTRODUÇÃO.....	83
III.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
III.2.1 Materiais	84
III.2.2 Preparação do filme.....	85
III.2.3 Hidratação do filme	85
III.2.4 Centrifugação e extrusão	85
III.2.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	86
III.2.6 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	86
III.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão.....	86
III.2.8 Ensaio de encapsulação	86
III.2.9 Análise estatística	87
III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
III.3.1 Avaliação da autoagregação por hidratação do filme sob agitação magnética e sonicação	89
III.3.2 Novas estratégias para a autoagregação por hidratação do filme sob agitação magnética.....	92
III.3.3 Efeito da centrifugação e extrusão	95
III.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
REFERÊNCIAS	100
Capítulo IV- <i>Design</i> racional para encapsulação de L-asparaginase em polimerossomos: Existem regras práticas para encapsulação de proteínas?	103
IV.1 INTRODUÇÃO	103
IV.2 MATERIAIS E MÉTODOS	105
IV.2.1 Materiais.....	105
IV.2.2 Síntese de PMPC ₂₅ -PDPA ₇₂ e PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀	105
IV.2.3 Preparação de polimerossomos	105
IV.2.4 Caracterização dos sistemas de polimerossomos	107
IV.2.4 Quantificação da ASNase encapsulada	108
IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
IV.3.1 Polimerossomos obtidos pela abordagem bottom-up: troca de pH.....	111

IV.3.2 Polimerossomos obtidos pela abordagem Top-Down: Hidratação do filme seguido de eletroporação	115
IV.3.3 Encapsulação de L-Asparaginase nos polimerossomos	119
IV.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
REFERÊNCIAS	122
Capítulo V-Como superar os problemas metodológicos da nanoencapsulação de proteínas em polimerossomos? <i>Um estudo com a L-Asparaginase</i>	127
V.1 INTRODUÇÃO	127
V.2 MATERIAIS E MÉTODOS	128
V.2.1 Materiais	128
V.2.2 Preparação dos Polimerossomos.....	129
V.2.3 Caracterização dos Polimerossomos.....	130
V.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
V.3.1 Desenvolvimentos dos polimerossomos.....	131
V.3.2 Encapsulação da ASNase em polimerossomos	142
V.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	144
REFERÊNCIAS	144
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE.....	147
APÊNDICES	149
ANEXOS	164

Lista de figuras

Figura 1-Resultados por ano (2005-2017) apresentados pelo <i>Web of knowledge</i> , usando os descritores <i>câncer (Título)</i> e <i>nanocarreadores (tópico)</i>	21
Figura I.1- Diagnóstico laboratorial da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA): Em A está representada uma imagem do sangue periférico de uma pessoa sem LLA e em B, a imagem é de um paciente com LLA, sendo claro a grande quantidade linfoblastos. Adaptada da Fonte: http://imagebank.hematology.org/ , acessado em 01 de junho de 2018.	29
Figura I.2-Cristal da L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i> (2.40 Å): Representação 3D por cores relacionadas à hidrofobicidade da proteína, sendo o vermelho relativo à hidrofobicidade e o azul hidrofobicidade. Fonte: <i>Protein Data bank</i> (Código PDB: 3ECA).....	30
Figura I.3- Esquema do tetrâmero da L-asparaginase, em modelo <i>space filling</i> , com seus quatro monômeros. Pode-se ver as interações entre os dímeros A e C, e entre os dímeros B e D, onde ficaram os sítios ativos.	32
Figura I. 4- Estrutura química do aminoácido L-asparagina. Fonte: Desenhado pelo autor usando programa <i>Chemdraw</i>	32
Figura I.5- Esquema do mecanismo de ação de ação hidrolítica da L-asparaginase sobre a asparagina em duas etapas: 1-Primeiro ocorre o ataque nucleofílico da enzima ao substrato asparagina formando um intermediário acil-enzima e amônia. 2-Outro ataque nucleofílico acontece por parte de uma molécula de água que resulta na formação do aspartato e liberação da enzima livre. Fonte: <i>Desenhado pelo autor usando programa Chemdraw</i>	33
Figura I. 6-Ilustração de um polimerossomo com a proteína Asparaginase encapsulada no core hidrofílico, é possível ver em cinza a membrana hidrofóbica que também pode ser um espaço para encapsulação de fármacos com caráter apolar e em azul a porção externa da vesícula contendo os blocos de polietilenoglicol. Fonte: <i>Autor</i>	40
Figura I.7- Auto-organização dos copolímeros anfifílicos. Em altas concentrações são formadas estruturas liotrópicas conhecidas como cristais líquidos, que são arranjos cuja morfologia possui lamelas. A partir da hidratação, esses sistemas passam para estados de esponjas interligadas, vesículas empacotadas de modo hexagonal e, finalmente, vesículas isotrópicas. Adaptada de <i>BATTAGLIA & RYAN (2005)</i>	47
Figura I.8- Mecanismos propostos para explicar a formação dos polimerossomos: 1) Ocorre o crescimento de micelas em bicamadas que se auto-organizam em vesículas 2) Ocorre o crescimento de micelas, entretanto ocorre a difusão de solvente dentro destas micelas e posteriormente a formação das vesículas. Fonte: <i>Adaptada de BLEUL; THIERMANN; MASKOS (2015)</i>	48
Figura I.9-Reperesença da eletroporação de polimerossomos elaborados a partir de copolímeros dibloco, onde as amostras de polimerossomos preparados são colocados em cubetas de eletroporação juntamente com a molécula que se deseja encapsular e após aplicação de campo elétrico, poros provisórios são formados nos polimerossomos e as moléculas podem ser encapsuladas. Fonte: <i>Adaptada de CHIERICO (2015)</i>	49
Figura II.1- Geometria preferencialmente adotada por copolímeros anfifílicos em meio aquoso de acordo com o volume da fração hidrofílica. A porção representada em azul representa a fração hidrofílica, neste caso PEG e a porção representada em preto a fração hidrofóbica. Fonte: <i>Figura adaptada de DISCHER; AHMED (2006)</i>	60
Figura II.2- Microscopias das estruturas de autoagregação formadas a partir da hidratação do filme de poli (2-metacrilóiloxietil fosforilcolina)-bloco-poli(2-diisopropilamino etil metacrilato). Primeiro, os pedaços liberados de filme são intumescidos em uma rede	

tubular contínua; em seguida, ocorre a quebra em túbulos individuais e pequenas estruturas emaranhadas. Estes se dividem ainda mais em tubos menores que finalmente perolizam e brotam em como polímeros esféricos. <i>Fonte:</i> Adaptada de BATTAGLIA; RYAN (2006).....	61
Figura II.3-Filme polimérico de PEG ₄₅ PLA ₆₉ formado após evaporação do solvente.....	64
Figura II.4- Aspectos dos sistemas PEG ₄₅ PLA ₆₉ hidratados: A) Após agitação orbital a 150 RPM e B) Após agitação magnética a 400 RMP.....	65
Figura II.5- Análise de espalhamento de luz dinâmico para os sistemas de PEG ₄₅ PLA ₆₉ obtidos por agitação orbital por 2 horas.....	68
Figura II.6- Análise de espalhamento de luz dinâmico para os sistemas de PEG ₄₅ PLA ₆₉ obtidos por agitação orbital overnight (ON).....	69
Figura II.7- Análise de espalhamento de luz dinâmico para os sistemas de PEG ₄₅ PLA ₆₉ obtidos por agitação magnética overnight (ON).....	70
Figura II.8- Efeito da extrusão no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG ₄₅ PLA ₆₉ seguida por sonicação durante 50 min. A) Sistema antes de extrusar. B) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,4 µm. C) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,2 µm.....	72
Figura II.9- Efeito da sonicação no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃ . A) Sistema agitados a 400 RPM <i>overnight</i> . B) Distribuição após sonicação por 20 min C) Distribuição após sonicação por 50 min.....	74
Figura II.10- Efeito da extrusão no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃ seguida por sonicação durante 50 min. A) Sistema antes de extrusar. B) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,4 µm. C) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,2 µm.....	75
Figura II.11- Efeito da sonicação no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀ . A) Sistema antes agitados a 400 RPM <i>overnight</i> . B) Distribuição após sonicação por 20 min C) Distribuição após sonicação por 50 min.....	76
Figura II.12- Efeito da extrusão no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀ seguida por sonicação durante 50 min. A) Sistema antes de extrusar. B) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,4 µm. C) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,2 µm.....	77
Figura III.1- Curvas de coeficiente de correlação: A) Tempo de relaxação para nanoestruturas formadas a partir dos copolímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico) sob agitação magnética overnight com as caudas no final de cada correlograma, atribuídas a partículas grandes. B) Efeito de sonicação para poli (ácido etileno-ácido láctico) PEG ₄₅ PLA ₆₉ . C) Efeito de sonicação para poli (ácido etileno-ácido láctico) PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃ D) Efeito de sonicação para poli (ácido etileno-ácido láctico) de PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀	88
Figura III.2 -Microscopia eletrônica de transmissão de agregados não-esféricos formados por poli (etileno-bloco-ácido láctico) PEG ₄₅ PLA ₆₉ após agitação <i>overnight</i> e sonicação por 50 min.....	89
Figura III.3- Índices de polidispersão para os três copolímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico) sob agitação magnética <i>overnight</i> e diferentes tempos de sonicação (n = 3).....	91

Figura III.4- Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de polímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico) PEG ₄₅ PLA ₆₉ , PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃ e PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀ sob agitação magnética overnight e sonicação por 50 min. A representação esquemática destaca a membrana hidrofóbica (t) e a corona hidrofílica de PEG (d).....	92
Figura III.5 Índices de polidispersão médio para os copolímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico), PEG-PLA, sob agitação magnética em diferentes tempos e sob aquecimento a 40 °C (n = 3)	93
Figura III.6- Curvas de coeficiente de correlação para nanoestruturas formadas a partir dos três copolímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico) PEG ₄₅ PLA ₆₉ , PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃ e PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀ sob agitação a 24, 48 e 72 horas com ou sem aquecimento.....	94
Figura III.7- Curvas de coeficientes de correlação para nanoestruturas formadas a partir dos copolímeros de polietileno-bloco-ácido láctico) PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃ e PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀ após centrifugação.....	95
Figura III.8- Análise de rastreamento das nanoestruturas, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento dinâmico de luz por intensidade de polimerossomos de PEG-PLA preparados por hidratação do filme polimérico sob agitação magnética durante 24 horas à temperatura ambiente após extrusão por 31 vezes através de membrana de policarbonato de radiação de poro de 400 nm.....	97
Figura III.9- Curvas de coeficiente de correlação para nanoestruturas após extrusão a 40 °C.....	98
Figura III.10- Eficiência de encapsulação da L-asparginase (ASNase) and albumina sérica bovina (BSA) nos polimerossomos de PEG-PLA (n = 3).....	99
Figura III.11- Desafios da autoagregação do copolímero poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) em polimerossomos.....	99
Figura IV.1- Estrutura química do copolímero em bloco PMPC-PDPA, onde <i>m</i> e <i>n</i> são os graus médios de polimerização. Abaixo do pKa do PDPA (6,4), a amina terciária nas cadeias de PDPA está protonada, tornando o bloco copolímero hidrofílico e proporcionando sua dissolução em meio aquoso como unímeros. Acima de pH 6,4, os grupos de aminas terciárias PDPA tornam-se desprotonados, tornando este bloco hidrofóbico e o copolímero anfifílico, desencadeando assim sua autoagregação. <i>Fonte: Adaptado de Lomas et al. (2010)</i>	106
Figura IV.2- Microscopia eletrônica de transmissão dos sistemas produzidos através de troca de pH com PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ e PEG ₁₁₃ -PDPA ₈₀ . Em A e B, as micrografias mostram vesículas de PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ . Em C e D, as micrografias mostram vesículas de PEG ₁₁₃ -PDPA ₈₀	112
Figura IV.3- Perfil de distribuição de tamanho (diâmetro hidrodinâmico) por DLS (distribuição por intensidade e número) para os polimerossomos PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ e PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀ contendo ASNase, preparados por troca de pH após cromatografia de exclusão molecular.....	112
Figura IV.4- A) Funções de correlações do DLS obtidas para sistemas PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ e PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀ após o método de troca de pH. B) Diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) das medidas de intensidade de espalhamento e medidas de PDI para sistemas de polimerossomos vazios e com proteína antes da purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC). C) Funções de correlações DLS registradas para os sistemas finais PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ e PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀ após a SEC. D) Diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) das medidas de intensidade de espalhamento e PDI para sistemas de polimerossomos com e sem ASNase após a SEC.....	114
Figura IV.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão: (A) polimerossomos obtidos por hidratação do filme de PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ , (B) polimerossomos de PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ após	

eletroporação com 10 pulsos (C) polimerossomos de PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ após eletroporação com 20 pulsos, (D) polimerossomos obtidos por hidratação do filme de PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀ , (E) polimerossomos de PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀ após eletroporação com 10 pulsos, (F) polimerossomos de PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀ após eletroporação com 20 pulsos.....	116
Figura IV.6- Perfil de distribuição DLS por intensidade para PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ e PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀ para os polimerossomos contendo ASNase preparados por hidratação do filme seguida de eletroporação, após cromatografia de exclusão molecular (SEC).....	117
Figura IV.7- A) Funções de correlações do DLS obtidas para sistemas de PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ obtidos por hidratação do filme B) Z-Average das medidas baseadas em intensidade de tamanho e medidas de PDI para sistemas de PMPC ₂₅ -PDPA ₇₀ . C) Funções de correlações do DLS obtidas para sistemas PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀ obtidos por hidratação do filme. D) Z-Average das medidas baseadas em intensidade de tamanho e medidas de PDI para sistemas de PEG ₁₀₀ -PDPA ₈₀	118
Figura IV.8- Rendimentos de polimerossomos contendo ASNase encapsulada após as abordagens de (A) top-down (hidratação do filme seguida de eletroporação) e (B) bottom-up (troca de pH).....	119
Figura V.1- Preparação de polimerossomos para a encapsulação de L-Asparaginase baseado em três questões iniciais: "Por quê?" "Qual?" e Como? Os copolímeros Pluronic L-121 (PEG ₅ -PPO ₆₈ -PEG ₅) e PEG-PLA (PEG ₄₅ -PLA ₆₉ , PEG ₁₁₄ -PLA ₁₅₃ e PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀) foram usados para produzir as vesículas.....	134
Figura V.2- Perfil de % de recuperação de atividade enzimática da L-Asparaginase depois das condições de estresse empregadas nos métodos de elaboração de polimerossomos.....	135
Figura V.3- Esquema das abordagens bottom-up e top-down para produção de polimerossomos e encapsulação da L-asparaginase (ASNase).....	136
Figura V.4- Distribuição de tamanho dos polimerossomos Pluronic [®] L-121 obtidos a partir da troca de temperatura (método bottom-up) e das frações coletadas após a purificação por SEC. A) DLS para nanossistema após o método de troca de temperatura. B) DLS para frações coletadas da SEC. C) Imagens de TEM para sistemas finais: frações concentradas após centrifugação com filtro de 10kDa.....	137
Figura V.5- A) Distribuição de tamanho das nanoestruturas de Pluronic [®] L-121 e PEG-PLA* obtidas pelo método de hidratação do filme B) kcps para o sistema Pluronic [®] L-121 diluído (1:20) e sistemas PEG-PLA diluídos: PEG ₄₅ -PLA ₆₉ (1:10), PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀ (1:2) e PEG ₁₁₄ -PLA ₁₅₃ sem diluição.....	139
Figura V.6- Distribuição de tamanho dos polimerossomos de Pluronic [®] L-121 preparados por hidratação de filme sob agitação <i>overnight</i> e após 24, 48, 72 horas e uma semana à temperatura ambiente (25°C).....	141
Figura V.7- Distribuição de tamanho e micrografias de TEM dos polimerossomos de Pluronic [®] L-121 A) antes da eletroporação e B) Após a eletroporação (2500 V e 10 pulsos).....	142

Lista de tabelas

Tabela I.1- Estratégias de nanoencapsulação para L-Asparaginase (ASNase).	38
Tabela I.2- Classificação teórica dos sistemas formados a partir do parâmetro de empacotamento crítico.....	45
Tabela I.3- Classificação teórica dos sistemas formados pela autoagregação de copolímeros anfifílicos a partir do valor da fração hidrofílica (<i>f</i>).	46

Tabela II.1- Características moleculares dos copolímeros usados.	62
Tabela II.2-Resultado da análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) por intensidade para nanoestruturas de autoagregação obtidas a partir do PEG ₄₅ PLA ₆₉	66
Tabela IV.1- Condições para encapsulação da proteína.....	121

Lista de abreviações

ASNase-Asparaginase

Asn-Asparagina

ASNs-asparagina sintetase

CA- copolímero anfifílico

DLS-*dynamic light scattering*

DNA- *deoxyribonucleic acid*

EE%- eficiência de encapsulação

Eq-Equação

FDA-Food and Drug Administration

LLA-Leucemia linfóide aguda

LP-Lipossomos

MET-Microscopia eletrônica de transmissão

PEG-PLA - poli(óxido de etileno-b-ácido láctico)

PMPC-PDPA- poli(2-metacrilóxi-etil fosforilcolina)-bloco-poli(2-diisopropilamino etil metacrilato)

PEG-PDPA- poli(óxido de etileno)-bloco-poli (2-diisopropilamino etil metacrilato)

PL-Polimerossomos

HF-Hidratação do filme

RNA-*Ribonucleic acid*

Lista de equações

Equação I.1- *Critical packing parameter* (p)

Equação I.2- Energia livre de Gibbs

Equação II.3- Equação de Stokes-Einstein

Equação III.3- Eficiência de encapsulação por método indireto

Equação IV.4- Número total de polimerossomos

Equação IV.5- Número de polimerossomos para cada população de tamanho

Equação IV.6- Número de agregação do copolímero

Equação IV.7- Volume do bloco PDPA em um único polimerossomo

Equação IV.8- Número de unidades hidrofóbicas monoméricas que formam a cadeia hidrofóbica

Equação IV.9- Relação entre a espessura da membrana hidrofóbica, d , que alcança o comprimento das repetições de unidades de monômeros hidrofóbicos, N_{PDPA} , de acordo com um coeficiente de dobra do polímero de $2/3$

Equação IV.10- Eficiência de encapsulação por método direto

RESUMO

APOLINÁRIO, A.C. **Desenvolvimento e caracterização de polimerossomos para veiculação de L-asparaginase**. 2018. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A enzima L-Asparaginase (ASNase) é um biofármaco utilizado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, no entanto, a evolução da produção da ASNase como um medicamento desde o final da década de 1970 resultou em apenas quatro alternativas disponíveis no mercado farmacêutico, com relatos de graves reações imunogênicas e toxicidade. Desse modo, a nanotecnologia é uma plataforma que pode ser explorada para administração dessa enzima diminuindo a exposição da mesma a proteases e aumentando a sua meia-vida aparente. Os polimerossomos (PL) são opções que pela nanoestrutura vesicular poderiam encapsular a ASNase em seu *core* aquoso e pela presença de uma membrana polimérica, são mais robustos que os lipossomos. Assim, neste trabalho objetivou-se desenvolver PL para encapsulação da ASNase como uma alternativa às formulações deste biofármaco existentes. Foram desenvolvidos PL de PEG-PLA, PMPC-PDPA, PEG-PDPA e Pluronic® L-21. Foram estudados fatores relacionados à composição dos copolímeros (fração hidrofílica, responsividade a fatores externos tais como pH e temperatura) e métodos de elaboração (hidratação do filme polimérico, troca de pH e temperatura) bem como foi feita a caracterização dos PL obtidos (tamanho, índice de polidispersão, espessura de membrana, formação de excessivo *bulk* polimérico, obtenção de micelas). Também foi feito um planejamento racional para encapsulação da ASNase (hidratação direta do filme polimérico e encapsulação por eletroporação, autoagregação com encapsulação por troca de pH ou de temperatura). Para os PL preparados com PEG-PLA, a extrusão resultou em distribuição de tamanhos mais estreitos correspondentes aos valores de PDI de 0,345, 0,144 e 0,081 para PEG₄₅-PLA₆₉, PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄-PLA₁₈₀, respectivamente. Foi demonstrado que copolímeros com menor fração hidrofóbica resultam em maior eficiência de encapsulação para proteínas, já que possuem volumes aquosos maiores. Com o PMPC₂₅-PDPA₇₂ foi possível encapsular em média três unidades de ASNase por vesículas através da eletroporação ou troca de pH, sendo que no primeiro método houve formação de túbulos e no último método as micelas não foram completamente removidas. Para PEG₁₀₀-PDPA₈₀, grandes agregados permaneceram após a purificação levando a um PDI alto, mas não foi observada a formação de túbulos, já a troca de pH para este copolímero resultou em maior perda de copolímeros como *bulk* polimérico precipitado. Para o copolímero tribloco Pluronic® L-121, foi observado que as vesículas eram estáveis durante uma semana à temperatura ambiente, contrariando o que era descrito na literatura. Nesses sistemas, quando preparados por hidratação do filme, a encapsulação da ASNase foi realizada por eletroporação mas a proteína não foi detectada dentro das vesículas. Atribuímos a não-encapsulação à organização da bicamada Pluronic® L-121 sem conformação definida das cadeias poliméricas, dificultando a reorganização do bloco hidrofílico na porção interna do poro durante eletroporação. Por troca de temperatura, cerca de 5 % de ASNase foi encapsulada e o método resultou em total recuperação da atividade da enzima. Desse modo foram obtidos diferentes PL com diferentes características nanoestruturais de acordo com os copolímeros utilizados para carreamento da ASNase.

Palavras-chaves: L-Asparaginase; polimerossomos; autoagregação; copolímeros anfífilicos

ABSTRACT

APOLINÁRIO, A.C. **Development and characterization of polymersomes for the release of L-asparaginase**, 2018. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The enzyme L-Asparaginase (ASNase) is a biopharmaceutical used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia, still the industrial production of ASNase as a marketable drug since the late 1970s has resulted in only four alternatives available in the pharmaceutical market, with reports of severe immunogenic reactions and toxicity. In this sense, nanotechnology is a platform that can be exploited to administer this enzyme by decreasing its exposure to proteases and increasing its apparent half-life. Polymerosomes (PL) are interesting routes which by its intrinsically vesicular nanostructure could encapsulate the ASNase in its aqueous core and by the presence of a polymeric membrane, being more robust than the liposomes. Thus, in this work it was intended to develop PL for ASNase encapsulation as an alternative to existing formulations of this biopharmaceutical. PL of PEG-PLA, PMPC-PDPA, PEG-PDPA and Pluronic® L-21 were developed. It was studied the copolymers composition (*i.e.* hydrophilic fraction, responsiveness to external factors such as pH and temperature), PL design (*i.e.* polymer film hydration, pH change and temperature) and PL characterization (*i.e.* size, polydispersity index - PDI, membrane thickness, formation of excessive polymer bulk, micelles production). A suitable experimental planning for ASNase encapsulation (*i.e.* direct hydration of the polymeric film and encapsulation by electroporation, self-aggregation with encapsulation by pH or temperature change) was also performed. For the PL prepared with PEG-PLA, the extrusion resulted in narrower size distribution corresponding to the PDI values of 0.345, 0.144 and 0.081 for PEG₄₅-PLA₆₉, PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ and PEG₁₁₄-PLA₁₈₀, respectively. It has been shown that copolymers with lower hydrophobic fraction result in higher encapsulation efficiency for proteins, since they have larger aqueous volumes. With PMPC₂₅-PDPA₇₂ PL, it was possible to encapsulate three units of ASNase *per* vesicles through electroporation or pH change. In the first method, tubules were formed and in the latter one the micelles were not completely removed. For PEO₁₀₀-PDPA₈₀ PL, large aggregates remained after purification leading to a high PDI value, nevertheless no tubule formation was observed, since the pH change for this copolymer resulted in greater loss of copolymers as a precipitated polymer bulk. For the Pluronic® L-121 triblock copolymer PL, it was observed that the vesicles were stable for one week at room temperature, contrary to what was described in the literature. These PLs were prepared by film hydration method and ASNase encapsulation was performed by electroporation, nonetheless the protein was not detected within the vesicles. It is attributed the non-encapsulation to the organization of the Pluronic® L-121 bilayer without defined conformation of the polymer chains, making it difficult to reorganize the hydrophilic block in the internal portion of the pore during electroporation. By temperature change, about 5% of ASNase was encapsulated and the method resulted in complete recovery of enzyme activity. In conclusion, several PLs with a vast range of differential nanostructural characteristics were obtained according to the copolymers used for ASNase loading.

Keywords: L-Asparaginase; polymersomes; self-aggregation; amphiphilic copolymers.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O século XXI completou sua maioridade em 2018 e muitas são as conquistas da pós-modernidade no âmbito tecnológico, vivemos em uma época de avanços sociais inegáveis no mundo e no Brasil, por exemplo vemos um grande apelo por uma maior integração das instituições científicas e tecnológicas (ICTs) e o setor produtivo, o que foi consolidado por lei, através do novo Marco Legal da Ciência, Tecnologia e Inovação aprovado no Decreto Federal nº 9.283, de 7 de fevereiro de 2018, que regulamentou a lei nº 13.243, de 11 de janeiro de 2016, que visa aumentar as chances de o conhecimento chegar às empresas e alavancar o desenvolvimento econômico e social do país (BRASIL, 2018).

Neste sentido, a ciência desenvolvida nas universidades tenta acompanhar esta evolução, mas na área biomédica alguns desafios permanecem de pé, sendo que as bases para uma terapêutica segura e eficaz constituem ainda um gargalo para ciências farmacêuticas e alguns estudos de provas de conceito (*Concept proof*) permanecem necessários. Por exemplo o desenvolvimento de novos sistemas para nanoencapsulação de fármacos, pode ter diferentes apelos, como furtividade, resultando em diminuição do reconhecimento pelo sistema reticuloendotelial (KUSHWAH et al., 2018).

Destaca-se ainda o direcionamento a alvos com captação celular da nanoestrutura e liberação intracelular dos fármacos (VISWANATHAN et al., 2016), ou mesmo nanoestruturas dinâmicas capazes não apenas de carrear fármacos, mas de executar funções mediante estímulos externos ou de mimetizar processos biofísicos e bioquímicos complexos como permeação de substratos e catálise enzimática (JOSEPH et al., 2017). Estas últimas aplicações são extremamente conceituais, mas já foram anunciadas com brilhantismo no Prêmio Nobel de Químico de 2016, recebido pelos cientistas Stoddart,

Sauvage and Feringa com a proposta nos “nanorobôs” que executariam ações por meio de estímulos externos.

As vertentes científicas objetivando uma terapia racional se tornam ainda mais complexas quando se trata de câncer, um conjunto de doenças não negligenciadas, tanto no aspecto clínico quanto acadêmico, afinal os periódicos que publicam a respeito destas patologias apresentam altos fatores de impacto. As publicações sobre novas abordagens de tratamento de diferentes cânceres crescem anualmente como mostra uma breve pesquisa no *Web of knowledge*, usando os descritores *câncer* (Título) e *nanocarreadores* (tópico) limitando a busca até 2017 (Figura 1).

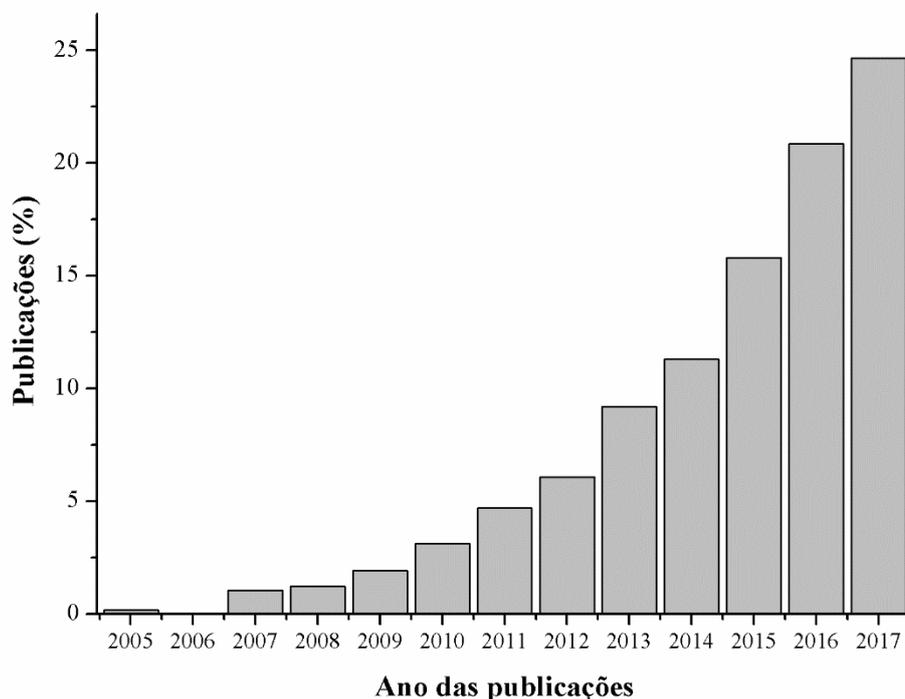


Figura 1-Resultados por ano (2005-2017) apresentados pelo *Web of knowledge*, usando os descritores *câncer* (Título) e *nanocarreadores* (tópico).

Extrapolando os conceitos da sociologia humanística descrita por Zygmunt Bauman (BAUMAN, 2001), parece que na nanomedicina, estamos seguindo o rumo da modernidade líquida descrita por ele para explicar a fluidez das relações em nosso mundo contemporâneo, o que vemos é uma “matança” generalizada de células e animais, mas

pouca novidade no mercado farmacêutico. Um exemplo clássico envolvendo a nanotecnologia são as formas lipossomais de doxurribicina, um dos poucos exemplos concretos de pesquisa na área que gerou um produto aprovado em 1995, sendo que o mercado global para este medicamento deverá atingir um valor de US\$ 1,39 bilhão até 2024 segundo dados do site especializado *Grand View Research* (GRAND VIEW RESEARCH, 2016).

Mesmo sendo um produto consolidado, um trabalho publicado em 2016 revelou que há diferenças entre as formulações lipossomais encontradas no mercado, especialmente decorrentes de variações morfológicas, de número de vesículas e tamanho, as quais podem explicar as flutuações na mediação da resposta às vesículas por parte do sistema complemento em soros de humanos (WIBROE et al., 2016).

Estas lacunas são esperadas na nanomedicina quando pensamos por exemplo, que apenas em 2014, ano que iniciei minha de doutorado, a *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um Guia (*Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology*) para a indústria estabelecendo se um produto envolve ou não nanotecnologia na sua produção. De acordo com esse guia, que a nanotecnologia é considerada quando um produto é projetado para ter pelo menos uma dimensão externa, ou uma estrutura interna ou de superfície, na escala de aproximadamente 1 nm a 100 nm, desde que possam exibir propriedades ou fenômenos relacionados a esta escala que são relevantes para avaliações de segurança, eficácia, desempenho, qualidade, impacto na saúde pública. Considera-se ainda produtos com propriedades físicas ou químicas ou efeitos biológicos, que são atribuíveis às dimensões do produto, mesmo que essas dimensões se afastem da nanoescala, até um micrômetro (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014). Aliado a isso, em 2014 também, a

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou seu Comitê Interno de Nanotecnologia.

Na verdade, a busca por sistemas de distribuição de fármacos (*drug delivery*) na oncologia é extremamente importante, uma vez que apesar do câncer não ser uma doença negligenciada, a seletividade e segurança da maioria dos fármacos usados são baixas em razão da necessidade de extinguir o câncer como doença primária pela sua gravidade. A nanotecnologia é uma das principais abordagens das pesquisas modernas de *drug delivery*, os nanocarreadores têm propriedades peculiares relacionadas ao tamanho nanométrico e área superficial aumentada, o que lhes confere potencial para modular características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de fármacos. Portanto, estes sistemas são capazes de melhorar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* de fármacos, prolongar o tempo de circulação sanguínea e permitir a liberação controlada e direcionada (SAFARI; ZARNEGAR, 2014; WICKI et al., 2015).

O emprego da nanotecnologia pode ser particularmente necessário para os agentes quimioterápicos macromoleculares como proteínas, os quais apresentam maior instabilidade físico-química, estando susceptíveis à diminuição ou perda da atividade, bem como *in vivo* podem ser imunogênicos. Um exemplo bastante usual de proteína usada na quimioterapia é a L-asparaginase, a qual é a base do esquema terapêutico do tratamento da leucemia linfoblástica aguda com ótimos prognósticos, mas com sérios episódios de toxicidade. Ao longo de seis décadas, abordagens de estudos biotecnológicos têm sido aplicadas para contornar tal problema com existência hoje de quatro formas do medicamento: L-asparaginase obtida de *Escherichia coli*, de *Erwinia chrysanthemi*, a peguilada de *E. coli* e a recombinante de *E. coli*. No entanto, os estudos de nanoencapsulação são poucos e no mercado farmacêutico ainda não há uma formulação

de L-asparaginase em nanocarreador, o que representaria uma alternativa à forma peguilada (BLACKMAN et al., 2018).

Polimerossomos são exemplos de nanocarreadores modernos e essencialmente apropriados para encapsulação de proteínas por sua estrutura vesicular que permite que a proteína seja protegida em um sistema reservatório e a natureza polimérica que é um fator de estabilidade (APOLINÁRIO et al., 2017). No entanto, o caráter inovador deles dentro da nova “Era Criativa da Nanobiotecnologia”, bem como a estrutura complexa de proteínas é um desafio para as nanociências. Diante do exposto, esta pesquisa propôs o desenvolvimento de polimerossomos para encapsulação da L-asparaginase a partir de diferentes hipóteses traçadas. Mediante os resultados obtidos pelo nosso grupo no Laboratório de Nanobiotecnologia da FCF-USP (NANOBIIO), procuramos construir um paradigma com as possibilidades futuras deste novo delineamento terapêutico para quimioterapia da leucemia linfoblástica aguda com L-asparaginase.

REFERÊNCIAS

APOLINÁRIO, A.C.; PACHIONI-VASCONCELOS, J.; PESSOA JR., A.; RANGEL-YAGUI, C. Lipossomos versus polimerossomos: a evolução da bala mágica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 810–817, 2017.

BAUMAN, Z. *Modernidade Líquida*. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2001.

BLACKMAN, L. D.; VARLAS, S.; ARNO, M. C.; HOUSTON, Z. H.; FLETCHER, N. L.; THURECHT, K. J.; HASAN, M.; GIBSON, M. I.; O'REILLY, R. K. Confinement of Therapeutic Enzymes in Selectively Permeable Polymer Vesicles by Polymerization-Induced Self-Assembly (PISA) Reduces Antibody Binding and Proteolytic Susceptibility. **ACS Central Science**, p. acscentsci.8b00168, 2018.

BRASIL. Decreto Federal nº 9.283, de 7 de fevereiro de 2018. Medidas de incentivo à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo, Brasília, DF, 2018.

GRAND VIEW RESEARCH, Inc. **Liposomal Doxorubicin Market Size To Reach \$ 1.39 Billion By 2024**.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**. June.

JOSEPH, A.; CONTINI, C.; CECCHIN, D.; NYBERG, S.; RUIZ-PEREZ, L.; GAITZSCH, J.; FULLSTONE, G.; TIAN, X.; AZIZI, J.; PRESTON, J.; VOLPE, G.; BATTAGLIA, G. Chemotactic synthetic vesicles: Design and applications in blood-brain barrier crossing. **Science Advances**, v. 3, n. 8, p. e1700362, 2017.

DKUSHWAH, V.; KATIYAR, S. S.; AGRAWAL, A. K.; GUPTA, R. C.; JAIN, S.; KATIYAR, S. S.; AGRAWAL, A. K.; GUPTA, R. C.; JAIN, S. Co-delivery of docetaxel and gemcitabine using PEGylated self-assembled stealth nanoparticles for improved breast cancer therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 5, p. 1629–1641, 2018.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014.

VISWANATHAN, G.; HSU, Y. H.; VOON, S. H.; IMAE, T.; SIRIVIRIYANUN, A.; LEE, H. B.; KIEW, L. V.; CHUNG, L. Y.; YUSA, S. I. A Comparative Study of Cellular Uptake and Subcellular Localization of Doxorubicin Loaded in Self-Assemblies of Amphiphilic Copolymers with Pendant Dendron by MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. **Macromolecular Bioscience**, p. 882–895, 2016.

WIBROE, P. P.; AHMADVAND, D.; OGHABIAN, M. A.; YAGHMUR, A.; MOGHIMI, S. M. An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil[®], Caelyx[®], DOXOrubicin, and SinaDoxosome. **Journal of Controlled Release**, v. 221, p. 1–8, 2016.

WICKI, A.; WITZIGMANN, D.; BALASUBRAMANIAN, V.; HUWYLER, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138–157, 2015.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoestruturas poliméricas de autoagregação do tipo polimerossomos para encapsulação da enzima L-asparaginase, como uma alternativa às formas existentes deste biofármaco para tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda. Especificamente, objetivou-se:

- ❑ Delinear estratégias para obtenção de polimerossomos de PEG-PLA, PMPC-PDPA, PEG-PDPA e Pluronic[®] L-21;
- ❑ Caracterizar as nanoestruturas quanto ao tamanho e morfologia com uso de espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de transmissão;
- ❑ Estudar os fatores relacionados à composição e métodos de elaboração associados às características estruturais dos sistemas de polimerossomos obtidos;
- ❑ Desenvolver estratégias de encapsulação da enzima L-asparaginase nos polimerossomos obtidos.

CAPÍTULO I

Visão geral da Tese (Referencial Teórico)

Uma parte do referencial teórico desta tese serviu de base para escrita de um artigo de revisão publicado na revista Química Nova, sendo o primeiro *paper* em língua portuguesa a descrever polimerossomos.

(http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=6602)

Outra parte do referencial teórico serviu de base para a escrita do artigo de revisão *QbD-Based Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles*

CAPÍTULO I- REFERENCIAL TEÓRICO

I.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA): UMA BREVE APRESENTAÇÃO DA PATOLOGIA OBJETO DO TRATAMENTO

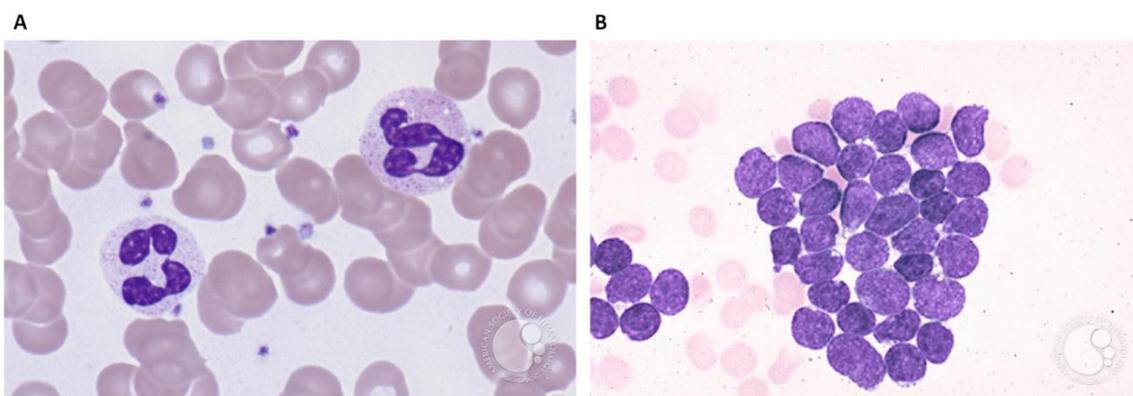
“Untreated acute leukemia is a complex, fatal, neoplastic disease (...). While leukemia as a recognized disease is over 100 years old, the recorded history of effective palliative treatment of acute leukemia dates from the introduction of Aminopterin by Farber and associates in 1948.” (TIVEY, 1954)

A partir do trecho citado acima, se pode inferir que a leucemia linfoblástica aguda (LLA) tem sido durante décadas um objeto de estudo com lacunas a serem preenchidas especialmente na sua terapêutica. O tratamento farmacológico desta patologia teve início na década de 40, no entanto a doença já era conhecida há mais de 100 anos antes. Atualmente, mesmo com toda evolução proporcionada pela pesquisa e desenvolvimento (P&D) na indústria farmacêutica, a LLA é uma patologia que implica em mortalidade em cerca de 10% dos casos relatados em crianças e que permanece como principal causa de morte relacionada ao câncer em crianças e jovens, decorrente de complicações (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; IACOBUCCI et al., 2016).

A LLA é uma neoplasia maligna do sistema linfopoético caracterizada pelo crescimento anormal e pouco diferenciado das células linfoides precursoras das linhagens de linfócitos B ou T, nas quais o tempo de síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA, *do inglês deoxyribonucleic acid*) é maior em relação aos tecidos normais (FONTANA et al., 2018). Como consequência, os elementos hematopoéticos normais são rapidamente substituídos por células linfoides imaturas, daí a classificação como aguda (STIENE-MARTIN, LOTSPEICH-STEININGER & KOEPKE, 1998) o que resulta basicamente em três graves modificações nos parâmetros laboratoriais do paciente:

- Diminuição dos eritrócitos, ocasionando anemia e consequente fadiga, palidez e mal-estar;
- Granulocitopenia, o que gera vulnerabilidade do paciente a infecções, com quadros de febre e calafrios;
- Trombocitopenia, o que leva a episódios de hemorragia, com surgimento de petéquias e epistaxe.

A causa primária de morte relacionada à LLA é a infecção com quadro de sepse e em segundo lugar as hemorragias. No diagnóstico laboratorial mediante a análise do sangue periférico é possível visualizar células que em condições normais seriam apenas observadas na medula óssea como os linfoblastos (Figura I.1). A análise da medula óssea e órgãos linfoides como baço também revela condição de infiltração por estas células (STIENE-MARTIN, LOTSPEICH-STEININGER & KOEPKE, 1998).



Autor: Peter Maslak

Categoria: Medula óssea reativa/ células hematopoiéticas normais, com presença de Os neutrófilos

Data de publicação: 10/01/2008

B

Autores: Peter Maslak; Susan McKenzie;

Categoria: Neoplasias Mieloides e leucemia aguda (OMS 2016) e Neoplasias Linfoblásticas Precursoras/ Nesta imagem os blastos são d um caso de LLA com células precursoras B

Data de publicação: 10/28/2002

Figura I.1- Diagnóstico laboratorial da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA): Em A está representada uma imagem do sangue periférico de uma pessoa sem LLA e em B, a imagem é de um paciente com LLA, sendo evidente a grande quantidade linfoblastos. *Fonte: Adaptada de <http://imagebank.hematology.org/>, acessado em 01 de junho de 2018.*

A causa da LLA é desconhecida, alguns indícios são frutos de estudos epidemiológicos e a patogênese da doença engloba anormalidades moleculares quanto à citogenética, por exemplo translocações entre os genes TEL e AML1, que estão associadas ao melhor prognóstico das crianças durante o tratamento. As translocações

entre os genes BCR e ABL (denominada de cromossomo Filadélfia positivo), por sua vez, predomina nos adultos e resulta na menor sobrevida destes pacientes uma vez que leva à síntese de uma proteína quimérica com atividade tirosina-quinase muito elevada, resultando em proliferação celular. A hiperdiploidia nas crianças com presença de 40-50 cromossomos também é um fator que resulta em maiores chances de cura provavelmente em razão de uma maior sensibilidade aos fármacos (SCHAFFEL & SIMÕES, 2008; RELLING & RAMSEY, 2013; FONTANA et al., 2018)

De modo geral, há muitos outros aspectos relacionados à fisiopatologia da LLA que fugiriam ao objetivo desta tese, assim será enfatizada a abordagem terapêutica da doença com foco no biofármaco L-Asparaginase.

I.2 -L-ASPARAGINASE E UM POUCO DA HISTÓRIA: 60 ANOS DE ESTUDOS

“Like antifolate drugs, the potential utility of L-asparaginase in treating cancer was discovered by accident and represents another example of rational drug design that was later revealed to exploit a metabolic difference between cancer cells and normal cells.” (VANDER HEIDEN, 2011)

A L-Asparaginase (ASNase) (Figura I.2) é sem questionamento algum, o fármaco que atua como componente principal no tratamento da LLA infantil. A terapia geralmente inclui também o uso de corticoides (prednisona e dexametasona) que agem intracelularmente em receptores nucleares induzindo a apoptose das células linfoblásticas (INABA & PUI, 2012), vincristina, que atua nos microtúbulos

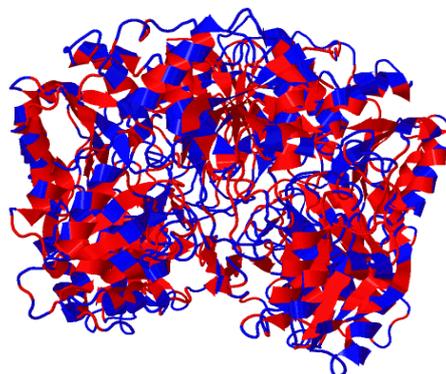


Figura I.2-Cristal da L-asparaginase de *Escherichia coli* (2.40 Å): Representação 3D por cores relacionadas à hidrofobicidade da proteína, sendo o vermelho relativo à hidrofobicidade e o azul hidrofiliicidade. Fonte: Protein Data bank (Código PDB: 3ECA).

bloqueando a divisão celular nas fases de metáfase/anáfase (DUMONTET & SIKIC,

1999), e em alguns esquemas terapêuticos são usadas antraciclinas como a doxorubicina, cujo mecanismo de ação parece envolver prejuízo na função da topoisomerase II levando à intercalação com o DNA ou geração de radicais livres que danificam a membrana celular, DNA e proteínas (THORNA et al., 2012).

A ação farmacológica da ASNase na LLA será discutida no próximo tópico, no entanto, antes vale a pena conhecer as etapas das pesquisas que culminaram com o uso desse biofármaco na terapia desta neoplasia. A evidência da ação da ASNase como agente antineoplásico especificamente para LLA foi pesquisada de modo muito bem planejado por Dolowy em 1966 (DOLOWY et al., 1966). No entanto, os primórdios da conotação antineoplásica da ASNase deriva de observações de Kidd em 1953, em dois artigos nos quais inicialmente foi relatada a redução de linfomas em ratos após aplicação do soro de porquinhos da Índia. Nestas publicações não havia nenhuma associação entre o efeito antineoplásico e a ASNase, pelo contrário foi divulgado que poderiam ser proteínas do sistema complemento as responsáveis pela ação.

Anos após os estudos de Kidd, Broome publicou o primeiro trabalho de apenas duas páginas na revista *Nature* correlacionando a atividade quimioterápica do soro do porquinho da Índia com a enzima ASNase (BROOME, 1961); nesse trabalho ele cita um artigo de Clementi publicado em 1922, o qual afirmou que o soro de porquinho da Índia apresenta altos níveis de ASNase (CLEMENTI, 1922), fato não considerado por Kidd. Em 1963, Broome publicou mais dois trabalhos com a continuação dos seus estudos nos quais evidencia o efeito antilinfoma desta enzima (BROOME, 1963a, 1963b).

Até então, as pesquisas ressaltavam a atividade quimioterápica da ASNase para linfomas, Dolowy em 1966 foi o primeiro a mencionar a atividade antileucêmica da ASNase (DOLOWY et al., 1966). Antes disso, em 1964 um grupo de cientistas publicou um trabalho sobre a obtenção da ASNase a partir de *Escherichia coli*, o que foi reforçado

em 1968 por Roberts, Burson e Hill que publicaram um estudo completo sobre a obtenção da ASNase a partir de *Escherichia coli* (ROBERTS; BURSON; HILL, 1968). Dez anos após este estudo, em 1978, a agência de assuntos regulatórios norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a primeira formulação de ASNase para uso comercial, a Elspar[®] obtida de *E. coli*. Em 1994 foi aprovada a forma peguilada da ASNase de *E. coli*, denominada pergaspargase (Oncaspar[®]), em 2011 foi lançada a Erwinase[®], enzima obtida de *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) (CHEN, 2015) e mais recentemente em 2016 a forma recombinante da ASNase de *E. coli* ASNase (Spectrila[®]) foi aprovada na Europa para administração intravenosa (LANVERS-KAMINSKY, 2017).

Ao longo de quase 60 anos de pesquisas, desde os ensaios de Kidd até hoje, as principais frentes de estudos com a ASNase se concentram em quatro campos: i) biotecnologia com obtenção da enzima a partir de novas fontes, ii) biologia molecular por meio da obtenção de formas recombinantes da proteína, iii) peguilação da enzima nativa e iv) finalmente nanotecnologia, com encapsulação da biomolécula em nanocarreadores ou nanorreatores; todas as abordagens buscam reduzir os múltiplos efeitos adversos oriundos do tratamento com ASNase (os quais serão discutidos no tópico seguinte).

1.2.1 Aspectos farmacológicos e bioquímicos da L-Asparaginase

*“The design of many antineoplastic agents has been based on atom or group replacement in normal metabolites. New dimensions are being added to this approach (...) The potential for developing macromolecular “drugs” such as therapeutic enzymes and peptide hormone analogs must be viewed as a whole **new area for drug design** (HANDSCHUMACHER, 1977)”*

A citação acima sugere que na década 70 os modelos de desenvolvimento de fármacos tradicionais já não eram suficientes para terapêutica do câncer e novas propostas

eram necessárias buscando inovação; como bem cita o autor, macromoléculas como enzimas representariam um novo *insight* e no próprio artigo citado é feita referência à ação farmacológica da ASNase na LLA.

A ASNase, é um tetrâmero constituída por quatro monômeros idênticos (A, B, C e D) com massa molecular total de 140–150 kDa, de modo que A interage com B e C com D (Figura I.3), sendo aceito por alguns que a atividade da enzima seria apenas quando estruturada como tetrâmero. Os sítios ativos da enzima estão localizados entre as subunidades na porção interior dos dímeros, cada dímero teria assim dois sítios ativos formados pelos resíduos do domínio N-terminal que interage com o domínio C-terminal (SWAIN et al., 1993).

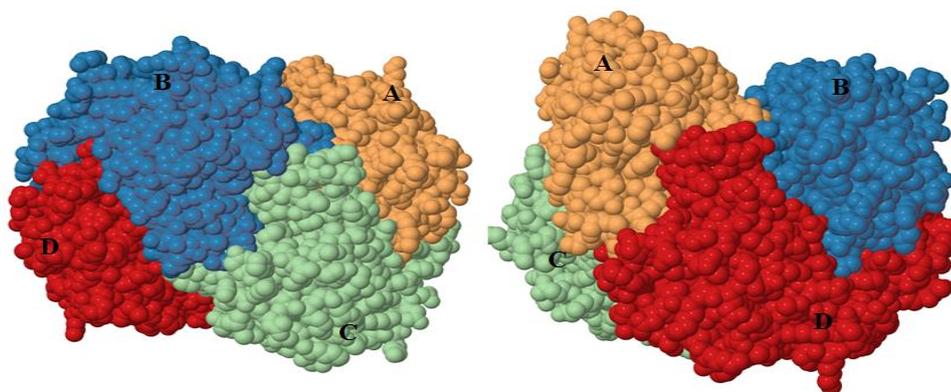


Figura I.3- Esquema do tetrâmero da L-asparaginase, em modelo *space filling*, com seus quatro monômeros. Pode-se ver as interações entre os dímeros A e C, e entre os dímeros B e D, onde ficaram os sítios ativos. Fonte: *Protein Data bank* (Código PDB: 3ECA).

De modo geral, o mecanismo de ação farmacológica de uma enzima ocorre a partir da ligação desta ao seu substrato, a ASNase atua sobre o aminoácido asparagina (Asn) (Figura I.4).

Bioquimicamente, a ASNase leva à depleção da Asn porque é uma amidohidrolase que catalisa a hidrólise deste aminoácido levando à formação dos produtos L-aspartato e amônia por meio de ataque nucleofílico promovido

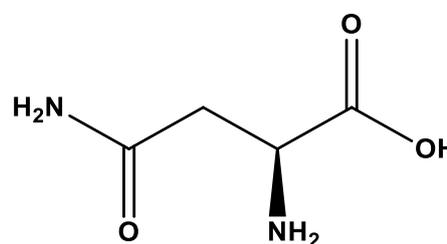


Figura I. 4- Estrutura química do aminoácido L-asparagina. Fonte: *Desenhado pelo autor usando programa Chemdraw.*

por um resíduo de treonina e não de serina como na maioria das hidrolases (VERMA et al., 2014) (Figura I.5).

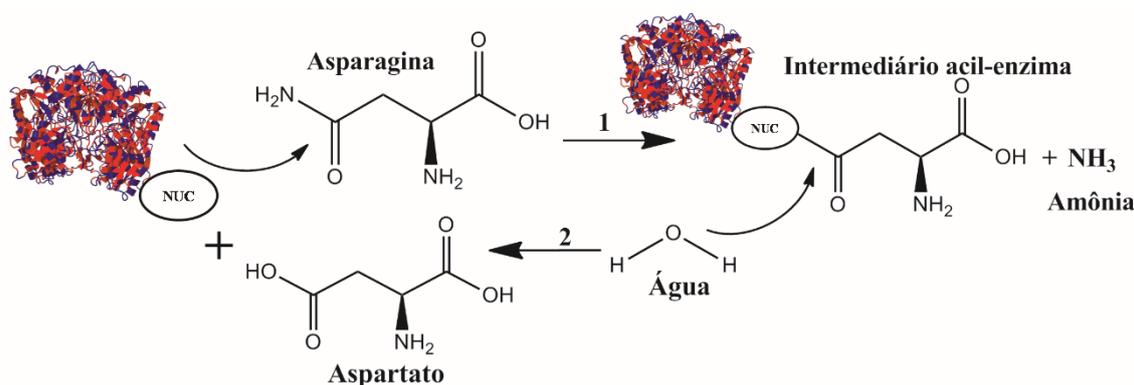


Figura I.5- Esquema do mecanismo de ação hidrolítica da L-asparaginase sobre a asparagina em duas etapas: 1-Primeiro ocorre o ataque nucleofílico da enzima ao substrato asparagina formando um intermediário acil-enzima e amônia. 2-Outro ataque nucleofílico acontece por parte de uma molécula de água que resulta na formação do aspartato e liberação da enzima livre. Fonte: Desenhado pelo autor usando programa Chemdraw.

É aceito que o grupo carboxamida do resíduo T12 do sítio catalítico promove um primeiro ataque nucleofílico formando amônia e um intermediário acil-enzima, o qual trata-se da ASNase ligada covalentemente ao substrato. Em seguida ocorre um segundo ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da Asn com participação dos resíduos K162 e T12 e então ocorre a hidrólise do intermediário levando à formação do aspartato e liberação da enzima. O aspartato é transaminado em oxaloacetato, um intermediário do ciclo de Krebs, ou convertido em fumarato durante o ciclo da uréia (ZHANG et al., 2014).

A Asn exerce importante papel na biossíntese de proteínas, DNA, ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*, RNA), além disso, a fase *gap* G1 da divisão celular é dependente deste aminoácido (UENO et al., 1997). As formas de obtenção de Asn pela célula são basicamente duas: captação da corrente sanguínea e síntese na própria célula. Para as células tumorais, a Asn torna-se um nutriente ainda mais necessário, uma vez que estas apresentam um aumento na taxa de proliferação e consequentemente metabolismo acelerado. Aliado a isto, talvez o aspecto mais relevante é que, algumas

linhagens de células tumorais não conseguem sintetizar Asn *de novo* porque apresentam falta ou baixos níveis da enzima asparagina sintetase (ASNs) (ALI et al., 2016).

A ASNs catalisa a reação dependente de trifosfato de adenosina (*do inglês, Adenosine triphosphate, ATP*), tendo a glutamina como fonte de nitrogênio, na qual converte os aminoácidos aspartato e glutamina em Asn e glutamato (BALASUBRAMANIAN; BUTTERWORTH; KILBERG, 2013). Do ponto de vista genético, é aceito que a expressão do gene para síntese desta proteína é reprimida em células leucêmicas, de modo resumido, o gene responsável pela produção da ASNs em pacientes portadores de LLA passaria por um mecanismo epigenético de silenciamento gênico por meio da metilação em resíduos de cisteínas das chamadas ilhas de CpG, que são dinucleotídeos presentes em genes promotores (AKAGI et al., 2006).

Diante do exposto, percebe-se que o mecanismo de ação da ASNase no tratamento da LLA é por meio da degradação da Asn do meio extracelular, que é a fonte da qual as células tumorais obtêm esse aminoácido. Ocorre assim a inibição de fase G1 do processo de mitose o que provoca a morte da célula leucêmica por apoptose.

A toxicidade da ASNase mantém relação com seu mecanismo de ação uma vez que a enzima também pode possuir atividade glutaminásica, ou seja, o mecanismo de hidrólise também pode ocorrer com menor afinidade sobre a glutamina com formação de glutamato e amônia, o que resulta em reações adversas como hepatotoxicidade, pancreatite e imunossupressão (SUGIMOTO et al., 2015). Alguns autores, entretanto, já citam que sem a atividade glutaminásica a ASNase não teria efeito sobre o substrato Asn. Um estudo recente afirma que essa correlação só seria verdadeira no caso das células apresentarem ASNs (CHAN et al., 2014). Também são relatados casos de trombose, além de deficiências nos fatores de coagulação como plasminogênio, proteína C, proteína S e antitrombina. Uma explicação para isto seria que a ASNase reduziria a produção de

proteínas homeostáticas, bem como promoveria a ativação de células endoteliais provocando trombose e consumo de proteínas da homeostase (TRUELOVE; FIELDING; HUNT, 2013). Outra razão para toxicidade da ASNase são as reações de hipersensibilidade de alguns pacientes como edema, urticária e até choque anafilático em razão da origem bacteriana da enzima (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

I.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E NANOENCAPSULAÇÃO: CASO DA L-ASPARAGINASE

A utilização de enzimas como biofármacos não tem como problemática apenas a toxicidade e a imunogenicidade relatadas no tópico anterior, mas também é difícil a manutenção da estrutura e estabilidade de proteínas em prateleira (*shelf-life*), a qual está sujeita a mudanças conformacionais, agregação e desnaturação resultando na diminuição ou perda da atividade. A imobilização de enzimas é definida como o confinamento de uma enzima em uma fase diferente do substrato ou produto e é uma alternativa para manter a estabilidade da enzima (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012).

No caso da ASNase, um dos problemas mais complexos para se contornar é a inativação silenciosa da enzima durante o tratamento devido à presença de anticorpos anti-asparaginases (ZALEWSKA-SZEWCZYK et al., 2007) e também proteases lisossomais presentes nas células leucêmicas (PATEL et al., 2009). A imobilização da enzima poderia ser uma alternativa para contornar este empecilho, uma vez que protege a enzima da ação de proteases e amplia o tempo de meia-vida catalítica *in vivo* (BOSIO et al., 2016).

Há diferentes formas de imobilização enzimática, sendo relatados na literatura três principais tipos: adsorção, ligações covalentes como *crosslinking* e encapsulação, especialmente em nanoestruturas. A adsorção resulta de interações hidrofóbicas entre a enzima e o carreador incluindo forças de van der Waals, interações iônicas e ligações de

hidrogênio. Essas interações são relativamente fracas, sem alterações na estrutura nativa da enzima (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). As ligações covalentes ocorrem na própria cadeia de aminoácidos em resíduos como os de arginina, lisina, ácido aspártico e histidina. Na imobilização por *crosslinking* é utilizado um agente bifuncional como, por exemplo, glutaraldeído. A encapsulação trata-se da imobilização por inclusão, quase sempre sem ligação ao material carreador e é bastante explorada no campo farmacêutico uma vez que protege a enzima de exposição a proteases, agregação e mudanças conformacionais (ROTHER & NIDETZKY, 2014).

No caso da ASNase, a literatura revela diversos casos de imobilização da enzima, VINA, KARSAKEVICH & BEKERS (2001) relataram a produção de um gliconjugado da L-asparaginase de *Erwinia carotovora* por meio de ligação covalente ao polissacarídeo levano através de uma reação de oxidação com uso de periodato de potássio seguido por alquilação redutiva sendo que a reação ocorre nos resíduos de lisina da enzima. A conjugação foi realizada na faixa de pH 9-9,2 na qual os grupamentos amínicos encontram-se preferencialmente desprotonados. Segundo os autores, quando utilizados levanos de alto peso molecular observou-se diminuição da atividade da ASNase, aumento do K_M da enzima, aumento na faixa de pH ótimo e aumento da estabilidade térmica. A imobilização covalente da ASNase foi também feita em suportes de agarose altamente ativados seguido por *crosslinking* com aldeídos de alto peso molecular obtidos de dextrana. A técnica resultou em diminuição na atividade da enzima imobilizada à medida que o suporte era mais ativo talvez por ocasionar alguma modificação na estrutura quaternária da proteína, no entanto, resultou em aumento da meia-vida da ASNase (BALCÃO et al., 2001).

Imobilização por *crosslinking* com glutaraldeído também já foi realizada empregando-se sericina (proteína da seda), o que resultou em maior estabilidade térmica,

menor K_M e maior resistência à degradação por tripsina (ZHANG et al., 2004). A ASNase imobilizada em superfícies de poli(metil metacrilato) com amido resultou em todas as vantagens citadas acima e ainda aumentou a faixa de pH ótimo (ULU; KOYTEPE; ATES, 2016). A encapsulação da enzima, especialmente em nanopartículas é uma vertente de grandes possibilidades uma vez que a nanotecnologia pode proteger a enzima de possíveis formas de inativação *in vivo* (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

De modo geral, há uma gama de diferentes materiais nos quais a ASNase já foi adsorvida: Albumina, peptídeos poli (D,L-alanina), dextrana, sulfato de dextrana, quitosana, N,O-carboximetilquitosana, frutose, levan, inulina, alginato, fibra de seda, sericina de seda ácidos graxos BSA, fosfolipídeos, PEG, PEG-albumina alginato-gelatina de cálcio, poli (dextrano / L-arginina)-CaCO₃, PEG-quitosana e glicol-quitosana, entre outros (ULU; ATES, 2017).

A nanoencapsulação da ASNase em nanopartículas clássicas (nanoesferas e nanocápsulas) e lipossomos já foi descrita na literatura, no entanto ainda não existem formulações com esses nanocarreadores em uso clínico (CRUZ et al., 1993; TEODOR et al., 2009; HA et al., 2010; ZHANG et al., 2011). A tabela I.1 exibe alguns exemplos de estratégias de nanoencapsulação já estudadas para ASNase.

Tabela I.1- Estratégias de nanoencapsulação para L-Asparaginase (ASNase).

Sistema	Polímero/metal/lipídio	Técnica	Caracterização das nanoestruturas	Eficiência de encapsulação ou recuperação de atividade	Referência
Nanopartículas contendo a enzima peguilada	Poli (ácido láctico-co-glicólico) 50:50 com massa molecular 10 kDa	Dupla emulsificação	Tamanho e morfologia por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	77,88 % para ASNase livre e 65,1 % peguilada	(SURI VASUDEV et al., 2011)
Nanopartículas	Quitosana e Tripolifosfato de sódio	Gelatinização ionotrópica	Tamanho e morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e DLS	59,1 -70,8 % dependendo das proporções dos polímeros usados	(BAHREINI et al., 2014)
Nanopartículas	Poli (ácido láctico-co-glicólico) 50:50 com massa molecular 30 kDa	Dupla emulsificação	Tamanho e morfologia por MET	5 %	(MANUELA GASPAR et al., 1998)
Nanopartículas	Poli-(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato)	Dupla emulsificação	Tamanho e morfologia por MEV	23,7 % para enzima não peguilada e 27,9 % para enzima peguilada	(BARAN; AZURE, 2002)
Nanopartículas	Poli (ácido láctico-co-glicólico) 50:50	Dupla emulsificação	Tamanho por difração a laser	26-70 % dependendo da fase aquosa usada	(WOLF et al., 2003)
Micropartículas	Sericina da seda com 50-200KDa	Reação <i>crosslink</i> com glutaraldeído	Tamanho por difração a laser	Retenção de 62 % de atividade	(ZHANG et al., 2004)

Continuação Tabela I.2- Estratégias de nanoencapsulação para L Asparaginase (ASNase).

Sistema	Polímero/metal/lipídio	Técnica	Caracterização das nanoestruturas	Eficiência de encapsulação ou recuperação de atividade	Referência
Nanoesferas ocas	Alginato- <i>graft</i> -polietilenoglicol, α -ciclodextrina,	Autoagregação	Tamanho e morfologia por MET e DLS	37-80 % dependendo da concentração de polímero usado	(HA et al., 2010)
Nanopartículas magnéticas	Óxido de ferro, óxido de silício, poli (2-vinil-4,4-dimetil azalactona)	Formação em meio alcalino	Tamanho e morfologia por MET e DLS	318 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de enzima por nanopartícula	(MU et al., 2014)
Lipossomos	Fosfatidilcolina, colesterol e outros lipídios	Hidratação do filme seguida ou não por extrusão	Tamanho por DLS	40 % para amostra extrudada e 80 % para amostra não-extrudada	(CRUZ; GASPAR, 1993)
Lipossomos	Fosfatidilcolina, colesterol e outros lipídios com e sem carga	Hidratação do filme seguida de filtração	Tamanho e morfologia por DLS e MEV, potencial zeta	1,95% para lipídeos neutros 2,39 para positivos e 2,35 % para negativos	(ANINDITA; VENKATESH, 2012)
Lipossomos	Fosfolipídios de soja e colesterol	Evaporação em fase reversa	Tamanho e morfologia por MET e DLS, potencial zeta	66,47 %	(WAN et al., 2016)
Vesículas complexas de políons (PICsomas)	Polietilenoglicol (PEG) e homoionômeros	Interação eletrostática em meio aquoso entre cargas opostas	Tamanho e morfologia por DLS e Crio-MET	91% dos PICsomas continham pelo menos uma ASNase	(ULU & ATES, 2017)
Polimerossomos	Poli (óxido de etileno) -poli (2-hidroxipropil metacrilate)	Autoagregação induzida por polimerização	Tamanho e morfologia por DLS e Crio-MET	9%	(BLACKMAN et al., 2018)

Ao observar-se a Tabela I.1 é possível ver uma predominância de sistemas de liberação para ASNase com emprego de polímeros, o que confere estabilidade ao nanocarreador em relação por exemplo a lipídios, bem como possivelmente possuindo características furtivas, evita a imediata imunogenicidade da enzima. Por outro lado, a nanoestrutura vesicular dos lipossomos (LP) agrega a este nanocarreador inúmeras possibilidades de aplicações na indústria farmacêutica por permitir a encapsulação em um *core* com caráter hidrofílico, o que seria ideal para proteínas como a ASNase, no entanto, como já mencionado acima, a natureza lipídica destes nanocarreadores poderia levar à instabilidade destas nanoestruturas (DISCHER et al., 1999). Neste sentido, os polimerossomos (PL) são vesículas poliméricas análogas aos LP, porém a constituição não é baseada em fosfolipídios, mas em copolímeros anfifílicos. Assim, PL unem as vantagens da estabilidade conferida pelas cadeias poliméricas com a estrutura de reservatório vesicular. O tópico seguinte detalha essas nanoestruturas que são foco desta tese.

I.4 POLIMEROSSOMOS: UMA BREVE CONTEXTUALIZAÇÃO

“Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers”
(DISCHER et al., 1999)

A citação acima trata-se do título do primeiro trabalho acadêmico que nomeou vesículas poliméricas como polimerossomos (Figura I.6) e deu início ao uso da terminologia especialmente na nanotecnologia farmacêutica, sendo os PL considerados um dos mais modernos sistemas de *drug delivery*. Apesar de não ter passado nem duas décadas desde a publicação deste artigo, estudos referentes a PL têm evoluído

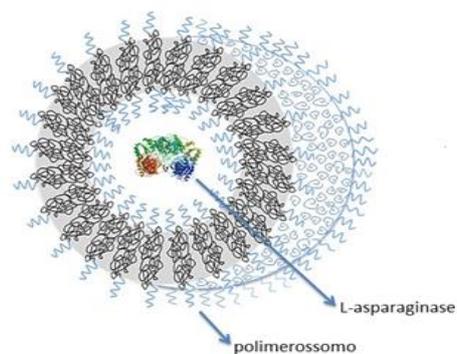


Figura I. 6-Ilustração de um polimerossomo com a proteína Asparaginase encapsulada no core hidrofílico, é possível ver em cinza a membrana hidrofóbica que também pode ser um espaço para encapsulação de fármacos com caráter apolar e em azul a porção externa da vesícula contendo os blocos de polietilenoglicol. Fonte: Desenhado pelo autor.

constantemente, contudo nenhum produto está disponível no mercado. Até agora, apenas uma companhia de Singapura tem uma licença exclusiva para vacinas veterinárias usando a tecnologia baseada em PL, com a proposta de desenvolver sistemas com proteínas encapsuladas na membrana de tal modo que estas proteínas fiquem estáveis e sejam prontamente apresentadas às células de defesa do corpo para gerar respostas imunes.

Os PL podem ser definidos sob diversos ângulos de visão. A própria nomenclatura criada em 1999 por DISCHER et al.(1999) faz uma analogia morfológica aos lipossomos e assim ficaria simples compreendê-los como vesículas, que diferente dos LP originados por fosfolipídios, são constituídas por polímeros anfifílicos. Do ponto de vista físico-químico, há uma forte correlação entre a produção das vesículas e os processos cinéticos e termodinâmicos gerados pelo efeito hidrofóbico na presença da água. Nesse contexto, os PL são descritos como estruturas supramoleculares na forma vesicular originadas a partir da autoagregação de copolímeros anfifílicos em contato com meio aquoso em razão da existência de uma porção hidrofóbica em determinadas proporções nestes polímeros que tende a segregar do meio devido ao efeito hidrofóbico.

Na nanotecnologia seu emprego como estratégia de *drug delivery* tem se mostrado tão promissor que podem ser designados como nanocarreadores (NC) poliméricos tanto para fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos em razão do caráter vesicular (WU et al., 2014). Do conceito análogo aos lipossomos, passando pela referência aos fenômenos físico-químicos e pelo ápice das aplicações nas nanociências, é possível afirmar que se tratam certamente de estruturas dinâmicas e estáveis para carreamento de fármacos, as quais possuem características comuns a nanocarreadores já consagrados no mercado farmacêutico como os próprios lipossomos e as nanocápsulas poliméricas.

No entanto, à medida que os estudos de produção e aplicação avançam, novos *insights* são agregados a estes conceitos, de modo que a imagem de vesícula esférica

formada espontaneamente por copolímeros para liberação de fármacos vem sendo substituída por sistemas de PL formados a partir de técnicas que fornecem energia ao sistema induzindo a formação da estrutura com tamanhos e formas desejadas e até favorecendo a encapsulação de moléculas maiores. Também têm sido divulgadas pesquisas com polímeros responsivos gerando sistemas que respondam a variações locais de pH e temperatura, o que remete provavelmente às dificuldades relacionadas à liberação do fármaco confinado nas vesículas (GAITZSCH et al., 2011). Aliado as estas inovações, o conceito de PL permeáveis com a possibilidade de se obter nanobioreatores, nos quais poderiam ocorrer processos bioquímicos como uma catálise enzimática (MESSAGER et al., 2016) ou mesmo vesículas baseadas em quimiotaxia vem sendo relatados na comunidade científica e mesmo que como provas de conceito podem ser bases para futuras grandes inovações farmacêuticas (JOSEPH et al., 2018).

O processo de agregação dos copolímeros abrange aspectos físico-químicos debatidos há décadas sobre o que provocaria o comportamento destas macromoléculas quando em soluções aquosas e são relatadas variáveis como concentração e conformação geométrica dos polímeros, método de preparo além do efeito hidrofóbico como fatores que explicariam a formação dos PL (BLEUL; THIERMANN; MASKOS, 2015).

A aplicação destes NC é indiscutivelmente um tópico atraente nas ciências farmacêuticas e vem sendo amplamente relatada pela possibilidade de aplicação nos estudos de encapsulação de fármacos com diferentes polaridades (WU et al., 2014) e biofármacos macromoleculares como proteínas. No entanto, as definições quanto à otimização da taxa de encapsulação das moléculas e o entendimento das interações químicas existentes entre fármaco e os sistemas ainda apresentam lacunas.

1.4.1 Princípios físico-químicos de formação dos polimerossomos

1.4.1.1 Copolímeros anfifílicos

“Copolymers have become increasingly more important materials as routine design and synthesis of these polymers has become practical.”

(O'MAHONY et al., 2011)

Quaisquer que sejam as abordagens para o desenvolvimento de PL, o foco inicial é a unidade básica de constituição das vesículas, que são os copolímeros anfifílicos (CA), sendo que as características das vesículas, especialmente das bicamadas, são inteiramente relacionadas àsquelas dos CA (BERMUDEZ et al., 2002). Os CA contêm duas ou mais sequências de homopolímeros quimicamente distintas quanto ao caráter hidrofílico unidas por ligação covalente (DISCHER & EISENBERG, 2002; PAWAR et al., 2013). Daí as denominações diblocos, triblocos e multiblocos de acordo com a quantidade de porções interligadas.

O tipo de auto-organização dos CA depende primeiramente de três parâmetros: a massa molecular média (M_w), a massa ou fração de volume de cada bloco (f) e a energia efetiva de interação entre monômeros nos blocos (DISCHER & EISENBERG, 2002). Outras características dos copolímeros como configuração esticada ou enrolada de um dos blocos influenciando no volume deste também pode exercer efeitos na auto-organização (SMART et al., 2008). CA sintéticos podem apresentar considerável polidispersão, ou seja, podem apresentar variação no grau de polimerização das moléculas e, portanto, conter cadeias de polímeros de tamanhos desiguais.

1.4.1.2 Copolímeros anfifílicos: Autoagregação em estruturas supramoleculares como vesículas poliméricas

“We assume that the physical forces acting between aggregates of molecules and between individual molecules should explain many of their associative properties; but available physical methods have been inadequate for measuring or computing these forces in solids or liquids.”

(PARSEGIAN, 1973)

“Understanding the self-assembly is a fundamental challenge in modern science.”

(O'MAHONY et al., 2011)

O processo de auto-organização de moléculas anfifílicas é um campo extremamente instigante nas ciências e inclusive já foi tema de uma dicotomia entre físicos-químicos e biólogos como relata ISRAELACHVILI e colaboradores em 1975. De um lado os físicos acreditavam que tal fenômeno seria resultante da entropia e do outro os biólogos apontavam que a razão seria a conformação geométrica da molécula anfifílica; o próprio grupo de Israelachvili combinou estes dois axiomas reconhecendo que ambos se completariam (ISRAELACHVILI & MITCHELL, 1975).

Atualmente, apesar das inovações científicas é possível ver que os grupos de pesquisa ainda enfatizam a autoagregação de CA, especialmente nas discussões envolvendo a formação vesículas poliméricas, por embasamentos diferentes que, no entanto, estão interligados. Aceitar que exista uma regra para obtenção de sistemas autoagregados com determinada morfologia é algo contestável, na verdade há um conjunto de fatores que possibilitam a formação e mais complexamente a transformação destas estruturas no que é chamado de mesofase.

Sem dúvidas um dos fundamentos teóricos que explicam a autoagregação de moléculas anfifílicas é a razão entre as porções hidrofílica e hidrofóbica das mesmas, o que determina a curvatura da interface hidrofílica/hidrofóbica no agregado formado (ANTONIETTI; FÖRSTER, 2003). Portanto, CA se auto-organizam quando estão em água dependendo da relação entre as massas moleculares dos blocos hidrofílico e hidrofóbico (MAI & EISENBERG, 2012). A quantidade crítica de água que demanda o início da agregação depende dos diferentes fatores controlados durante o processo de produção (BLEUL; THIERMANN; MASKOS, 2015).

Os estudos sobre a formação de vesículas poliméricas iniciaram em 1994. (HONDA; SAKAKI; NOSE, 1994) e em 1999 por Dennis Discher, ao denominar as vesículas como PL, também descreveu sobre organização morfológica, elaboração e aplicação destas nanoestruturas (DISCHER et al., 1999). Na década de 90 foi amplamente aceito que o tipo de auto-organização dos CA pode ser deduzido a partir do *critical packing parameter* (p) descrito na equação I.1 (Eq. I.1) (OLTRA; NAIR; DISCHER, 2014), conceito introduzido em 1975 por Israelachvili para os tensoativos, moléculas anfifílicas clássicas (ISRAELACHVILI, 1975).

$$p = \frac{v}{a_0 + l_c} \quad \text{Equação I.1}$$

Em que: v é o volume da cadeia hidrofóbica, a_0 é a área da seção transversal da porção hidrofílica da molécula anfifílica e l_c é o comprimento da cadeia hidrofóbica.

A Tabela I.2, adaptada de ISRAELACHVILI (1975) apresenta classificação teórica das morfologias encontradas de acordo com o valor de p .

Tabela I.2- Classificação teórica dos sistemas formados a partir do parâmetro de empacotamento crítico.

Parâmetro de empacotamento crítico	Geometria preferencial do agregado
$p < 1/3$	micelas esféricas
$1/3 < p < 1/2$	micelas cilíndricas
$1/2 < p < 1$	lamelas flexíveis e vesículas
$p = 1$	lamelas planares/bicamadas

Para CA com porção hidrofílica formada por poli(óxido de etileno) (PEG), pode-se ainda inferir o tipo de morfologia a partir do parâmetro f ($0 < f < 1$), que representa o volume da fração hidrofílica e que pode ser calculado facilmente a partir dos valores de massa das frações hidrofílica e hidrofóbica usando a densidade de fusão dos homopolímeros (Tabela I.3) (DISCHER et al., 2007).

Tabela I.3- Classificação teórica dos sistemas formados pela autoagregação de copolímeros anfifílicos a partir do valor da fração hidrofílica (f).

Volume da fração hidrofílica (f) %	Nanoestruturas formadas
$40 < f < 25$	Polimerossomos
$50 < f < 40$	micelas poliméricas cilíndricas
$f > 50$	micelas poliméricas esféricas

Do ponto de vista termodinâmico, a formação das micelas e/ou vesículas é influenciada pela energia livre do sistema, expressa pela equação I.2, respeitando-se o princípio da minimização de energia, pelo qual processos que levam a uma diminuição na energia livre de Gibbs são considerados espontâneos.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação I.2}$$

em que ΔG é a variação da energia livre de Gibbs, ΔH e ΔS são respectivamente as variações de entalpia e entropia do sistema e T é a temperatura.

O balanço das interações intra e intermoleculares entre o solvente e as moléculas de copolímero resultam na contribuição entálpica, incluindo interações de van der Waals e ligações de hidrogênio. O ganho entrópico é oriundo da liberdade conformacional das moléculas de água que antes da agregação encontravam-se ordenadas na vizinhança dos grupos hidrofóbicos dos unímeros solúveis de copolímero (HOCINE & LI, 2013).

Outros estudos, passaram a focar não apenas na razão hidrofílica/hidrofóbica, mas também nas concentrações dos CA. Em meio aquoso, os CA se auto-organizam em cristais líquidos liotrópicos e a transição da fase liotrópica para estruturas isotrópicas poderia acontecer com a passagem das lamelas em pilhas para estruturas fechadas (vesículas) com aumento da fase aquosa (BATTAGLIA & RYAN, 2005).

Battaglia & Ryan descreveram o espaçamento d em estruturas lamelares como sendo a espessura da bicamada hidrofóbica adicionada de uma porção hidrofílica hidratada chamada de *brush* e este ao espaço d foi denominado d_{hid} . Além disso,

enfatazaram que as interações de van der Waals são equilibradas pela repulsão decorrente da hidratação do *brush* polimérico sob pressão osmótica. No entanto, sob diluição, as forças de hidratação dominam e as lamelas começam a se separar umas das outras e as bordas conduzem às lamelas a novos padrões de organização, como ilustrado na Figura I.7.

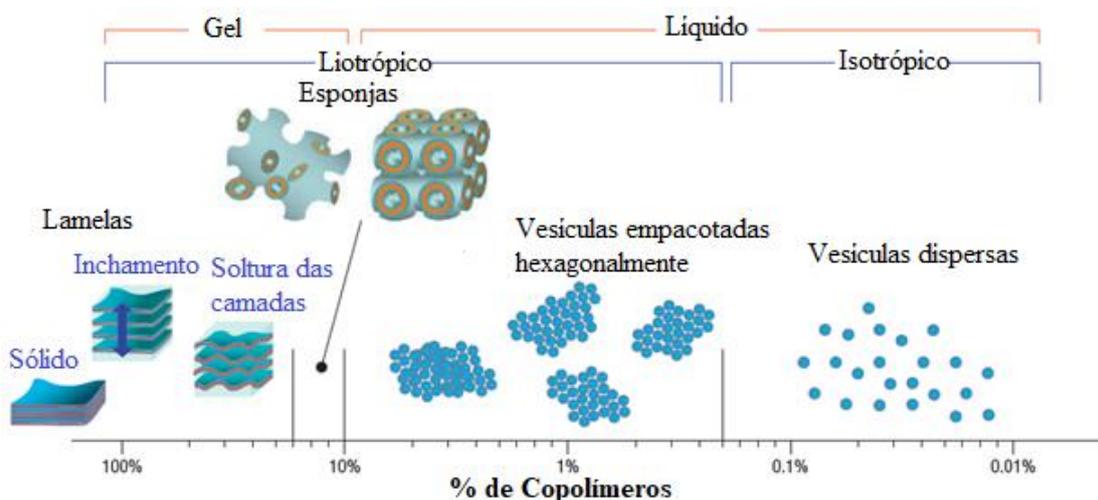


Figura I.7- Auto-organização dos copolímeros anfifílicos. Em altas concentrações são formadas estruturas liotrópicas conhecidas como cristais líquidos, que são arranjos cuja morfologia possui lamelas. Sob hidratação, esses sistemas passam para estados de esponjas interligadas, vesículas empacotadas de modo hexagonal e, finalmente, vesículas isotrópicas. *Fonte: Adaptada de BATTAGLIA & RYAN (2005).*

Dois mecanismos têm sido usados para explicar a formação dos PL. O primeiro sugere que ocorre o crescimento de micelas poliméricas em bicamadas, que por sua vez se auto-organizam em PL; o outro mecanismo também se embasa no crescimento de micelas, entretanto acrescenta que ocorreria a difusão de solvente dentro destas micelas e em seguida a formação dos PL como ilustrado na Figura I.8 (BLEUL; THIERMANN; MASKOS, 2015). Desse modo, tem sido aceito por alguns autores que as micelas esféricas seriam nanoestruturas dos quais se formariam os demais tipos de agregados como micelas cilíndricas, PL entre outros (MAI; EISENBERG, 2012).

Por meio da variação do tamanho dos blocos do CA, determinadas morfologias das nanoestruturas de autoagregação podem ser obtidas em detrimento a outras e ainda é possível ajustar o tamanho, propriedades mecânicas e a taxa de encapsulação e liberação

de fármacos encapsulados nos PL. Mais de 20 formas de agregados nanoestruturados já foram identificadas a partir da autoagregação de CA (BERMUDEZ et al., 2002).

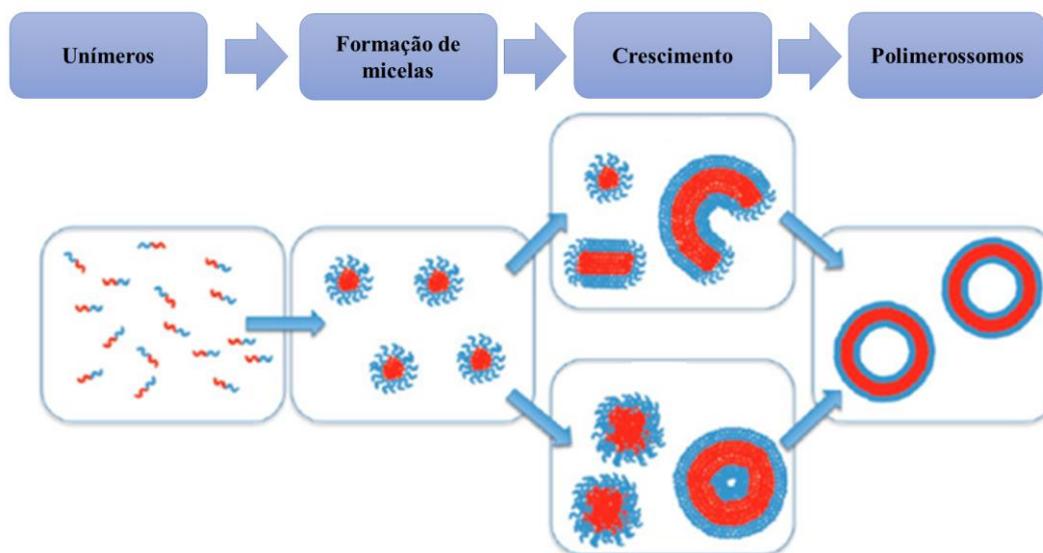


Figura I.8- Mecanismos propostos para explicar a formação dos polimerossomos: 1) Ocorre o crescimento de micelas em bicamadas que se auto-organizam em vesículas 2) Ocorre o crescimento de micelas, entretanto ocorre a difusão de solvente dentro destas micelas e posteriormente a formação das vesículas. *Fonte: Adaptada de BLEUL; THIERMANN; MASKOS (2015).*

1.4.2 Métodos de preparo

Os principais métodos de preparo de PL incluem autoagregação direta, mediante a dissolução dos CA em meio aquoso, hidratação de um filme polimérico fino do CA, troca de solvente ou temperatura e de pH e dupla emulsificação com evaporação do solvente (LIAO et al., 2012; SHEN; EISENBERG, 1999).

A formação espontânea de PL já foi relatada em certas condições, por exemplo alguns copolímeros são solúveis em determinadas faixas de pH (SUN et al., 2014), no entanto no geral são necessárias etapas que forneçam algum nível de energia (HOWSE et al., 2009).

1.4.2.1 Hidratação do Filme polimérico

O método da hidratação do filme (HF) consiste na hidratação de um filme polimérico fino formado a partir da lenta evaporação de um solvente orgânico no qual o CA é previamente dissolvido, quando se almeja a formação de PL irregulares (*patchy polymersomes*), são usadas misturas de CA (RUIZ-PEREZ et al., 2016). A hidratação deve ocorrer sob agitação vigorosa, alguns trabalhos relatam semanas de agitação (ROBERTSON et al., 2014).

Battaglia & Ryan (2006) investigaram a hidratação de filmes poliméricos empregando microscopia confocal e observaram que, sob condições de hidratação sem fornecimento de energia, ocorria a formação de membranas em protrusão como dedos. Essas membranas tubulares podem crescer e formar vesículas devido à difusão do CP na fase aquosa e à difusão desta no CP. A diferença de emissão de fluorescência relativa em dois extremos ao longo do tempo indicou que a interface móvel causa diminuição no gradiente de concentração e, conseqüentemente, isso leva à formação de membranas tubulares nas interfaces. Quando se utilizou pulsos elétricos, a difusão foi fortemente aumentada e ocorreu uma formação rápida e completa de vesículas, que depois se separaram da interface.

A HF em geral vem seguida de alguma outra técnica, pós-filme, como sonicação em banho de ultrassom, ciclo de resfriamento e aquecimento ou extrusão, visando reduzir o tamanho das vesículas e diminuir a polidispersão (LETFORD; BURT, 2007). A eletroporação também é uma técnica complementar à HF, quando se deseja encapsulação em vesículas pré-formadas. Consiste na aplicação de um campo elétrico (Figura I.9) que, dependendo

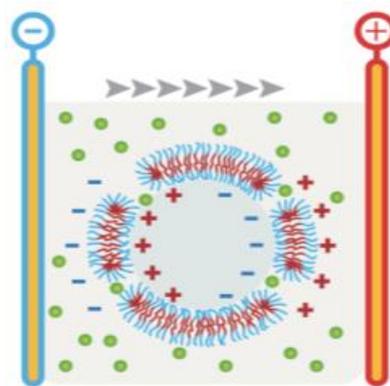


Figura I.9-Representação da eletroporação de polimerossomos de copolímeros dibloco. As amostras de polimerossomos preparados são colocados em cubetas de eletroporação juntamente com a molécula que se deseja encapsular e após aplicação de campo elétrico, poros provisórios são formados nos polimerossomos e as moléculas podem ser encapsuladas. *Fonte: Adaptada de CHIERICO (2015).*

do tamanho das vesículas e voltagem aplicada, número, duração e frequência dos pulsos, abre temporariamente poros nanométricos na membrana da vesícula permitindo a passagem de substâncias para encapsulação (BAIN et al., 2015).

Alguns trabalhos relatam sucesso no emprego desta técnica para encapsulação de biomoléculas como proteínas (WANG et al., 2012).

I.4.2.2 Método da troca da solvente

O método da troca da solvente forma PL por dois modos: pela dissolução dos CA em um solvente orgânico miscível em fase aquosa, que dissolva todos os blocos do CA, seguido de adição lentamente da fase aquosa à solução orgânica contendo o CA ou por injeção da fase orgânica na fase aquosa, havendo precipitação dos PL, também sendo denominada de nanoprecipitação. Posteriormente é realizada a remoção do solvente por meio de diálise ou evaporação (LEE; FEIJEN, 2012).

I.4.2.3 Técnica da dupla emulsificação

Pela técnica da dupla emulsificação (DE), os unímeros de CAs dissolvidas na fase oleosa e se auto-organizam em PL após evaporação da fase orgânica (SHUM et al., 2011). Neste método, são formadas emulsões do tipo água-em-óleo-em-água e, comumente, dispositivos microfluídicos são empregados como suporte para formar os PL (JANG et al., 2015). Estes dispositivos permitem a manipulação precisa de micro-fluxos em microcanais para gerar gotículas de emulsão uniformes com controle de tamanho (ZHANG et al., 2015).

I.4.2.4 Técnica da troca de pH

Outro método que vem sendo empregado na produção de PL é a troca de pH. Neste caso o CA deve apresentar um grupamento ionizável com pKa que permita que seja dissolvido em água em uma determinada faixa de pH e, à medida que o pH é alterado,

ocorre a autoagregação do CA. Este método vem sendo amplamente empregado por Battaglia e colaboradores na elaboração de PL formados pelos CA poli (2-metacrilóiloxietil fosforilcolina)-b-poli(2-diisopropilamino etil metacrilato (PMPC-PDPA) e poli (óxido de etileno)-b-poli(2-diisopropilamino etil metacrilato (PEG-PDPA). Os grupos de amina terciária nas cadeias PDPA são protonados abaixo do pKa de 6,4 e, portanto, o CA é completamente hidrofílico, permitindo a sua dissolução molecular em meio aquoso. Acima do pH 6,4, os grupamentos amínicos do PDPA tornam-se desprotonados conferindo hidrofobicidade a este bloco, levando a autoagregação do CA em PL (PEARSON et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- AKAGI, T.; YIN, D.; KAWAMATA, N.; BARTRAM, C. R.; HOFMANN, W.-K.; WOLF, I.; MILLER, C. W.; KOEFFLER, H. P. Methylation analysis of asparagine synthetase gene in acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia**, v. 20, n. 7, p. 1303–6, 2006.
- ALI, U.; NAVEED, M.; ULLAH, A.; ALI, K.; SHAH, S. A.; FAHAD, S.; MUMTAZ, A. S. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European journal of pharmacology**, v. 771, p. 199–210, 2016.
- ANINDITA, D.; VENKATESH, N. Design and evaluation of liposomal delivery system for L-Asparaginase. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 8427105346, p. 112–117, 2012.
- ANTONIETTI, M.; FÖRSTER, S. Vesicles and Liposomes: A Self-Assembly Principle Beyond Lipids. **Advanced Materials**, v. 15, n. 16, p. 1323–1333, 2003.
- BAHREINI, E.; AGHAIYPOUR, K.; ABBASALIPOURKABIR, R.; MOKARRAM, A.; GOODARZI, M.; SAIDIJAM, M. Preparation and nanoencapsulation of l-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 340, 2014.
- BAIN, J.; RUIZ-PÉREZ, L.; KENNERLEY, A. J.; MUENCH, S. P.; THOMPSON, R.; BATTAGLIA, G.; STANILAND, S. S. In situ formation of magnetopolymersomes via electroporation for MRI. **Scientific reports**, v. 5, p. 14311, 2015.
- BALASUBRAMANIAN, M. N.; BUTTERWORTH, E. a; KILBERG, M. S. Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 304, n. 8, p. E789-99, 2013.
- BALCÃO, V. M.; MATEO, C.; FERNA, R.; MALCATA, F. X. Structural and Functional

Stabilization of L -Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. **Biotechnological Progress**, v. 17, p. 537–542, 2001.

BARAN, E. T.; AZURE, C. In vivo half life of nanoencapsulated. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v. 3, p. 1113–1121, 2002.

BATTAGLIA, G.; RYAN, A. J. The evolution of vesicles from bulk lamellar gels. **Nature Materials**, v. 4, n. 11, p. 869–876, 2005.

BERMUDEZ, H.; BRANNAN, A. K.; HAMMER, D. A.; BATES, F. S.; DISCHER, D. E. Molecular Weight Dependence of Polymersome Membrane Structure , Elasticity , and Stability. **Macromolecules**, v. 35, n.20, p. 8203–8208, 2002.

BLACKMAN, L. D.; VARLAS, S.; ARNO, M. C.; HOUSTON, Z. H.; FLETCHER, N. L.; THURECHT, K. J.; HASAN, M.; GIBSON, M. I.; O'REILLY, R. K. Confinement of Therapeutic Enzymes in Selectively Permeable Polymer Vesicles by Polymerization-Induced Self-Assembly (PISA) Reduces Antibody Binding and Proteolytic Susceptibility. **ACS Central Science**, *no prelo*.

BLEUL, R.; THIERMANN, R.; MASKOS, M. Techniques To Control Polymersome Size. **Macromolecules**, v. 48, n. 20, p. 7396–7409, 2015.

BOSIO, V. E.; ISLAN, G. A; MARTÍNEZ, Y. N.; DURÁN, N.; CASTRO, G. R. Nanodevices for the immobilization of therapeutic enzymes. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 447–64, 2016.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, v. 191, p. 1114–1115, 1961.

BROOME, J. D. Evidence that the l-asparaginase of guinea pig serum effects for its antilymphoma is responsible. I Properties op the l-asparaginase of guinea pig serum in relation. **J. Exp. Med**, v. 99, p. 99–120, 1963a.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 118, p. 121–148, 1963b.

CHAN, W. K.; LORENZI, P. L.; ANISHKIN, A.; PURWAHA, P.; ROGERS, D. M.; SUKHAREV, S.; REMPE, S. B.; WEINSTEIN, J. N. The glutaminase activity of L -asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, v. 123, n. 23, p. 3596–3607, 2014.

CHEN, S.-H. Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance. **Pediatrics and neonatology**, v. 56, n. 5, p. 287–93, 2015.

CHIERICO, L. *Polymersomes mediated intracellular delivery of antibodies : implication in anticancer therapy* . 2015. 232 f.Tese (Doutorado em Filosofia) Departamento de Química. University College London, Londo, Unided Kigdom .

CRUZ, M. E. M.; GASPAR, M. M. Liposomal L-asparaginase: in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics** v. 96, n. 1-3,1993.

CRUZ, M. E. M.; GASPAR, M. M.; LOPES, F.; JORGE, J. S.; PEREZ-SOLER, R. Liposomal l-asparaginase: in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**,

v. 96, n. 1–3, p. 67–77, 1993.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2012.

DISCHER, B. M.; WON, Y. Y.; EGE, D. S.; LEE, J. C.; BATES, F. S.; DISCHER, D. E.; HAMMER, D. A. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. **Science**, v. 284, n.5417, p. 1143–1146, 1999.

DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer Vesicles. **Science**, v. 297, n.5583, p. 967–974, 2002.

DISCHER, D. E.; ORTIZ, V.; SRINIVAS, G.; KLEIN, M. L.; KIM, Y.; CHRISTIAN, D.; CAI, S.; PHOTOS, P.; AHMED, F. Emerging applications of polymersomes in delivery: From molecular dynamics to shrinkage of tumors. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n.8-9, p. 838–857, 2007.

DOLOWY, W.C., HEMNISON, D., CORNET, J., SELLIN, H. Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase: Study of Mice with Lymphoma and Normal Monlezeys and Report on a Child with Leukemia. **Cancer**, v. 19, n. 12, p. 1813–1819, 1966.

DUMONTET, C.; SIKIC, B. Mechanisms of Action of and Resistance to Antitubulin Agents : Microtubule Dynamics, Drug Transport. **JCO**, v. 17, n. 3, p. 1061–1070, 1999.

FONTANA, M. C.; MARCONI, G.; FEENSTRA, J. D. M.; FONZI, E.; PAPAYANNIDIS, C.; GHELLI LUSERNA DI RORÁ, A.; PADELLA, A.; SOLLI, V.; FRANCHINI, E.; OTTAVIANI, E.; FERRARI, A.; BALDAZZI, C.; TESTONI, N.; IACOBUCCI, I.; SOVERINI, S.; HAFERLACH, T.; GUADAGNUOLO, V.; SEMERAD, L.; DOUBEK, M.; STEURER, M.; RACIL, Z.; PAOLINI, S.; MANFRINI, M.; CAVO, M.; SIMONETTI, G.; KRALOVICS, R.; MARTINELLI, G. Chromothripsis in acute myeloid leukemia: biological features and impact on survival. **Leukemia**, Epub, 2017 .

GAITZSCH, J.; APPELHANS, D.; GRÄFE, D.; SCHWILLE, P.; VOIT, B. Photocrosslinked and pH sensitive polymersomes for triggering the loading and release of cargo. **Chemical communications**, v. 47, p. 3466–3468, 2011.

HA, W.; MENG, X.-W.; LI, Q.; FAN, M.-M.; PENG, S.-L.; DING, L.-S.; TIAN, X.; ZHANG, S.; LI, B.-J. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation. **Soft Matter**, v. 6, n. 7, p. 1405, 2010.

HANDSCHUMACHER, R. E. Some considerations in the design of new antineoplastic agents. **Cancer**, v. 40, n. S1, p. 529–533, 1977.

HOCINE, S.; LI, M.-H. Thermoresponsive self-assembled polymer colloids in water. **Soft Matter**, v. 9, p. 5839, 2013.

HONDA, C.; SAKAKI, K.; NOSE, T. Micellization of an asymmetric block copolymer in mixed selective solvents. **Polymer**, v. 35, n. 24, p. 5309–5318, 1994.

HOWSE, J. R.; JONES, R. a L.; BATTAGLIA, G.; DUCKER, R. E.; LEGGETT, G. J.; RYAN, A. J. Templated formation of giant polymer vesicles with controlled size distributions. **Nature materials**, v. 8, n. 6, p. 507–511, 2009.

IACOBUCCI, I.; LI, Y.; ROBERTS, K. G.; DOBSON, S. M.; KIM, J. C.; PAYNE-TURNER, D.; HARVEY, R. C.; VALENTINE, M.; MCCAHLAIN, K.; EASTON, J. J.;

- YERGEAU, D.; JANKE, L. J.; SHAO, Y.; CHEN, I.-M. L.; RUSCH, M.; ZANDI, S.; KORNBLAU, S. M.; KONOPLEVA, M.; JABBOUR, E.; PAIETTA, E. M.; ROWE, J. M.; PUI, C.-H.; GASTIER-FOSTER, J.; GU, Z.; RESHMI, S.; LOH, M. L.; RACEVSKIS, J.; TALLMAN, M. S.; WIERNIK, P. H.; LITZOW, M. R.; WILLMAN, C. L.; MCPHERSON, J. D.; DOWNING, J. R.; ZHANG, J.; DICK, J. E.; HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Truncating Erythropoietin Receptor Rearrangements in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer cell**, v. 29, n. 2, p. 186–200, 2016.
- INABA, H., PUI, C. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukemia: comparison of prednisone and dexamethasone. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 11, p. 1096–1106, 2012.
- INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–55, 2013.
- ISRAELACHVILI, J. N.; MITCHELL, D. J. A model for the packing of lipids in bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 389, p. 13–19, 1975.
- JANG, W.-S.; PARK, S. C.; KIM, M.; DOH, J.; LEE, D.; HAMMER, D. a. The effect of stabilizer on the mechanical response of double-emulsion-templated polymersomes. **Macromolecular rapid communications**, v. 36, n. 4, p. 378–84, 2015.
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.
- LANVERS-KAMINSKY, C. Asparaginase pharmacology: Challenges still to be faced. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 439–450, 2017.
- LEE, J. S.; FEIJEN, J. Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 473–483, 2012.
- LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 259–69, 2007.
- LIAO, J.; WANG, C.; WANG, Y.; LUO, F.; QIAN, Z. Recent Advances in Formation, Properties, and Applications of Polymersomes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 3432–3441, 2012.
- MAI, Y.; EISENBERG, A. Self-assembly of block copolymers. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 2011, p. 5969, 2012.
- MANUELA GASPAR, M.; BLANCO, D.; CRUZ, M. E. M.; JOSÉ ALONSO, M. Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. **Journal of Controlled Release**, v. 52, p. 53–62, 1998.
- MU, X.; QIAO, J.; QI, L.; DONG, P.; MA, H. Poly (2-Vinyl-4 , 4-dimethylazlactone) - Functionalized Magnetic Nanoparticles as Carriers for Enzyme Immobilization and Its Application. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 6, n. 23, p.21346–21354, 2014.
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 3, p. 208–21, 2007.

O'MAHONY, C.T.; FARRELL, R.A.; GOSHAL, T.; HOLMES, J.D.; MORRIS, M.A. The thermodynamics of defect formation in self-assembled systems. In *Thermodynamics—Systems in Equilibrium and Non-Equilibrium*; Moreno-Piraján, J.C., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2011; pp. 279–306

OLTRA, N. S.; NAIR, P.; DISCHER, D. E. From stealthy polymersomes and filomicelles to “self” Peptide-nanoparticles for cancer therapy. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 5, p. 281–99, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910917>>.

PATEL, N.; KRISHNAN, S.; OFFMAN, M. N.; KROL, M.; MOSS, C. X.; LEIGHTON, C.; DELFT, F. W. Van; HOLLAND, M.; LIU, J.; ALEXANDER, S.; DEMPSEY, C.; ARIFFIN, H.; ESSINK, M.; EDEN, T. O. B.; WATTS, C.; BATES, P. A.; SAHA, V. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L - asparaginase. **Journal Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1964-1973 2009.

PAWAR, P. V.; GOHIL, S. V.; JAIN, J. P.; KUMAR, N. Functionalized polymersomes for biomedical applications. **Polymer Chemistry**, v. 4, p. 3160, 2013.

PEARSON, R. T.; WARREN, N. J.; LEWIS, A. L.; ARMES, S. P.; BATTAGLIA, G. Effect of pH and temperature on PMPC-PDPA copolymer self-assembly. **Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 1400–1407, 2013.

PARSEGIAN, V. A. Long-range physical forces in the biological milieu. **Rev. Biophysical and Bioengineer**, v.2, p. 221–255, 1973.

APOLINÁRIO, A.C.; RANGEL-YAGUI, C.O.; MAGON, S. M. PESSOA JR. A. and C. de O. Challenges for the Self-Assembly of Poly (Ethylene Glycol)– Poly (Lactic Acid) (PEG-PLA) into Polymersomes : Beyond the Theoretical Paradigms. **Nanomaterials**, v. 8, n. 373, p. 1-16, 2018.

RELLING, M. V; RAMSEY, L. B. Pharmacogenomics of acute lymphoid leukemia: new insights into treatment toxicity and efficacy. **American Society of Hematology**, v. 2013, p. 126–30, 2013.

ROBERTS, J.; BURSON, G.; HILL, J. M. New Procedures for Purification of L-Asparaginase with High Yield from Escherichia coli. **J.Bact.**, v. 95, n. 6, p. 2117–2123, 1968.

ROBERTSON, J. D.; YEALLAND, G.; AVILA-OLIAS, M.; CHIERICO, L.; BANDMANN, O.; RENSHAW, S. a; BATTAGLIA, G. pH-sensitive tubular polymersomes: formation and applications in cellular delivery. **ACS nano**, v. 8, n. 5, p. 4650–61, 27, 2014.

ROTHER, C.; NIDETZKY, B. Enzyme immobilization by microencapsulation : methods, materials, and technological applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, 2014

RUIZ-PEREZ, L.; MESSENGER, L.; GAITZSCH, J.; JOSEPH, A.; SUTTO, L.; GERVASIO, F. L.; BATTAGLIA, G. Molecular engineering of polymersome surface topology. **Science Advances**, v. 2, n. 4, p. 1–8, 2016.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014.

- SCHAFFEL, R.; SIMÕES, B. P. Leucemia Linfoblástica Aguda Filadélfia positiva. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 52–58, 2008.
- SHEN, H.; EISENBERG, A. Morphological Phase Diagram for a Ternary System of Block Copolymer PS 310 - b -PAA 52 / Dioxane / H₂O. *Journal of Physical Chemistry*, v. 103, n.44, p. 9473–9487, 1999.
- SHUM, H. C.; ZHAO, Y. J.; KIM, S. H.; WEITZ, D. A. Multicompartment polymersomes from double emulsions. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n.7, p. 1648–1651, 2011.
- STIENE-MARTIN, A.; LOTSPEICH-STEININGER, C. A.; KOEPKE, J. A. *Clinical Hematology: principles, procedures, correlations*: 2ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.
- SUGIMOTO, K.; SUZUKI, H. I.; FUJIMURA, T.; ONO, A.; KAGA, N.; ISOBE, Y.; SASAKI, M.; TAKA, H.; MIYAZONO, K.; KOMATSU, N. A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines. **Cancer science**, v. 106, n. 11, p. 1534–1543, 2015.
- SUN, H.; MENG, F.; CHENG, R.; DENG, C.; ZHONG, Z. Dual reduction- and pH-bioresponsive crosslinked polymersomes for efficient intracellular delivery of proteins and potent induction of cancer cell apoptosis. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 5, p. 2159–2168, 2014.
- SURI VASUDEVA, S.; AHMAD, S.; PARVEEN, R.; AHMAD, F. J.; ANISH, C. K.; ALI, M.; PANDA, A. K. Formulation of PEGylated L-asparaginase loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of PEGylation on enzyme loading, activity and in vitro release. **Pharmazie**, v. 66, n.12, p. 956–960, 2011.
- SWAIN, A.L., JASKÓLSKI, M., HOUSSET, D., MOHANA, J. K R., WLODAWER, A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **PNAS**, v. 90, n.4, p. 1474–1478, 1993.
- TEODOR, E.; LITESCU, S.-C.; LAZAR, V.; SOMOGHI, R. Hydrogel-magnetic nanoparticles with immobilized L-asparaginase for biomedical applications. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 20, n. 6, p. 1307–14, 2009.
- THOMAS, D. A.; FADERL, S.; CORTES, J.; BRIEN, S. O.; GILES, F. J.; KORNBLAU, S. M.; GARCIA-MANERO, G.; KEATING, M. J.; ANDREEFF, M.; JEHA, S.; BERAN, M.; VERSTOVSEK, S.; PIERCE, S.; LETVAK, L.; SALVADO, A.; CHAMPLIN, R.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Treatment of Philadelphia chromosome – positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4396–4408, 2016.
- THORNA, C.F., OSHIROA, C., MARSHE, S. HERNANDEZ-BOUSSARDB, T.; MCLEODD, H., KLEINA, T.E., ALTMANA, R. B. Pharmacogenet Genomics Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2012.
- TIVEY, H. The natural history of untreated acute leukemia. **Ann N Y Acad Sci**, v. 60, n. 2, p. 322-58, 1954.
- TRUELOVE, E.; FIELDING, a K.; HUNT, B. J. The coagulopathy and thrombotic risk associated with L-asparaginase treatment in adults with acute lymphoblastic leukaemia.

Leukemia, v. 27, n. 3, p. 553–559, 2013.

UENO, T.; OHTAWA, K.; MITSUI, K.; KODERA, Y.; HIROTO, M.; MATSUSHIMA, A.; INADA, Y.; NISHIMURA, H. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L -asparaginase. **Leukemia**, v.11, p. 1858–1861, 1997.

ULU, A.; ATES, B. Immobilization of L -Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1598–1610, 2017.

ULU, A.; KOYTEPE, S.; ATES, B. Synthesis and characterization of PMMA composites activated with starch for immobilization of L-asparaginase. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 19, p. 43421, 2016.

VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 671–684, 2011.

VERMA, S.; MEHTA, R. K.; MAITI, P.; RÖHM, K.-H.; SONAWANE, A. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of E. coli asparaginase II. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1844, n. 7, p. 1219–1230, 2014.

VINA, I.; KARSAKEVICH, A.; BEKERS, M. Stabilization of anti-leukemic enzyme L -asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. **Journal of molecular catalysis B enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 551–558, 2001.

WAN, S.; HE, D.; YUAN, Y.; YAN, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, J. Chitosan-modified lipid nanovesicles for efficient systemic delivery of L-asparaginase. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 143, p. 278–84, 2016.

WANG, L.; CHERICO, L.; LITTLE, D.; PATIKARNMONTHON, N.; YANG, Z.; AZZOUZ, M.; MADSEN, J.; ARMES, S. P.; BATTAGLIA, G. Encapsulation of biomacromolecules within polymersomes by electroporation. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, p. 11122–11125, 2012.

WOLF, M.; WIRTH, M.; PITTNER, F.; GABOR, F. Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, n. 1–2, p. 141–152, 2003.

WU, D.; SPULBER, M.; ITEL, F.; CHAMI, M.; PFOHL, T.; PALIVAN, C. G.; MEIER, W. Effect of Molecular Parameters on the Architecture and Membrane Properties of 3D Assemblies of Amphiphilic Copolymers. *Macromolecules*, v. 47, n.15, p 5060–5069, 2014.

ZALEWSKA-SZEWCZYK, B.; ANDRZEJEWSKI, W.; MŁYNARSKI, W.; JEDRYCHOWSKA-DAŃSKA, K.; WITAS, H.; BODALSKI, J. The anti-asparaginase antibodies correlate with L-asparaginase activity and may affect clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 48, n. 5, p. 931–6, 2007.

ZHANG, J.; FAN, J.; VENNETI, S.; CROSS, J. R.; TAKAGI, T.; BHINDER, B.; DJABALLAH, H.; KANAI, M.; CHENG, E. H.; JUDKINS, A. R.; PAWEL, B.; BAGGS, J.; CHERRY, S.; RABINOWITZ, J. D.; THOMPSON, C. B. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. **Molecular Cell**, v. 56, n. 2, p. 205–218, 2014.

ZHANG, L.; EISENBERG, A. 3 REPORTS Multiple Morphologies of “ Crew-Cut ” Aggregates of Polystyrene-b-poly (acrylic acid) Block Copolymers. **Science**, v. 268,

n.5218, p. 21–24, 1995.

ZHANG, M.; WANG, W.; XIE, R.; JU, X.; LIU, Z.; JIANG, L.; CHEN, Q.; CHU, L. Controllable microfluidic strategies for fabricating microparticles using emulsions as templates. **Particuology**, v.24, p. 1–14, 2015.

ZHANG, Y.-Q.; WANG, Y.-J.; WANG, H.-Y.; ZHU, L.; ZHOU, Z.-Z. Highly efficient processing of silk fibroin nanoparticle-l-asparaginase bioconjugates and their characterization as a drug delivery system. **Soft Matter**, v. 7, n. 20, p. 9728, 2011.

ZHANG, Y. Q.; TAO, M. L.; SHEN, W. De; ZHOU, Y. Z.; DING, Y.; MA, Y.; ZHOU, W. L. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v. 25, n.17, p. 3751–3759, 2004.

CAPÍTULO II

*Obtenção de nanoestruturas supramoleculares formadas pela autoagregação de poli
(óxido de etileno-b-ácido láctico)/PEG-PLA*

Neste capítulo, as nanoestruturas não foram chamadas de polimerossomos porque apenas o DLS foi usado para caracterização destas. Sem imagens de microscopia eletrônica de transmissão que exibissem a forma vesicular e sem dados de encapsulação de fármacos hidrofílicos que indicassem a existência de espaço aquosos, foi preferido se referir a estas como nanoestruturas de autoagregação.

Capítulo II- Obtenção de estruturas supramoleculares formadas pela autoagregação de poli (óxido de etileno-b-ácido láctico)

II.1 INTRODUÇÃO

Dennis Discher não só introduziu o conceito de Polimerossomos (PL) como vesículas mais robustas que os lipossomos tendo como unidades estruturais copolímeros anfifílicos (CA) (DISCHER et al., 1999), como também escreveu um trabalho intitulado simplesmente de “*Polymersomes*”, no qual está uma das figuras mais divulgadas quando se deseja explicar a formação de PL (Figura II.1) (DISCHER; AHMED, 2006). Este trabalho difundiu uma regra comumente adotada quando se escolhe os CA para elaboração de PL baseada no volume da fração hidrofílica dos CA para gerar PL em meio aquoso. Para os CA em solução aquosa, uma forma geométrica preferencial de cilindro, cone truncado ou cone determina se vesículas, micelas cilíndricas ou esféricas serão formadas.

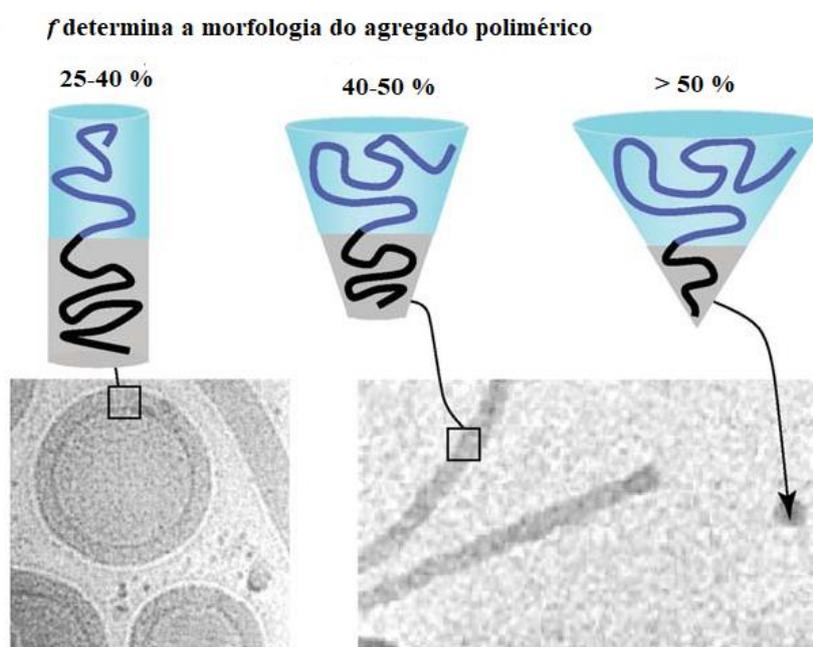


Figura II.1- Geometria preferencialmente adotada por copolímeros anfifílicos em meio aquoso de acordo com o volume da fração hidrofílica. A porção representada em azul representa a fração hidrofílica, neste caso PEG e a porção representada em preto a fração hidrofóbica. Fonte: Figura adaptada de DISCHER; AHMED (2006).

Posteriormente, Battaglia e colaboradores relataram que não apenas o valor de f determinava a morfologia dos agregados (Figura II.2), mas por exemplo para o copolímero poli (2-metacrilóiloxietil fosforilcolina)-bloco-poli(2-diisopropilamino etil metacrilato) (PMPC-PDPA), o tempo de agitação durante o processo de hidratação do filme determina se serão obtidos túbulos ou vesículas esféricas (BATTAGLIA; RYAN, 2006).

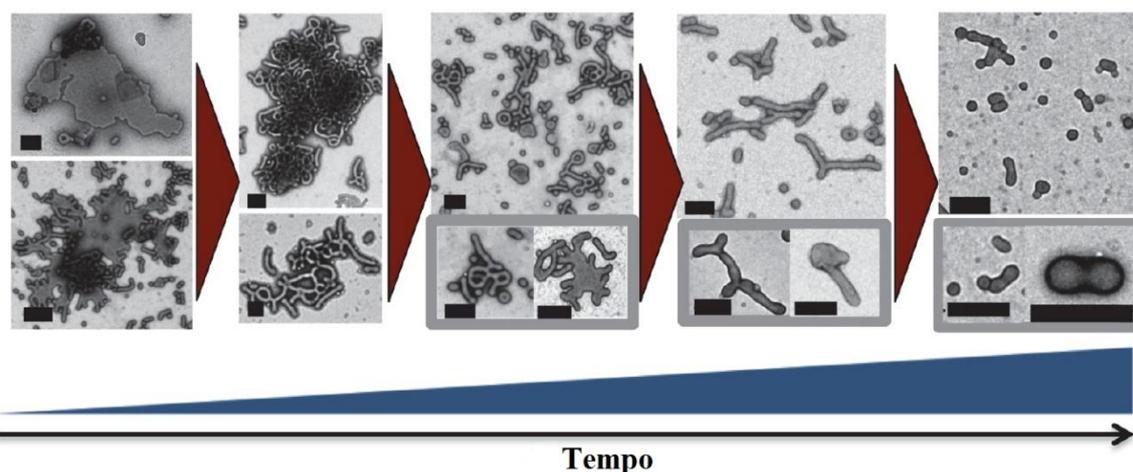


Figura II.2- Microscopias das estruturas de autoagregação formadas a partir da hidratação do filme de poli (2-metacrilóiloxietil fosforilcolina) -bloco-poli (2-diisopropilamino etil metacrilato). Primeiro, os pedaços liberados de filme são intumescidos em uma rede tubular contínua; em seguida, ocorre a quebra em túbulos individuais e pequenas estruturas emaranhadas. Estes se dividem ainda mais em tubúlos menores que finalmente perolizam e brotam em como polimerossomos esféricos. *Fonte: Adaptada de ROBERTSON (2014).*

Atualmente é aceito que há desafios pendentes no desenvolvimento de PL, o que sugere um nível mais avançado de controle das morfologias com fundamentos físicos e moleculares (LOVERDE et al., 2011). Deste modo, este capítulo descreve os delineamentos experimentais iniciados para obtenção de PL por meio da hidratação do filme polimérico a partir de PEG-PLA, um copolímero dibloco susceptível a hidrólise da porção poliéster do bloco PLA.

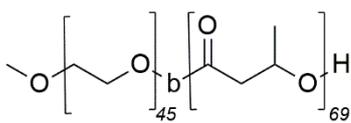
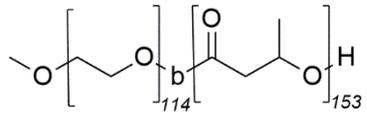
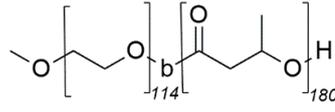
II.2 MATERIAIS E MÉTODOS

II.2.1 Materiais

II.2.1 Seleção dos copolímeros anfifílicos

A seleção dos copolímeros foi feita a partir das diferenças entre as massas moleculares das frações hidrofílicas (PEG) e hidrofóbicas (PLA), visando à seleção de copolímeros que possuíssem o volume de fração hidrofílica (f) entre 0,20 e 0,42. A Tabela II.1 apresenta os três copolímeros PEG-PLA escolhidos para o estudo.

Tabela II.1- Características moleculares dos copolímeros usados.

Copolímeros	PEG-PLA Mn ^a	Temperatura de transição vítrea do bloco hidrofóbico ^b	f_{PEG}	PDI ^c
PEG ₄₅ PLA ₆₉		23°C	0,28	1,20
PEG ₁₁₄ PLA ₁₅₃		39°C	0,30	1,15
PEG ₁₁₄ PLA ₁₈₀		40°C	0,27	1,16

Dados do Fabricante:

^a ¹H-RMN espectroscopia por comparação da área dos hidrogênios de metoxila do poli (óxido de etileno) em 3.6 ppm com os hidrogênios do poli (ácido láctico) ao redor de 5.1 e 1.55 ppm

^b Determinada por calorimetria exploratória diferencial, do inglês, *differential scanning calorimeter (DSC)*

^c Obtido através de cromatografia de exclusão molecular

II.2.2 Formação das nanoestruturas

II.2.2.1 Definição dos parâmetros para obtenção dos polimerosomos

As condições de ensaio iniciais e as concentrações dos CA usadas foram definidas a partir de um estudo piloto realizado para o copolímero PEG₄₅PLA₆₉ que permitiu definir o protocolo de preparo para os demais CA de PEG-PLA, a partir do método de hidratação do filme polimérico. Para este estudo piloto, amostras de 0.33 mg. mL⁻¹ de PEG₄₅PLA₆₉ em clorofórmio foram transferidas para balões volumétricos e promoveu-se agitação orbital nos balões acoplados ao rotaevaporador (**agitação indireta**) a 150 RPM por duas

horas ou por um período *overnight* (16 horas). Amostras também foram submetidas a **agitação direta** com uso de barra magnética no interior de balão em agitador magnético Corning PC-420D[®] (Chelmsford, Essex, Inglaterra) a 400 RPM por *overnight*. Em seguida os sistemas foram submetidos a evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador, Büchi[®] R-210 (Valinhos, São Paulo, Brasil) com diminuição progressiva da pressão até o valor de 25 mbar sob rotação lenta de 40 RPM durante 3 horas, para remoção do solvente. Para hidratação dos filmes formados, empregou-se tampão fosfato salino (PBS) 10 mM (1X) pH 7,4 ($\pm 0,2$) filtrado a 0,22 μm em filtros de seringas Biofil[®]. Os filmes hidratados foram submetidos à agitação em banho ultrassônico Qsonica[®] (Columbiana County, Ohio, Estados Unidos), sendo que dois tempos de sonicação foram analisados: 20 e 50 minutos.

A extrusão das nanoestruturas formadas foi investigada com o extrusor Avanti Polar lipids, Inc[®] (Alabaster, Alabama, Estados Unidos) empregando-se membrana de 0,45 μm de diâmetro de poro seguida por membrana de 0,22 μm . Para cada tamanho de poro foram feitas 31 extrusões, com o volume de 1 mL do sistema.

II.2.3 Caracterização das nanoestruturas por espalhamento de luz dinâmico

Os ensaios de Espalhamento de Luz Dinâmico foram realizados no Laboratório de Corrosão da Escola Politécnica da USP e a análise de microscopia eletrônica de transmissão no Instituto de Ciências Biomédicas da USP. O diâmetro hidrodinâmico foi medido por espalhamento de luz dinâmico no equipamento *Zetasizer Nano*, Malvern Instruments[®] (Worcestershire, United Kingdom) em cubeta de vidro sem diluição da amostra. As medidas foram feitas a uma temperatura de 25°C e com o detector a um ângulo de 90°. As amostras foram equilibradas por 120s, com um ajuste automático de atenuador e foram realizadas 3 medidas para cada leitura. A viscosidade da água foi de

0,088, o índice de refração de 1,330 e os valores de índice de refração de 1,30 referente ao PEG (superfície externa das partículas) foi adotado para as nanoestruturas. As partículas foram consideradas como esferas e a equação de Stokes-Einstein (Equação II.1) foi utilizada para análise do decaimento de correlação entre a intensidade medida e o coeficiente de difusão.

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

Em que: D_f é o coeficiente de difusão, kB é a constante de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico das partículas espalhadoras.

II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.3.1 Ensaio piloto para obtenção de polimerossomos a partir de poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) PEG₄₅PLA₆₉

O PEG₄₅PLA₆₉ apresenta valor de fração de volume hidrofílico de 0,28 e do ponto de vista teórico forma vesículas quando em solução aquosa. A Figura II.3 exibe o filme polimérico formado a partir destes CA na lateral do balão e na Figura II.4 é possível ver duas situações resultantes do processo de hidratação deste filme conforme o tipo de agitação usada. Quando o processo foi orbital, ou



Figura II.3- Filme polimérico de PEG₄₅PLA₆₉ formado após evaporação do solvente. *Fonte: Autor*

seja, apenas com balão em agitação sem cisalhamento direto no líquido de hidratação, observou-se a existência de polímero precipitado (*bulk*) mesmo após a sonicação; já com o uso da agitação magnética *overnight* é notável a diferença macroscópica no sistema, sem a presença de grandes precipitados.

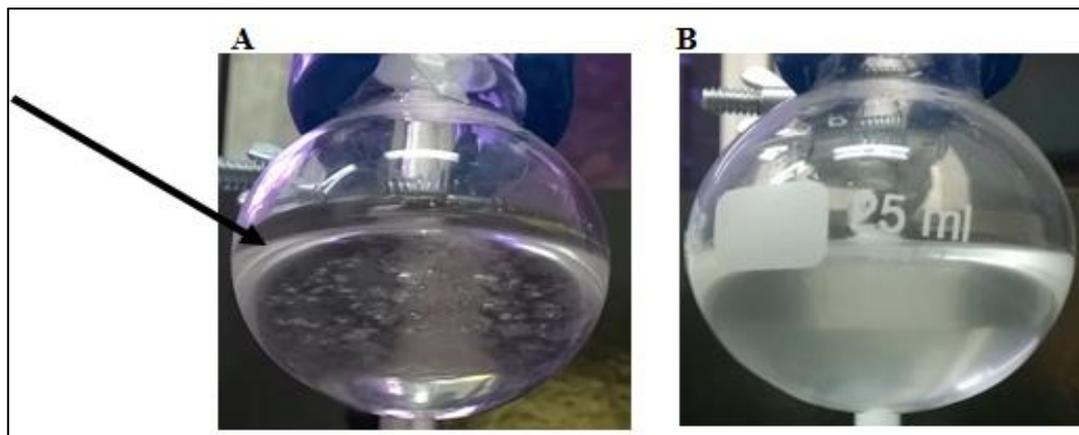


Figura II.4- Aspectos dos sistemas PEG₄₅PLA₆₉ hidratados: A) Após agitação orbital a 150 RPM e B) Após agitação magnética a 400 RMP. *Fonte: Autor.*

A literatura relata que precipitados de CA podem estar presentes nos sistemas coexistindo com PL e outros agregados (ARIFIN; PALMER, 2005), mas estes precipitados de polímeros implicam em uma menor concentração dos PL formados, o que além de levar à perda de CA, resulta em menor encapsulação de moléculas (BALASUBRAMANIAN et al., 2016). Portanto, a agitação magnética resultou em um sistema coloidal mais homogêneo e mais adequado para encapsulação de proteínas como a ASNase.

A análise de DLS dos sistemas apresentada na Tabela II.2 e nas Figuras II.5, II.6 e II.7 para os dois modos de agitação revelou a presença de estruturas de autoagregação na escala nanométrica, o que sugeriu que houve a formação de PL. O aumento no tempo de agitação, o uso da agitação magnética durante a hidratação e a sonicação levaram à formação de estruturas com menor diâmetro hidrodinâmico. O ensaio de DLS é amplamente usado na caracterização de estruturas nanométricas por ser um método barato, rápido e que permite recuperação da amostra. No entanto trata-se de uma medida secundária que se baseia no espalhamento de luz induzido pelo movimento browniano das partículas, consideradas como esféricas e não interagentes (NAIIM et al., 2015). Portanto, é um método que requer criteriosa interpretação e cautela uma vez que sistemas

autoagregados como os obtidos por tensoativos e copolímeros anfifílicos podem formar uma variedade de estruturas como micelas cilíndricas, que resultariam em leituras com maiores índices de polidispersão.

A obtenção de PL pelo método de hidratação do filme polimérico geralmente resulta em um sistema com alto PDI devido à possibilidade de formação de estruturas com variadas faixas de tamanho, não apenas vesículas mas também micelas, além de polímero não-solubilizado (BLEUL; THIERMANN; MASKOS, 2015; DIONZOU et al., 2016). Podemos confirmar isto com os resultados de DLS apresentados, uma vez que os valores PDI foram altos. Avaliando-se a distribuição de tamanho por número é possível verificar com agitação orbital a presença de nanoestruturas até 200-400 nm e com agitação magnética uma predominância na faixa de 300 nm. É necessário considerar a distribuição por número de partículas, uma vez que uma partícula grande pode ser apenas um traço de impureza, ou uma menor população de estruturas em uma escala maior como “vesículas gigantes” e o PDI elevado é resultante da presença destas estruturas maiores que mesmo em proporções pequenas, geram espalhamentos significativos de luz e ocupam maior volume na amostra em relação às estruturas menores que podem estar em maioria no sistema. Desse modo, o resultado de tamanho por intensidade pode não refletir a composição predominante do sistema, sendo sempre importante avaliar a distribuição por número (DIONZOU et al., 2016).

Tabela II.2-Resultado da análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) por intensidade para nanoestruturas de autoagregação obtidas a partir do PEG₄₅PLA₆₉.

Agitação orbital		
Sistemas formados*	Diâmetro hidrodinâmico por intensidade (nm)	PDI
2/0	836,7 (65%) e 213,5 (35%)	0,962
2/20	300 (72%) e 1878 (28%)	1
2/50	467,6 (95%) e 66,28 (5%)	1
ON/0	217 (61%) e 664 (39%)	0,749

Continuação Tabela II.2- Resultado da análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) por intensidade para nanoestruturas de autoagregação obtidas a partir do PEG₄₅PLA₆₉.

Agitação orbital		
Sistemas formados*	Diâmetro hidrodinâmico por intensidade (nm)	PDI
ON/20	378,7 (70%) e 173,6 (30%)	0,673
ON/50	443,9 (80%) e 146,6 (20%)	0,807
Agitação magnética		
Sistemas formados*	Diâmetro hidrodinâmico por intensidade (nm)	PDI
ON/0	447,8	0,767
ON/20	409	0,841
ON/50	374	1

*2/0- agitação por 2 horas e sem sonicação, 2/20- agitação por 2 horas e sonicação por 20 min, 2/50- agitação por 2 horas e sonicação por 50 min, ON/0- agitação *overnight* e sem sonicação, ON/20- agitação *overnight* e sonicação por 20 min, ON/50- agitação *overnight* e sonicação por 50 min. PDI-Índice de polidispersão.

A hipótese delineada a partir das implicações do valor de f sustentaria por si só a formação de vesículas, entretanto os resultados apresentados na Tabela 2.1 indicam que o método de obtenção exerce influência no sistema de PL. A agitação pode resultar em uma força de cisalhamento como descrevem ROBERTSON et al (2014) e exercer influência no processo de autoagregação dos CA além do valor de f . À medida que o filme polimérico se desprende do balão, a agitação favorece a quebra de partes da rede polimérica no filme e a difusão da fase aquosa ocorre em uma área superficial maior favorecendo a formação das vesículas ao invés da precipitação do copolímero, uma vez que o valor de f do CA está na faixa que é correlacionada com o surgimento deste tipo de nanoestrutura. A sonicação também gera energia por meio do fenômeno da cavitação, que consiste na expansão e contração de bolhas de gás em um líquido exposto a ondas de pressão acústicas com ruptura (cavitação com colapso) ou sem ruptura (cavitação estável) das bolhas. A oscilação das bolhas cria uma pressão local resultando na quebra das vesículas maiores em fragmentos menores que se reorganizam em vesículas menores.

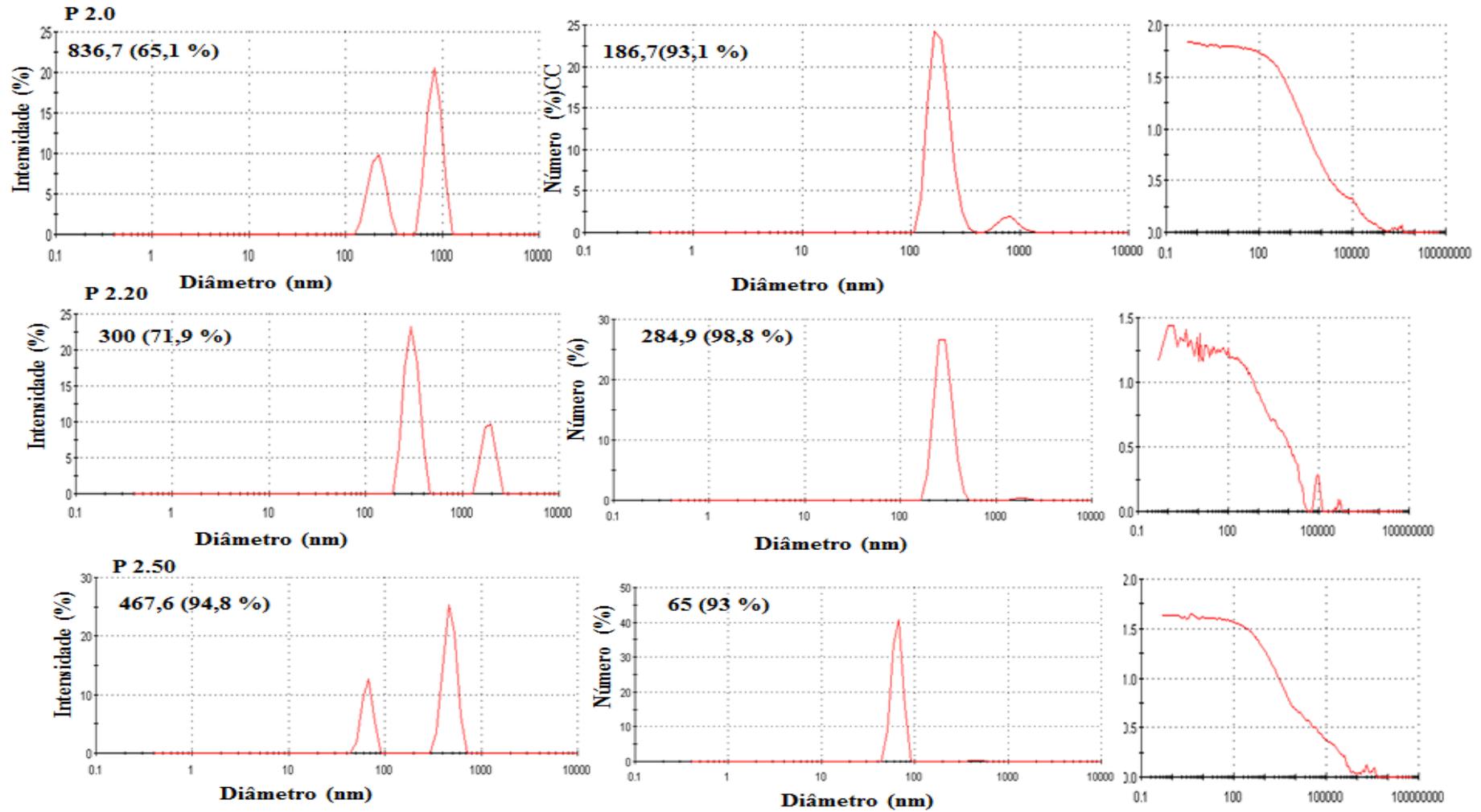


Figura II.5- Análise de espalhamento de luz dinâmica para os sistemas de PEG₄₅PLA₆₉ obtidos por agitação orbital por 2 horas.

*Nomenclatura dos sistemas: P2.0 Polimerossomos obtidos após 2 horas de agitação. P2.20 Polimerossomos obtidos após 2 horas de agitação e 20 min de sonicação. P2.50 Polimerossomos obtidos após 2 horas de agitação e 50 min de sonicação

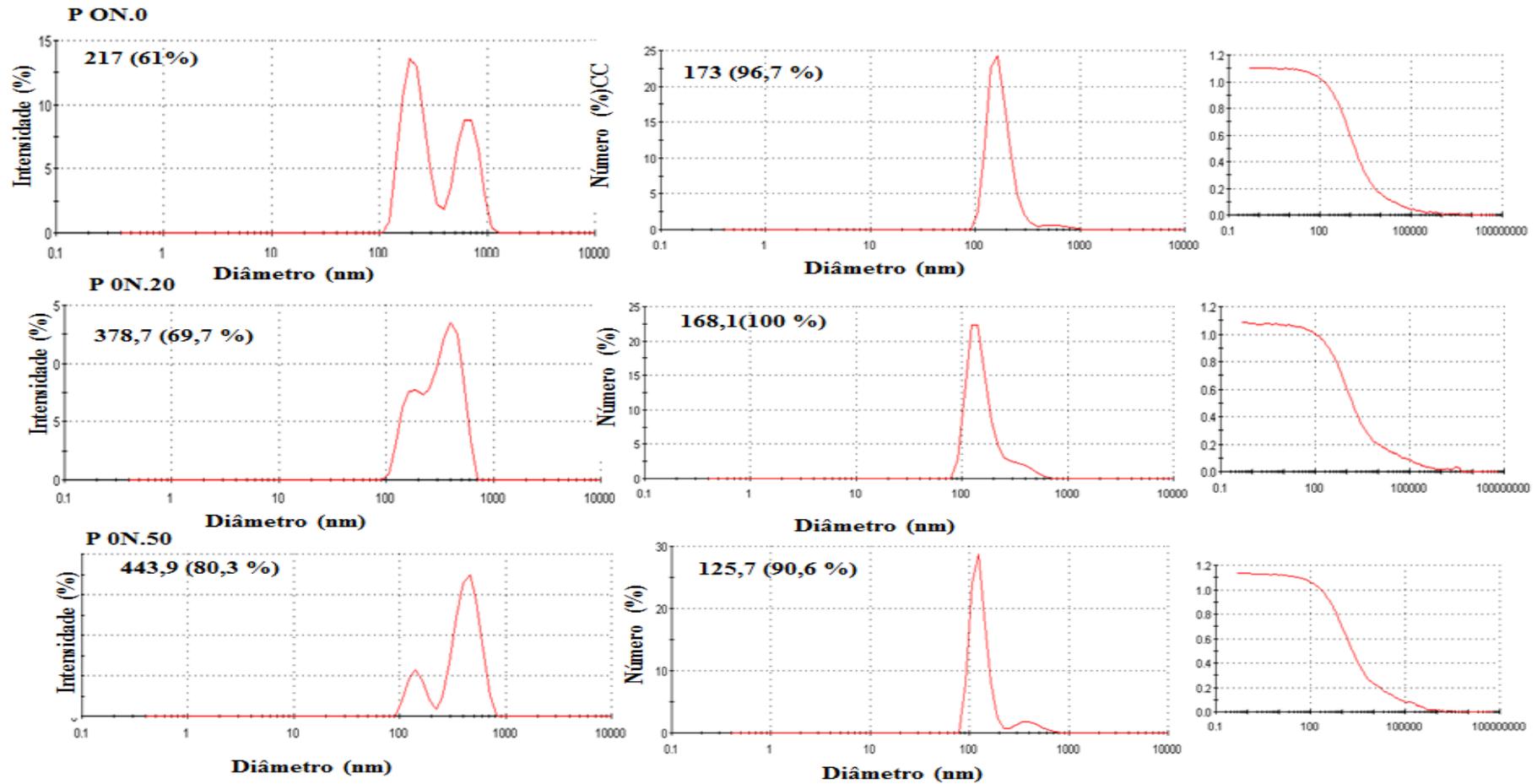


Figura II.6- Análise de espalhamento de luz dinâmica para os sistemas de PEG₄₅PLA₆₉ obtidos por agitação orbital *overnight* (ON).

*Nomenclatura dos sistemas: P ON.0 Polimerossomos obtidos após agitação *overnight*. P ON.20 Polimerossomos obtidos após agitação *overnight* e 20 min de sonicação. P ON.50 Polimerossomos obtidos após obtidos após agitação *overnight* e 50 min de sonicação

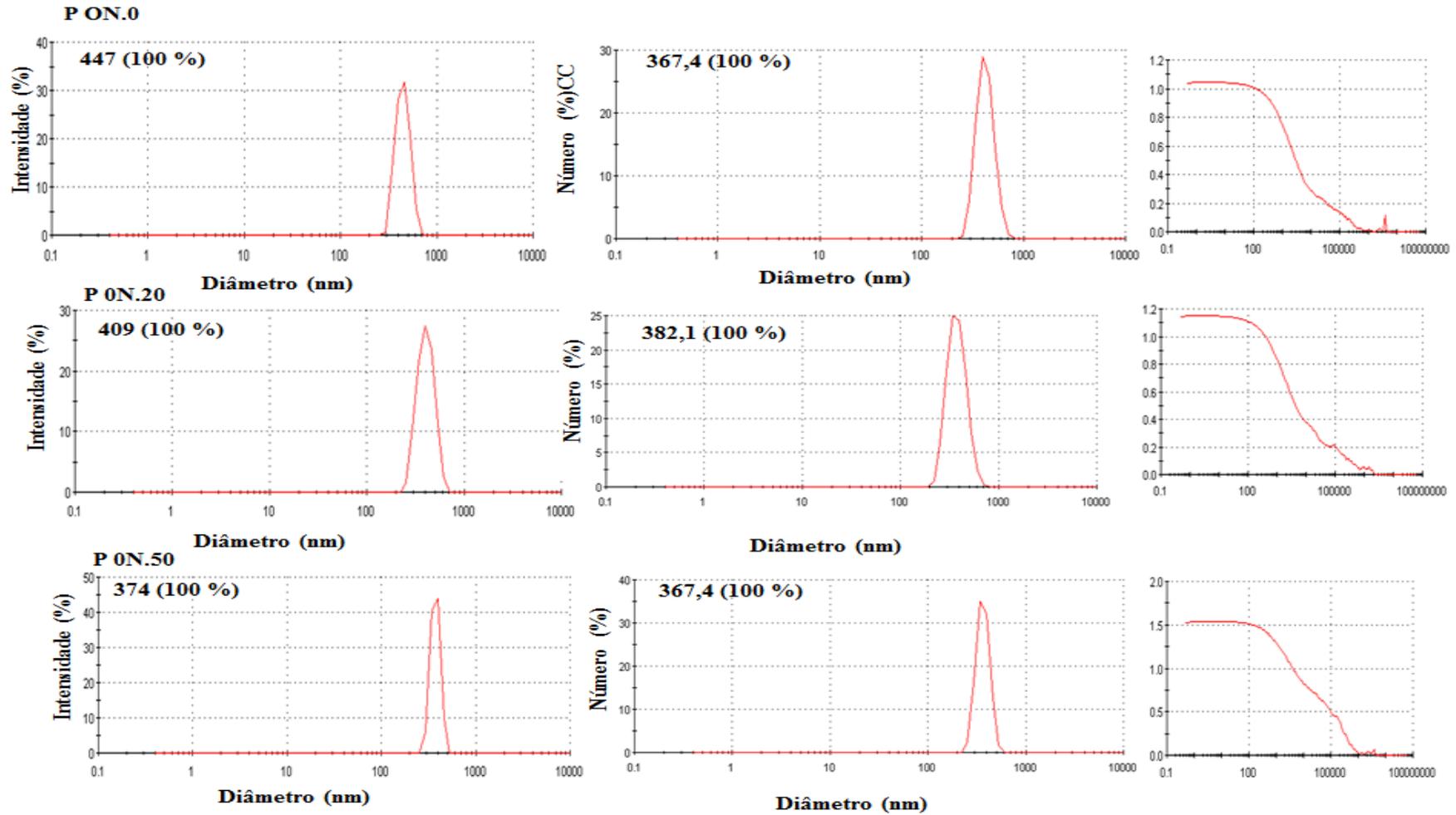


Figura II.7- Análise de espalhamento de luz dinâmica para os sistemas de PEG₄₅PLA₆₉ obtidos por agitação magnética *overnight* (ON).

*Nomenclatura dos sistemas: P ON.0 Polimerossomos obtidos após agitação *overnight*. P ON.20 Polimerossomos obtidos após agitação *overnight* e 20 min de sonicação. P ON.50 Polimerossomos obtidos após agitação *overnight* e 50 min de sonicação

A partir dos resultados apresentados acima, definiu-se que o emprego de agitação magnética overnight a 400 RPM seguida por sonicação durante 50 min seria o método adotado inicialmente para elaboração dos PL de PEG-PLA. No entanto a alta polidispersão resultante do método de hidratação do filme é um entrave e neste caso a literatura cita que a técnica de extrusão seria uma etapa útil na obtenção de sistemas com faixa de tamanhos mais estreitas (HABEL et al., 2016).

A figura II.8 mostra o efeito da extrusão nos sistemas formados por PEG₄₅PLA₆₉. Na distribuição de tamanho apresentada em A observa-se a prevalência em número de diâmetros hidrodinâmicos na faixa de 300 nm, o que já havia sido relatado para a condição de agitação (400 RPM por *overnight*) e sonicação (50 min) definida anteriormente com presença de populações com outras faixas de tamanhos, um dos principais problemas no método de hidratação do filme. Em B é possível ver que a extrusão com membrana de 0,4 µm, como esperado, permitiu a obtenção de distribuição de tamanho de partículas com menor diâmetro hidrodinâmico. No entanto, observa-se também o aparecimento de um pico em uma faixa ainda menor que a do poro da membrana. Outra etapa de extrusão com poro de 0,2 µm de diâmetro foi realizada e em C é possível inferir que a diminuição progressiva do tamanho dos poros estreitou ainda mais a faixa do diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas com PEG₄₅PLA₆₉.

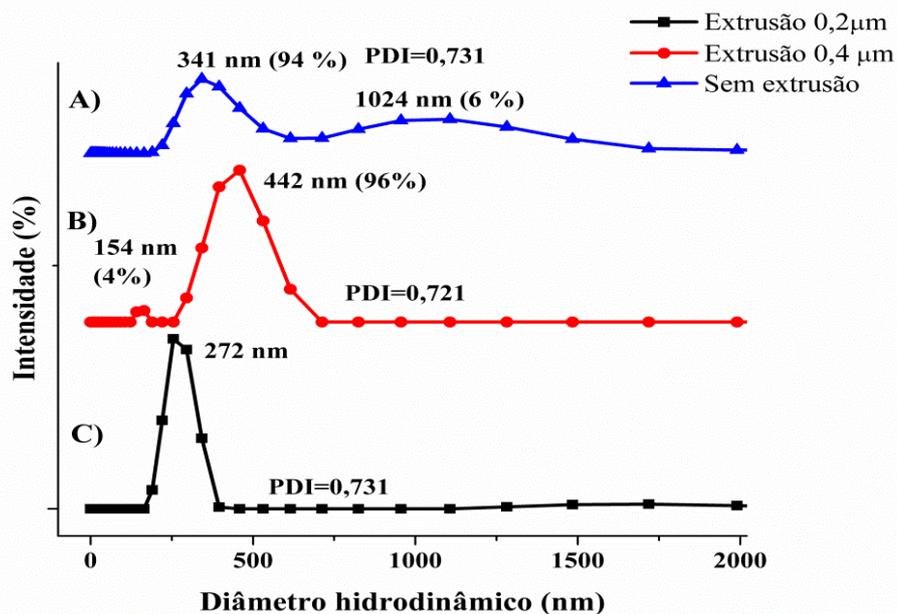


Figura II.8- Efeito da extrusão no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG₄₅PLA₆₉ seguida por sonicação durante 50 min. A) Sistema antes de extrusar. B) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,4 µm. C) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,2 µm.

A fluidez da membrana dos PL é fator primordial para a extrusão, uma vez que as vesículas devem se deformar e se romper durante a passagem pelos poros. Essa fluidez da membrana relaciona-se à massa molecular da porção hidrofóbica e ao valor da temperatura de transição vítrea (T_g). A porção PLA do PEG₄₅PLA₆₉ apresenta, segundo dados do fabricante, uma temperatura de transição vítrea (T_g) de 23°C. Para a extrusão dos sistemas formados com PEG-PLA de maiores massas moleculares que apresentam maiores valores de T_g , poderia por exemplo ser necessário o emprego de um agente plastificantes. Os plastificantes são solventes que atuam na bicamada da vesícula e promovem maior fluidez desta (MEN et al., 2016; SO; LODGE, 2016). A forma das vesículas obtidas após a extrusão podem sofrer alterações na forma esférica para outros formatos como esferóides prolatos, elipsóides e halteres e o fato do PDI encontrado não diminuir pode estar relacionado a isso (SO; LODGE, 2016)

II.3.2 Obtenção de polimerossomos a partir de poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀

A Figura II.9 exhibe os resultados de DLS para o PEG₁₁₄PLA₁₅₃ nas mesmas condições estudadas para PEG₄₅PLA₆₉. É possível ver que os sistemas apresentaram uma faixa de tamanho nanométrica e com aparecimento de picos prevalentes abaixo de 300 nm sem extrusão, diferente de PEG₄₅PLA₆₉ cujos picos de diâmetro hidrodinâmico foram menores que 300 nm apenas após a extrusão. A massa da fração hidrofóbica PLA de PEG₁₁₄PLA₁₅₃ (11 000 g mol⁻¹) é cerca de duas vezes maior em relação a PEG₄₅PLA₆₉ (5000 g.mol⁻¹), o que implica em uma membrana com maior espessura. No entanto o valor f de PEG₁₁₄PLA₁₅₃ (0,305) é semelhante ao de PEG₄₅PLA₆₉ (0,278) e a hipótese teórica de formação de vesículas com base nesse parâmetro permanece, sendo necessário avaliar os efeitos das técnicas de sonicação e de extrusão nos PL como avaliado para PEG₄₅PLA₆₉.

A agitação magnética a 400 RPM sem a sonicação resultou no aparecimento de uma população com partículas na faixa de 150-500 nm (Figura II.9A), com valor de PDI alto como esperado em razão da aleatoriedade da hidratação do filme polimérico. Após a sonicação, uma população de nanoestruturas com menos de 300 nm apareceu e os picos nas faixas de 900 nm (após 20 min de sonicação, Figura II.9B) e 800 nm (após 50 min de sonicação, Figura II.9C) aparecem apenas na distribuição por intensidade e não por número. Portanto, esses picos não representam o sistema, mas podem remeter à presença de algum agregado polimérico advindo da sonicação.

Desse modo podemos inferir que o valor de f e a técnica empregada permitiram obter nanoestruturas com tamanhos esperados para vesículas poliméricas. Assim como para PEG₄₅PLA₆₉, a agitação a 400 RPM e sonicação por 50 min foram definidas como condições para obtenção de PL a partir de PEG₁₁₄PLA₁₅₃. A distribuição por número

confirma que o sistema tem uma prevalência de nanoestruturas em uma faixa de tamanho esperada para vesículas e assim os elementos que contribuem para o alto valor de PDI são considerados como traços de outros agregados que não correspondem à composição predominante do sistema.

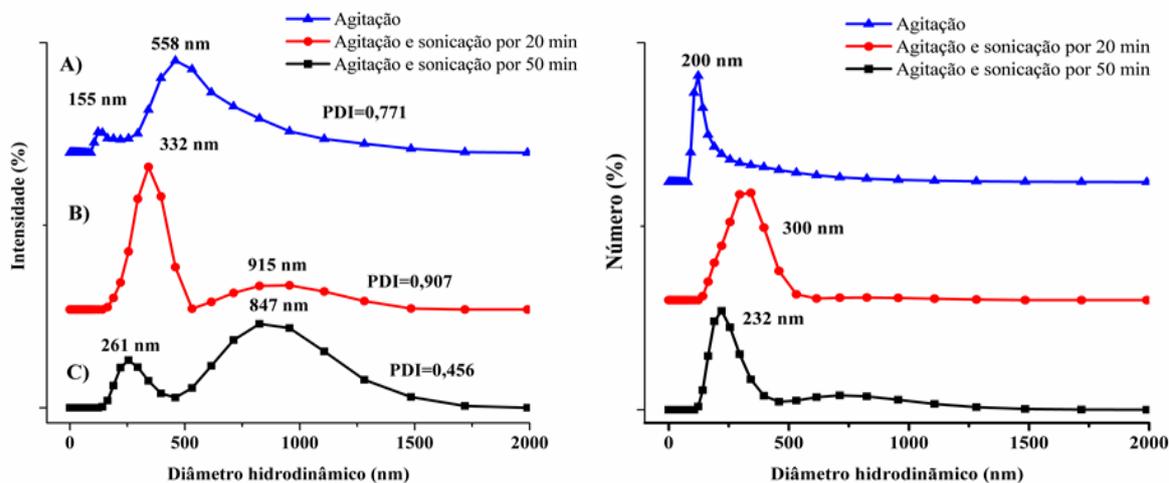


Figura II.9- Efeito da sonicação no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG₁₁₄PLA₁₅₃. A) Sistema agitados a 400 RPM *overnight*. B) Distribuição após sonicação por 20 min C) Distribuição após sonicação por 50 min.

A extrusão (Figura II.10) também foi realizada nas vesículas agitadas a 400 RPM e sonicadas por 50 min e resultou em diminuição na faixa de tamanho das nanoestruturas sem, contudo, sem redução nos valores de PDI. Como já comentado antes, PEG₁₁₄PLA₁₅₃ apresenta um valor de porção hidrofóbica PLA maior que PEG₄₅PLA₆₉ e também maior temperatura de T_g (39°C), assim a extrusão a temperatura ambiente é dificultada. No entanto, os dados de espalhamento de luz por número de partículas indicam a obtenção de populações com faixas de distribuição de tamanho de 100 nm após a extrusão, ainda que por intensidade picos referentes a estruturas em escala de tamanho maior que os poros das membranas usadas no processo de extrusão sejam observados.

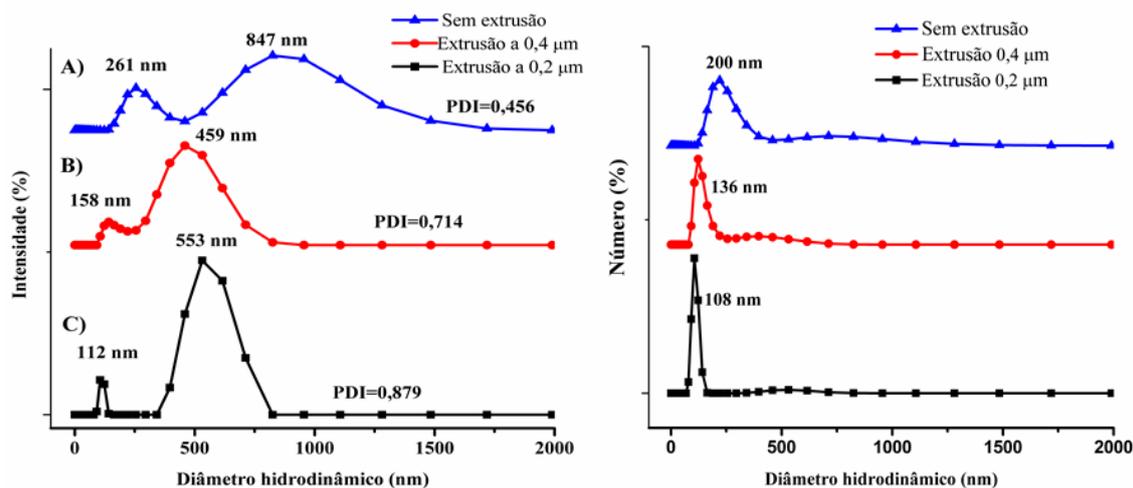


Figura II.10- Efeito da extrusão no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG₁₁₄PLA₁₅₃ seguida por sonicação durante 50 min. A) Sistema antes de extrudar. B) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,4 µm. C) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,2 µm.

Com base nas análises de DLS inferimos que a distribuição de tamanho por número do extrudado final após passagem por poro de 0,2 apresenta uma população prevalente na faixa de 100 nm indicando que o processo foi satisfatório. Os picos na faixa de 400- 500 nm vistos no gráfico por intensidade (Figura II.10B e C) podem indicar que em razão da rigidez da membrana dos PL, relacionada à massa molecular e T_g da porção hidrofóbica, a extrusão nem sempre leva à reorganização em vesículas menores, mas pode resultar em deformação das vesículas formadas.

Seguindo a mesma linha de raciocínio de que o valor de f e a técnica empregada para obtenção dos PL são determinantes para o processo de autoagregação, as mesmas condições de agitação, sonicação e extrusão até agora estudadas foram empregadas para o copolímero PEG₁₁₄PLA₁₈₀. Na Figura II.11 é possível ver a distribuição de diâmetro para o sistema obtido com esse copolímero.

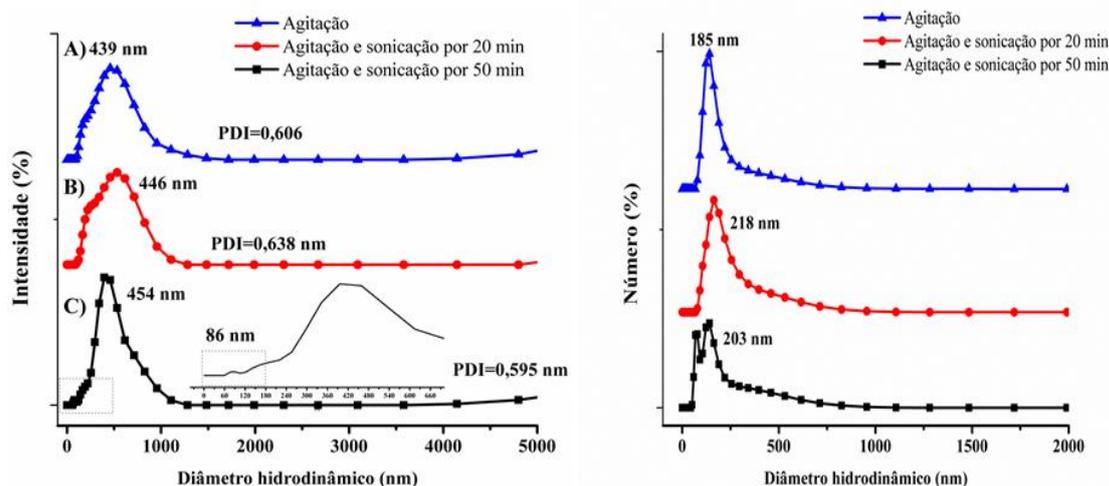


Figura II.11- Efeito da sonicação no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG₁₁₄PLA₁₈₀. A) Sistema antes agitados a 400 RPM *overnight*. B) Distribuição após sonicação por 20 min C) Distribuição após sonicação por 50 min.

O diâmetro hidrodinâmico, assim como para os copolímeros anteriores, aponta para obtenção de estruturas na escala nanométrica. Para este CA a faixa predominante por intensidade foi de 400 nm (Figura II.11 A) e os picos de tamanho por número estão na faixa de 200 nm. O valor de f é de 0,271, semelhante aos demais copolímeros, mas a massa molecular da porção PLA é maior (13000 g.mol^{-1}), sendo esperada uma membrana com espessura maior e, conseqüentemente, mais resistente.

A extrusão dessas nanoestruturas teoricamente é mais complexa em razão da massa molecular da porção PLA e do valor de T_g para este bloco (40°C). Além disso, já é observado que há uma faixa de tamanho em escala menor que 500 nm. A primeira tentativa (Figura II.12) sugere que a extrusão em membrana com poro de $0,4 \mu\text{m}$ resultou em uma população com tamanho menor ($\sim 170 \text{ nm}$) e outra não esperada maior que a inicial. A extrusão a $0,2 \mu\text{m}$ (Figura II.12 C) não se mostrou adequada resultando em uma população (intensidade e número) em escala maior que a encontrada nos sistema mesmo antes da sonicação, tal situação também foi relatada por RANK et al. (2009) que afirmou que a extrusão em poro de $0,2 \mu\text{m}$ foi prejudicada em razão da rigidez da membrana das vesículas.

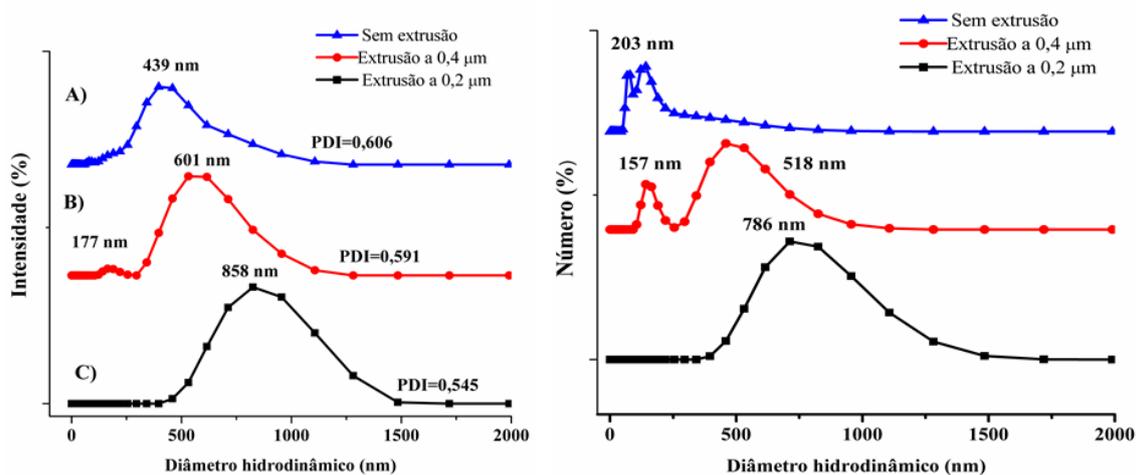


Figura II.12- Efeito da extrusão no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas obtidas a partir da hidratação do filme polimérico de PEG₁₁₄PLA₁₈₀ seguida por sonicação durante 50 min. A) Sistema antes de extrusar. B) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,4 µm. C) Distribuição por intensidade após extrusão com membrana de 0,2 µm.

A distribuição por número é a que mais se aproxima da composição majoritária do sistema e para esse copolímero já estava na faixa de 200 nm, sendo previsível que a extrusão em membrana com poro de 0,4 µm permitiria a passagem destas nanoestruturas. Mas os agregados na faixa de 400 nm revelados pela distribuição por intensidade estão no limite de diâmetro do poro e, considerando a dificuldade de deformação da membrana esperada para PEG₁₁₄PLA₁₈₀, a extrusão pode exigir uma pressão maior e resultar em uma desorganização da forma da nanoestrutura no extrudado que implique em aumento do tamanho dos agregados assim como ocorreu para PEG₁₁₄PLA₁₅₃ na extrusão em 0,2 µm.

Portanto, a extrusão em membranas com poro de 0,2 µm não seria adequada em temperatura ambiente tanto pela resistência à deformação das populações acima de 200 nm quanto pelo fato da maior parte da população estar em uma faixa de tamanho limite para este tamanho de poro, sendo dispensável esta etapa. Esses dados revelam a dificuldade de se extrudar as amostras em razão da rigidez da bicamada. LAPINSKI et al. (2007) encontraram que após acrescentar colesterol em lipossomos, o qual aumenta a

rigidez da membrana, a distribuição das vesículas extrudadas por DLS foi bimodal com um dos picos bem maior que o poro da membrana usada na extrusão.

Além disso, boa parte dos dados publicados para extrusão de PL são com polímeros cuja porção hidrofóbica apresenta massas moleculares das frações hidrofóbicas menores que 10 kDa (LEE et al., 2001; SMART et al., 2008; SCOTT et al., 2012), menores temperaturas de transição vítrea (BRINKHUIS et al., 2012) ou foram extrudados com uso de agentes plastificantes ou mesmo presença de lipídios (RANK et al., 2009; WINZEN et al., 2013).

II.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados, iniciou-se a construção de novo paradigma, o qual embasou as próximas etapas de trabalho. Teoricamente sabemos que:

- ❑ “Os PL são estruturas de autoagregação cuja formação é prevista pelo valor do da fração de volume hidrofílico (f)”, assim os copolímeros foram escolhidos com base nesse parâmetro além é claro da biodegradabilidade de biocompatibilidade.
- ❑ “Os PL são análogos dos lipossomos e assim técnicas como a sonicação e extrusão podem ser empregadas para redução de tamanho e polidispersão destes sistemas”, assim os métodos de obtenção foram definidos.
- ❑ “Uma vez que há formação dos PL, há probabilidade de encapsulação da ASNase”, assim o desafio maior seria a formação dos PL.

Na prática podemos considerar que:

- ❑ A autoagregação sugere um fenômeno espontâneo e a previsão da formação das nanoestruturas com base no valor de fração de volume hidrofílico f

corroborar com esse conceito de espontaneidade. No entanto, o que na verdade pode-se afirmar para os três PEG-PLA estudados é que o valor de f aliado a um método com um *input* de energia favorece ou não a formação destas nanoestruturas.

- ❑ Do ponto de vista morfológico, polimerossomos e lipossomos são vesículas, no entanto, a rigidez da cadeia de copolímero pode limitar a utilização da extrusão e sonicação em razão do tamanho da fração hidrofóbica, sendo necessário aumento de temperatura ou agentes que promovam fluidez destas membranas.
- ❑ A simples formação das vesículas não garante encapsulação da ASNase; o volume interno pode ser um fator limitante.

REFERÊNCIAS

ARIFIN, D. R.; PALMER, A. F. Polymersome encapsulated hemoglobin: A novel type of oxygen carrier. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 2172–2181, 2005.

BALASUBRAMANIAN, V.; HERRANZ-BLANCO, B.; ALMEIDA, P. V.; HIRVONEN, J.; SANTOS, H. A. Multifaceted Polymersome Platforms: Spanning from Self-assembly To Drug Delivery and Protocells. **Progress in Polymer Science**, v.60, p.51-85, 2016.

BATTAGLIA, G.; RYAN, A. J. Pathways of polymeric vesicle formation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 21, p. 10272–10279, 2006.

BLEUL, R.; THIERMANN, R.; MASKOS, M. Techniques to Control Polymersome Size. **Macromolecules**, v. 48, n. 20, p. 7396–7409, 2015.

BRINKHUIS, R. P.; STOJANOV, K.; LAVERMAN, P.; EILANDER, J.; ZUHORN, I. S.; RUTJES, F. P. J. T.; HEST, J. C. M. Van. Size Dependent Biodistribution and SPECT Imaging of ¹¹¹In-Labeled Polymersomes. **Bioconjugate Chem.**, v. 23, n.5, p. 958–965, 2012.

DIONZOU, M.; MORÈRE, A.; ROUX, C.; LONETTI, B.; MARTY, J.-D.; MINGOTAUD, C.; JOSEPH, P.; GOUDOUNÈCHE, D.; PAYRÉ, B.; LÉONETTI, M.; MINGOTAUD, A-F. Comparison of methods for the fabrication and the characterization of polymer self-assemblies: what are the important parameters? **Soft matter**, v. 12, n. 7, p. 2166–76, 2016.

DISCHER, B. M.; WON, Y. Y.; EGE, D. S.; LEE, J. C.; BATES, F. S.; DISCHER, D. E.; HAMMER, D. A. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. **Science**, v. 284, n.5417, p. 1143–1146, 1999.

DISCHER, D. E.; AHMED, F. Polymersomes. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 323–41, 2006.

HABEL, J.; OGBONNA, A.; LARSEN, N.; KRABBE, S.; ALMDAL, K.; HÉLIX-NIELSEN, C. How preparation and modification parameters affect PB-PEG polymersome properties in aqueous solution. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.54, n.16, p. 1–12, 2016.

LAPINSKI, M. M.; CASTRO-FORERO, A.; GREINER, A. J.; OFOLI, R. Y.; BLANCHARD, G. J. Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. **Langmuir**, v.23, n.23, p. 11677–11683, 2007.

LEE, J. C.; BERMUDEZ, H.; DISCHER, B. M.; SHEEHAN, M. A.; WON, Y.; BATES, F. S.; DISCHER, D. E. Preparation, Stability, and In Vitro Diblock Copolymers. **Biotechnology and Bioengineering**. v.73, n.2, p.135-145, 2001.

LOVERDE, S. M.; PANTANO, D. A.; CHRISTIAN, D. A.; MAHMUD, A.; KLEIN, M. L.; DISCHER, D. E. Curvature, rigidity, and pattern formation in functional polymer micelles and vesicles-From dynamic visualization to molecular simulation. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 15, n. 6, p. 277–284, 2011.

MEN, Y.; PENG, F.; TU, Y.; VAN HEST, J. C. M.; WILSON, D. a. Methods for production of uniform small-sized polymersome with rigid membrane. **Polymer Chemistry**, v. 7, n. 24, p. 3977–3982, 2016.

NAIIM, M.; BOUALEM, A; FERRE, C.; JABLOUN, M.; JALOCHA, A; RAVIER, P. Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements. **Soft matter**, v. 11, n. 1, p. 28–32, 2015.

RAMEEZ, S.; ALOSTA, H.; PALMER, A. F. Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: a potential oxygen carrier. **Bioconjugate chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1025–32, 2008.

RAMEEZ, S.; BAMBA, I.; PALMER, A. F. Large scale production of vesicles by hollow fiber extrusion: a novel method for generating polymersome encapsulated hemoglobin dispersions. **Langmuir**, v. 26, n. 7, p. 5279–85, 2010.

RANK, A.; HAUSCHILD, S.; FO, S.; SCHUBERT, R. Preparation of Monodisperse Block Copolymer Vesicles via a Thermotropic Cylinder - Vesicle Transition. v. 25, n.3, p. 1337–1344, 2009.

ROBERTSON, J. D.; YEALLAND, G.; AVILA-OLIAS, M.; CHIERICO, L.; BANDMANN, O.; RENSHAW, S. a; BATTAGLIA, G. pH-sensitive tubular polymersomes: formation and applications in cellular delivery. **ACS nano**, v. 8, n. 5, p. 4650–61, 2014.

SCOTT, E. A.; STANO, A.; GILLARD, M.; MAIO-LIU, A. C.; SWARTZ, M. A.; HUBBELL, J. A. Dendritic cell activation and T cell priming with adjuvant- and antigen-loaded oxidation-sensitive polymersomes. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 6211–6219, 2012.

SHIFRIN, S.; PARROTT, C. L. In vitro assembly of L-asparaginase subunits. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, p. 4175–4180, 1974.

SMART, T. P.; FERNYHOUGH, C.; RYAN, A. J.; BATTAGLIA, G. Controlling Fusion and Aggregation in Polymersome Dispersions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 29, n. 23, p. 1855–1860, 2008.

SO, S.; LODGE, T. P. Size Control and Fractionation of Ionic Liquid Filled Polymersomes with Glassy and Rubbery Bilayer Membranes. **Langmuir**, v. 32, n. 19, p. 4959–68, 2016.

WINZEN, S.; BERNHARDT, M.; SCHAEFFEL, D.; KOCH, A.; KAPPL, M.; KOYNOV, K.; LANDFESTER, K.; KROEGER, A. Submicron hybrid vesicles consisting of polymer–lipid and polymer–cholesterol blends. **Soft Matter**, v. 9, n. 25, p. 5883, 2013.

CAPÍTULO III

Desafios da autoagregação do copolímero poli (óxido de etileno-bloco-ácido láctico) em polimerossomos: Além dos paradigmas teóricos

Diante dos resultados apresentados no Capítulo 2, ficou claro que seria necessário um maior empenho no desenvolvimento de sistemas com melhores características do ponto de vista nanotecnológico. Assim este capítulo descreve novas estratégias usadas na autoagregação do copolímero poli (óxido de etileno-bloco-ácido láctico) em polimerossomos bem como a encapsulação da L-Asparaginase nestes polimerossomos.

Este capítulo foi publicado na Revista *Nanomaterials*:

APOLINÁRIO, A. C.; MAGOÑ; PESSOA JR, A.; RANGEL-YAGUI, C. O. Challenges for the Self-Assembly of Poly (Ethylene Glycol)-Poly (Lactic Acid) (PEG-PLA) into Polymersomes: Beyond the Theoretical Paradigms. *Nanomaterials*, v. 8, p. 373, 2018.
Fator de Impacto: 3.553

Capítulo III- Desafios da autoagregação do copolímero poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) em polimerossomos: *Além dos paradigmas teóricos*

III.1 INTRODUÇÃO

Recentemente, os polimerossomos (PL) têm se destacado na área farmacêutica como nanoestruturas versáteis com estabilidade coloidal e capacidade de encapsular uma ampla gama de fármacos hidrofílicas e hidrofóbicas incluindo macromoléculas de potencial terapêutico, como proteínas (PACHIONI-VASCONCELOS et al., 2016). A organização espontânea e reversível de moléculas de copolímeros anfifílicos em estruturas supramoleculares de PL é denominada autoagregação e é um dos campos mais desafiadores e mais promissores da nanotecnologia farmacêutica (LOOS, 2016).

Em teoria, o desenvolvimento de PL poderia ser conseguido através do simples contato de copolímeros anfifílicos com água devido ao efeito hidrofóbico (LOPRESTI et al., 2011). No entanto, apesar da espontaneidade da autoagregação, a literatura mostra que uma variedade de protocolos com emprego de energia, como agitação, sonicação e extrusão, são necessários para obter amostras de PL uniformes (HOWSE et al., 2009). Além disso, a organização reversível se opõe à natureza "não ergódica" dos copolímeros que possuem concentração de agregação crítica (CAC) próxima a zero, evitando a troca material entre os PL com a solução (PEGORARO et al., 2014).

A estrutura do copolímero determina as diferentes propriedades desses sistemas, sugerindo que o método de autoagregação de copolímeros em PL pode ser um processo desafiador que implica em diferentes plataformas, dependendo do copolímero utilizado. A principal teoria para a autoagregação de copolímeros em PL é baseada no valor do volume fração hidrofílica (f) que prevê se uma molécula anfifílica se agrega em micelas ou vesículas quando em soluções aquosas (DISCHER; AHMED, 2006). Este parâmetro,

entretanto, não garante a autoagregação de copolímeros em PL, as condições do método de preparação também são um fator preponderante (DIONZOU et al., 2016).

Um dos métodos mais utilizados para preparar nanoestruturas auto-agregadas é o método de hidratação do filme. No entanto, a hidratação do filme pode levar a distribuições amplas e multimodais de tamanho PL (FETSCH et al., 2016) e geralmente são necessárias etapas complementares para obter vesículas com uma distribuição de tamanho estreito. Entre estas etapas complementares, pode-se empregar a extrusão e sonicação dos sistemas.

A extrusão consiste em passar o sistema através de uma membrana de policarbonato com uma determinada tamanho de poro (BARTENSTEIN et al., 2016). Já a sonicação gera energia por meio do fenômeno da cavitação, que consiste na expansão e contração de bolhas de gás em um líquido exposto a ondas de pressão acústicas com ruptura (cavitação com colapso) ou sem ruptura (cavitação estável) das bolhas. A oscilação das bolhas cria uma pressão local resultando na quebra das vesículas maiores em fragmentos menores que se reorganizam em vesículas menores (LAPINSKI et al., 2007).

Neste capítulo, foi discutida a autoagregação do copolímero biodegradável e biocompatível poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) (PEG-PLA) em PL por meio de método de hidratação do filme, explorando diferentes valores de f deste, diferentes tempos de agitação e temperaturas. Também foram descritos diferentes passos pós-hidratação nas tentativas de reduzir as distribuições de tamanho dos PL.

III.2 MATERIAIS E MÉTODOS

III.2.1 Materiais

Os copolímeros PEG-PLA são os mesmos descritos no capítulo anterior no tópico. O ácido bicinconínico (BCA) foi adquirido da Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Co.,

Saint Louis, MO, Estados Unidos). L-asparaginase (225 U/mg) foi adquirida da ProSpec Tany[®] (Ness-Ziona, Israel). Todos os outros reagents são grau analítico e comprados da Synth[®] (São Paulo, São Paulo, Brazil) e água ultra-purificada em um sistema Milli-Q system (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA).

III.2.2 Preparação do filme

Para cada sistema, o copolímero foi dissolvido em clorofórmio a 1 mg. mL⁻¹ e o solvente foi evaporado sob vácuo à temperatura ambiente durante 2 horas no evaporador rotativo Büchi[®] R-210 (Flawil, Suíça) para formar um fino filme polimérico.

III.2.3 Hidratação do filme

O filme polimérico foi hidratado com PBS 1X pH 7,4 resultando em um sistema com PEG-PLA a 0,03 % (m/v). Para a hidratação do filme, empregou-se a agitação magnética em um agitador Corning PC-420D[®] (Chelmsford, Essex, Inglaterra) por 12, 24, 48 e 72 horas a 400 RPM à temperatura ambiente ou a 40 °C. Na tentativa de reduzir a distribuição de tamanho, a sonicação foi realizada em um banho de ultra-som Qsonica[®] (Columbiana County, Ohio, Estados Unidos) a 50W (em 20 ou 50 min)

III.2.4 Centrifugação e extrusão

Os sistemas obtidos após a hidratação do filme foram centrifugados a 2000 x g durante 5 minutos numa centrífuga Eppendorf 5810 R[®] (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi considerado como amostra purificada. A extrusão foi realizada a 40 °C passando os sistemas 31 vezes através de uma membrana de policarbonato de radiação de poro de 400 nm em uma extrusora Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, Estados Unidos).

III.2.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A análise DLS foi realizada como descrito na seção II.2.3.1 do Capítulo 2.

III.2.6 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

A análise de NTA foi realizada com um instrumento Nanosight[®] LM14 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) equipado com uma câmera CMOS científica montada em um microscópio óptico para rastrear a luz dispersa por partículas iluminadas por um feixe focado (80 μm) gerado por um laser de modo único diodo (405 nm).

III.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise de MET foi realizada em um microscópio Jeol 100 CX II (com aceleração de voltagem de 80 kV). Foram depositados 5 μL da amostra em *grids* de cobre recobertos por filme de carbono, 5 μL de ácido fosfotúngstico foi utilizado como agente de coloração negativa, seguido de lavagem com 5 μL de água Milli Q[®], entre estas etapas foi esperado o tempo de 1 min e a retirado o excesso de líquido com papel de filtro.

III.2.8 Ensaio de encapsulação

Para comprovar a estrutura vesicular, foi verificada a capacidade de encapsulação das proteínas albumina sérica bovina (BSA, 66 kDa) e a enzima anti-leucêmica L-asparaginase (ASNase, 142 kDa). Para isso, empregamos as melhores condições de preparo de polimerossomos (hidratação do filme à temperatura ambiente com agitação magnética a 400 RPM por 24 h, extrusão a 40 °C por membranas de poros de 400 nm) substituindo o PBS por uma solução BSA ou ASNase (1 mg. mL⁻¹) para hidratação de filmes. A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada por método indireto (Equação III.1) após centrifugação a 10.000 g por 30 min. A concentração de proteína

não encapsulada no sobrenadante foi determinada pelo método do ácido bicinônico (BCA) seguindo o protocolo do fabricante (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA).

$$EE (\%) = \frac{P_{total} - P_{sup}}{P_{total}} \quad (\text{Equação III.1})$$

Em que: P_{total} a massa total de proteína adicionada ao sistema, P_{sup} é a massa da proteína no sobrenadante

III.2.9 Análise estatística

Os dados foram tratados no software Origin Pro 8[®] (*Originlab Corporation*, Wellesley, MA, EUA). O teste t *Student* ou a análise de variância unidirecional (ANOVA) e Tukey *post hoc* foram utilizados para avaliar os valores de PDI encontrados para os sistemas obtidos de diferentes copolímeros em diferentes condições empregadas.

III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como apresentado no Capítulo 1, a agitação magnética otimizou a autoagregação de copolímeros e a sonicação auxiliou na redução do diâmetro hidrodinâmico, mas mesmo assim os valores de PDI continuavam altos e ainda era visível a presença de *bulk* polimérico. Na análise de DLS, a presença dessas grandes estruturas, mesmo em proporções menores, causa grande espalhamento de luz, uma vez que elas ocupam um maior volume na amostra em comparação com estruturas menores, mesmo que estas constituam a maior população por distribuição expressa por número no sistema heterogêneo.

De acordo com a ANOVA, considerando apenas a agitação, os valores de PDI para os três copolímeros são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) e o teste de Tukey confirmou que o PDI para PEG₄₅PLA₆₉ é diferente dos outros dois copolímeros. A função de correlação (Figura III.1A) confirmou este resultado, mostrando diferença nos tempos

de decaimento: quase 180 μs para PEG₄₅PLA₆₉ e ao redor de 100 μs para PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀. A função de correlação foi amplamente discutida por BARTENSTEIN et al. (2016) e é um fator que indica diferenças claras entre as amostras. A auto-correlação decai mais lenta para partículas maiores devido a dinâmica de relaxação mais lenta

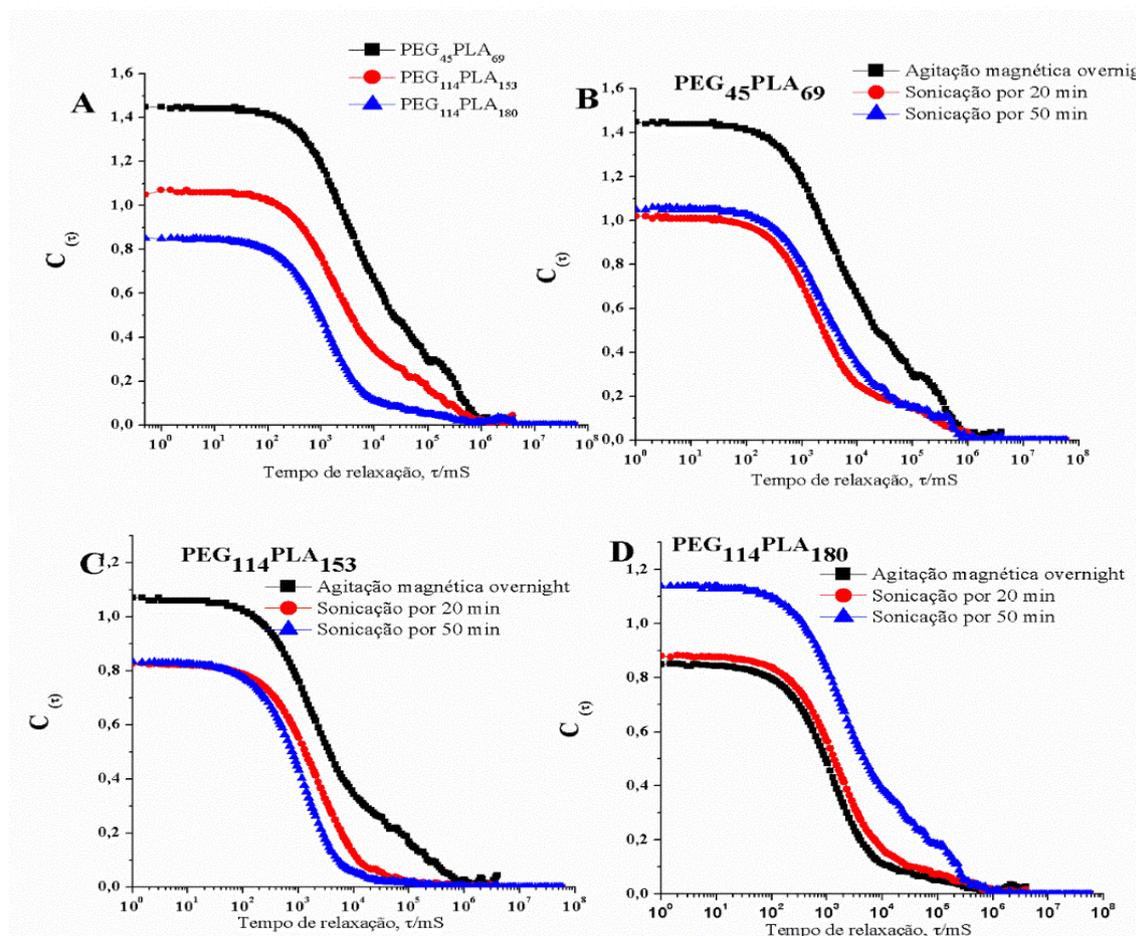


Figura III.1- Curvas de coeficiente de correlação: A) Tempo de relaxação para nanoestruturas formadas a partir dos copolímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico) sob agitação magnética overnight com as caudas no final de cada correlograma, atribuídas a partículas grandes. B) Efeito de sonicação para poli (ácido etileno-ácido láctico) PEG₄₅PLA₆₉. C) Efeito de sonicação para poli (ácido etileno-ácido láctico) PEG₁₁₄PLA₁₅₃ D) Efeito de sonicação para poli (ácido etileno-ácido láctico) de PEG₁₁₄PLA₁₈₀.

Uma “cauda” foi identificada no final da função de correlação para todos os copolímeros, enfatizando que todos os sistemas continham partículas grandes que contribuíam para um alto PDI. Normalmente, valores elevados de PDI em sistemas de PL podem ser atribuídos à presença de micelas, conforme relatado por BARTENSTEIN et al., 2016, mas em nosso estudo, atribuímos estes a estruturas maiores, pois nenhum sinal

de micelas foi observado. Assim foram feitas as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliar a morfologia dos nanoagregados formados e confirmar a presença de PL nos sistemas e, como mostrado na Figura III.2, é possível ver a presença de agregados não-esféricos e irregulares que corroboram com essa hipótese.

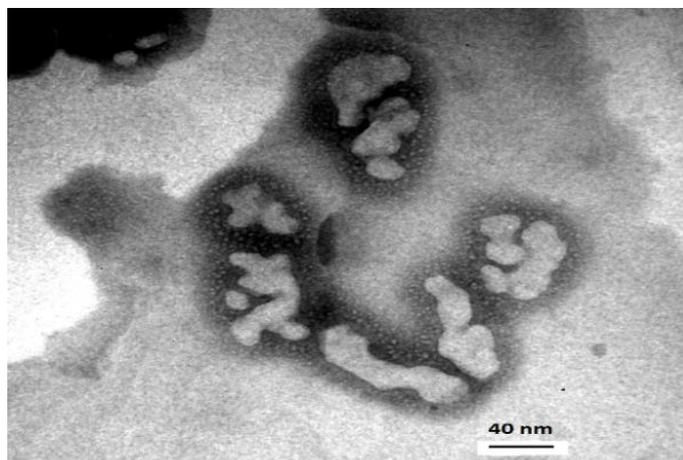


Figura III.2 -Microscopia eletrônica de transmissão de agregados não-esféricos formados por poli (etileno-bloco-ácido láctico) PEG₄₅PLA₆₉ após agitação *overnight* e sonicação por 50 min.

Além disso, embora a ANOVA tenha indicado valores de PDI estaticamente diferentes, estes valores foram superiores a $\sim 0,4$ para os três copolímeros, indicando que as amostras ainda apresentam uma distribuição de tamanho muito ampla (um sistema monodisperso teria um $PDI < 0,3$ (BARTENSTEIN et al., 2016).

Estes resultados indicaram que, do ponto de vista microscópico, as condições de hidratação do filme ainda eram insatisfatórias e outros esforços seriam necessários para obter preparações PL mais homogêneas.

III.3.1 Avaliação da autoagregação por hidratação do filme sob agitação magnética e sonicação

Para controlar a distribuição de tamanho, a sonicação foi considerada como um próximo passo e os resultados de DLS com os resultados apresentados no Capítulo 2. A literatura mostra que a sonicação reduziu o tamanho dos agregados devido à cavitação, que consiste na oscilação de pequenas bolhas de gás por expansão e contração em um

líquido exposto a ondas de pressão acústica, essas bolhas de gás acabam por colapsar resultando em altas pressões e esse estresse quebra os grandes agregados vesiculares presentes no sistema em pequenas vesículas(MAULUCCI et al., 2005).

Aqui neste capítulo, antes de lançar mão de outras técnicas como estratégias pós-filme para otimizar a formação de PL, foram feitas as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliar se havia mesmo formação de PL naquelas condições. Para os polímeros de PEG-PLA, não foram observadas diferenças significativas nos valores de PDI após a sonicação (Figura III.3) nem entre os diferentes tempos de sonicação (20 min e 50 min). O coeficiente de correlação (Figura III.1B-D), no entanto, foi ligeiramente diferente após a sonicação, com uma curva mais suave para todas as preparações sonicadas, exceto para PEG₁₁₄PLA₁₈₀. Isso poderia corresponder à distribuição de tamanho mais estreito para os correlogramas mais uniformes. O tempo de decaimento foi de aproximadamente 180 μ s para PEG₁₁₄PLA₁₈₀ e 100 μ s para PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀ após etapas de sonicação. A diferença nos interceptos do eixo Y não foi considerada neste estudo, porque a concentração das amostras medidas por DLS não foi controlada neste estudo.

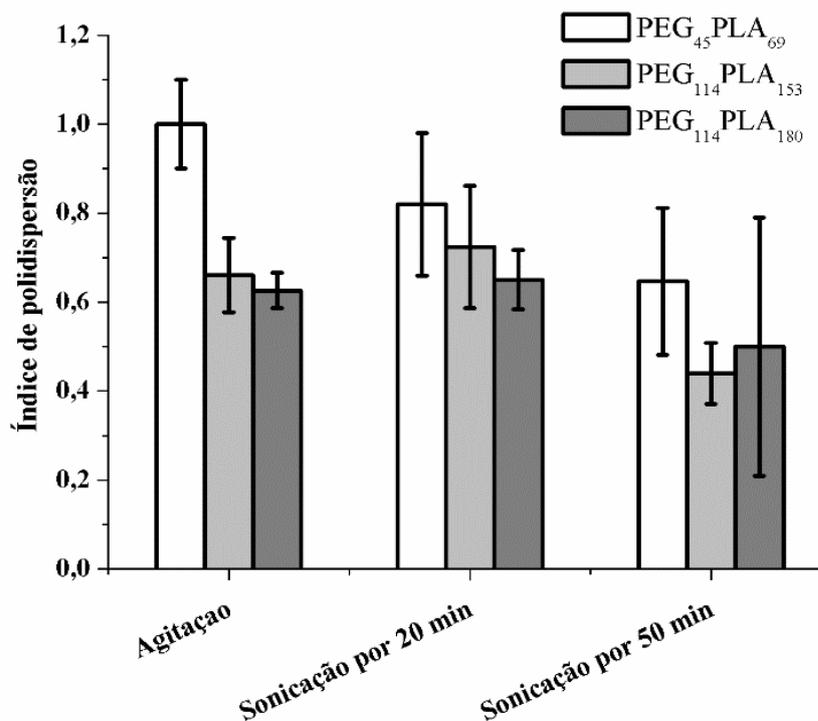


Figura III.3- Índices de polidispersão para os três copolímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico) sob agitação magnética *overnight* e diferentes tempos de sonicação (n = 3).

As imagens de MET dos sistemas obtidos com agitação magnética *overnight* e sonicação em 50 min são mostradas na Figura III.4. A morfologia típica das estruturas vesiculares foi confirmada e as medidas feitas com o programa *Image J*[®] indicaram diâmetros médios de cerca de 226 nm, 94 nm e 133 nm e membranas de 8, 10,5 e 14 para PEG₄₅PLA₆₉, PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀, respectivamente. Os PL foram considerados menores em relação aos tamanhos obtidos por DLS, mas isso é esperado, uma vez que o DLS estima o diâmetro hidrodinâmico e, conseqüentemente, a corona hidrofílica do PEG hidratado é levada em consideração (em média há três moléculas de água por unidade de óxido de etileno) (SMART et al., 2009)

A imagem de MET permitiu visualizar o interior das vesículas e sua membrana (Figura III.4, parte inferior direita). A preparação dos grids de MET com ácido fosfotúngstico leva a imagens de contraste negativas. A cor mais escura da membrana PL

pode ser explicada pelo fato de que o ácido fosfotúngstico reage mais fortemente com os grupos éster de PLA (LOPRESTI et al., 2011).

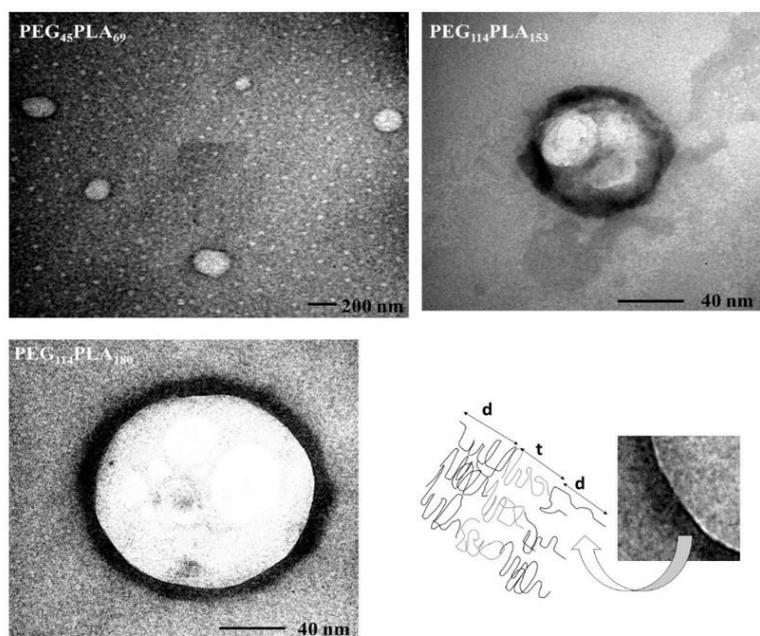


Figura III.4- Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de polímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico) PEG₄₅PLA₆₉, PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀ sob agitação magnética overnight e sonicção por 50 min. A representação esquemática destaca a membrana hidrofóbica (t) e a corona hidrofílica de PEG (d).

III.3.2 Novas estratégias para a autoagregação por hidratação do filme sob agitação magnética

Para evitar a distribuição ampla de tamanho das nanoestruturas com valores elevados de PDI, foram investigados diferentes tempos de agitação magnética a 400 rpm: 24, 48 e 72 horas de agitação magnética (400 rpm) à temperatura ambiente ou a 40 °C. Os resultados são apresentados na Figura III.5 e mostram que a agitação por 24h resultou em valores de PDI menores que a agitação *overnight* descrita no Capítulo 2. Para PEG₄₅PLA₆₉ e PEG₁₁₄PLA₁₅₃, uma diminuição no PDI foi observada. O tempo de agitação mais longo facilitou a hidratação do copolímero inicialmente quebrando a rede polimérica do filme em estruturas menores e mais uniformes. O bloco hidrofóbico de PEG₁₁₄PLA₁₈₀ tem temperatura de transição vítrea e massa molecular mais altos entre os

três copolímeros como já comentado no capítulo 2, conseqüentemente a formação de vesículas unilamelares esféricas em solução aquosa é dificultada.

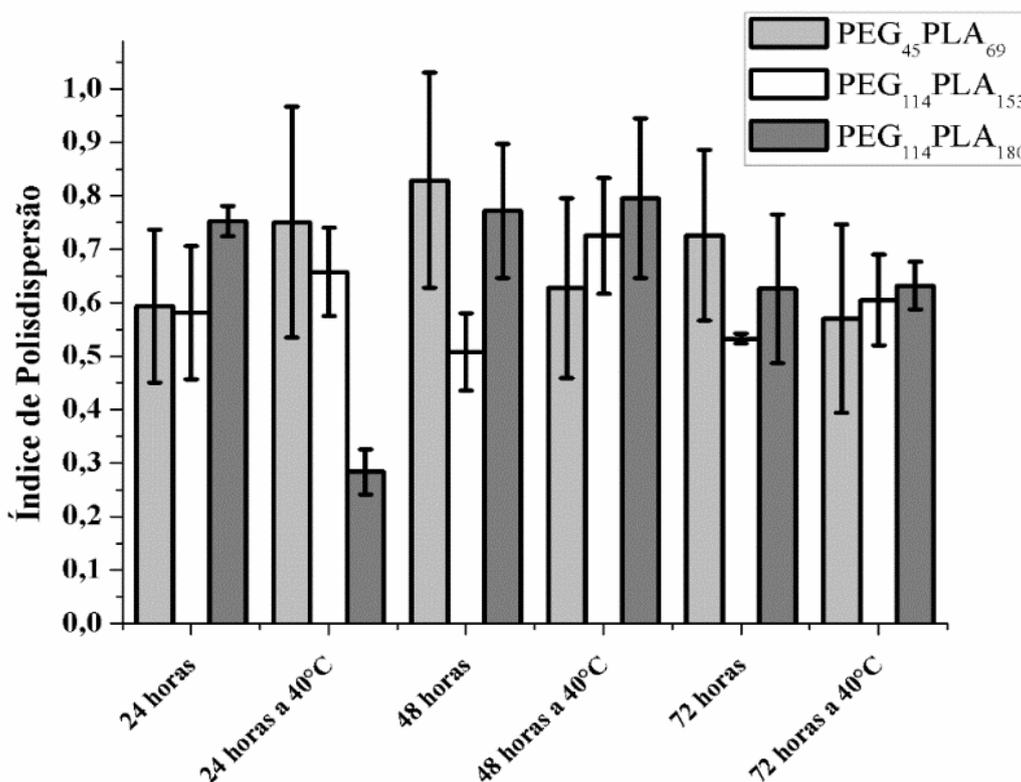


Figura III.5 Índices de polidispersão médio para os copolímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico), PEG-PLA, sob agitação magnética em diferentes tempos e sob aquecimento a 40 °C (n = 3).

De acordo com os resultados, tempos de agitação superiores a 24 horas, bem como aquecimento, não melhoraram as distribuições de tamanho. A ANOVA não apontou diferença estatisticamente significativa para os valores de PDI de PEG₄₅PLA₆₉ e PEG₁₁₄PLA₁₅₃ para os tempos de agitação de 24, 48 e 72 horas.

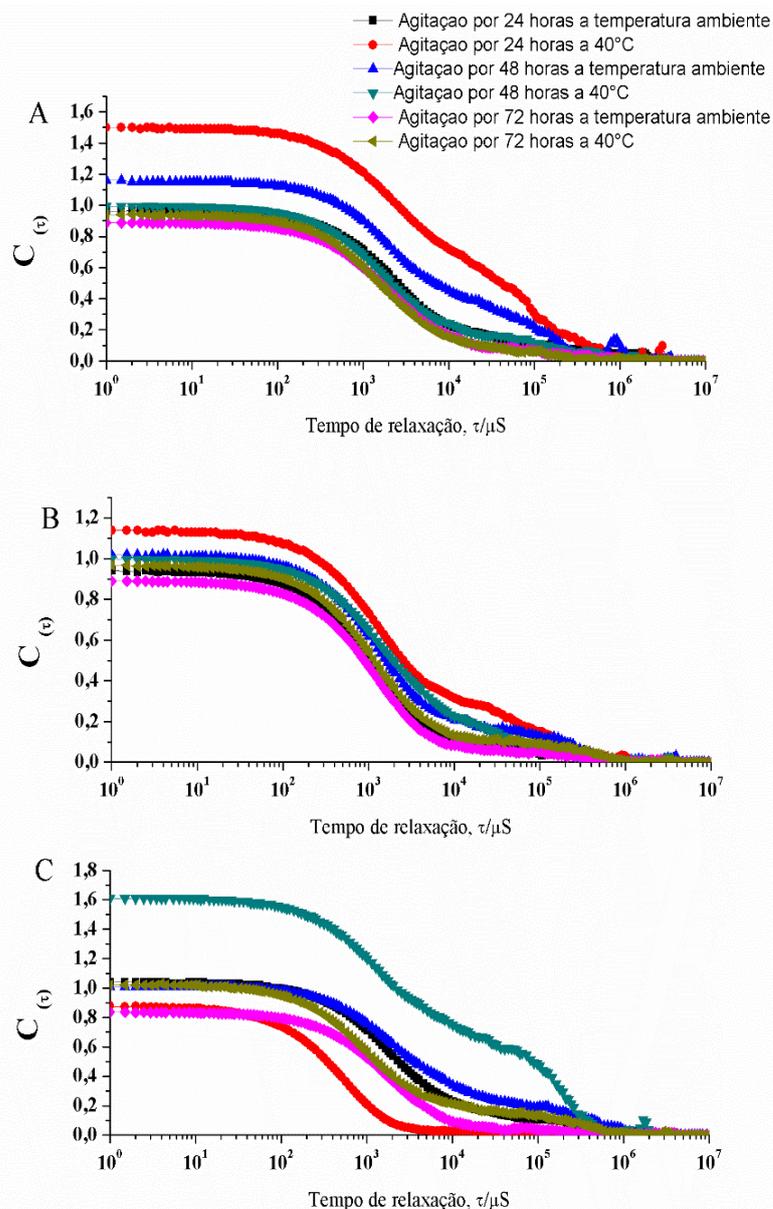


Figura III.6- Curvas de coeficiente de correlação para nanoestruturas formadas a partir dos três copolímeros de poli (etileno-bloco-ácido láctico) PEG₄₅PLA₆₉, PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀ sob agitação a 24, 48 e 72 horas com ou sem aquecimento.

Para o PEG₁₁₄PLA₁₈₀, observou-se um valor de PDI significativamente menor ($p < 0,05$) após 24h de agitação a 40 °C, talvez por causa da maior temperatura de transição vítrea do PLA₁₈₀. A Figura III.6 mostra os coeficientes de correlação e pode-se ver ligeiras diferenças de tempo de decaimento, bem como a melhora da curva para PEG₁₁₄PLA₁₈₀ indicando amostras mais homogêneas. Geralmente, o tamanho dos PL aumenta quando eles são preparados em condições de temperatura de hidratação mais altas.

III.3.3 Efeito da centrifugação e extrusão

O tempo de agitação de 24 horas à temperatura ambiente foi escolhido como a condição para os experimentos adicionais porque os resultados discutidos acima indicaram que esta condição poderia melhorar o PDI dos PL formados por PEG₄₅PLA₆₉ e PEG₁₁₄PLA₁₅₃. Aqui os esforços para reduzir o PDI e, conseqüentemente, obter uma distribuição de tamanho mais estreita foram focados no fracionamento das populações das nanoestruturas por centrifugação em tentativas de separar as vesículas e o *bulk* polimérico. A Figura III.7 mostra que

a centrifugação resultou em valores de PDI de 0,363 e 0,280 para PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀, respectivamente. A centrifugação foi rápida, simples e resultou na separação bem-sucedida das vesículas do meio contendo grandes agregados.

Infelizmente, a análise DLS não pôde ser realizada para PEG₄₅PLA₆₉ porque a centrifugação resultou em amostras muito diluídas devido à perda de material durante a centrifugação.

De forma semelhante, o uso da extrusão nos métodos pós-hidratação resultou na perda de material e na diluição dos sistemas, mas mesmo assim foram encontrados PL nos mesmos como confirmado por imagens TEM (Figura III.8). Assim aumentamos a concentração inicial de copolímero na preparação dos PL para 0,1 % e, levando em consideração a dificuldade de deformação das vesículas em razão da temperatura de

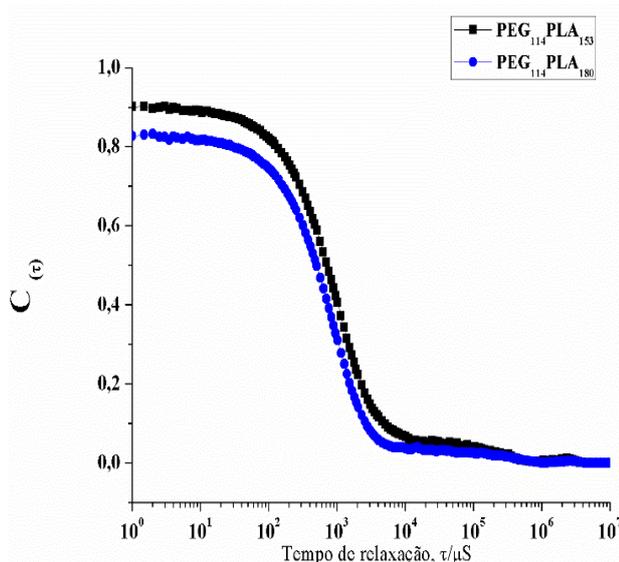


Figura III.7- Curvas de coeficientes de correlação para nanoestruturas formadas a partir dos copolímeros de polietileno-bloco-ácido láctico) PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀ após centrifugação.

transição vítrea, a extrusão foi realizado a 40 °C. Além disso, utilizamos a análise de NTA para complementar os estudos DLS (Figura III.8).

Os PL preparados com maior concentração de copolímero (0,1% (m / v)) (Figura 9) apresentaram distribuição de tamanho mais estreita com valores de PDI de 0,345, 0,144 e 0,081 para PEG₄₅PLA₆₉, PEG₁₁₄PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀, respectivamente. No entanto, para PEG₄₅PLA₆₉ uma cauda no correlograma ainda foi observada, correspondente à partículas grandes (Figura III.9). Tanto a centrifugação como a extrusão levaram à redução do PDI, porém os mecanismos são diferentes. O primeiro método é um passo de purificação com a separação das frações por tamanho e densidade (ROBERTSON et al., 2014). Na extrusão, por outro lado, nanoestruturas maiores se deformam ou rompem e a autoagregação ocorre de novo (BARTENSTEIN et al., 2016).

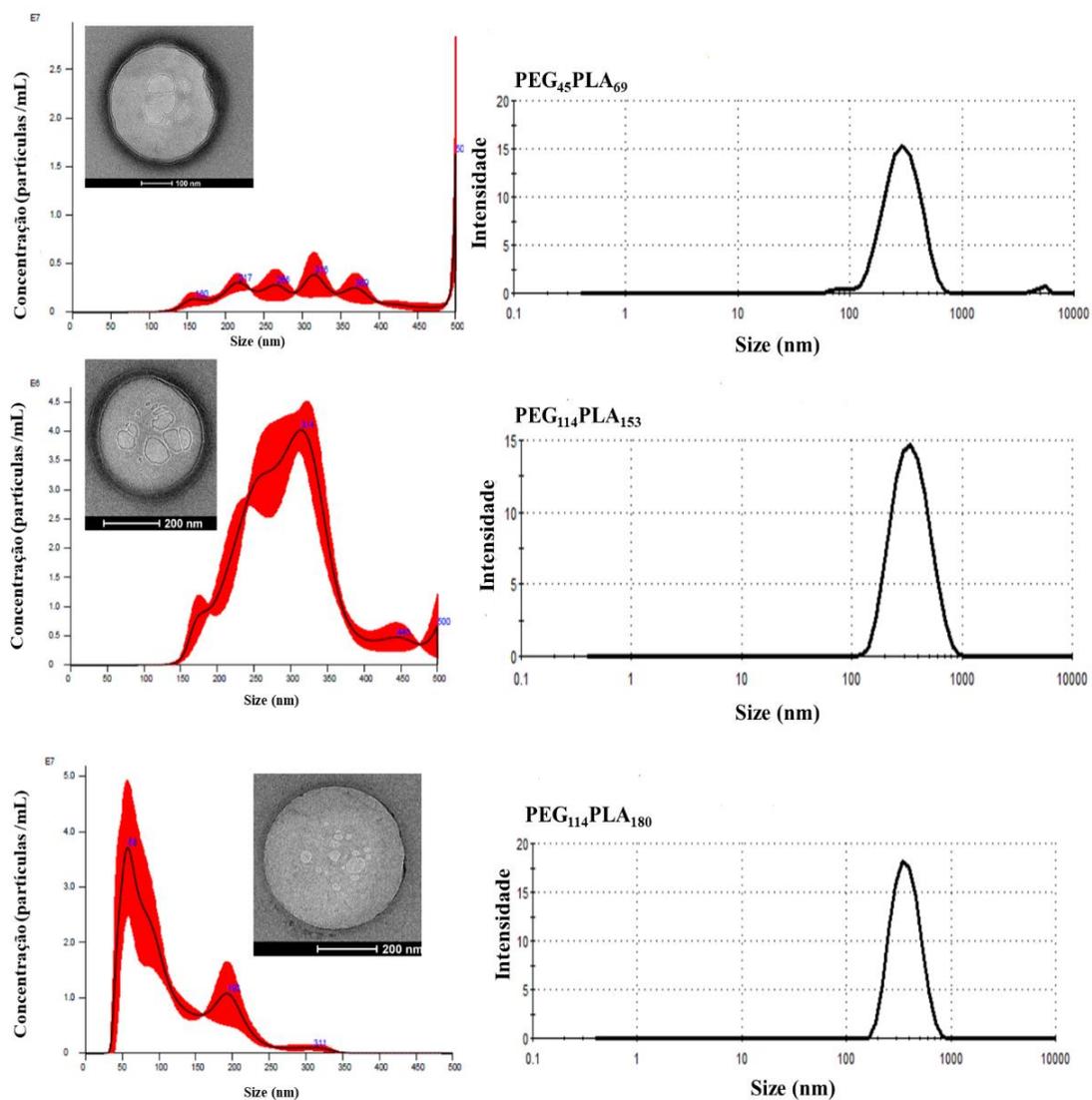


Figura III.8- Análise de rastreamento das nanoestruturas, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento dinâmico de luz por intensidade de polimerossomos de PEG-PLA preparados por hidratação do filme polimérico sob agitação magnética durante 24 horas à temperatura ambiente após extrusão por 31 vezes através de membrana de policarbonato de radiação de poro de 400 nm.

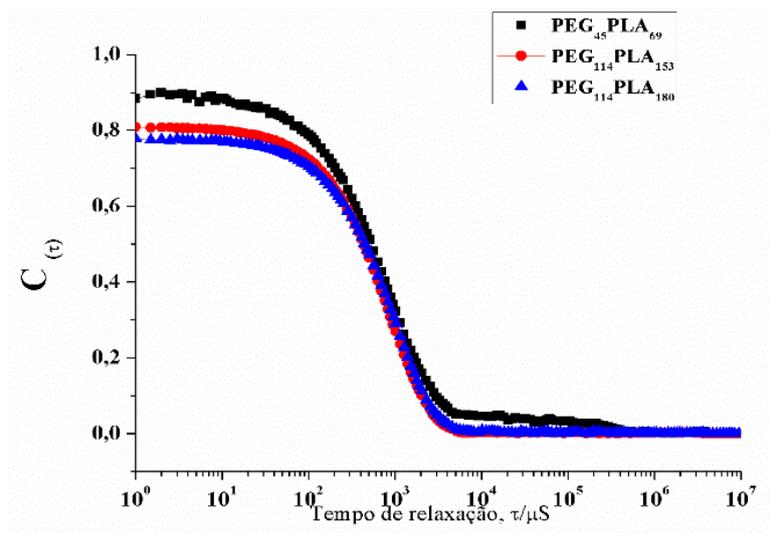


Figura III.9- Curvas de coeficiente de correlação para nanoestruturas após extrusão a 40 °C.

Como prova de conceito da formação de PL, encapsulamos BSA e ASNase nos PL (Figura III.10). Nossos resultados confirmam a formação de PL e a capacidade de encapsular proteínas globulares dentro do core aquoso e os valores de eficiência de encapsulação (EE%) apresentados aqui estão de acordo com descrito anteriormente na literatura para proteínas globulares (WANG et al., 2012). Valores mais altos de EE foram observados para PEG₄₅-PLA₆₉, que corresponde a vesícula com maior tamanho e indica que está diretamente relacionado ao volume do core aquoso. Além disso, pode-se notar que para todos PEG-PLAs foram obtidos valores similares de EE% para BSA e ASNase, reforçando encapsulação dependeu principalmente da concentração de proteína em solução e, neste caso, não se referem ao tamanho da proteína e/ou massa molecular. Portanto, para aumentar EE% em PEG-PLA PL, é necessário considerar trabalhar com soluções de proteína mais concentradas, que podem apresentar desafios como aumento da probabilidade de agregação de proteínas.

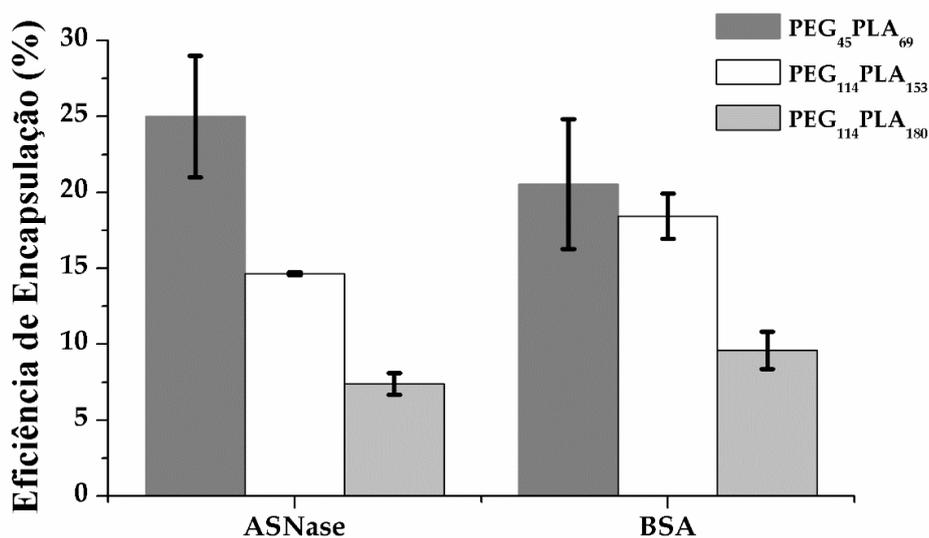


Figura III.10- Eficiência de encapsulação da L-asparginase (ASNase) and albumina sérica bovina (BSA) nos polimerossomos de PEG-PLA (n = 3).

Na Figura III.11 estão resumidos os desafios da autoagregação do copolímero poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) em polimerossomos.

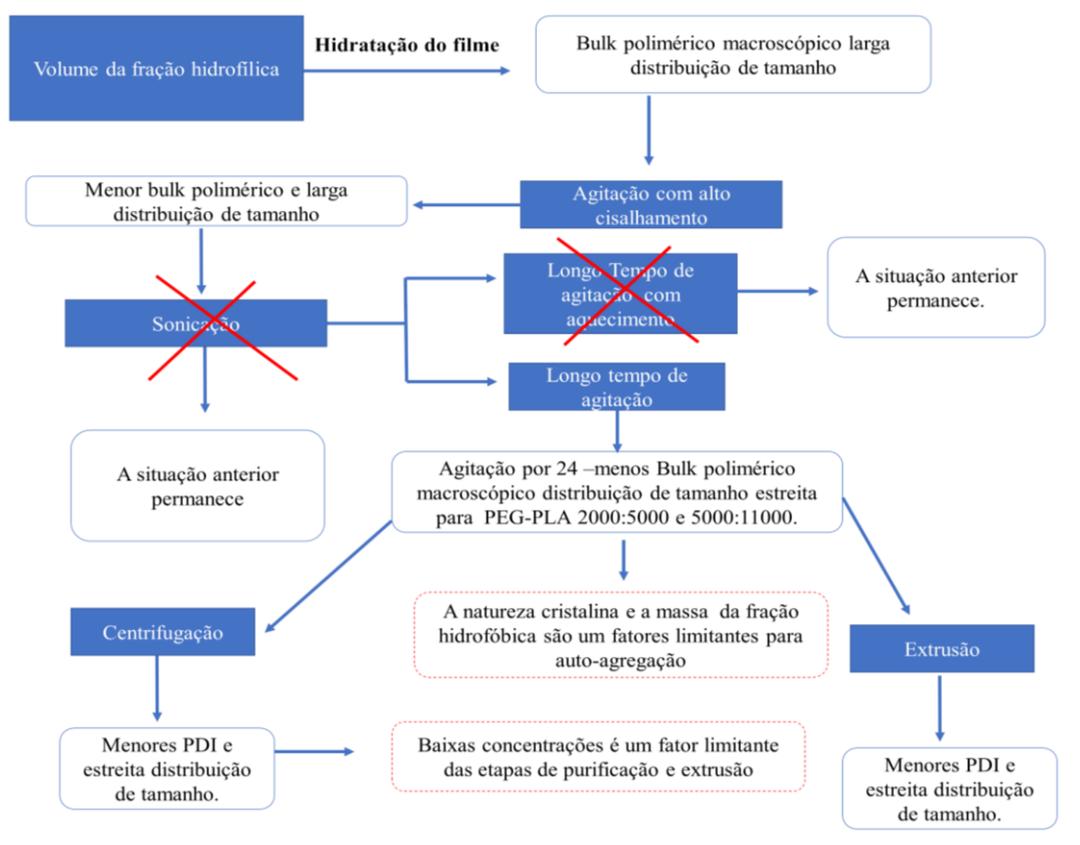


Figura III.11- Desafios da autoagregação do copolímero poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) em polimerossomos.

III.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo demonstramos a autoagregação copolímeros de polietileno-bloco-ácido láctico) (PEG-PLA) em polimerossomos. Nossos resultados mostram que, quando comparados a outras moléculas anfifílicas, os copolímeros em bloco apresentam natureza complexa e para produzir polimerossomos outras propriedades devem ser levadas em conta além dos conceitos clássicos de autoagregação espontânea em água. Isso pode incluir massa molecular ou temperatura de transição vítrea do bloco hidrofóbico. Além disso, nosso trabalho mostra que o ajuste de métodos pós-filme, tais como agitação (força de cisalhamento), extrusão, sonicação e a centrifugação contribuem para as características finais dos polimerossomos. Por exemplo, a transição vítrea do copolímero pode aumentar a dificuldade da autoagregação e, em alguns casos podem resultar em perda de material na forma de *bulk* polimérico. Técnicas de hidratação pós-filme, tais como extrusão e centrifugação, podem remover o *bulk* e melhorar a homogeneidade do sistema final, mas também podem resultar na diluição do mesmo. Além disso, deve-se considerar que, apesar dos desafios autoagregação, copolímeros de PEG-PLA com menor fração hidrofílica (f) resultam em maior eficiência de encapsulação para moléculas hidrofílicas, como proteínas, que é desejado para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para essas moléculas. Todas estas questões devem ser consideradas cuidadosamente no desenvolvimento de polimerossomos no campo da tecnologia farmacêutica.

REFERÊNCIAS

BARTENSTEIN, J. E.; ROBERTSON, J.; BATTAGLIA, G.; BRISCOE, W. H. Stability of polymersomes prepared by size exclusion chromatography and extrusion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, n.5, p. 739–746, 2016.

DIONZOU, M.; MORÈRE, A.; ROUX, C.; LONETTI, B.; MARTY, J.-D.; MINGOTAUD, C.; JOSEPH, P.; GOUDOUNÈCHE, D.; PAYRÉ, B.; LÉONETTI, M.; MINGOTAUD, A.-F. Comparison of methods for the fabrication and the characterization

of polymer self-assemblies: what are the important parameters? **Soft Matter**, v. 12, n. 7, p. 2166–2176, 2016.

DISCHER, D. E.; AHMED, F. Polymersomes. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 323–41, 2006.

FETSCH, C.; GAITZSCH, J.; MESSENGER, L.; BATTAGLIA, G.; LUXENHOFER, R. Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolypeptoids – Micelles, Worms and Polymersomes. **Scientific Reports**, v. 6, n.1, 2016

HOWSE, J. R.; JONES, R. a L.; BATTAGLIA, G.; DUCKER, R. E.; LEGGETT, G. J.; RYAN, A. J. Templated formation of giant polymer vesicles with controlled size distributions. **Nature materials**, v. 8, n. 6, p. 507–511, 2009.

LAPINSKI, M. M.; CASTRO-FORERO, A.; GREINER, A. J.; OFOLI, R. Y.; BLANCHARD, G. J. Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. v.23, n. 23, p. 11677–11683, 2007.

LOOS, K. Self-assembly. **Polymer**, v. 107, p. 341–342, 2016.

LOPRESTI, C.; MASSIGNANI, M.; FERNYHOUGH, C.; BLANAZS, A.; RYAN, A. J.; MADSEN, J.; WARREN, N. J.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L.; CHIRASATITSIN, S.; ENGLER, A. J.; BATTAGLIA, G. Controlling Polymersome Surface Topology at the Nanoscale by Membrane Confined Polymer / Polymer Phase Separation. **ACS Nano**, v.5, n. 3, p. 1775–1784, 2011.

MAULUCCI, G.; DE SPIRITO, M.; ARCOVITO, G.; BOFFI, F.; CASTELLANO, A. C.; BRIGANTI, G. Particle size distribution in DMPC vesicles solutions undergoing different sonication times. **Biophysical journal**, v. 88, n. 5, p. 3545–3550, 2005.

PACHIONI-VASCONCELOS, J. D. A.; LOPES, A. M.; APOLINÁRIO, A. C.; VALENZUELA-OSÉS, J. K.; COSTA, J. S. R.; NASCIMENTO, L. D. O.; PESSOA, A.; BARBOSA, L. R. S.; RANGEL-YAGUI, C. D. O. Nanostructures for protein drug delivery. **Biomaterials science**, v. 4, n. 2, p. 205–18, 2016.

PEGORARO, C.; CECCHIN, D.; MADSEN, J.; WARREN, N.; ARMES, S. P.; MACNEIL, S.; LEWIS, A.; BATTAGLIA, G. Translocation of flexible polymersomes across pores at the nanoscale. **Biomaterials Science**, v. 2, p. 680-692, 2014.

ROBERTSON, J. D.; YEALLAND, G.; AVILA-OLIAS, M.; CHIERICO, L.; BANDMANN, O.; RENSHAW, S. a; BATTAGLIA, G. pH-sensitive tubular polymersomes: formation and applications in cellular delivery. **ACS nano**, v. 8, n. 5, p. 4650–61, 2014.

SMART, T. P.; MYKHAYLYK, O. O.; RYAN, A. J.; BATTAGLIA, G. Polymersomes hydrophilic brush scaling relations. **Soft Matter**, v. 5, n. 19, p. 3607, 2009.

ANG, 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. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 44, p. 11122–11125, 2012.

CAPÍTULO IV

***Design* racional para encapsulação de L-asparaginase em polimerossomos: Existem regras práticas para encapsulação de proteínas?**

Os resultados apresentados nos Capítulos 2 e 3 indicam a dificuldade de se encapsular L-asparaginase em razão do gargalo da obtenção de sistemas contendo polimerossomos com distribuição de tamanho e índices de polidispersão que atendam a critérios nanotecnológicos, bem como de aspectos inerentes aos copolímeros utilizados que levam à formação de grande proporção de *bulk* polimérico e baixa concentração vesículas. Assim o Capítulo 4 descreve uma nova estratégia para encapsulação da L-asparaginase realizada durante estágio na *University College London*, no laboratório do professor Giuseppe Battaglia.

Capítulo IV- *Design* racional para encapsulação de L-asparaginase em polimerossomos: Existem regras práticas para encapsulação de proteínas?

IV.1 INTRODUÇÃO

A nanoencapsulação de proteínas é desejável para a terapia de várias patologias, não só para facilitar a ação em tecidos tumorais por meio do efeito de Permeação e Retenção Aumentadas, do inglês, *Enhanced Permeation and Retention* (EPR), como também para proteger essas proteínas de possíveis variações físico-químicas e efeitos de proteases e permitir a circulação prolongada, evitando reações imunogênicas (PACHIONI-VASCONCELOS et al., 2016).

Entre as proteínas empregadas como fármacos, a L-asparaginase (ASNase) é amplamente usada como principal componente na terapêutica da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). No entanto, a ASNase também apresenta imunogenicidade em pacientes durante a terapia da LLA, desencadeando a produção de anticorpos anti-asparaginase (IgG e IgM) que podem levar a reações de hipersensibilidade, alergia e até anafilaxia, ou ainda a um fenômeno chamado inativação silenciosa (ZALEWSKA-SZEWCZYK et al., 2007). A nanoencapsulação da ASNase poderia minimizar essas desvantagens.

Portanto, o desenvolvimento de uma plataforma para uma biodistribuição adequada evitando a baixa meia-vida desta enzima é um ponto importante na pesquisa de novas alternativas para o tratamento da LLA. A ASNase tem sido usada desde 1978 com poucos incrementos tecnológicos, com o mais eficiente até agora sendo a peguilação (CHEN, 2015). Nesse sentido, nanocarreadores análogos de lipossomos, tais como os polimerossomos (PL), que são vesículas formadas a partir de copolímeros anfifílicos, podem manter a enzima encapsulada no core aquoso e minimizar os efeitos imunogênicos, devido à sua corona polimérica que teria efeito furtivo (APOLINÁRIO, et al., 2017).

Mesmo com todos os benefícios nanotecnológicos, o desenvolvimento de PL contendo ASNase como um sistema comercial é um desafio significativo. Existem cinco estágios gerais de desenvolvimento da nanomedicina: 1) pesquisa básica de nanociências, 2) desenvolvimento de aplicações e 3) estudos pré-clínicos em animais, que podem levar até 20 anos, 4) investigações clínicas e 5) nanomedicina comercial final, que podem levar até mais 7 anos (ETHERIDGE et al., 2013). As pesquisas básicas apontam baixa encapsulação de proteínas em geral devido aos aspectos físico-químicos da proteína, como alta massa molecular e tendência à agregação (O'NEIL et al., 2009; LIU et al., 2010; CHENG et al., 2011; ZHANG et al., 2012; SUN et al., 2014; LU et al., 2015). Além disso, estudos com PL visando a liberação de fármacos começaram em 1999 (DISCHER et al., 1999) e recentemente, um estudo liderado por Battaglia e colaboradores relatou uma estratégia inovadora envolvendo a encapsulação de proteínas através da abordagem de quimiotaxia, na qual a reação enzimática ocorreria dentro da vesícula sem liberação da enzima na corrente sanguínea (JOSEPH et al., 2017).

Nesse capítulo empregamos os copolímeros poli (2-metacrilóiloxietil fosforilcolina)-bloco-poli(2-diisopropilamino etil metacrilato) (PMPC-PDPA) e poli(óxido de etileno)-bloco-poli(2-diisopropilamino etil metacrilato) (PEG-PDPA) para preparar polimerossomos e encapsular a ASNase. A porção PDPA apresenta um pKa de 6,2 e, dependendo do valor de pH encontra-se protonada (hidrofílica) ou desprotonada (hidrofóbica). Duas abordagens de preparo de PL diferentes foram empregadas: o método de troca de pH e a hidratação do filme, seguida por eletroporação como método para inserir a proteína no *core* aquoso dos polimerossomos. Portanto, empregamos uma abordagem de *bottom-up* e uma de *top-down*, respectivamente.

IV.2 MATERIAIS E MÉTODOS

IV.2.1 Materiais

A L-Asparaginase foi adquirida a ProSpec Tany® 225U / mg (Ness-Ziona, Israel). Os demais reagentes químicos foram adquiridos da Sigma Aldrich: metanol anidro (MeOH, $\geq 99,8\%$), ácido trifluoroacético (TFA), ácido fosfotúngstico (PTA), pastilhas de tampão salino fosfato (PBS) e Sepharose 4B.

IV.2.2 Síntese de PMPC₂₅-PDPA₇₂ e PEG₁₀₀-PDPA₈₀

Os copolímeros foram sintetizados de acordo com a metodologia descrita por HEARNDEN et al. (2009) e COLLEY et al. (2010) e foram cedidos pelo grupo de pesquisa do professor Battaglia.

IV.2.3 Preparação de polimerossomos

As dispersões de PL foram preparadas por duas rotas: troca de pH (abordagem *bottom-up*) e hidratação de filme fino seguido de eletroporação (abordagem *top-down*).

IV.2.3.1 Troca de pH

Uma alíquota de 20 mg de copolímero PMPC₂₅-PDPA₇₀ ou PEG₁₁₃-PDPA₈₀ foi solubilizada em 2 mL de PBS pH 2,0 e filtrados em membrana de 0,2 μm de diâmetro. O pH foi então aumentado lentamente para 6,0 por meio da adição de NaOH 1 M a uma vazão de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ e em seguida adicionou-se a solução de ASNase em PBS 7,4 (800 μL , 5 mg/mL). Nesta etapa, é importante que o pH seja inferior a 6,4 (valor de pKa de PDPA) garantindo que as cadeias de PDPA estejam na forma molecular. Após atingir pH 6,0, a taxa diminuiu para 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o pH foi aumentado para 7,4. A Figura IV.1 ilustra o princípio teórico da técnica empregada, este processo foi realizado utilizando uma

bomba de seringa e a suspensão de polímeros foi mantida sob agitação magnética constante. O sistema foi purificado por meio de centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos para remoção de agregados macroscópicos e em seguida a 10 000 x g durante 5 min para remoção de micelas, sendo o *pellet* final ressuspensão em PBS. Outra etapa de purificação permitiu remover micelas remanescentes e proteína livre, utilizando cromatografia de exclusão molecular.

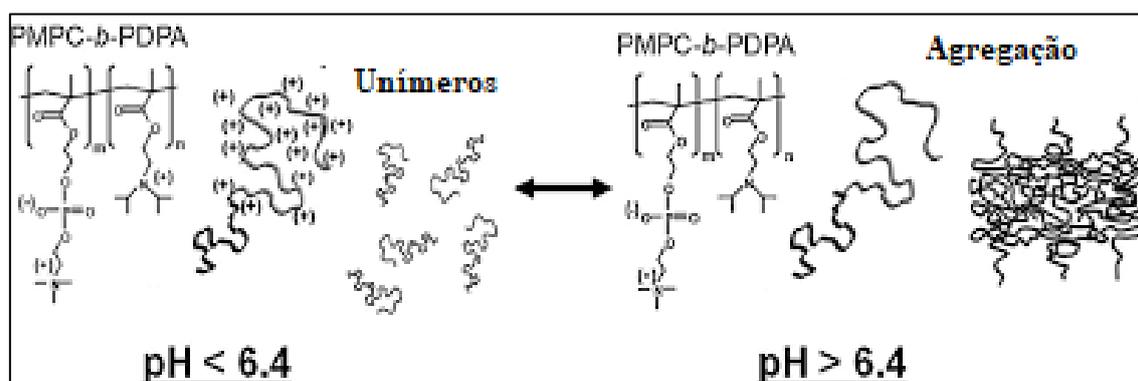


Figura IV.1- Estrutura química do copolímero em bloco PMPC-PDPA, onde m e n são os graus médios de polimerização. Abaixo do pKa do PDPA (6,4), a amina terciária nas cadeias de PDPA está protonada, tornando o bloco copolímero hidrofílico e proporcionando sua dissolução em meio aquoso como unímeros. Acima de pH 6.4, os grupos de aminas terciárias PDPA tornam-se desprotonados, tornando este bloco hidrofóbico e o copolímero anfifílico, desencadeando assim sua autoagregação. O mesmo princípio vale para o bloco PEG-PDPA. Fonte: Adaptado de Lomas et al. (2010).

IV.2.3.2 Hidratação do filme e eletroporação

Os copolímeros PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₁₃-PDPA₈₀ foram dissolvidos numa mistura de CHCl₃ e MeOH (2:1 v/v) a uma concentração de copolímero total de 5 mg. mL⁻¹ e em seguida o solvente foi removido à vácuo a 30 °C por 48 h. O filme polimérico resultante foi hidratado com PBS (pH 7,4), resultando em sistemas com concentração final de copolímero de 5 mg. mL⁻¹, os quais foram mantidos sob agitação vigorosa durante 4 semanas para PMPC₂₅-PDPA₇₀ e 2 semanas para PEG₁₁₃-PDPA₈₀. Agregados macroscópicos (*bulk* polimérico) foram removidos das amostras por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos.

A eletroporação foi realizada nos sistemas após remoção do *bulk* polimérico misturando suavemente 200 µL da suspensão contendo os PL e 200 µL de solução de

ASNase (5 mg. mL^{-1}) em uma cubeta de eletroporação. Esta mistura foi eletroporada (eletroporador Eppendorf 2510) empregando-se 10 ou 20 pulsos de um campo elétrico AC a 2500 V com um intervalo de 60 s entre cada pulso.

IV.2.4 Caracterização dos sistemas de polimerossomos

IV.2.4.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A distribuição de tamanho dos PL obtidos por cada método foi analisada por DLS usando um instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS que opera com um laser He-Ne 633 nm e um detector ajustado em um ângulo de 173° . As amostras foram previamente diluídas a 1:20 (aproximadamente 0.25 mg. mL^{-1}) em PBS filtrado (filtro de $0,2 \mu\text{m}$) e transferidas para cubetas de poliestireno (Malvern, DTS0012). Os resultados obtidos foram apresentados como a média de três medições realizadas em taxas de contagem de 100 a 200 kcps (contagens por segundo $\times 10^3$). O diâmetro hidrodinâmico médio das partículas nas amostras foi obtido a partir de coeficientes de difusão usando a equação de Stokes-Einstein, apresentada no capítulo 2.

IV.2.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

As suspensões de PL ($5 \mu\text{L}$ a 1 mg. mL^{-1} em H_2O mQ ultrapura) foram depositadas em *grids* de cobre previamente submetidos à descarga incandescente sob vácuo introduzido (*Glow discharge*) a 2×10^{-2} mbar, vácuo reduzido a $6-4 \times 10^{-2}$ mbars durante 45 s. Após 1 minuto, os *grids* foram transferidos foram contrastados durante 5-10s com solução de ácido fosfotúngstico (PTA) (pH 7,5, filtrado). Então, os *grids* foram lavados com água ($5 \mu\text{L}$) e secos a vácuo. As imagens de microscopia foram obtidas com um microscópio eletrônico FEI Tecnai G2 Spirit e/ou um JEOL 2100 operando a 100 kV, ambos equipados com câmera CCD Orius SC2001 da Gatan.

IV.2.4.3 Purificação dos sistemas

Os PL com ASNase encapsulada foram purificados do excesso de proteína não encapsulada por cromatografia de exclusão de molecular, do inglês *Size Exclusion Chromatography (SEC)*, usando Sepharose 4B como a fase estacionária. A resina (suspensão a 20% em EtOH) foi primeiro lavada com água e centrifugada (3000 RCF, 5 min). Em seguida, lavou-se 5 vezes com PBS e centrifugou-se a 3000 RCF por 5 min. A Sepharose foi então empacotada na coluna cromatográfica (20 cm x 1cm) e lavada 3 vezes com PBS. A amostra (300 μ L) foi aplicada na coluna e o material purificado foi eluído por coleta de frações de 900 μ L cada. As frações foram analisadas por DLS para identificação daquelas correspondentes aos PL. Para a liberação da proteína encapsulada, as frações coletadas foram submetidas à mudança de pH, sendo o valor diminuído para 6,0 através da adição de PBS a pH 2,0.

IV.2.4 Quantificação da ASNase encapsulada

A separação e quantificação de polímero e ASNase nos PL foram realizadas através de cromatografia em fase reversa utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Dionex (Ultimate 3000) (RP-HPLC). As amostras foram analisadas utilizando uma coluna Phenomenex Jupiter C18 (5 μ m, 300 Å, 4,60 mm x 250 mm), a 30 °C. A fase móvel foi eluída a 1 mL.min⁻¹ e um gradiente de H₂O ultrapurificada (eluente A) e CH₃OH (eluente B), ambos contendo ácido trifluoroacético (TFA) a 0,05% v/v. A concentração de copolímero foi detectada por absorvância a 220 nm, enquanto a concentração de ASNase foi determinada por fluorescência com excitação a 270 nm e detecção de emissão a 354 nm. Curvas padrão para os polímeros e para a ASNase permitiram quantificar simultaneamente nas amostras a quantidade total de polímero formando os PL e de ASNase encapsulada.

IV.2.4.1 Capacidade de encapsulação

Os dados obtidos com as análises de DLS e HPLC foram utilizados para calcular o número de PL produzidos em cada sistema, empregando-se o programa Excel[®]. A capacidade de encapsulação foi definida como o número de moléculas de enzima encapsuladas em cada PL. O número de PL em cada sistema foi medido como descrito por Wang *et al.* 2012 (WANG et al., 2012) e Joseph *et al.* 2017 (JOSEPH et al., 2017). A concentração e tamanho de cadeias hidrofóbicas e hidrofílicas de PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₁₃-PDPA₈₀ foram utilizadas como variáveis de entrada para um conjunto de equações descritas abaixo.

O número total de PL (N_p) em um sistema foi obtido pela equação IV.1 e é igual a:

$$N_p = \sum_1^n N_p^i \text{ (Equação IV.1)}$$

em que: N_p^i corresponde ao número de polimerossomos para cada população de tamanho, o qual foi calculado como na equação IV.2:

$$N_p^i = \frac{M_c}{M_{wc} \times N_a^i} \times N_A \times R^i = \frac{C_c \times V_s}{M_{wc} \times N_a^i} \times N_A \times R^i \text{ (Equação IV.2)}$$

em que:

M_c é a massa de polímero após a purificação por cromatografia de exclusão molecular;

M_{wc} é a massa molecular do PMPC-PDPA ou PEG-PDPA;

N_A é o número de Avogadro;

C_c é a concentração de polímeros depois da purificação;

V_s é o volume da solução depois da purificação;

R_i é o número de polimerossomos para cada população obtida por DLS

N_a^i é o número de agregação do copolímero e está relacionado com o volume interno dos polimerossomos descrito na equação IV.3

$$N_a^i = \frac{\rho_{PDPA} \times V_{PDPA}^i}{M_{wPDPA}} \times N_A \text{ (Equação IV.3)}$$

Em que:

ρ_{PDPA} é densidade do bloco PDPA (1.05 g/cm³)

M_{wPDPA} é a massa molecular do PMPC-PDPA ou PEG-PDPA;

V_{PDPA}^i é o volume do bloco PDPA em um único polimerossomo e é expresso na equação

IV.4:

$$V_{PDPA}^i = \frac{4}{3}\pi x[(r-d)^3 - (r-d-l)^3] \text{ (Equação IV.4)}$$

Em que:

r é o raio do polimerossomo

d é o comprimento da porção hidrofílica

l é a espessura da porção hidrofóbica

IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O preparo dos PL baseou-se em uma abordagem *top-down* na qual as vesículas se autoagregam ao longo da hidratação de um filme pré-formado e em uma abordagem *bottom-up*, em que a formação das vesículas ocorre a partir de unímeros (cadeias de copolímeros) que se autoagregam com base no método de troca de pH (MESSAGER et al., 2016). Algumas questões teóricas foram consideradas com base em um amplo histórico da produção de PL descrito ao longo de 10 anos por Battaglia e colaboradores (BATTAGLIA; RYAN, 2005, 2006a, 2006b; SMART et al., 2009; WANG et al., 2012; PEARSON et al., 2013b; BARTENSTEIN et al., 2016; FETSCH et al., 2016; ROBERTSON et al., 2016; JOSEPH et al., 2017), permitindo-nos ter uma ideia das melhores condições para a encapsulação de proteínas. Em primeiro lugar, foram consideradas as características físico-químicas da ASNase, como seu ponto isoelétrico, massa molecular e diâmetro hidrodinâmico, bem como as propriedades dos copolímeros, como comprimento da porção hidrofílica d , a espessura da porção hidrofóbica l , o pKa e a massa molecular.

IV.3.1 Polimerossomos obtidos pela abordagem bottom-up: troca de pH

Para realizar o método de troca de pH, é necessário considerar o valor de pKa do bloco hidrofóbico PDPA, que é igual a 6,4 à temperatura ambiente (LOMAS et al., 2010). Portanto, o bloco PDPA é protonado quando o pH é inferior a 6,4 e perde o próton acima deste pH, tornando-se assim hidrofóbico. No início do processo o pH está ao redor de 2,5, o bloco PDPA está carregado e hidrofílico atingindo um volume significativo em solução. Quando o polímero está totalmente protonado, ele atinge seu volume máximo e pode ser modelado como um polieletrólito carregado (LOMAS et al., 2007). Por outro lado, quando o pH está acima de 6,4, o volume efetivo dos polímeros na água é reduzido devido ao colapso do bloco PDPA que se torna hidrofóbico. Neste ponto, os sistemas tornaram-se turvos, indicando agregação dos unímeros de copolímero anfifílico em nanoestruturas (PEARSON et al., 2013a). A ASNase foi adicionada aos sistemas a pH 6.0, no qual encontra-se carregada negativamente.

Durante o processo de encapsulação, a ASNase estava em um microambiente complexo que continha os unímeros dos copolímeros com significativo volume efetivo. No processo de autoagregação, não só vesículas foram obtidas, mas grandes agregados poliméricos para PEG₁₁₃-PDPA₈₀ e micelas para PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₁₃-PDPA₈₀ também foram formados, como pode ser visto a partir das imagens de MET (Figura IV.2). O perfil de DLS (Figura IV.3) confirma tais observações.

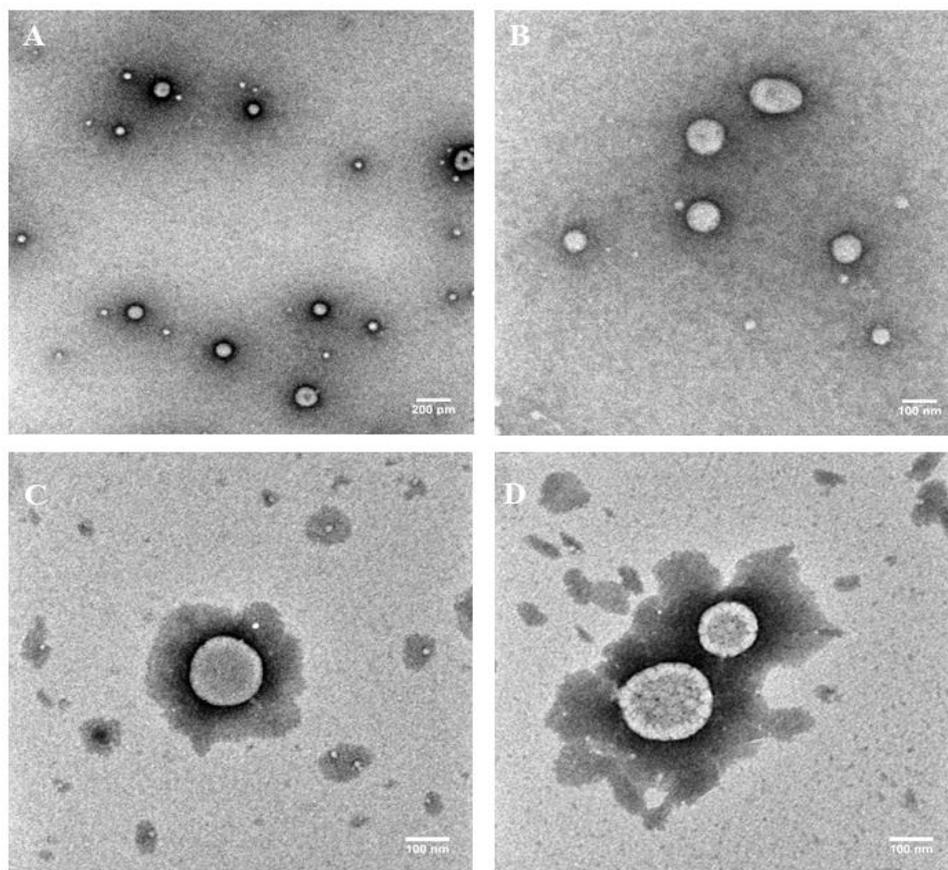


Figura IV.2- Microscopia eletrônica de transmissão dos sistemas produzidos através de troca de pH com PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₁₃-PDPA₈₀. Em A e B, as micrografias mostram vesículas de PMPC₂₅-PDPA₇₀. Em C e D, as micrografias mostram vesículas de PEG₁₁₃-PDPA₈₀.

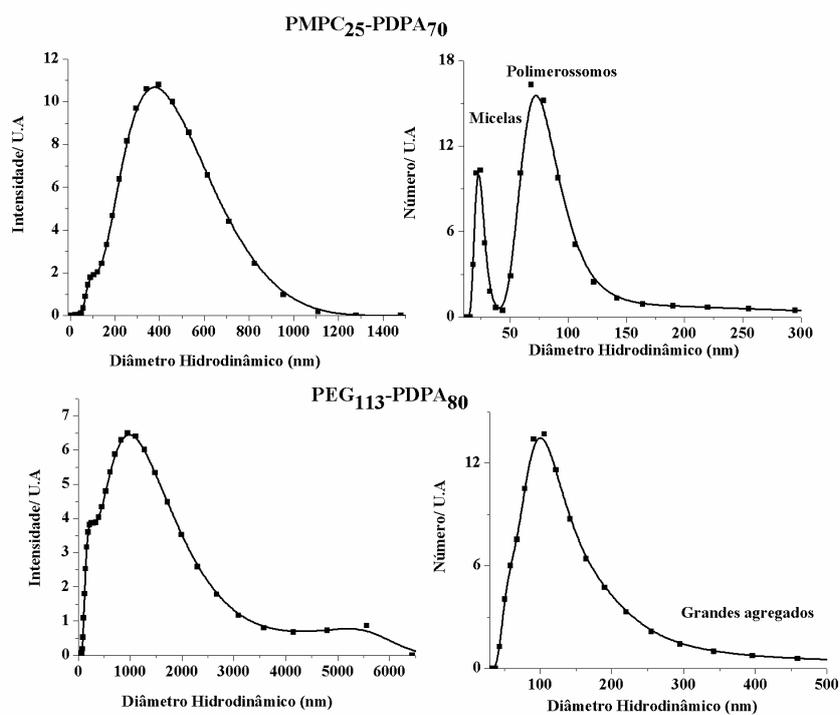


Figura IV.3- Perfil de distribuição de tamanho (diâmetro hidrodinâmico) por DLS (distribuição por intensidade e número) para os polimerossomos PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₀₀-PDPA₈₀ contendo ASNase, preparados por troca de pH após cromatografia de exclusão molecular.

Os sistemas PL recuperados na centrifugação e ressuspensos apresentaram alto PDI antes da purificação por SEC, o que é atribuído à presença de grandes agregados, especialmente para o sistema PEG₁₁₃-PDPA₈₀ (Figura IV.4B). A presença de micelas nesses sistemas está de acordo com as teorias da formação de PL, uma vez que os unímeros de PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₁₃-PDPA₈₀ podem se autoagregar em pequenas micelas que crescem em bicamadas que, por sua vez, tendem a se fechar em PL.

A função de correlação da análise de DLS (Figura IV.4A) mostrou para ambos os copolímeros um tempo de decaimento mais rápido para o sobrenadante obtido após o segundo passo de centrifugação a 20 000 x g indicando uma fração rica em estruturas menores, no caso em micelas, em comparação com a fração PL do *pellet* ressuspense em PBS.

Mesmo com um passo final de purificação com base em tamanho como SEC (ROBERTSON et al., 2016a), estruturas menores atribuídas a vesículas (~ 100 nm) e micelas (~ 40 nm) permaneceram na amostra final preparada a partir de PMPC₂₅-PDPA₇₀ e contendo ASNase (Figura IV.3), o que aumentou ligeiramente o PDI desses sistemas (Figura IV.4B). No caso do PEG₁₁₃-PDPA₈₀, a presença de micelas não foi observada para os sistemas finais, mas agregados maiores permaneceram, o que aumentou significativamente o tempo de decaimento nas funções correlação obtidas por DLS (Figura IV.4C) e os valores de PDI (Figura IV.4D).

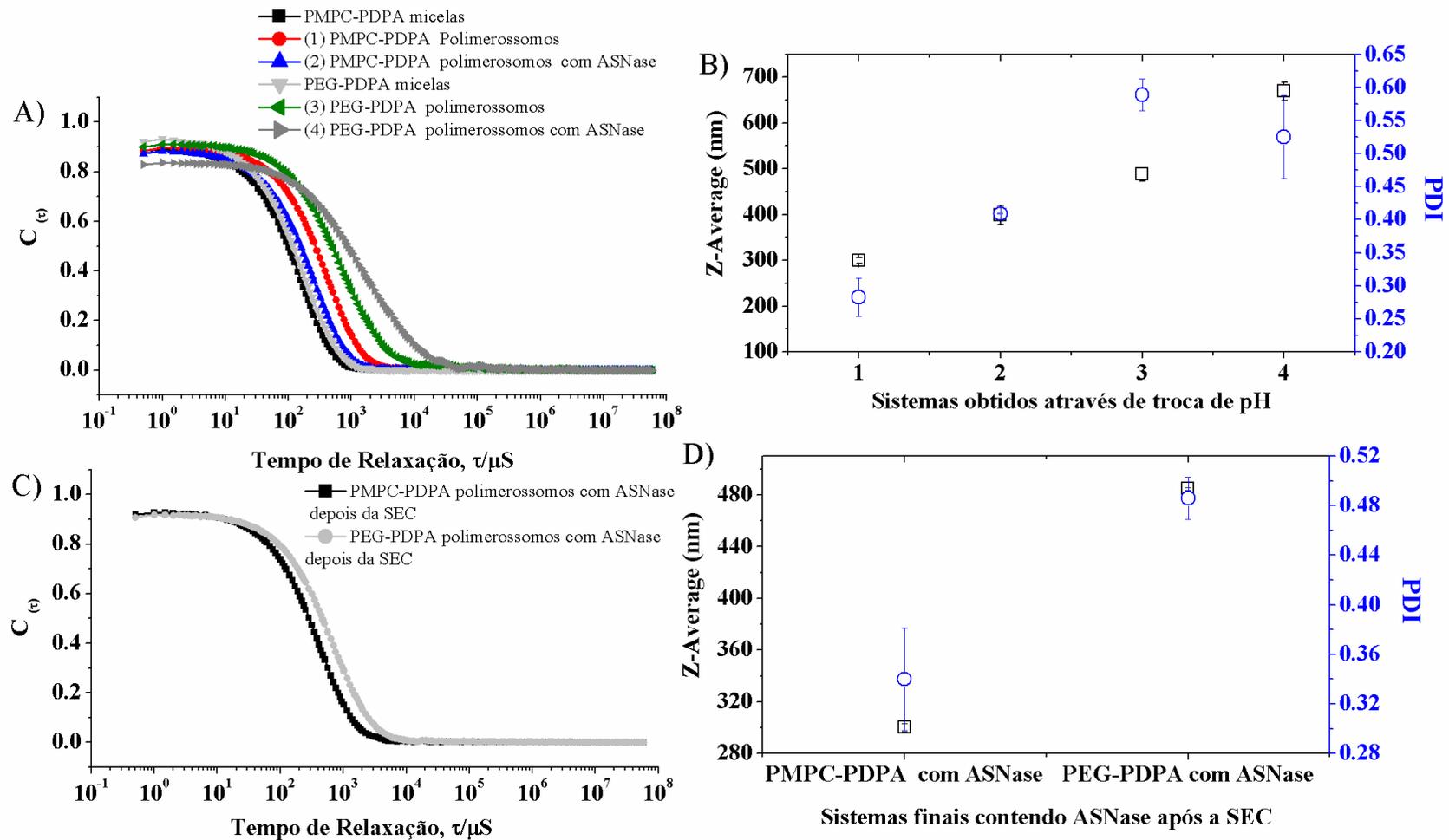


Figura IV.4- A) Funções de correlações do DLS obtidas para sistemas PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₀₀-PDPA₈₀ após o método de troca de pH. B) Diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) das medidas de intensidade de espalhamento e medidas de PDI para sistemas de polimerossomos vazios e com proteína antes da purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC). C) Funções de correlações DLS registradas para os sistemas finais PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₀₀-PDPA₈₀ após a SEC. D) Diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) das medidas de intensidade de espalhamento e PDI para sistemas de polimerossomos com e sem ASNase após a SEC.

IV.3.2 Polimerossomos obtidos pela abordagem Top-Down: Hidratação do filme seguido de eletroporação

Na abordagem *top-down*, as amostras de PL foram inicialmente preparadas através do método de hidratação do filme, que requer quatro semanas para PMPC₂₅-PDPA₇₀ (BATTAGLIA; RYAN, 2006a) e duas semanas para PEG₁₀₀-PDPA₈₀, sob agitação com alta taxa de cisalhamento. Posteriormente, os sistemas foram eletroporados com um valor de tensão fixa (V_a) de 2500 V para encapsular ASNase.

Durante a hidratação do filme, PL se formam gradualmente a partir da interface entre a água e o filme polimérico. Para PMPC₂₅-PDPA₇₀, foi obtida uma mistura de PL esféricos e tubulares (Figura IV.5A), conforme relatado por Robertson et al. (2014), no entanto, com uma estreita distribuição de tamanho (Figura IV.6). Por outro lado, os sistemas PEG₁₀₀-PDPA₈₀ não apresentaram vesículas tubulares, mas apenas esféricas (Figura IV.5D). Após a eletroporação independentemente do número de pulsos usados e da purificação por SEC, as vesículas mantiveram a morfologia original, inclusive as vesículas tubulares continuaram presentes para o sistema formado por PMPC₂₅-PDPA₇₀.

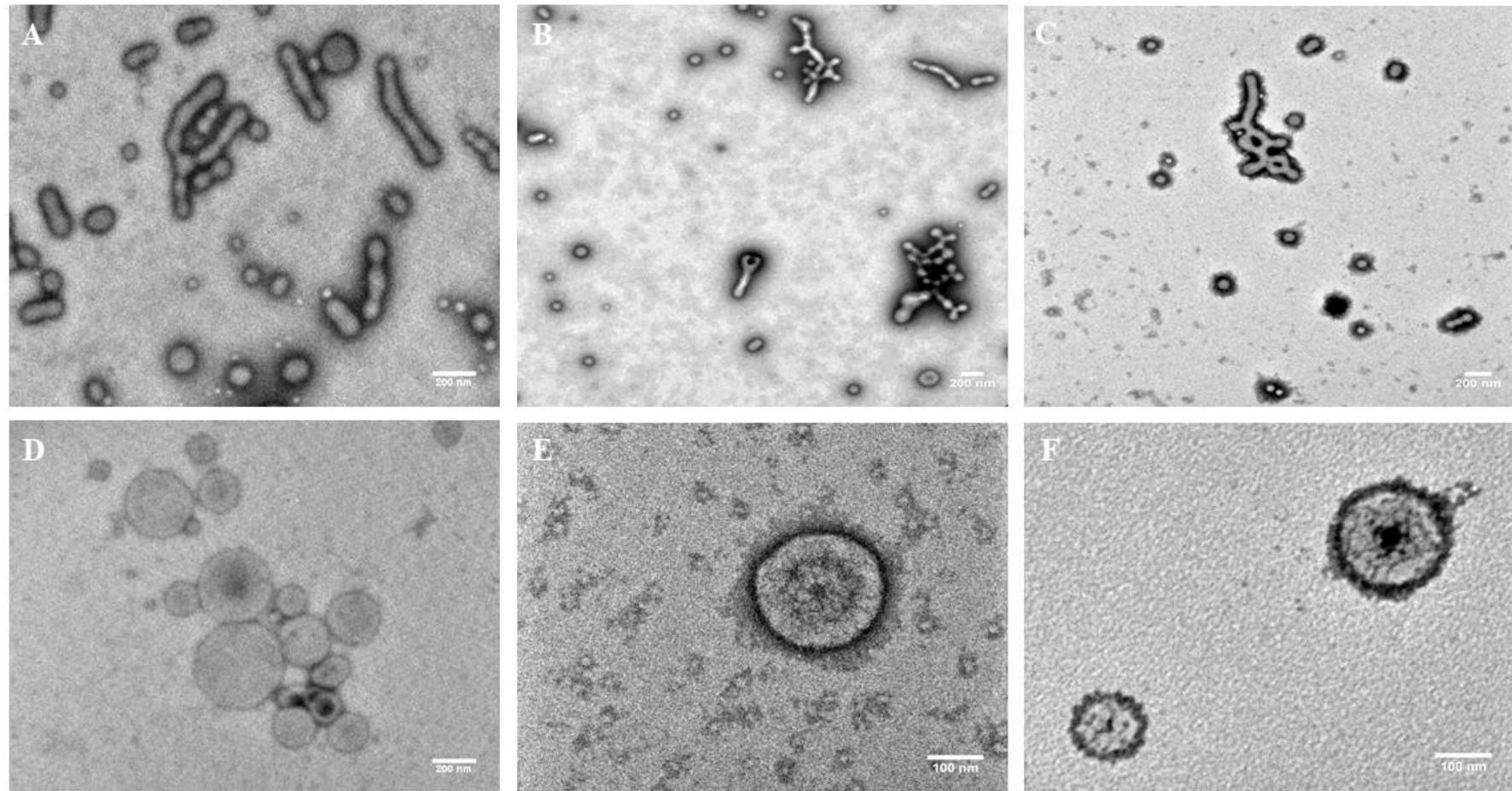


Figura IV.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão: (A) polimerossomos obtidos por hidratação do filme de PMPC₂₅-PDPA₇₀, (B) polimerossomos de PMPC₂₅-PDPA₇₀ após eletroporação com 10 pulsos (C) polimerossomos de PMPC₂₅-PDPA₇₀ após eletroporação com 20 pulsos, (D) polimerossomos obtidos por hidratação do filme de PEG₁₀₀-PDPA₈₀, (E) polimerossomos de PEG₁₀₀-PDPA₈₀ após eletroporação com 10 pulsos, (F) polimerossomos de PEG₁₀₀-PDPA₈₀ após eletroporação com 20 pulsos.

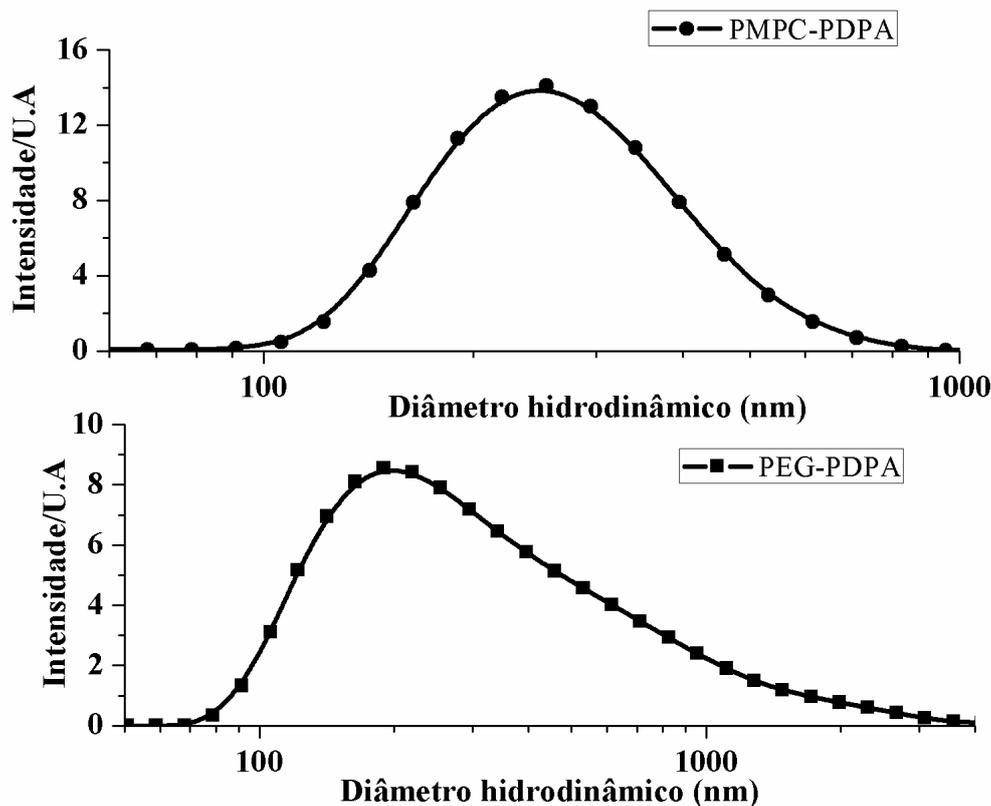


Figura IV.6- Perfil de distribuição DLS por intensidade para PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₀₀-PDPA₈₀ para os polimerossomos contendo ASNase preparados por hidratação do filme seguida de eletroporação, após cromatografia de exclusão molecular (SEC).

A presença de polimerossomos tubulares nos sistemas de PMPC-PDPA foi explicada anteriormente por Battaglia e seus colaboradores: o filme polimérico se entumece com a hidratação e, em seguida, forma uma rede que rompe liberando segmentos de filme. Esses segmentos se agrupam em uma rede tubular contínua que em seguida formam túbulos únicos e pequenas estruturas emaranhadas. Estes túbulos se dividem em túbulos menores dos quais finalmente brotam PL esféricos (ROBERTSON et al., 2014).

A eletroporação não levou a mudanças no tempo de decaimento do DLS para o sistema PMPC₂₅-PDPA₇₀ contendo ASNase (Figura IV.6 A), o qual manteve o tamanho nanométrico e PDI baixo (Figura 6 B). Após a purificação por SEC, observou-se uma ligeira alteração no tempo de decaimento dos sistemas PEG₁₀₀-PDPA₈₀ (Figura IV.7C) e

o sistema final contendo ASNase apresentou valores mais baixos de tamanho e PDI (Figura IV.8D).

As diferenças e semelhanças estruturais e biológicas entre PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₀₀-PDPA₈₀ já foram relatadas por Ruiz-Perez et al (2016), que evidenciaram que a natureza volumosa do grupo fosforilcolina, o qual tem uma área maior do que a ocupada pelo segmento de PDPA na molécula de copolímero e, de fato, protege o PDPA da água quando consideramos os unímeros do copolímero. No PEG₁₀₀-PDPA₈₀, as unidades de óxido de etileno não são suficientemente volumosas para cobrir a área hidrofóbica do PDPA, o que pode justificar a autoagregação mais rápida e, portanto, o menor tempo necessário para obter PL.

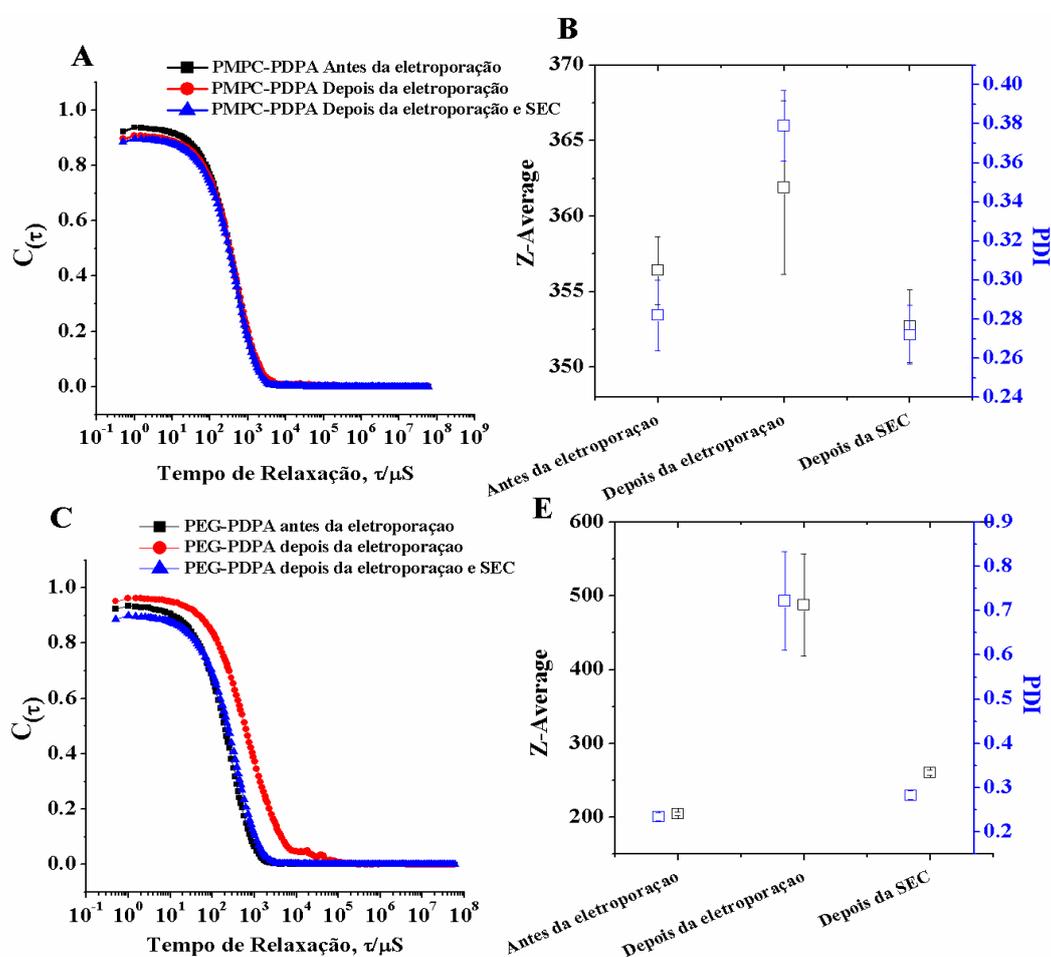


Figura IV.7- A) Funções de correlações do DLS obtidas para sistemas de PMPC₂₅-PDPA₇₀ obtidos por hidratação do filme B) Z-Average das medidas baseadas em intensidade de tamanho e medidas de PDI para sistemas de PMPC₂₅-PDPA₇₀. C) Funções de correlações do DLS obtidas para sistemas PEG₁₀₀-PDPA₈₀ obtidos por hidratação do filme. D) Z-Average das medidas baseadas em intensidade de tamanho e medidas de PDI para sistemas de PEG₁₀₀-PDPA₈₀.

IV.3.3 Encapsulação de *L-Asparaginase* nos polimerossomos

Para calcular a capacidade de encapsulação, primeiro foi considerado o rendimento dos polimerossomos, haja visto que há uma relação entre a quantidade de vesículas e a quantidade de proteína a ser encapsulada. Como pode ser visto na Figura IV.8, o método de hidratação do filme seguido de eletroporação resultou em rendimentos significativamente maiores em quantidade de polimerossomos do que o método de troca de pH.

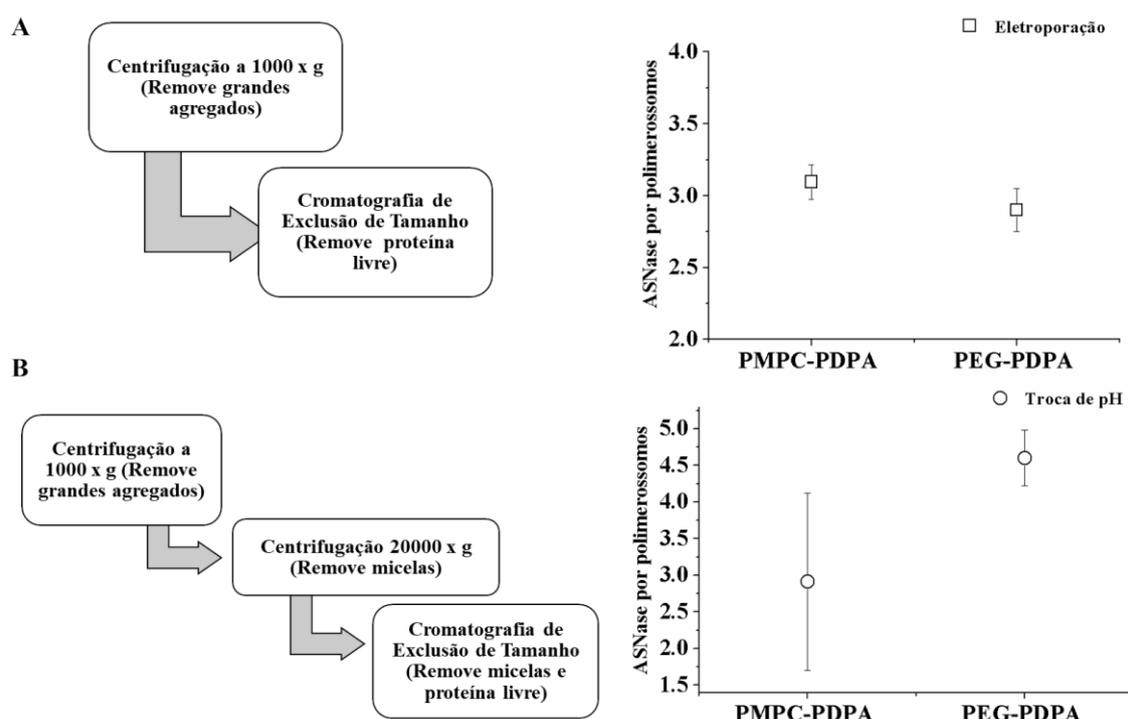


Figura IV.8- Rendimentos de polimerossomos contendo ASNase encapsulada após as abordagens de (A) top-down (hidratação do filme seguida de eletroporação) e (B) bottom-up (troca de pH).

Após a hidratação do filme, o passo para a purificação foi a centrifugação para remover o bulk polimérico e, após a eletroporação, cromatografia de exclusão molecular para remover ASNase livre. Após o método da troca de pH, foi necessário remover as micelas formadas. Além disso, neste caso, a autoagregação ocorre rapidamente formando agregados poliméricos maiores, o que torna o rendimento final em vesículas menor que

o rendimento obtido por hidratação do filme seguida de eletroporação. Portanto, a abordagem *bottom-up* levou a uma maior perda de massa de copolímero nos sistemas finais e, portanto, à diminuição dos rendimentos de PL finais devido à formação de micelas e maior quantidade de *bulk* polimérico em comparação com a hidratação do filme seguida por eletroporação. O fato da hidratação do filme ter sido realizada em quatro semanas contribui para a autoagregação de um sistema homogêneo, com agregados menores e com menos micelas.

No método de *bottom-up*, a encapsulação da ASNase foi influenciada por um microambiente complexo durante a autoagregação de PMPC₂₅-PDPA₇₀ e PEG₁₀₀-PDPA₈₀, com presença de unímeros e micelas. Além disso, o rendimento de PL foi baixo, levando a um pequeno volume de espaço total para encapsulação. Este método resultou em uma eficiência de encapsulação de 3 moléculas de ASNase por PL de PMPC₂₅-PDPA₇₀ e cerca de 4 moléculas de ASNase para cada PL de PEG₁₀₀-PDPA₈₀.

Por outro lado, durante a eletroporação, a difusão de íons, moléculas pequenas e macromoléculas ocorre no lúmen da vesícula após a formação de poros temporários na membrana pela aplicação da força elétrica externa. Quando a desestabilização da membrana ocorre, os copolímeros se reorganizam orientando o bloco hidrofílico para dentro do poro interno. Esta reorganização minimiza o contato entre o bloco hidrofóbico e a água (WANG et al., 2012). A hidratação do filme seguida por eletroporação resultou em uma eficiência de encapsulação de cerca de 3 proteínas por PL para ambos os copolímeros, mas com maior rendimento final de PL em comparação com o método de troca de pH, especialmente para PMPC₂₅-PDPA₇₀. Portanto, o método de eletroporação após a hidratação do filme foi o mais eficiente em termos de taxa global de encapsulação.

A tabela IV.7 resume as principais condições práticas para a encapsulação da ASNase.

Tabela IV.1- Condições para encapsulação da L-asparaginase.

Condições	Abordagem <i>Bottom-up</i> / Troca de pH		Abordagem <i>Top-down</i> / Hidratação do filme seguida de eletroporação	
	Teoria	Regra Prática (<i>Thumb rule</i>)	Teoria	Regra Prática (<i>Thumb rule</i>)
Tempo do processo	Rápido	Se o processo for realizado rapidamente, a população de micelas pode ser maior do que a de polimerossomos, então todo o processo deve ocorrer em cerca de 1 hora. Se for muito lento, o crescimento assimétrico ocorre levando à formação de estruturas do tipo genus (ref pearson et al 2013, Robertson et al. 2016)	Lento	Uma vez que o sistema esteja formado, a eletroporação é uma rápida rota de encapsulação. A ASNase permanece apenas por um curto período de tempo em temperatura ambiente (20 pulsos com intervalo de 1 minuto entre eles).
Autoagregação	Polimerossomos esféricos e micelas	Uma vez que a proteína está carregada negativamente e os polímeros carregados positivamente, as interações eletrostáticas promovem a encapsulação. No entanto, o microambiente é complexo porque a autoagregação ocorre na presença da proteína, além das micelas que podem interagir estericamente com a proteína.	Polimerossomos esféricos e túbulos	Os polimerossomos tubulares não são desejados para a encapsulação da ASNase, porém a eletroporação evitou a complexidade da autoagregação, uma vez que os polimerossomos já estão formados.
Etapas de purificação	Centrifugação a baixa e alta velocidade seguidas de cromatografia de exclusão molecular.	Para o PMPC-PDPA, as micelas não foram completamente removidas. Para PEG-PDPA, os grandes agregados permaneceram após a purificação levando a um PDI alto	Centrifugação a baixa velocidade e SEC.	Um passo para remover os túbulos pode ser aplicado para otimizar a encapsulação. Os tubos podem ser removidos por gradiente de sacarose (ref Robertson et al. 2016)
Rendimento de polimerossomos	Uma quantidade elevada de polímero (20 mg) em 3 mL de PBS ácido e à medida que se promove a elevação do pH o volume final do sistema pode chegar a 4 mL	Embora uma massa alta de copolímero seja usada, a presença de micelas, leva a etapas adicionais de purificação e ocorre perdas de concentração ao longo destas etapas, portanto, menor espaço para encapsular ASNase	Uma pequena quantidade de polímero (5 mg) em 1 mL de PBS poderia ser utilizada e eletroporação permite a utilização de apenas μ l de sistema de polimerossomos	Uma alíquota (200 μ L) de polimerossomos é usada para eletroporação, mas a concentração final de polímero é maior do que no método de troca de pH

IV.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para os copolímeros PMPC-PDPA e PEG-PDPA, pela abordagem de *bottom-up* através do método de troca de pH, a ASNase está em solução em um microambiente complexo com a presença de unímeros e micelas durante o processo de formação das vesículas, além disso, o rendimento de PL foi baixo, levando a um pequeno volume de espaço total para encapsulação. Pela abordagem de *top-down*, a presença de túbulos para o PMPC-PDPA após a hidratação do filme ainda faz com que sejam necessárias semanas de agitação para completa formação de vesículas esféricas, no entanto o método de eletroporação foi o mais eficiente em termos de taxa global de encapsulação.

REFERÊNCIAS

APOLINÁRIO, A.C.; PACHIONI-VASCONCELOS, JULIANA; PESSOA JR., ADALBERTO; RANGEL-YAGUI, C. Lipossomos versus polimerossomos: a evolução da bala mágica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 810–817, 2017.

BARTENSTEIN, J. E.; ROBERTSON, J.; BATTAGLIA, G.; BRISCOE, W. H. Stability of polymersomes prepared by size exclusion chromatography and extrusion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 739–746, 2016.

BATTAGLIA, G.; RYAN, A. J. The evolution of vesicles from bulk lamellar gels. **Nature materials**, v. 4, n. 11, p. 869–876, 2005.

BATTAGLIA, G.; RYAN, A. J. Pathways of polymeric vesicle formation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 21, p. 10272–10279, 2006a.

BATTAGLIA, G.; RYAN, A. J. Effect of amphiphile size on the transformation from a lyotropic gel to a vesicular dispersion. **Macromolecules**, v. 39, n. 2, p. 798–805, 2006b.

BLEUL, R.; THIERMANN, R.; MASKOS, M. Techniques To Control Polymersome Size. **Macromolecules**, v. 48, n. 20, p. 7396–7409, 2015.

CHEN, S.-H. Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance. **Pediatrics and neonatology**, v. 56, n. 5, p. 287–93, 2015.

CHENG, R.; LIU, G.; MA, S.; LI, S.; MENG, F.; LIU, H.; ZHONG, Z. Biodegradable chimaeric polymersomes mediate highly efficient delivery of exogenous proteins into cells. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 2011, p. e136–e137, 2011.

COLLEY, H.; MASSIGNANI, M.; CANTON, I.; MADSEN, J.; BLANAZS, A.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L.; MACNEIL, S.; BROWN, N. J.; THORNHILL, M. H. & BATTAGLIA, G. Internalization and biodistribution of polymersomes into oral squamous cell carcinoma cells in vitro Research Article. **Nanomedicine**, v. 5, n. 7, p. 1025–1036, 2010.

DISCHER, B. M.; WON, Y. Y.; EGE, D. S.; LEE, J. C.; BATES, F. S.; DISCHER, D. E.; HAMMER, D. A. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. *Science (New York, N.Y.)*, v. 284, n. 5417, p. 1143–1146, 1999.

DISCHER, D. E.; AHMED, F. Polymersomes. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 323–341, 2006.

ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A. G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; MCCULLOUGH, J. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2013.

FETSCH, C.; GAITZSCH, J.; MESSENGER, L.; BATTAGLIA, G.; LUXENHOFER, R. Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolypeptoids – Micelles, Worms and Polymersomes. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 33491, 2016.

HEARNDEN, V.; LOMAS, H.; MACNEIL, S.; THORNHILL, M.; MURDOCH, C.; LEWIS, A.; MADSEN, J.; BLANAZS, A.; ARMES, S.; BATTAGLIA, G. Diffusion studies of nanometer polymersomes across tissue engineered human oral mucosa. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 7, p. 1718–1728, 2009.

JOSEPH, A.; CONTINI, C.; CECCHIN, D.; NYBERG, S.; RUIZ-PEREZ, L.; GAITZSCH, J.; FULLSTONE, G.; TIAN, X.; AZIZI, J.; PRESTON, J.; VOLPE, G.; BATTAGLIA, G. Chemotactic synthetic vesicles: Design and applications in blood-brain barrier crossing. **Science Advances**, v. 3, n. 8, p. e1700362, 2017.

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**, v. 31, n. 29, p. 7575–85, 2010.

LOMAS, H.; CANTON, I.; MACNEIL, S.; DU, J.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J.; LEWIS, A. L.; BATTAGLIA, G. Biomimetic pH sensitive polymersomes for efficient DNA encapsulation and delivery. **Advanced Materials**, v. 19, n. 23, p. 4238–4243, 2007.

LOMAS, H.; DU, J.; CANTON, I.; MADSEN, J.; WARREN, N.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L.; BATTAGLIA, G. Efficient encapsulation of plasmid DNA in pH-sensitive PMPC-PDPA polymersomes: Study of the effect of PDPA block length on copolymer-DNA binding affinity. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 5, p. 513–530, 2010.

LU, L.; ZOU, Y.; YANG, W.; MENG, F.; DENG, C.; CHENG, R.; ZHONG, Z. Anisamide-decorated pH-sensitive degradable chimaeric polymersomes mediate potent and targeted protein delivery to lung cancer cells. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 6, p. 1726–1735, 2015.

MESSAGER, L.; BURNS, J. R.; KIM, J.; CECCHIN, D.; HINDLEY, J.; PYNE, A. L. B.; GAITZSCH, J.; BATTAGLIA, G.; HOWORKA, S. Biomimetic Hybrid Nanocontainers with Selective Permeability. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 37, p. 11106–11109, 2016.

O'NEIL, C. P.; SUZUKI, T.; DEMURTAS, D.; FINKA, A.; HUBBELL, J. A. A novel method for the encapsulation of biomolecules into polymersomes via direct hydration. **Langmuir**, v. 25, n. 16, p. 9025–9029, 2009.

PACHIONI-VASCONCELOS, J. D. A.; LOPES, A. M.; APOLINÁRIO, A. C.; VALENZUELA-OSÉS, J. K.; COSTA, J. S. R.; NASCIMENTO, L. D. O.; PESSOA, A.; BARBOSA, L. R. S.; RANGEL-YAGUI, C. D. O. Nanostructures for protein drug delivery. **Biomaterials science**, v. 4, n. 2, p. 205–18, 2016.

PEARSON, R. T.; WARREN, N. J.; LEWIS, A. L.; ARMES, S. P. Effect of pH and Temperature on PMPC – PDPA Copolymer Self- Assembly. 2013a.

PEARSON, R. T.; WARREN, N. J.; LEWIS, A. L.; ARMES, S. P.; BATTAGLIA, G. Effect of pH and temperature on PMPC-PDPA copolymer self-assembly. **Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 1400–1407, 2013b.

ROBERTSON, J. D.; RIZZELLO, L.; AVILA-OLIAS, M.; GAITZSCH, J.; CONTINI, C.; MAGOŃ, M. S.; RENSHAW, S. A.; BATTAGLIA, G. Purification of Nanoparticles by Size and Shape. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27494, 2016.

ROBERTSON, J. D.; YEALLAND, G.; AVILA-OLIAS, M.; CHIERICO, L.; BANDMANN, O.; RENSHAW, S. a; BATTAGLIA, G. pH-sensitive tubular polymersomes: formation and applications in cellular delivery. **ACS nano**, v. 8, n. 5, p. 4650–61, 27 maio 2014.

SMART, T. P.; MYKHAYLYK, O. O.; RYAN, A. J.; BATTAGLIA, G. Polymersomes hydrophilic brush scaling relations. **Soft Matter**, v. 5, n. 19, p. 3607, 2009.

SUN, H.; MENG, F.; CHENG, R.; DENG, C.; ZHONG, Z. Acta Biomaterialia Reduction and pH dual-bioresponsive crosslinked polymersomes for efficient intracellular delivery of proteins and potent induction of cancer cell apoptosis. **ACTA BIOMATERIALIA**, 2014.

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. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 44, p. 11122–11125, 2012.

ZALEWSKA-SZEWCZYK, B.; ANDRZEJEWSKI, W.; MŁYNARSKI, W.; JEDRYCHOWSKA-DAŃSKA, K.; WITAS, H.; BODALSKI, J. The anti-asparagines

antibodies correlate with L-asparagines activity and may affect clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 48, n. 5, p. 931–6, 2007.

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**, v. 28, n. 4, p. 2056–2065, 2012.

CAPÍTULO V

Como superar os problemas metodológicos da nanoencapsulação de proteínas em polimerossomos? Um estudo com a L-Asparaginase

Este capítulo expõe uma adaptação feita no Laboratório de Nanobiotecnologia da FCF/USP/SP dos métodos empregados no grupo do professor Giuseppe Battaglia na UCL. Os dados aqui discutidos foram compilados em um artigo submetido para publicação no periódico *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*

Overcoming the pitfalls of polymersomes as protein delivery systems: a study on L-Asparaginase encapsulation.

Alexsandra Conceição Apolinário¹, Rafael Bertelli Ferraro¹, Camila Areias de Oliveira¹, Adalberto Pessoa Jr¹. and Carlota de Oliveira Rangel-Yagui¹

Capítulo V-Como superar os problemas metodológicos da nanoencapsulação de proteínas em polimerossomos? *Um estudo com a L-Asparaginase*

V.1 INTRODUÇÃO

No campo da nanobiotecnologia, os polimerossomos (PL) são alternativas como sistemas de liberação de fármacos devido à possibilidade de encapsular moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, incluindo biomacromoléculas como proteínas (MESSAGER et al., 2014). Devido à morfologia vesicular, essas nanoestruturas são consideradas análogos dos lipossomos mas são formadas pela autoagregação de copolímeros anfifílicos, conseqüentemente, possuem propriedades mecânicas mais robustas (DISCHER et al., 1999a). A evolução da ciência de polímeros também fundamentou o desenvolvimento de PL. Após mais de duas décadas, diferentes sistemas de PL têm sido propostos, como os termorresponsivos (WONG et al., 2015), pH responsivos (LOMAS et al., 2010), quimiotáxico (JOSEPH et al., 2017) e com membranas permeável PL (MESSAGER et al., 2016). Especial ênfase foi dada à PL para encapsulação de proteínas (WANG et al., 2012), em particular enzimas com o possível desenvolvimento de nanoreatores (KIM et al., 2009).

Diferentes métodos são necessários para o desenvolvimento de PL, mas as semelhanças morfológicas com lipossomas levam ao uso de muitas técnicas já utilizadas para estas nanoestruturas como hidratação do filme polimérico e extrusão. No entanto, o bloco hidrofóbico que forma o copolímero pode oferecer desafios adicionais, como a alta temperatura de transição vítrea que dificulta a extrusão (MARSDEN; GABRIELLI; KROS, 2010). É claro que muitas contribuições inovadoras no campo de PL são relatadas, mas para a rotina nos laboratórios, alguns problemas permanecem.

Os protocolos para produzir e caracterizar as vesículas poliméricas envolvem passos e detalhes essenciais que geralmente não são descritos nas publicações. Portanto, são necessárias descrições mais precisas para a preparação de PL através de métodos rápidos, racionais, escalonáveis e consistentes, especialmente para encapsulação de proteínas, uma vez que essas macromoléculas são suscetíveis a alterações estruturais e perda de função biológica.

Nesse trabalho, descrevemos dicas para obter e caracterizar PL visando à encapsulação de proteínas. Os copolímeros estudados foram o dibloco poli (óxido de etileno-b-ácido láctico) (PEG-PLA) de diferentes frações hidrofílicas e o tribloco Pluronic[®] L-121 (PEG₅-PPO₆₈-PEG₅). Diferentes abordagens de preparação, como os métodos *bottom-up* e *top-down*, foram aplicadas e etapas amplamente relatadas para a formação de PL foram avaliadas. A enzima L-Asparaginase (ASNase) foi utilizada como proteína modelo. A L-asparaginase é um dos principais fármacos utilizados no tratamento da leucemia linfoblástica aguda. No entanto, existem algumas desvantagens clínicas como hipersensibilidade, a opsonização e sua captura pelo sistema mononuclear fagocítico. A nanoencapsulação dessa enzima seria uma alternativa para evitar sua exposição a proteases e anticorpos plasmáticos (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015).

V.2 MATERIAIS E MÉTODOS

V.2.1 Materiais

A enzima L-asparaginase 225 U / mg (dados do fabricante) foi adquirida da ProSpec Tany[®] (Ness-Ziona, Israel). Os copolímeros poli (óxido de etileno-bloco-ácido láctico)

(PEG₄₅-PLA₆₉, PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄-PLA₁₈₀) foram adquiridos da Polymer Source[®] (Montreal, Quebec, Canadá) e Pluronic[®] L-121 (PEG₅PPO₆₈PEG₅) foi gentilmente doado pela Basf SE. Todos os outros reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, Estados Unidos): Sepharose 4B, metanol anidro, ácido fosfotúngstico (PTA), Triton X-100 e *kit* de determinação de proteínas por BCA. Todos os materiais foram utilizados como recebidos, sem qualquer purificação adicional. Água purificada (Milli-Q, Millipore, Bedford – MA) foi usada para todos os experimentos. Os sistemas foram preparados em tampão PBS.

V.2.2 Preparação dos Polimerossomos

Para os copolímeros de PEG-PLA foi realizada a hidratação do filme e para o Pluronic[®] L-121, dois métodos foram realizados para obter dispersões de PL: troca de temperatura (abordagem *bottom-up*) e hidratação de filme combinado com eletroporação para encapsulação (*top-down*).

V.2.2.1 Hidratação do filme e eletroporação

O copolímero (PEG-PLA ou Pluronic[®] L-121) foi diluído em uma mistura de CHCl₃ e MeOH (2:1 v/v) na concentração final de 5 mg/mL e seco a vácuo por 2 horas em evaporador rotativo a 40 rpm rotação para obter um filme fino de polímero. O filme foi hidratado com PBS pH 7,4 (concentração de polímero de 5 mg/mL) e submetido à agitação magnética a 800 rpm durante 24 horas. Depois, o sistema de PL foi misturado com ASNase para uma concentração final da enzima de 2 mg/mL e eletroporado (2500 V, 10 pulsos com intervalo de 60 segundos entre cada pulso).

V.2.2.2 Troca de Temperatura

Uma solução de copolímero Pluronic[®] L-121 (5 mg/mL) e ASNase (2 mg/ mL) foi submetida a agitação a 400 rpm, a 4°C durante 1 hora. Para obter nanoestruturas de autoagregação, a solução foi mantida sob agitação magnética por 800 rpm à temperatura ambiente por 24 horas. O *bulk* polimérico foi removido por centrifugação (1000 x g, 5 minutos). O passo seguinte foi a ultrafiltração (10 minutos a 3000 x g) do sistema utilizando filtros Amicon (10 kDa) (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para aumentar a concentração de PL antes da purificação.

V.2.3 Caracterização dos Polimerossomos

V.2.3.1 Espalhamento Dinâmico de luz (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico dos PL foi avaliado por análise DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern) como descrito no capítulo 4.

V.2.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das vesículas e o tamanho foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. Os *grids* foram submetidos à descarga elétrica em um equipamento *Glow* (PELCO easiGlow[™], Redding, CA, EUA) por 45 segundos sob pressão reduzida ($6,4 \times 10^{-2}$ mbar) e o preparo da amostra foi feito como descrito no capítulo 4. Os ensaios de MET foram realizados em microscópio Tecnai G20 (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA).

V.2.3.3 Purificação dos sistemas e cálculo da eficiência de encapsulação

A purificação dos PLs contendo ou não ASNase foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (SEC) em uma coluna de 15 mL, sendo a Sepharose 4B a fase estacionária. Para o empacotamento em coluna, a resina (em etanol 20%) foi lavada com água seguida de centrifugação (3000 x g, 5 minutos) e depois lavada cinco vezes com PBS pH 7,4 e centrifugada (3000 x g, 5 minutos). As colunas foram cheias com Sepharose 4B e eluídas com tampão PBS pH 7,4. A purificação por SEC foi realizada adicionando 400 µL da amostra na coluna. As frações eluídas foram recolhidas e concentradas por ultrafiltração 3000 x g durante 10 minutos utilizando filtros Amicon (10 kDa) até 400µL de volume final. A ruptura das nanoestruturas foi realizada pela adição de Triton X-100 a uma concentração final de 2%. A quantificação da proteína encapsulada foi realizada pelo método ácido bicinonínico (BCA), seguindo o protocolo do fabricante (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) e a eficiência de encapsulação calculada de acordo com a equação V.1.

$$EE\% = \frac{P_{\text{encapsulada}}}{P_{\text{total}}} \times 100 \text{ (Equação V.1)}$$

em que: P_{total} é a massa de proteína total adicionada ao sistema e $P_{\text{encapsulada}}$ é a massa de proteína no sistema após a purificação.

V.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.3.1 Desenvolvimentos dos polimerossomos

Desde 1990, quando Discher introduziu o conceito de PL na comunidade científica (DISCHER et al., 1999), alguns problemas metodológicos estão presentes, especialmente por

causa do uso excessivo de protocolos de preparação iguais aos dos lipossomos. Também, porque o pesquisador às vezes não considera características particulares do fenômeno de autoagregação como as diferentes temperaturas de transição vítrea e as diferentes concentrações de copolímeros, o que pode resultar na presença de micelas e fases lamelares (BATTAGLIA; RYAN, 2005; BATTAGLIA et al., 2006). A encapsulação de fármacos em PL também é um desafio, apesar da nova era criativa do *design* polimérico para *drug delivery* (LOVERDE et al., 2011).

A primeira dica para a preparação de PL é iniciar o método científico com base em três perguntas: “*Por quê?*”, “*Qual?*” e “*Como?*”? A primeira questão a ser feita é “*Por que polimerossomos?*” como descrito na figura V.1, devemos considerar desde o início informações sobre a aplicação terapêutica, como o alvo e o tipo de molécula que será encapsulada. A partir desta resposta inicial, surge a seguinte questão: “*Qual copolímero seria mais adequados?*” Muitas opções são possíveis, tais como copolímeros responsivos a pH, responsivos à temperatura ou cristalinos e cada um pode ser mais apropriado dependendo da aplicação. Se as características físico-químicas desses copolímeros e fármacos forem consideradas, a próxima pergunta é: “*Como produzir os polimerossomos?*” Como já foi dito, protocolos já descritos para lipossomos podem ser selecionados como primeira opção, mas nem sempre são adequados para PL.

Em relação à primeira questão, para a enzima ASNase, a compartimentalização no *core* dos PL pode aumentar sua meia-vida aparente e, uma vez que o mecanismo de ação é baseado na depleção de asparagina circulante, o *uptake* celular não é necessário. Neste caso,

a propriedade de furtividade devido à corona de PEG das vesículas reduz a captação celular e os tempos de retenção de vesículas na circulação sanguínea serão aumentados (PELAZ et al., 2015). Um dos principais desafios é manter a atividade da ASNase. Métodos como hidratação de filme com contato mínimo com solvente podem ser empregados, mas técnicas pós-filme como sonicação por exemplo, podem promover a agregação de proteínas. Investigamos a estabilidade da ASNase sob diferentes condições de estresse, como agitação e sonicação e é possível ver relativa perda da atividade da enzima como o principal gargalo, possivelmente em razão da agregação da mesma durante a agitação e sonicação (Figura V. 2). Neste sentido, a eletroporação de PL de Pluronic[®] L-121 pré-formados poderia ser uma estratégia para encapsular a ASNase.

NANOENCAPSULAÇÃO DA L-ASPARAGINASE

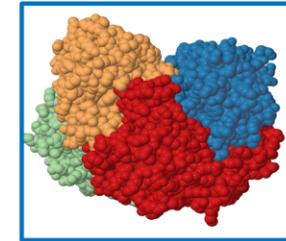
1) Por que polimerossomos (PL)?

Respostas	Dicas	Gargalos
Os sistemas PL devem manter a enzima circulando por um longo tempo.	Efeito de EPR não é importante, portanto copolímeros responsivos a fatores como pH não são necessários	O sistema deve preservar a reação catalítica da enzima e resistir em circulação por tempo suficiente para efeito terapêutico
Uma enzima será encapsulada, que é uma macromolécula e o core hidrofílico do PL é um espaço racional para encapsulação	A eficiência da encapsulação dependerá da concentração inicial de proteína e do volume do núcleo hidrofílico do PL	Garantir que o método utilizado para a produção de PL não interfira na atividade da enzima ou leve a mudanças conformacionais.

2) Quais os copolímeros mais adequados?

Respostas	Dicas	Gargalos
Pluronic® L-121: sensível à temperatura	O Pluronic® PL é descrito como estável apenas por algumas horas após a preparação, mas a instabilidade térmica das vesículas pode ser usada para elaborar PL por troca de temperatura.	PL de Pluronic® L-121 não deve ser conservado a 4 ° C.
PEG-PLA: polímero semi-cristalino susceptível a hidrólise	O bloco hidrofóbico (PLA) é cristalino à temperatura ambiente.	As vesículas de PEG-PLA podem ser mantidas a 4 ° C.

L-Asparaginase (ASNase)



3) Como produzir os polimerossomos?

Respostas	Dicas	Gargalos
Um método bottom-up para o Pluronic® L-121	A co-solubilização de Pluronic® L-121 e ASNase a 4 ° C, seguida de auto-agregação em vesículas à temperatura ambiente, pode ser uma abordagem bottom-up	A auto-agregação é um fenômeno complexo e a transição de fase pode atrapalhar a encapsulação ao preparar os PL por troca de temperatura
Um método top-down para todos os copolímeros (hidratação de filme)	A hidratação do filme seguida pela incorporação de ANSase por eletroporação pode ser empregada para evitar a agregação de proteínas. No entanto, este método leva a altos valores de PDI.	Etapas de purificação são necessárias para remover o volume e diminuir os valores de PDI dos PL preparados por hidratação do filme.

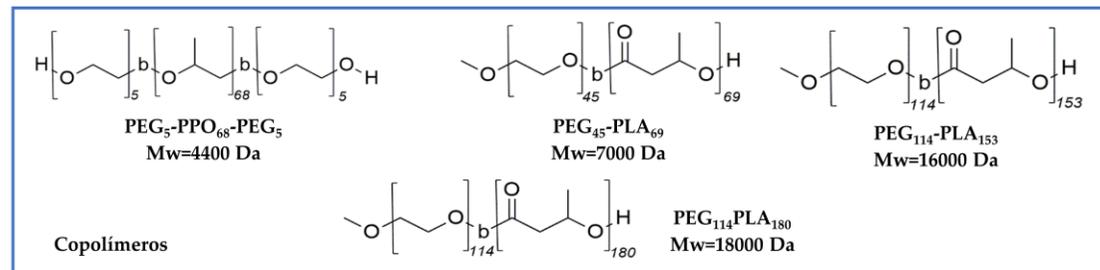


Figura V.1- Preparação de polimerossomos para a encapsulação de L-Asparaginase baseado em três questões iniciais: "Por quê?" "Qual?" e Como? Os copolímeros Pluronic L-121 (PEG₅-PPO₆₈-PEG₅) e PEG-PLA (PEG₄₅-PLA₆₉, PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ e PEG₁₁₄PLA₁₈₀) foram usados para produzir as vesículas.

* A imagem da L-asparaginase nesta figura foi obtida a partir do Protein Data bank (Código do PDB: 3ECA)

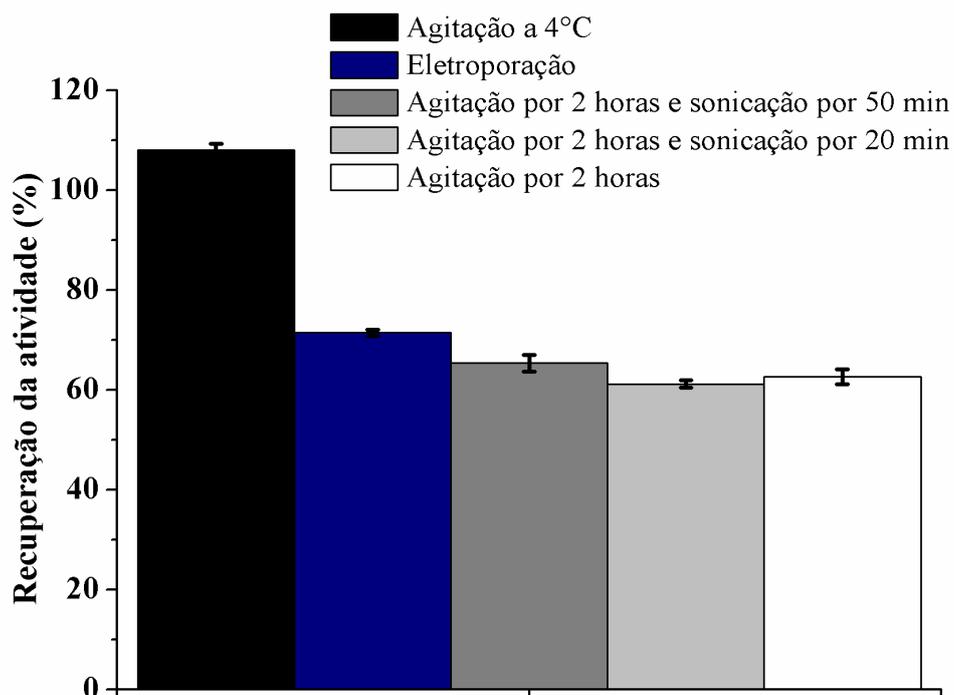


Figura V.2- Perfil de % de recuperação de atividade enzimática da L-Asparaginase depois das condições de estresse empregadas nos métodos de elaboração de polimerossomos.

Depois de responder as perguntas "Por quê?", "Qual?" e "Como"? Com base nas dicas descritas acima, os protocolos para preparar PLS e encapsular ao ASNase são ilustrados na figura V.3.

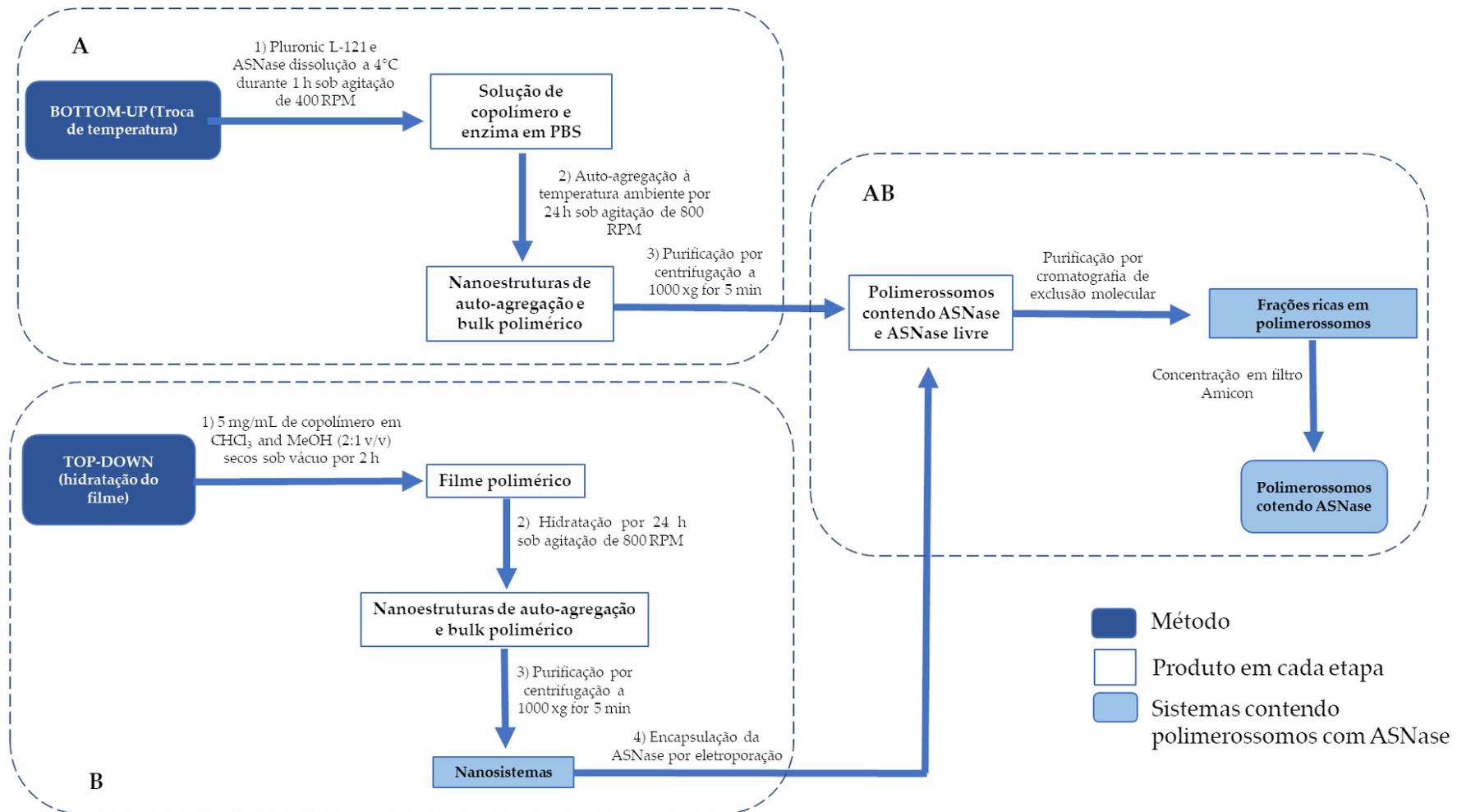


Figura V.3- Esquema das abordagens *bottom-up* e *top-down* para produção de polimerossomos e encapsulação da L-asparaginase (ASNase).

A abordagem *bottom-up* com troca de temperatura leva à mudança de fase no sistema. Inicialmente, a baixa temperatura (abaixo de 15 °C), o sistema consiste em uma solução de unímeros de Pluronic® L-121 e ASNase. À temperatura ambiente, ocorre a desidratação das porções de PPO, levando à reconfiguração com autoagregação devido ao efeito hidrofóbico. Além de PL, agregados micelares podem se formar, diminuindo a encapsulação protéica (CHENG et al., 2016).

A distribuição de tamanho por DLS dos sistemas de PL logo após o método de troca de temperatura (Figura V.4A) e das frações coletadas após a purificação por SEC (Figura V.4B) mostra que os sistemas eram razoavelmente monodispersos antes da purificação e preservavam as características do PL após a purificação. A Figura V.4C apresenta as imagens de MET dos sistemas e pode-se ver nanoestruturas com espaço delimitado por uma membrana espessa, confirmando que PL de Pluronic L-121® foram produzidos. O diâmetro médio das vesículas foi de 198 nm ($\pm 6,43$) para os sistemas anteriores à purificação e 205,9 nm ($\pm 1,67$), 197,5 nm ($\pm 0,77$) e 196,9 nm ($\pm 1,52$) para as 3 frações coletadas durante a purificação.

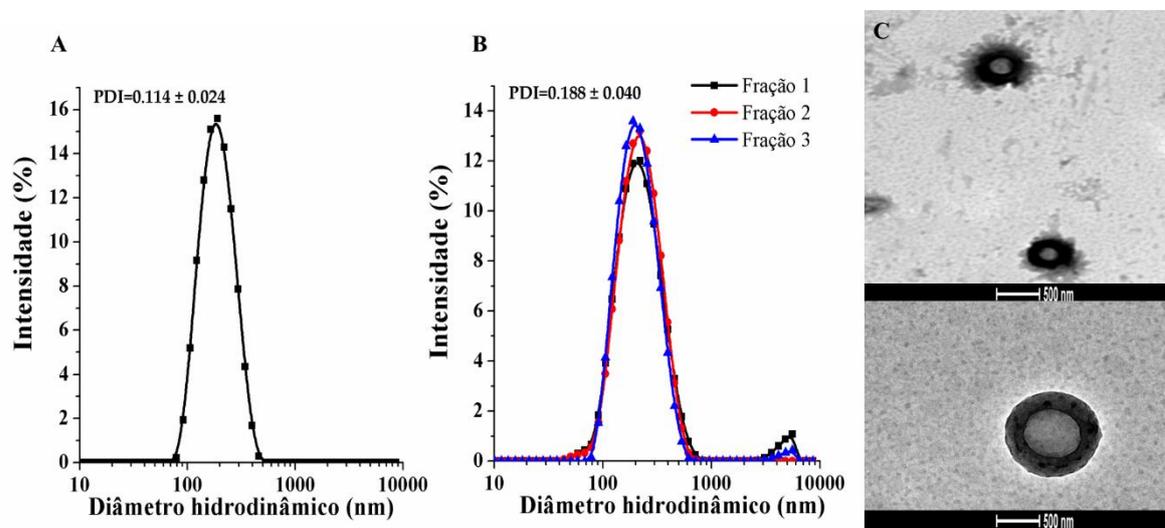


Figura V.4- Distribuição de tamanho dos polimerossomos Pluronic® L-121 obtidos a partir da troca de temperatura (método *bottom-up*) e das frações coletadas após a purificação por SEC. A) DLS para nanossistema após o método de troca de temperatura. B) DLS para frações coletadas da SEC. C) Imagens de TEM para sistemas finais: frações concentradas após centrifugação com filtro de 10kDa.

O método de hidratação do filme também resultou em nanossistemas como apresentado na Figura V.5A. Este método geralmente envolve condições estressantes para proteínas, tais como agitação extensiva e sonicação. Portanto, decidimos realizar a encapsulação de vesículas pré-formadas por eletroporação, como sugerido por Battaglia e colaboradores (MESSAGER et al., 2014). A eletroporação permite a encapsulação de proteínas após a produção da vesícula. Essa técnica é amplamente utilizada no campo da biotecnologia e requer o uso de um campo elétrico alto para criar poros induzidos pela eletroporação em bicamadas de vesículas (MEGLIC; KOTNIK, 2017). Os valores de diâmetro hidrodinâmico e PDI para os nanossistemas obtidos após a hidratação do filme foram de 151 nm (± 2) e 0,124 ($\pm 0,004$) para Pluronic[®] L-121, 658 nm (± 19) e 0,406 ($\pm 0,05$) para PEG₄₅-PLA₆₉, 240 nm (± 5) e 0,347 ($\pm 0,038$) para PEG₁₁₄-PLA₁₅₃, 266 (± 6) e 0,367 ($\pm 0,034$) para PEG₁₁₄PLA₁₈₀, respectivamente. Para todos os nanossistemas de PEG-PLA, um pequeno pico no final do perfil de distribuição de tamanho foi observado, o qual foi atribuído ao *bulk* polimérico remanescente.

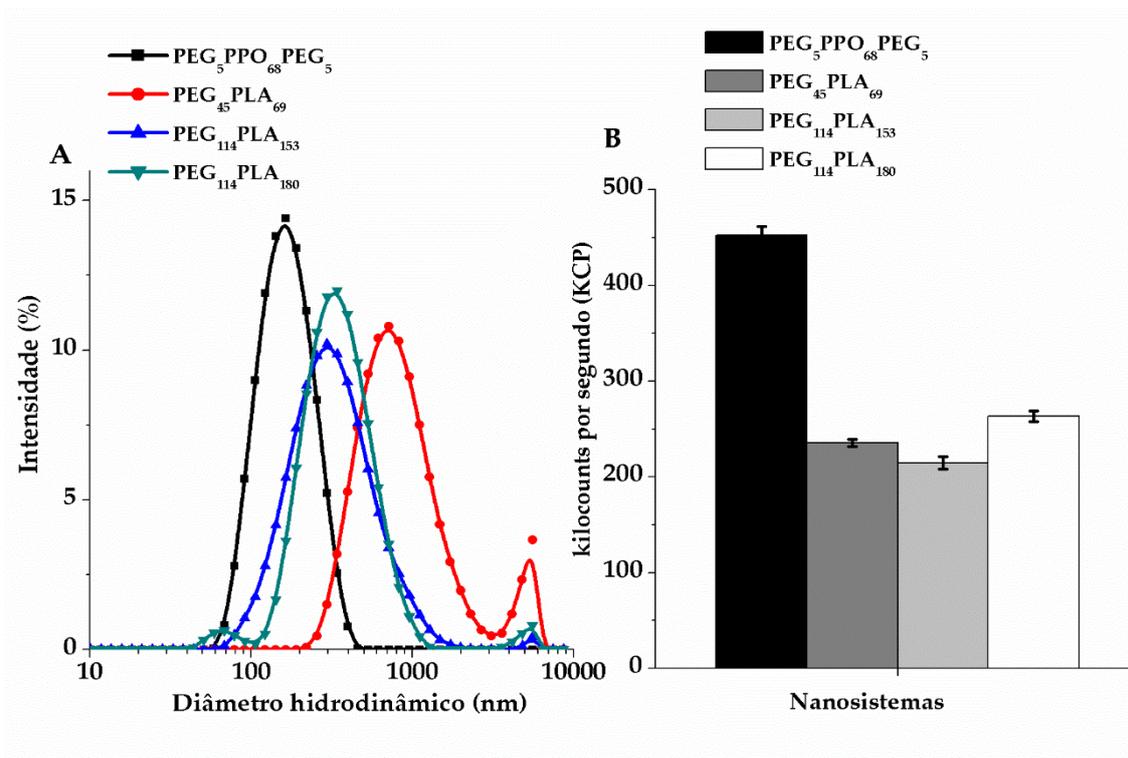


Figura V.5 A) Distribuição de tamanho das nanoestruturas de Pluronic® L-121 e PEG-PLA* obtidas pelo método de hidratação do filme B) kcps para o sistema Pluronic® L-121 diluído (1:20) e sistemas PEG-PLA diluídos: PEG₄₅-PLA₆₉ (1:10), PEG₁₁₄PLA₁₈₀ (1: 2) e PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ sem diluição.

* A micrografia dessas nanoestruturas já foi mostrada no capítulo 3

Apesar dos valores de PDI estreitos e tamanhos almejados para sistemas (exceto para PEG₄₅-PLA₆₉), um significativo *bulk* polimérico ainda foi observado para os copolímeros de PEG-PLA após a centrifugação. O grau de cristalinidade é uma das razões do desafio de autoagregação de copolímeros de PEG-PLA, como já foi relatado no capítulo 3. Como resultado, sistemas muito diluídos foram obtidos e a baixa concentração de vesículas foi considerada uma desvantagem para a realização da eletroporação, uma vez que a adição da solução de ASNase e a purificação de amostras com baixa concentração de PL levariam a nanossistemas muito diluídos. A Figura V.5B mostra a “taxa de contagem” (em *kcps*) para cada sistema PEG-PLA obtido a partir hidratação do filme. Os *kcps* são equivalentes ao número de fótons por segundo que chegam ao detector e, em uma concentração específica, o valor é uma indicação da capacidade de detecção

do instrumento (TANTRA; SCHULZE; QUINCEY, 2010). Com base no aspecto (leitoso ou não), os sistemas de Pluronic[®] L-121 foram diluídos 1:20 em PBS, os sistemas PEG₄₅-PLA₆₉ foram diluídos 10 vezes e os sistemas PEG₁₁₄PLA₁₈₀ 2 vezes, para realização das medidas de DLS. O sistema PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ foi analisado sem diluição. Mesmo com a maior diluição, o valor de k_{cps} para as nanoestruturas de Pluronic[®] L-121 foi maior em comparação com os nanossistemas de PEG-PLA, confirmando que os últimos estavam relativamente diluídos. Portanto, os copolímeros de PEG-PLA não foram mais considerados para os ensaios de eletroporação.

Para os passos seguintes, o Pluronic[®] L-121 foi escolhido e trabalhos anteriores descrevem que o Pluronic[®] L-121 forma pequenas vesículas unilamelares com aproximadamente 100 nm, similar ao que obtivemos. No entanto, a literatura relata que estes PL reverteriam para estruturas lamelares planas dentro de poucas horas após a preparação, o que limitaria a aplicação como sistemas de liberação controlada (LI et al., 2009). Realizamos então um estudo preliminar de estabilidade de curta duração que demonstrou que as vesículas de Pluronic[®] L-121 são estáveis durante uma semana à temperatura ambiente (Figura V.6).

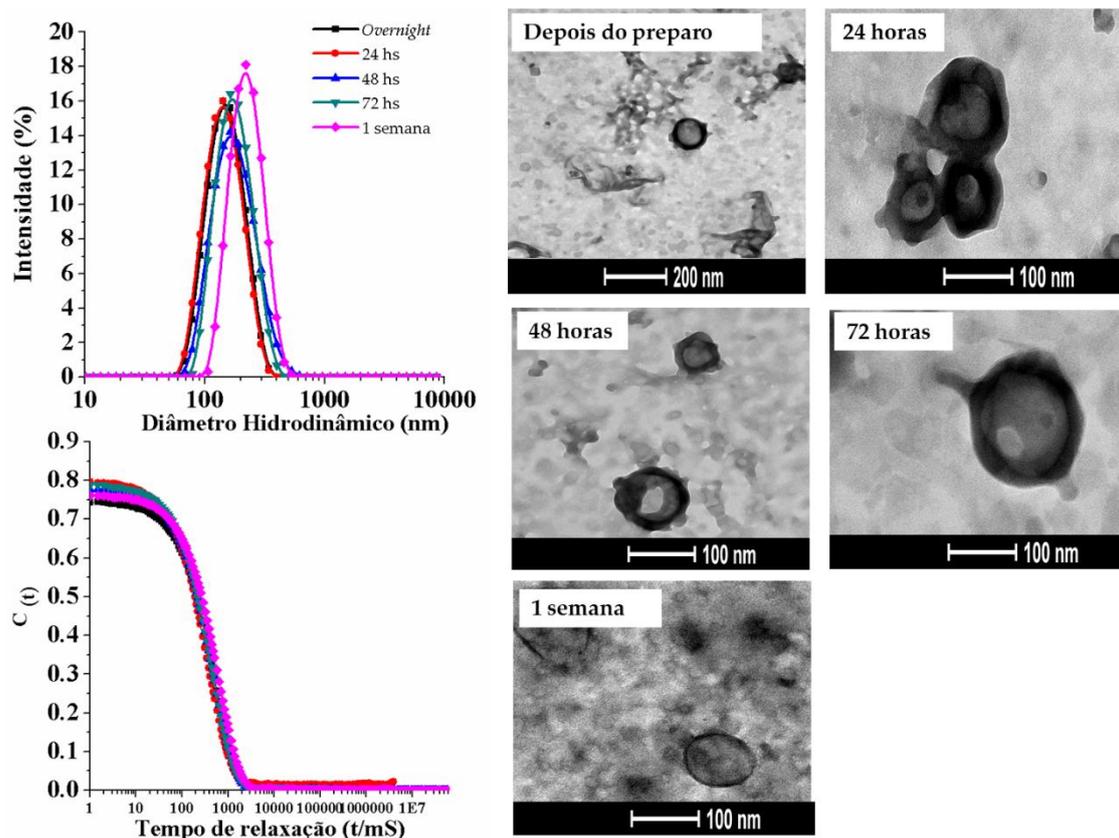


Figura V.6- Distribuição de tamanho dos polimerossomos de Pluronic® L-121 preparados por hidratação de filme sob agitação *overnight* e após 24, 48, 72 horas e uma semana à temperatura ambiente (25 °C).

Dada a estabilidade dos PL de Pluronic® L-121, as amostras foram eletroporadas para encapsulação da ASNase. As análises de DLS e TEM confirmaram a estabilidade dos PL frente à eletroporação (Figura V.7), sendo os valores de diâmetro hidrodinâmico para o sistema de $213 (\pm 3)$ e $171 (\pm 2)$, antes e após a eletroporação, respectivamente.

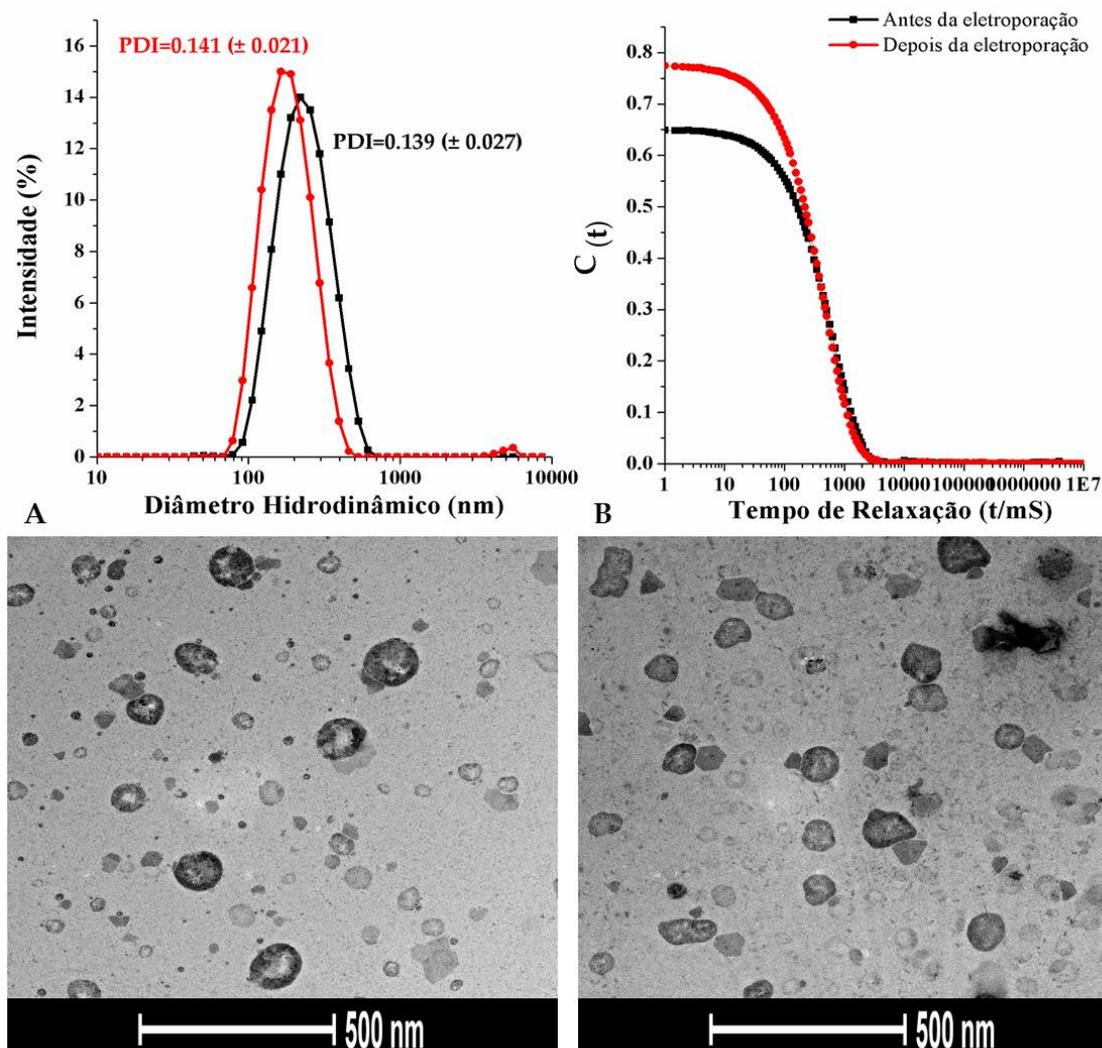


Figura V.7- Distribuição de tamanho e micrografias de TEM dos polimerossomos de Pluronic® L-121 A) antes da eletroporação e B) Após a eletroporação (2500 V e 10 pulsos).

V.3.2 Encapsulação da ASNase em polimerossomos

A eficiência de encapsulação para a abordagem *bottom-up* (troca de temperatura) após a purificação por SEC foi de 4.9% (± 1,6). No entanto, esses valores foram obtidos pelo método indireto e acreditamos que uma superestimação ocorre quando a EE% é baseado na quantificação da proteína no sobrenadante após a centrifugação do sistema.

As cadeias de PEG podem interagir formando uma rede polimérica e aprisionar moléculas de proteínas livres que são, portanto, medidas como encapsuladas. Para

confirmar nossa hipótese, realizamos a determinação indireta de EE% nos PL de Pluronic L-121 e valores de 69% foram obtidos (Figura V.8).

Recentemente, foi publicado um artigo sobre a encapsulação da ASNase em PL (BLACKMAN et al., 2018) de poli (óxido de etileno) -poli-(2-hidroxipropil metacrilato) e a EE% medida de maneira indireta por centrifugação foi de 9%. Portanto, o valor encontrado por nós pode ser considerado significativo, dada a limitação dos PL. Está claro para nós que a purificação de PL por SEC é fundamental para determinar a EE% e, dados os desafios para um procedimento adequado para esta etapa.

Não foi detectada encapsulação da proteína nos PL quando a eletroporação foi usada. Com base nos princípios da técnica, a eletroporação causa uma perturbação da membrana e provoca uma reorganização do bloco hidrofílico no poro interno e o rearranjo é finalizado para minimizar o contato entre o bloco hidrofóbico e a água (WANG et al., 2012). Para copolímeros dibloco, levando em consideração o espaço ocupado por cada bloco do copolímero (proporcional à espessura da membrana (d) e o balanço entre as interações dos dois blocos (hidrofílico e hidrofóbico), o raio mínimo para que ocorra formação de poro (R_p) estável com consequente encapsulação proteica pode ser estimado (DISCHER; AHMED, 2006):

$$r_p = k_1 N_{\text{bloco hidrofóbico}}^b + k_2 N_{\text{bloco hidrofílico}}^b \quad (\text{Equação 3})$$

em que: N é o número de unidades monoméricas que formam o bloco específico do copolímero, b é o coeficiente de *coil* do copolímero, k é uma constante pré-exponencial tipicamente proporcional à tensão interfacial entre dois blocos poliméricos (k_1) e entre o bloco hidrofóbico e a água (k_2).

Para o Pluronic® L-121, a arquitetura não impõe uma conformação definida para a membrana nos nanoagregados. Ambas as conformações em forma de I e em U são observadas nas bicamadas formadas. Dessa maneira, esse copolímero resulta em vesículas com membrana relativamente espessas, mas de empacotamento “frouxo”,

portanto mais permeáveis. Durante a técnica de eletroporação, a cadeia hidrofílica curta em relação à bicamada hidrofóbica dificulta a organização do bloco hidrofílico no poro interno, gerando poros instáveis na bicamada, que podem desaparecer antes da encapsulação da proteína. Dependendo do tamanho do bloco hidrofílico, o PL pode ainda resistir ao campo elétrico externo inalterado (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2011).

V.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseando-se nas questões, “*Por quê?*”, “*Qual?*” e “*Como?*” foi possível delinear métodos para a encapsulação da ASNase em PLs, bem como observar que certas dicas, quando aplicadas em determinadas etapas do processo de obtenção e caracterização de PLs, evitam falsos resultados, formação de artefatos e falta de reprodutibilidade. Os resultados obtidos demonstraram que antes de proceder à encapsulação, é necessário garantir que os PLs foram formados sem excesso de polímero precipitado, no entanto é imprescindível que a técnica de encapsulação da enzima não leve a desestabilização da mesma. Além disso, observou-se que a utilização de um copolímero tribloco não necessariamente permite extrapolação das técnicas usadas para diblocos, pois demonstramos que a eletroporação do Pluronic[®] L-121 não foi eficaz na formação de poros devido à arquitetura desse copolímero.

REFERÊNCIAS

- BATTAGLIA, G.; RYAN, A. J. The evolution of vesicles from bulk lamellar gels. **Nature Materials**, v. 4, n. 11, p. 869–876, 16 out. 2005.
- BATTAGLIA, G.; RYAN, A. J.; BUILDING, D.; UNI, T.; HILL, B.; SHEFFIELD, S. Pathways of Polymeric Vesicle Formation. p. 10272–10279, 2006.
- CHENG, X.; KIM, J. K.; KIM, Y.; BOWIE, J. U.; IM, W. Molecular dynamics simulation strategies for protein-micelle complexes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 7, p. 1566–1572, 2016.
- DISCHER, B. M.; WON, Y.; EGE, D. S.; LEE, J. C.; BATES, F. S.; DISCHER, D. E.;

HAMMER, D. A. Polymersomes : Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. v. 284, n. 5417, p. 1143–1147, 1999.

JOSEPH, A.; CONTINI, C.; CECCHIN, D.; NYBERG, S.; RUIZ-PEREZ, L.; GAITZSCH, J.; FULLSTONE, G.; TIAN, X.; AZIZI, J.; PRESTON, J.; VOLPE, G.; BATTAGLIA, G. Chemotactic synthetic vesicles: Design and applications in blood-brain barrier crossing. **Science Advances**, v. 3, n. 8, p. e1700362, 2017.

KIM, K. T.; CORNELISSEN, J. J. L. M.; NOLTE, R. J. M.; VAN HEST, J. C. M. A polymersome nanoreactor with controllable permeability induced by stimuli-responsive block copolymers. **Advanced Materials**, v. 21, n. 27, p. 2787–2791, 2009.

LI, F.; DE HAAN, L. H. J.; MARCELIS, A. T. M.; LEERMAKERS, F. A. M.; COHEN STUART, M. A.; SUDHÖLTER, E. J. R.; HAAN, L. H. J. de; MARCELIS, A. T. M.; LEERMAKERS, F. A. M.; STUART, M. A. C.; SUDHÖLTER, E. J. R. Pluronic polymersomes stabilized by core cross-linked polymer micelles . **Soft Matter**, v. 5, n. 20, p. 4042–4046, 2009.

LOMAS, H.; DU, J.; CANTON, I.; MADSEN, J.; WARREN, N.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L.; BATTAGLIA, G. Efficient encapsulation of plasmid DNA in pH-sensitive PMPC-PDPA polymersomes: Study of the effect of PDPA block length on copolymer-DNA binding affinity. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 5, p. 513–530, 2010.

LOVERDE, S. M.; PANTANO, D. A.; CHRISTIAN, D. A.; MAHMUD, A.; KLEIN, M. L.; DISCHER, D. E. Curvature, rigidity, and pattern formation in functional polymer micelles and vesicles-From dynamic visualization to molecular simulation. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 15, n. 6, p. 277–284, 2011.

MEGLIC, S. H.; KOTNIK, T. Electroporation-based applications in biotechnology. **Handbook of Electroporation**, v. 3, n. 8, p. 2153–2169, 2017.

MESSAGER, L.; BURNS, J. R.; KIM, J.; CECCHIN, D.; HINDLEY, J.; PYNE, A. L. B.; GAITZSCH, J.; BATTAGLIA, G.; HOWORKA, S. Biomimetic Hybrid Nanocontainers with Selective Permeability. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 37, p. 11106–11109, 2016.

MESSAGER, L.; GAITZSCH, J.; CHIERICO, L.; BATTAGLIA, G. Novel aspects of encapsulation and delivery using polymersomes. **Current opinion in pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 104–11, out. 2014.

PELAZ, B.; DEL PINO, P.; MAFFRE, P.; HARTMANN, R.; GALLEGRO, M.; RIVERA-FERNÁNDEZ, S.; DE LA FUENTE, J. M.; NIENHAUS, G. U.; PARAK, W. J. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 6996–7008, 2015.

TANTRA, R.; SCHULZE, P.; QUINCEY, P. Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. **Particuology**, v. 8, n. 3, p. 279–285, 2010.

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. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, p. 11122–11125, 2012.

WONG, C. K.; LAOS, A. J.; SOERİYADI, A. H.; WIEDENMANN, J.; CURMI, P. M.

G.; GOODING, J. J.; MARQUIS, C. P.; STENZEL, M. H.; THORDARSON, P. Polymersomes prepared from thermoresponsive fluorescent protein-polymer bioconjugates: Capture of and report on drug and protein payloads. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 18, p. 5317–5322, 2015.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

Ao longo deste estudo, diversos axiomas difundidos no campo da autoagregação de moléculas anfifílicas foram analisados e na prática, diferentes estratégias foram usadas para obtenção dos polimerossomos de acordo com os copolímeros empregados, ficando claro que não haviam regras universais, mas que a experiência laboratorial muitas vezes delinearía muito mais as abordagens usadas, ultrapassando assim os paradigmas teóricos.

Nos capítulos II e III, utilizando-se copolímeros de PEG-PLA para formação de polimerossomos, está demonstrado que muito além do volume da fração hidrofílica destes copolímeros dibloco, a cristalinidade e o método de elaboração empregado influenciam no perfil de distribuição por tamanho dos polimerossomos, bem como nas características finais dos nanossistemas, como concentração de vesículas, devido à presença de micelas ou mesmo precipitado polimérico. Neste trabalho, esta baixa concentração de vesículas e alta proporção de *bulk* polimérico precipitado foram gargalos que certamente refletiram na eficiência de encapsulação da ASNase entre 5-20% juntamente com as características de massa molecular dos copolímeros que influenciam o volume de espaço aquoso disponível para encapsulação desta proteína.

No Capítulo IV, utilizando-se PMPC-PDPA e PEG-PDPA, com diferentes abordagens de formação de vesículas, *top-down* (eletroporação) e *bottom-up* (troca de pH) foi possível observar que mesmo com métodos já consolidados, a encapsulação de uma proteína como a ASNase ainda é um campo desafiador, mas que conhecendo bem as etapas do processo de obtenção de vesículas e as características nanoestruturais destes nanocarreadores, é possível traçar um planejamento racional para encapsular a enzima em polimerossomos. No caso da abordagem *top-down*, mesmo com a necessidade de esperar semanas para hidratação do filme, o processo de eletroporação mostrou-se rápido e a proteína fica pouco tempo em temperatura ambiente pois as vesículas já estão

formadas. O sistema passou por um único processo de purificação, poucos microlitros deste é suficiente para eletroporação sendo possível obter vários lotes de sistemas de polimerossomos contendo a enzima no mesmo dia. Já na abordagem *bottom-up*, o método é inicialmente mais rápido permitindo a obtenção de vesículas contendo enzimas em aproximadamente 1 hora, porém há necessidade de purificação posterior e a técnica deve ser repetida em todas as etapas para cada lote de polimerossomos contendo a ASNase.

No Capítulo V, nota-se ainda mais o quanto o campo da autoagregação de copolímeros anfifílicos para obtenção de polimerossomos é complexa. Ao utilizar-se um copolímero tribloco como o Pluronic L-121, a eletroporação já não se mostrou tão eficiente como seria esperado, em razão do menor tamanho dos blocos hidrofílicos que são importantes para a estabilidade do poro. Por outro lado, o caráter responsivo à temperatura deste copolímero permitiu o desenvolvimento de um método no qual a proteína foi mantida a 4°C sob agitação com os unímeros de Pluronic L-121 e mediante troca de temperatura a mesma foi encapsulada no nanossistema, sendo que o processo a frio se mostrou eficiente sem perda da atividade da enzima.

Por fim, levando-se em consideração como já discutido na introdução desta tese, que apenas em 2014 órgãos regulatórios iniciaram definições para o emprego de nanotecnologia, e diante do fato de que os estudos com polimerossomos iniciaram há menos de 20 anos, do ponto de vista de aplicação farmacêutica há espaço para muitas contribuições científicas neste campo.

APÊNDICES

Artigos publicados

ARTIGO 1-Primeira página

Cite this: *Biomater. Sci.*, 2016, 4, 205

Nanostructures for protein drug delivery

Juliana de Almeida Pachioni-Vasconcelos,^{†a} André Moreni Lopes,^{†a}
Alexsandra Conceição Apolinário,^a Johanna Karina Valenzuela-Oses,^a
Juliana Souza Ribeiro Costa,^b Laura de Oliveira Nascimento,^{b,c}
Adalberto Pessoa Jr.,^a Leandro Ramos Souza Barbosa^d and
Carlota de Oliveira Rangel-Yagui^{*a}

Use of nanoscale devices as carriers for drugs and imaging agents has been extensively investigated and successful examples can already be found in therapy. In parallel, recombinant DNA technology together with molecular biology has opened up numerous possibilities for the large-scale production of many proteins of pharmaceutical interest, reflecting in the exponentially growing number of drugs of biotechnological origin. When we consider protein drugs, however, there are specific criteria to take into account to select adequate nanostructured systems as drug carriers. In this review, we highlight the main features, advantages, drawbacks and recent developments of nanostructures for protein encapsulation, such as nanoemulsions, liposomes, polymersomes, single-protein nanocapsules and hydrogel nanoparticles. We also discuss the importance of nanoparticle stabilization, as well as future opportunities and challenges in nanostructures for protein drug delivery.

Received 2nd September 2015,

Accepted 28th October 2015

DOI: 10.1039/c5bm00360a

www.rsc.org/biomaterialsscience

^aDepartment of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil. E-mail: corangel@usp.br; Fax: +55 11-3075-6306; Tel: +55 11-3091-2478

^bDepartment of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Brazil

^cFaculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Brazil

^dDepartment of General Physics, Institute of Physics, University of São Paulo, Brazil

[†]These authors have contributed equally to this work.

1. Introduction

Research on the synthesis, properties and applications of nanoscale materials and devices has contributed to several biomedical fields such as drug delivery, imaging agents and diagnostic tools. The importance of nanotechnology can be noticed in several angles, as the scientific one; the number of



Juliana A. Pachioni-
Vasconcelos

Juliana Pachioni-Vasconcelos received her B.Sc. in Pharmacy (2010) from Presbyterian University Mackenzie (Brazil) and M.Sc. in Pharmaceutical Sciences (2012) from the University of São Paulo (Brazil). She is currently a Ph.D. candidate in Biochemical and Pharmaceutical Technology at the University of São Paulo, where she works with Prof. Rangel-Yagui's group. Her Ph.D. research focuses on the nanotechnological development of protein drugs mainly by incorporation into polymersomes.



André Moreni Lopes

Dr André Moreni Lopes received his B.Sc. in Biology (2004), and Ph.D. in Biochemical and Pharmaceutical Technology (2010) from the University of São Paulo (Brazil). His Ph.D. thesis focused on downstream processes, mainly aqueous two-phase systems for protein purification. During his Ph.D. he spent six months as a Visiting Student at the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB/Cuba). During the last four years, he has been working on nanobiotechnology, particularly with biomolecules incorporation into nanostructures. Dr Lopes is currently a Postdoctoral Fellow at the Department of Bioengineering – University of California (UCLA), under the supervision of Prof. Daniel T. Kamei.

química nova

ISSN: 0100-4042

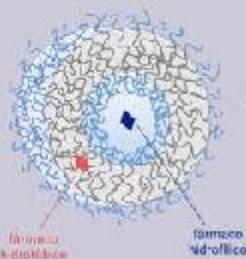
eISSN: 1678-7064 on line

Volume 40, Número 7, 2017



POLIMEROSSOMOS VERSUS LIPOSSOMOS: A EVOLUÇÃO DA “BALA MÁGICA”

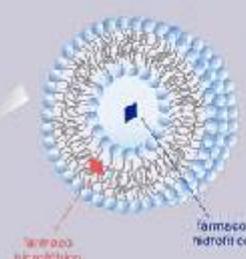
Auto-agregação de
copolímeros



POLIMEROSSOMO

- Versatilidade química, permitindo diferentes perfis de encapsulação, liberação e seletividade
- Facilidade de manipulação devido à estabilidade físico-química e mecânica
- Cinética de desagregação e liberação de fármacos mais lenta

Auto-agregação de
fosfolípidios



LIPOSSOMO

- Rápida eliminação pelo sistema imune inato
- Instabilidade físico-química
- Cinética de desagregação e liberação de fármacos mais rápida

ARTIGO 2-Primeira página



Revisão

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170054>

Quim. Nova, Vol. 40, No. 7, 810-817, 2017

POLIMEROSSOMOS VERSUS LIPOSSOMOS: A EVOLUÇÃO DA “BALA MÁGICA”

Alexsandra Conceição Apolinário, Juliana de Almeida Pachioni-Vasconcelos, Adalberto Pessoa Jr. e Carlota de Oliveira Rangel-Yugui*

Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 16, Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 29/12/2016; aceito em 08/03/2017; publicado na web em 15/05/2017

POLYMERSOMES VERSUS LIPOSOMES: THE “MAGIC BULLET” EVOLUTION. Polymeric vesicles known as polymersomes are formed by the self-assembly of amphiphilic block copolymers and have structural organization similar to liposomes. However, polymersomes present higher physicochemical stability and structure versatility due to their polymeric nature. In this review we describe the main aspects related to the structure and applications of these systems for drug delivery.

Keywords: drug delivery; polymersomes; liposomes; amphiphilic block-copolymers; self-aggregated nanostructures.

INTRODUÇÃO

As pesquisas com sistemas de liberação de fármacos e biofármacos a partir de nanoestruturas têm revolucionado as ciências farmacêuticas no mundo todo.^{1,2} Estes nanocarreadores (NC) têm propriedades peculiares relacionadas ao tamanho em escala nanométrica e área superficial aumentada, o que lhes confere potencial para modular características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de fármacos. Portanto, são capazes de melhorar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* de fármacos, prolongar o tempo de circulação sanguínea e permitir a liberação controlada e direcionada.^{3,4}

Devido às vantagens dos NC, a cada dia estudos descrevem novas possibilidades de aperfeiçoar ainda mais estes sistemas e percebe-se uma evolução constante no campo da nanotecnologia aplicada a produtos farmacêuticos, especialmente na oncologia. As pesquisas relatam NC amplamente usados como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas metálicas e lipossomos (LP), com diferentes abordagens referentes à composição, inovações na técnica de produção e alternativas para liberação sítio-dirigida, de modo que haja aprimoramento funcional do produto final.⁵⁻⁸

Um exemplo bastante atual de inovação em nanocarreadores são as vesículas poliméricas, descritas inicialmente em 1981 por Kunitake e colaboradores⁹ e em 1995 estudadas com maior embasamento físico-químico por Zhang & Eisenberg.¹⁰ Posteriormente, essas vesículas foram denominadas polimerossomos (PL) por Discher e colaboradores,¹¹ uma vez que apresentam organização estrutural semelhante aos LP. PL podem ser conceituados como nanocarreadores supramoleculares poliméricos com estrutura vesicular. Enquanto LP são vesículas de interior aquoso compostas por uma membrana lipídica, os PL, que também apresentam interior aquoso, são compostos por uma membrana de copolímeros anfífilicos.

Para compreender a importância dos PL, é válido reforçar que são morfologicamente análogos aos LP, os quais estão entre os NC mais empregados no campo farmacêutico e foram relatados pioneiramente nos anos 60 por Bangham e seus colaboradores, que descreveram estruturas vesiculares organizadas em bicamadas originadas por fosfolípidos em soluções aquosas.¹² Após estudos iniciais com LPs, percebeu-se que estes nanocarreadores poderiam se encaixar no conceito proposto por Paul Ehrlich conhecido por “Bala Mágica” ou do inglês “Magic Bullet”, conceito descrito em um artigo publicado

pela Química Nova em 2002 intitulado “*Lipossomos: a bala mágica acertou?*”.¹⁴ De acordo com Ehrlich, deveriam haver compostos, e aqui extrapolamos para nanoestruturas, capazes de atingir o alvo biológico sem causar danos ao organismo. Quase 30 anos após estes estudos preliminares, em 1995, a primeira formulação lipossomal, Doxil[®], foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do sarcoma de Kaposi associado à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Atualmente, estima-se que 14 novos sistemas de LP foram aprovados e cerca de 21 encontram-se em ensaios clínicos.¹⁵ No entanto, a instabilidade físico-química é a principal desvantagem inerente a este NC devido à sua natureza lipídica, o que em geral não ocorre com os PL em razão da estrutura polimérica, que é físico-quimicamente mais estável. Portanto, estes sistemas vêm sendo empregados recentemente em diversas abordagens de estudos para *drug delivery*.^{12,16}

Os conceitos envolvendo os PL abrangem desde a compreensão da estrutura e propriedades dos copolímeros anfífilicos que constituem tais NC, passando pelos métodos de produção e caracterização das vesículas, bem como as principais aplicações. Neste artigo, descrevemos os principais aspectos relacionados a estes tópicos. Cabe ressaltar que não existe ainda na literatura artigos em língua portuguesa introduzindo o conceito de polimerossomos e suas potencialidades no campo farmacêutico.

Além disso, consideramos importante a divulgação de temas na área de nanotecnologia farmacêutica assim como fizeram antes pesquisadores brasileiros, como por exemplo Schaffazick e colaboradores,¹⁷ ao detalharem os aspectos sobre a formação e caracterização das nanopartículas, Oliveira e colaboradores¹⁸ em 2004, quando explanaram os principais aspectos da estrutura de microemulsões e Durán e colaboradores,¹⁹ que descreveram didaticamente a tecnologia de produção de nanocristais de fármacos.

LIPOSSOMOS VERSUS POLIMEROSSOMOS

Diante da analogia entre LP e PL, surge o questionamento sobre as diferenças, vantagens e desvantagens de um em relação ao outro. A relevância dos LP (Figura 1) dentro da nanotecnologia é indiscutível, são várias aplicações na área farmacêutica que incluem desde liberação de ativos cosméticos até fármacos anticancerígenos.^{20,21} Porém, as pesquisas com PL vêm ganhando espaço nas nanociências, já que são sistemas mais estáveis físico-quimicamente e mais resistentes mecanicamente em relação às vesículas lipídicas em razão das propriedades químicas dos polímeros que os constituem.²²

*e-mail: corangel@usp.br

ARTIGO 3-Primeira página



Article

Challenges for the Self-Assembly of Poly(Ethylene Glycol)–Poly(Lactic Acid) (PEG-PLA) into Polymersomes: Beyond the Theoretical Paradigms

Alexsandra Conceição Apolinário¹, Monika S. Magon^{2,3} , Adalberto Pessoa Jr.¹ and Carlota de Oliveira Rangel-Yagui^{1,*}

¹ Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bl.16, CEP: 05508-000, Brazil; acapolinario@gmail.com (A.C.A.); pessoajr@usp.br (A.P.J.)

² Department of Chemistry, University College London, Christopher Ingold Building, 20 Gordon Street, London WC1H 0AJ, UK; m.magon.12@ucl.ac.uk

³ Current address: BSRC Complex, School of Biology, University of St Andrews, St Andrews KY16 9ST, UK

* Correspondence: corangel@usp.br; Tel.: + 55-1130-912-381

Received: 13 April 2018; Accepted: 22 May 2018; Published: 26 May 2018



Abstract: Polymersomes (PL), vesicles formed by self-assembly of amphiphilic block copolymers, have been described as promising nanosystems for drug delivery, especially of biomolecules. The film hydration method (FH) is widely used for PL preparation, however, it often requires long hydration times and commonly results in broad size distribution. In this work, we describe the challenges of the self-assembly of poly (ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PEG-PLA) into PL by FH exploring different hydrophilic volume fraction (f) values of this copolymer, stirring times, temperatures and post-FH steps in an attempt to reduce broad size distribution of the nanostructures. We demonstrate that, alongside f value, the methods employed for hydration and post-film steps influence the PEG-PLA self-assembly into PL. With initial FH, we found high PDI values (>0.4). However, post-hydration centrifugation significantly reduced PDI to 0.280. Moreover, extrusion at higher concentrations resulted in further improvement of the monodispersity of the samples and narrow size distribution. For PL prepared at concentration of 0.1% (m/v), extrusion resulted in the narrower size distributions corresponding to PDI values of 0.345, 0.144 and 0.081 for PEG₄₅-PLA₆₉, PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ and PEG₁₁₄-PLA₁₈₀, respectively. Additionally, we demonstrated that copolymers with smaller f resulted in larger PL and, therefore, higher encapsulation efficiency (EE%) for proteins, since larger vesicles enclose larger aqueous volumes.

Keywords: amphiphilic block copolymers; polymeric vesicles; self-aggregated nanostructures; post-film hydration steps

1. Introduction

In the last few years, polymersomes (PL), vesicles composed of amphiphilic-block copolymers, have attracted attention in the pharmaceutical field as versatile nanostructures with colloidal stability, tunable membrane properties and ability to encapsulate a broad range of hydrophilic and hydrophobic drugs including biomacromolecules with therapeutic potential, such as proteins [1]. The use of nanotechnology to deliver biological drugs such as monoclonal antibodies, antibody fragments, peptides, replacement factors, enzymes and vaccines is increasing exponentially. Encapsulation of these active compounds into PL may provide superior benefits in terms of decreasing immunogenicity, increasing biomolecule's half-life and stabilizing these mostly protein-based drugs against denaturation and enzymatic degradation [2]. The spontaneous and reversible organization of amphiphilic molecules

Artigos submetidos

ARTIGO 4-Primeira página/ Preprint

Overcoming the pitfalls of polymersomes as protein delivery systems: a study on L-Asparaginase encapsulation

Elsevier Editorial System(tm) for Colloids
and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Overcoming the pitfalls of polymersomes as protein delivery systems: a study on L-Asparaginase encapsulation

Article Type: Research Paper

Keywords: Self-assembly; L-Asparaginase encapsulation; Amphiphilic block copolymers, polymeric vesicles

Corresponding Author: Professor Carlota Oliveira Rangel-Yagui, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Sao Paulo

First Author: Aleksandra C Apolinário

Order of Authors: Aleksandra C Apolinário; Rafael B Ferraro; Camila A Oliveira; Adalberto Pessoa-Jr; Carlota Oliveira Rangel-Yagui, PhD

Abstract: Polymersomes (PL) arise as versatile nanostructures for protein delivery in the nanomedical field due to hydrophilic core and the stable corona. Herein, we described tips and tricks to obtain and characterize PL aiming at L-Asparaginase (ASNase) encapsulation, an enzyme used to treat acute lymphoblastic leukemia. Polymersomes were prepared by Bottom-up (temperature switch) and top-down (film hydration) methods employing the diblock copolymers poly(ethylene oxide)-poly (lactic acid) (PEG45-PLA69, PEG114-PLA153 and PEG114-PLA180) and the triblock Pluronic® L-121 (poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide), PEG5-PPO68-PEG5). Diluted systems were obtained with PEG-PLA copolymers, but Pluronic® L-121 resulted in polymersomes of 200 nm and an encapsulation efficiency of 5% for ASNase. In spite of literature describing Pluronic® L-121 polymersomes as unstable, we demonstrated that the vesicles were stable over one week at room temperature. For the systems prepared by film hydration, ASNase encapsulation was performed by electroporation but, surprisingly, protein payload was not detected inside the vesicles. We attributed the lack of encapsulation to the Pluronic® L-121 bilayer architecture without defined conformation of the polymeric chains, difficulting the reorganization the hydrophilic block to the pore inner.

Suggested Reviewers: Catarina Reis PhD
professor, Lisboa University of Lisboa
catarinapintoreis@ulusofona.pt
Pharmaceutical Technology, Drug Delivery

Leandro Barbosa
lebarbosa@usp.br
Prof. Leandro has experience with colloidal systems, biophysics,
liposomes and proteins in solutions.

Fenghua Meng PhD
professor, Soochow University
fhmeng@suda.edu.cn

ARTIGO 5-Commentary submetido à revista *Nature Biotechnology*

26/07/2018

Nature Biotechnology

manuscripttrackingsystem

nature
biotechnology[tracking system home](#)[author instructions](#)[reviewer instructions](#)[help](#)[tips](#)[logout](#)[journal home](#)

Manuscript #	NBT-C45589
Current Revision #	0
Submission Date	20th Jul 18
Current Stage	Manuscript under consideration
Title	Why is bioproduction of L-asparaginase such a priority issue for Brazilian scientists?
Manuscript Type	Commentary
Manuscript Comment	<p>SUGGESTED REVIEWERS =====</p> <p>1. Dr. Simon Knott Cedars-Sinai 8700 Beverly Blvd. Steven Spielberg Building, Suite 100 Los Angeles, CA 90048 Phone: 310-423-7664 Email: simon.knott@cshs.org</p> <p>2. Gregory J. Hannon Cancer Research UK Cambridge Institute, University of Cambridge, Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge CB2 0RE, UK Watson School of Biological Sciences, Howard Hughes Medical Institute, Cold Spring Email: hannon@cshi.edu</p> <p>This year Dr. Knott and Hannon, together with other authors, published on the Nature a fundamental study on the promising use of asparaginase to treat the metastasis in a model of breast cancer</p> <p>3. Prof. Francesco Molinari Department of Food and Microbiological Science and Technology University of Milan via Celoria 2 20133 Milan, Italy Tel. +390-2-50319148 Fax. +390-2-50316694 E-mail: francesco.molinari@unimi.it Prof. Francesco Molinari has a 20-year expertise in the field of enzyme activity recovery from yeasts and fungi and is scientist-in-chief of the Laboratory of Fermentation Biotechnologies</p> <p>4. Prof. Giuseppe Battaglia Chair of Molecular Bionics Physical Chemistry Section Department of Chemistry University College London, London WC1H 0AJ, United Kingdom Room 336, 3rd Floor Tel: 020 7679 4688 Email: g.battaglia@ucl.ac.uk He is Professor of Molecular Bionics. His research is focused on the investigation of the specific design rules behind inter/intramolecular interactions and self-assembly of soft matter systems combining synthetic and supramolecular chemistry</p> <p>5. Prof. Ana Lucia Figueiredo Porto Federal Rural University of Pernambuco Department of Morphology and Animal Physiology Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dols Irmãos 52171-900 - Recife, PE - Brazil Phone: +55 81 33206391 Fax: +55 81 21268485 E-mail: analuporto@yahoo.com.br She is scientist-in-chief of the Laboratory of Enzyme Technology of the Federal Rural University of Pernambuco and has a 15-year expertise in various fields, among which liquid-liquid extraction of biomolecules, enzyme production for veterinary and food purposes.</p>

Artigos finalizados

ARTIGO 6-Em correção pelo professor Giuseppe Battaglia**(Refere-se ao Capítulo 4 desta tese)****Rational design for encapsulation of L-asparaginase in polymersomes: are there thumb rules to encapsulate the protein payload?**

Alexsandra Conceição Apolinário^{1*}, Monika S. Magon^{2*}, Cecilia Zorzi Bueno¹
Adalberto Pessoa Jr.¹, Carlota de Oliveira Rangel-Yagui¹ and Giuseppe Battaglia²

¹Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

²Department of Chemistry, University College London, London, United Kingdom.

ARTIGO 7- Será submetido até o dia 10/08/18**QbD-Based Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status
and Review of the Desirable Quality Profiles**

Larissa Pereira Brumano^a; Francisco Vitor Santos da Silva^a; Tales Alexandre Costa Silva^a; **Alexsandra Conceição Apolinário^a**; João Henrique Picado Madalena Santos^{a,b}; Eduardo Krebs Kleingesinds^a; Gisele Monteiro^a; Carlota de Oliveira Rangel Yagui^a; Brahim Benyahia^c; Adalberto Pessoa Junior^a

^aDepartment of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

^bDepartment of Chemistry, CICECO, Aveiro Institute of Materials, University of Aveiro, Aveiro, Portugal.

^cDepartment of Chemical Engineering, Loughborough University, Loughborough LE11 3TU, United Kingdom

**Resumos
apresentados em
congressos**

Poster (Painel)

526-1

SIZE CONTROL OF SELF-AGGREGATED NANOSTRUCTURES FORMED BY POLY(ETHYLENE OXIDE-B-LACTIDE) (PEG-PLA)**Autores:**

Apolinário, A.C.¹, Pachioni-Vasconcelos, J.A.¹, Lopes, A.M.¹, Pessoa Jr., A.¹, Rangel-Yagui, C.O.¹, ¹ USP - DEPARTMENT OF BIOCHEMICAL AND PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, SCHOOL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF SÃO PAULO

Abstract

Amphiphilic Block copolymers (ABC) can self-aggregate in solution leading to a variety of nanostructures, including polymeric micelles and vesicles know as polymersomes (PL). The type of aggregate formed depends on the molecular weight and relative block lengths of the ABC, as well as on preparation techniques. Sonication and extrusion are typical steps employed to decreases size and polydispersity of nanostructured systems. In this work, we evaluated the effect of different preparation protocols on the average size of self-aggregated nanostructures of poly(ethylene oxide-b-lactide) (PEG-PLA). The systems were prepared by polymeric film rehydration. Briefly, PEG-PLA (MW ratio 2000:5000 Da) was dissolved in chloroform at 1 mg.mL⁻¹ and the solvent was evaporated under vacuum at room temperature. The film obtained was rehydrated with PBS pH 7.4 resulting in a system with PEG-PLA at 3.3 mg.mL⁻¹. For film rehydration, two times (2 h or 16 h) and two types (orbital or magnetic) of agitation were studied, followed by sonication in ultrasound bath (20 or 50 min). Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the size of the aggregates; measurements were performed in undiluted samples at 25°C. DLS results, expressed by scattering intensity, showed bimodal distribution (average diameters from 200 nm to 1000 nm) of self-aggregated nanostructures formed under orbital agitation, while monodisperse distributions (average diameter of 370 nm) were observed for nanostructures formed under magnetic agitation. Nonetheless, according to volume and number distribution DLS analyzes, all methods resulted in more than 90% of the aggregates in the range of 200-400 nm. In addition, sonication decreased size of the nanostructures. Therefore, overnight (16h) magnetic agitation followed by 50 min sonication step was considered the best rehydration film protocol for the PEG-PLA. Giving the size of the self-aggregated nanostructures, we believe polymersomes were predominantly formed.

Keywords: amphiphilic copolymer, dynamic scattering light, film rehydration, polymersome, self-aggregation



II Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica – SBBF
12 a 16 de Junho de 2016 – Acarajú, SB

Title: Supramolecular self-assembled systems of poly(ethylene oxide-b-lactide) (PEG-PLA) with different chain lengths

Theme new research, 14, bold

Authors: Apolinário, A.C.1; Pachioni, J.A.1; Pessoa Jr.1, A., Barbosa, L. R. S.2, Rangel-Yagui, C.O.1

Theme new research, 12

Affiliations: 1-Department of Biochemical and Pharmaceutical Technol., School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil. 2-Institute of Physics

Theme new research, 10

Self-assembled polymeric nanostructures, such as polymersomes (PL) and polymeric micelles, has been largely investigated as drug delivery systems. The morphology and drug release profile of nanostructures is often dependent on the length of the hydrophobic and hydrophilic portions of amphiphilic block copolymers used. In this work, we evaluated the effect of different chain length on the size and morphology of poly(ethylene oxide-b-lactide) (PEG-PLA) self-assembled systems. The systems were prepared by polymeric film hydration using the following PEG-PLA copolymers: P1 (MW ratio 2000:5000 Da), P2 (MW ratio 5000:11000 Da) and P3 (MW ratio 5000:13000 Da). For each system, the copolymer was dissolved in chloroform at 1 mg/mL and the solvent was evaporated under vacuum at room temperature. The polymeric film obtained was hydrated with PBS pH 7.4 resulting in a system with PEG-PLA at 3.3 mg/mL. For film hydration, overnight agitation was performed, followed by sonication in ultrasound bath at 50W (50 min). Dynamic light scattering (DLS) was employed to determine the hydrodynamic diameter of the aggregates in undiluted samples at 25°C. The aggregates morphology was observed by transmission electron microscopy (TEM, accelerating voltage of 80 kV), with 5µl of each system placed on a copper grid and coated with a thin carbon film; phosphotungstic acid (1.0 wt %) was used as negative staining. Nanoscale structures were formed from the three PEG-PLA of different MW ratios. DLS analysis showed major nanostructure populations with diameter around 500 nm for P1, 300 nm for P2 and 400 nm for P3, and polydispersity index PDI of 0.7, 0.8 and 0.9 for P1, P2 and P3, respectively. The high PDI values are a characteristic of hydration film method, but also a result of diluted samples. Secondary peaks at 20-50 nm were also observed, what could correspond to smaller polymer aggregates, including polymeric micelles. By TEM images we could see polymersomes with sizes close to the ones found by DLS. For P1, polymeric micelles were also observed. TEM images revealed the increasing of bilayer thickness with the increase in PLA branch. Therefore, our study indicates that the three copolymers were able to produce polymeric vesicles and smaller PEG:PLA ratios result in larger diameter. Additionally, the MW of the PLA branch is correlated to bilayer thickness, what in turn can influence encapsulated drug release.

Acknowledgments: This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant 2013/08617-7 (Thematic Project) and 2014/10456-4 (Apolinário, A.C. fellowship). The authors are grateful to Corrosion Laboratory from Polytechnic School of the University of São Paulo



Development and Characterization of Polymersomes for Encapsulation of L-Asparaginase

APOLINÁRIO, A. C.¹; PESSOA-JR, A.¹; RANGEL-YAGUI, C. O.¹

¹School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract: L-asparaginase (ASNase) is one of the main chemotherapeutic agents for the therapy of acute lymphoblastic leukemia (ALL). The use of nanosystems aiming the delivery of this protein is an approach to avoid its immediate immunogenic effects and to increase half-life. In this sense, an interesting strategy for protein drug delivery are the polymersomes (PL), vesicles formed from amphiphilic block copolymers. In this work, we prepared PL of poly (ethylene glycol)-poly (lactic acid) (PEG₄₅-PLA₆₉, PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ and PEG₁₁₄-PLA₁₈₀) by polymeric film hydration (FH) to encapsulate L-asparaginase. Briefly, PEG-PLA copolymers were dissolved in chloroform at 1 mg mL⁻¹ and the solvent was evaporated under vacuum at room temperature. The film obtained was hydrated with PBS pH 7.4 resulting in systems with PEG-PLA at 0.03 % and 0.1 % (m/v). Pluronic L-121 (PEO₅-PPO₆₈-PEO₅) was also investigated at 0.5% (m/v), but for this triblock copolymer, we employed the temperature switch method, through Pluronic L-121 dissolution at 4 °C in the presence of L-asparaginase. Dynamic Light Scattering (DLS) allowed to determine the size of the PL. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the PL morphology by, accelerating voltage of 80 kV). For PEG-PLA with initial FH, we found high polydispersity index values (PDI > 0.4). Nonetheless, post hydration techniques such as centrifugation and extrusion led to narrower size distributions corresponding to PDI values of 0.345, 0.144 and 0.081 for PEG₄₅-PLA₆₉, PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ and PEG₁₁₄-PLA₁₈₀, respectively and nearly 0.1 for Pluronic L-121 vesicles. Regarding the ASNase encapsulation, we determined encapsulation efficiency by indirect method and obtained 25 (± 4), 14.65 (± 0.09) and 7.88 for PEG₄₅-PLA₆₉, PEG₁₁₄-PLA₁₅₃ and PEG₁₁₄-PLA₁₈₀, respectively. For Pluronic L-121, vesicles presented hydrodynamic diameter of 100 nm and PDI values without extrusion were approximately 0.1; ASNase encapsulation efficiency was close to 5%. The main challenges to obtain PL and to encapsulate ASNase are related to the vesicles production and the control of size and PDI.

This work is supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant (Projeto Temático) 2013/08617-7 and 2014/10456-4.

ANEXOS

Faculdade de Ciências Farmacêuticas**ATESTADO**

Atestamos, para os devidos fins que, até o dia 18/07/2018, o(a) senhor(a) Alexandra Conceição Apolinário, de número USP 8855544, cursou a(s) disciplina(s) abaixo na qualidade de aluno(a) regular do programa de pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, área de concentração Tecnologia Químico-Farmacêutica.

Disciplina: Tecnologias de Caracterização de Sistemas Nanoestruturados

Sigla: FBF5813-1/1 **Carga Horária:** 90 **Conceito:** A **Frequência:** 100 **Créditos:** 6

Início: 04/09/2014 **Término:** 15/10/2014

Disciplina: Atualização em Ciências Farmacêuticas

Sigla: FBA5754-1/2 **Carga Horária:** 30 **Conceito:** A **Frequência:** 100 **Créditos:** 2

Início: 20/10/2014 **Término:** 26/10/2014

Disciplina: Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas

Sigla: FBF5805-1/3 **Carga Horária:** 45 **Conceito:** A **Frequência:** 100 **Créditos:** 3

Início: 24/09/2014 **Término:** 28/10/2014

Disciplina: Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Sigla: FBT5700-3/2 **Carga Horária:** 90 **Conceito:** A **Frequência:** 100 **Créditos:** 6

Início: 08/05/2015 **Término:** 09/07/2015

Documento emitido às 07:18:23 horas do dia 18/07/2018 (hora e data de Brasília).

Código de controle: C7MK - G1P1 - 1MIX - T5FH

Código de controle válido até: 18/07/2019

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Aluno: Alexsandra Conceição Apolinário, número USP 8855544

Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Disciplina: Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III

Sigla: FBT5738-1/2 **Carga Horária:** 30 **Conceito:** A **Frequência:** 100 **Créditos:** 2

Início: 03/08/2015 **Término:** 19/10/2015

Disciplina: Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II

Sigla: FBT5776-5/3 **Carga Horária:** 30 **Conceito:** A **Frequência:** 100 **Créditos:** 2

Início: 17/10/2016 **Término:** 30/10/2016

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo:
<http://uspdigital.usp.br/webdoc>

Documento emitido às 07:18:23 horas do dia 18/07/2018 (hora e data de Brasília).

Código de controle: C7MK - G1P1 - 1MIX - T5FH

Código de controle válido até: 18/07/2019

Página 2 de 2