

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Natália Santos do Nascimento

Avaliação da penetração/permeação cutânea da catalase livre,
nanoencapsulada e peguilada visando a um efeito antioxidante

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Natália Santos do Nascimento

Avaliação da penetração/permeação cutânea da catalase livre,
nanoencapsulada e peguilada visando um efeito antioxidante

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre;
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo; Área de Tecnologia
Bioquímica-Farmacêutica;

Orientadora: Prof. Dra. Carlota de Oliveira Rangel
Yagui

Coorientador: Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meioconvencional 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

Nascimento, Natália

N244a Avaliação da penetração/permeação cutânea da catalase livre, nanoencapsulada e peguilada visando efeito antioxidante / Natália Nascimento. - São Paulo, 2023.
83 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Rangel-Yagui, Carlota
Coorientador: Baby, André

1. Biotecnologia Farmacêutica. 2. Efeito antioxidante. 3. Peguilação. 4. Polimerossomas. 5. Catalase. I. T. II. Rangel-Yagui, Carlota, orientador. III. Baby, André, coorientador.

Natália Santos do Nascimento

Avaliação da penetração/permeação cutânea da catalase livre, nanoencapsulada e peguilada visando um efeito antioxidante; Dissertação para obtenção do Título de Mestre; Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; Área de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

Orientadora/Presidente

1 ° examinador

2 ° examinador

3 ° examinador

São Paulo. ____ de _____ de 2023.

“O passado é história,
o futuro é mistério,
e hoje é uma dádiva...”

(Provérbio Chinês)

Viva o agora, meça suas conquistas em nanômetros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela dádiva da vida e por permitir que tudo ocorresse em seu tempo. Aos espíritos de luz que não me abandonaram em nenhum momento nessa minha jornada longe do meu aconchego e por toda proteção.

Agradeço aos meus pais Ransés Xavier do Nascimento e Ana Kárite Santos do Nascimento, assim como à minha irmã Gabriela Santos do Nascimento por todo o apoio proporcionados todos esses anos, distantes fisicamente, na maior parte do tempo. Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço à Prof^a. Dra. Carlota Rangel pelo acolhimento e pela oportunidade que vem me dando desde 2019 de fazer parte da família do Laboratório de Nanobiotecnologia – NanoBio. Sem a sua orientação, empatia e atenção não seria possível ter finalizado este trabalho.

Agradeço ao Prof^o. Dr. André Rolim Baby pelo acolhimento e auxílio na compreensão de diferentes experimentos e situações no decorrer deste trabalho.

Agradeço ao Prof^o. Dr. Adalberto Pessoa Junior, e ao Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, pelo apoio estrutural e analítico durante a realização dos experimentos de purificação das formulações estudadas.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Iolanda Midea Cuccovia, e ao Laboratório de Sistemas Biomiméticos, pelo apoio estrutural durante a realização dos experimentos de caracterização das formulações estudadas.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Luciana Biagini Lopes e sua aluna de pós-doutorado Dr^a. Regina Gomes Daré por todo o apoio estrutural e analítico durante a realização dos experimentos de difusão. Agradeço por toda simpatia, paciência e ensinamentos passados.

Agradeço aos técnicos de laboratório Larissa e Gledson pelo apoio e paciência durante todo este tempo.

Agradeço aqueles que, graças ao NanoBio, tenho o privilégio de chamar de amigos: Amanda, Gustavo, Rafael, Javier, Karin, João, Felipe, Jhenifer, Alison. Sem vocês essa caminhada teria sido muito mais difícil.

Agradeço aos meus amigos da vida: Marina, Larissa, Rafael Xavier, Rayanelle, Raniele, Ana Beatriz, Anne Justino, Gabriela Ribeiro, Tais, e muitos outros, pois sem vocês, a vida seria muito monótona, e o que é realmente importante, passaria despercebido pelos meus olhos.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo financiamento do projeto.

Agradeço por último a mim mesma por não ter desistido de continuar a realizar o nosso sonho de infância de trabalhar com a nanotecnologia. A mudança que estamos enfrentando nos últimos tempos não foi fácil, mas está valendo a pena.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Envelhecimento Cutâneo.....	13
2.2 Radiação Solar.....	17
2.3 Estresse Oxidativo	19
2.4 Peróxido de Hidrogênio	21
2.5 Catalase.....	22
2.6 Sistemas de Liberação de Fármacos e Polímeros Terapêuticos	26
2.6.1 Polimerossomas.....	27
2.6.2 Peguilação.....	29
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Material.....	31
4.2 Métodos.....	31
4.2.1 Análise <i>in silico</i> da estrutura da catalase de <i>A. niger</i>	31
4.2.2. Atividade enzimática	32
4.2.3 Purificação da catalase por ultrafiltração	33
4.2.4. Eletroforese em gel (SDS-PAGE)	34
4.2.5. Precipitação Induzida por <i>salting out</i>	35
4.2.6. Determinação da concentração de proteínas	36
4.2.7. Nanoencapsulação da catalase em polimerossomas	37
4.2.7.1. Cálculo da Eficiência de Encapsulação pelo método Indireto	38
4.2.7.2. Cálculo da Eficiência de Encapsulação pelo método Direto	38
4.2.8. Espalhamento Dinâmico de Luz	39
4.2.9. Peguilação	39
4.2.10. Estudos de penetração/permeação cutânea.....	41
4.2.11. Análises Estatísticas	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Análise <i>in silico</i> da estrutura da catalase de <i>A. niger</i>	43
5.2. Precipitação Induzida ou <i>Salting Out</i>	46
5.3 Nanoencapsulação da catalase em Polimerossomas.....	54
5.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	56
5.5 Peguilação	60
5.6. Estudos de penetração cutânea	66

6. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	72

RESUMO

O estresse oxidativo é um dos principais fatores associados ao processo de envelhecimento, com o desenvolvimento de patologias e alterações estéticas. A maioria dos organismos que vivem em aerobiose apresenta mecanismos naturais contra o excesso de radicais livres reduzindo o estresse oxidativo. Esses mecanismos envolvem enzimas responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio como a catalase, assim sendo, a administração tópica dessa enzima se torna atrativa para evitar o envelhecimento cutâneo. Contudo, por se tratar de uma biomolécula, a catalase é propensa à degradação e conseqüentemente apresenta baixa meia-vida. Ademais, sua penetração na pele pode ser dificultada devido ao tamanho e hidrofobicidade. Neste trabalho estudamos a utilização de métodos que permitem aumento da estabilidade da catalase a longo prazo e/ou de sua penetração através da pele, sendo, então, capaz de promover aumento da eficácia. Os métodos estudados foram a encapsulação da catalase em polimerossomas de Pluronic® L121 (PEO₅-PPO₆₂-PEO₅) e a peguilação da enzima. A enzima de grau alimentício obtida comercialmente foi purificada por precipitação induzida por sulfato de amônio com um rendimento de 128% em atividade enzimática e fator de purificação de 10,5. Os polimerossomas contendo a enzima apresentaram um diâmetro de partícula de 388 ± 221 nm, e PDI de $0,480 \pm 0,23$, com EE% de $2,3 \% \pm 0,9 \%$. A enzima foi peguilada com PEG de 20 e 40 kDa, com rendimentos de $52\% \pm 5\%$, e $44\% \pm 12\%$, respectivamente. Ensaio de difusão em células de Franz foram realizados com enzima peguilada (PEG-CAT), nanoencapsulada (PL-CAT) e livre (CAT) visando observar a manutenção de sua atividade e a capacidade de penetração/permeação na pele. A formulação PEG-CAT 20 kDa demonstrou valores superiores de atividade em relação a PL-CAT no estrato córneo. Já no contexto geral (estrato córneo, epiderme viável e permeado), PL-CAT promoveu atividade da enzima nas três camadas analisadas de forma uniforme. Ambas as formulações permearam todas as camadas da pele incrementando a atividade da enzima nativa no permeado. A formulação PEG-CAT se demonstrou promissora para utilização tópica, enquanto a formulação PL-CAT demonstrou maiores vantagens visando um delivery transdérmico.

Palavras-chave: Efeito antioxidante; Peguilação; Polimerossomas; Catalase.

ABSTRACT

Oxidative stress is one of the main factors associated with ageing process, with the development of pathologies and aesthetic changes. Most aerobic organisms have natural mechanisms against excess free radicals, reducing oxidative stress. These mechanisms involve enzymes responsible for neutralizing reactive species of oxygen, such as catalase, and its topical administration becomes attractive to prevent skin aging. However, as a biomolecule catalase is prone to degradation and therefore has a low half-life. In addition, its penetration into skin may be difficult due to the large size and hydrophilicity. Thus, in this work we investigated methods that allow increased long-term stability of catalase and/or its penetration through the skin, aiming at increased effectiveness. The methods studied were catalase encapsulation into Pluronic® L121 (PEO₅-PPO₆₂-PEO₅) polymerosomes and enzyme pegylation. The commercially obtained food grade enzyme was purified by induced precipitation by ammonium sulfate, with a yield of 128% in enzymatic activity and purification factor of 10.5. The catalase loaded polymerosomes presented particle diameter of 388 ± 221 nm, and PDI of 0.480 ± 0.23 , with EE% of $2.3\% \pm 0.9\%$. The enzyme was pegylated with 20 and 40 kDa PEGs, with yields of $52\% \pm 5\%$, and $44\% \pm 12\%$, respectively. Diffusion tests in Franz cells were carried out with the pegylated (PEG-CAT), the nanoencapsulated (PL-CAT) and the free enzyme (CAT) to investigate the activity and skin penetration/permeation. The PEG-CAT 20 kDa demonstrated higher values of activity in the *stratum corneum* compared to PL-CAT. However, the PL-CAT promoted enzyme activity in all layers uniformly. Both formulations permeated all skin layers and increased the activity of the native enzyme in the permeate. PEG-CAT formulation has been worthwhile to topical use, while PL-CAT formulation has showed advantages for transdermal delivery.

Keywords: Antioxidant effect; Pegylation; Polymerosomes; Catalase.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A pele é o maior órgão do ser humano, é composta por diferentes tipos de células as quais atuam como barreira física impedindo a entrada de microrganismos e materiais estranhos (TOBIN, 2017; ZIMMERMAN; BAI; GINTY, 2014). Além disso, a pele está exposta ao ambiente externo diariamente e à radiação ultravioleta solar que se destaca como fator chave em relação ao desenvolvimento do envelhecimento cutâneo – fotoenvelhecimento, e carcinogênese (LAN, 2019; WATSON et al., 2014).

O câncer de pele é considerado um problema de saúde pública visto que um a cada três diagnósticos de câncer no mundo consiste em câncer de pele (WHO, 2017). Em 2020, o câncer de pele tipo não-melanoma foi o terceiro maior incidente no mundo em homens, o segundo maior nas Américas e o terceiro na África do Sul em mulheres. Além de ser o número 1 em incidência na Oceania e o 3º maior na Europa. No mundo, em ambos os sexos, houve aproximadamente novos 324,6 mil casos de melanoma, enquanto o câncer de pele não-melanoma atingiu cerca de 1198,1 mil pessoas (FERLAY et al., 2021). É estimado que no ano de 2023, nos EUA, 97.610 mil novos casos de melanoma apareçam, enquanto 7.320 mil novos casos de não-melanoma apareçam. Em relação a mortalidade, é esperado que ocorram cerca de 12.470 mil mortes por ambos os tipos de câncer de pele nos EUA (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). No Brasil, entre 2023 e 2025, devem se registrar 704 mil novos casos de câncer, especialmente na região sul e sudeste, com 70% de incidência. O câncer mais incidente no país é o de pele não melanoma 31,3% do total de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Assim como as neoplasias, o envelhecimento cutâneo pode ser derivado de diversos fatores que podem ser divididos em dois grupos: intrínsecos e extrínsecos. A exposição prolongada e desprotegida à radiação solar é uma das principais causas da pele fotoenvelhecida em indivíduos de todas as idades (BERNEBURG; PLETTENBERG; KRUTMANN, 2000). Os fatores extrínsecos causam o fotoenvelhecimento a partir da indução de respostas celulares diversas, algumas delas mediadas por espécies reativas responsáveis pelo estresse oxidativo, danos celulares, mutações, carcinogênese e danos ao material genético, resultando em diferentes patologias (BENNET; KIM, 2015; BICKERS; ATHAR, 2006; BRASH et al., 1991). Sendo assim, pesquisar alternativas para combater o estresse oxidativo é de extrema importância e as enzimas se apresentam como uma alternativa promissora.

A incorporação de enzimas no dia a dia e nos setores industriais vem avançando desde o final do século passado (FAITH; NEUBECK; REESE, 1971), sendo estas utilizadas amplamente nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica (BASSO; SERBAN, 2019). A enzima catalase é um exemplo de biomolécula aplicada em diferentes setores industriais como o de alimentos (RAVEENDRAN et al., 2018), além de também ser utilizada em processos de biorremediação (KAUSHAL et al., 2018). A catalase é produzida por organismos aeróbicos a qual é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em água e oxigênio (AEBI, 1974). Normalmente, é produzida em escala industrial por microrganismos como *Aspergillus niger* ou extraída do fígado bovino (GROMADA; FIEDUREK, 1997; RAVEENDRAN et al., 2018).

Em relação ao estresse oxidativo, a enzima catalase apresenta um papel importante na resposta ao excesso de radicais livres (IZAWA; INOUE; KIMURA,

1996). Em mamíferos, é encontrada em grandes quantidades no fígado, rins e sangue (PERCY, 1983; RUIS, 1979), mas também na pele (CHEN et al., 2004; SYED; MUKHTAR, 2012). A partir disto, é válido o estudo da utilização dessa enzima para proteção da pele dos efeitos da radiação solar e prevenção dos danos ocasionados pelo excesso de radicais livres e consequente estresse oxidativo.

Contudo, por ser uma biomolécula, a catalase pode ser facilmente degradada em condições extremas de pH e temperatura na presença de solventes orgânicos e de fluidos biológicos que apresentem proteases em suas composições, por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de veículos que tornem possível a proteção de sua estrutura e, conseqüentemente, atividade. Sendo assim, métodos de bioconjugação e incorporação em nanoestrutura poderiam ser alternativas para o emprego da catalase como agente antienvhecimento cutâneo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

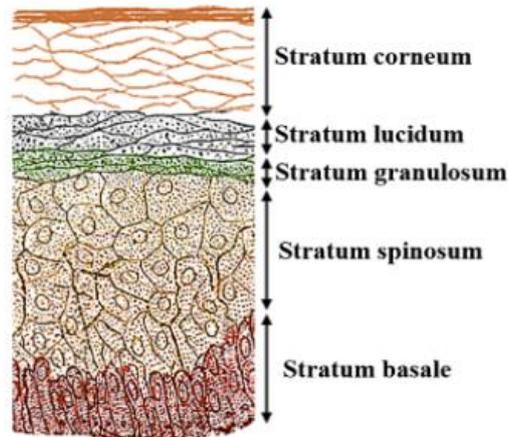
2.1 Envelhecimento Cutâneo

O processo de envelhecimento atinge quase todos os organismos vivos, nos seres humanos é um processo dinâmico e progressivo em que ocorrem mudanças morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas (EIDT, 2018). Apresenta dois fenótipos característicos de acordo com os fatores proeminentes responsáveis pelo seu desenvolvimento. O envelhecimento intrínseco é caracterizado por um desenvolvimento mais gradual de acordo com o avanço da idade e etnias, ou seja, o envelhecimento pré-programado no organismo,

progredindo pela passagem natural do tempo (FRANCO; AVELEIRA; CAVADAS, 2022; TOBIN, 2017). Enquanto esse tipo de envelhecimento está correlacionado à diminuição da síntese e o aumento da degradação de colágeno não funcional, o que prejudica a integridade do tecido, o envelhecimento extrínseco é ocasionado pela superexpressão enzimas proteolíticas de colágeno e elastina, derivando os sinais de elastose solar que é típico deste segundo tipo de envelhecimento, ocorrendo um processo mais intenso nos componentes estruturais da pele (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; PAPACCIO et al., 2022; TOBIN, 2017). Ambos são influenciados pela presença de radicais livres e, conseqüente, estresse oxidativo (POLJŠAK; DAHMANE, 2012; POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012).

A pele corresponde a 16% do peso total do nosso corpo, é composta por duas grandes camadas: epiderme e derme. A primeira camada, epiderme, apresenta melanócitos, células de Langerhans (NORDLUND, 2007) e queratinócitos (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010). Os melanócitos se encontram na camada basal da epiderme e são os que determinam a cor da pele e apresentam capacidade de fotoproteção. As células de Langerhans, por sua vez, se encontram espalhadas por toda a epiderme, sendo responsáveis pela apresentação de antígenos (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014). Diferentes subcamadas da epiderme podem ser observadas de acordo com a movimentação e desenvolvimento dos queratinócitos, desde a base da epiderme até seu ápice (KHAVKIN; ELLIS, 2011), de acordo com a Figura 1.

Figura 1: Ilustração das camadas da epiderme.



Fonte: NAFISI, MAIBACH, 2018, ADAPTADO.

O *stratum corneum* é a camada mais externa da epiderme, estando em contato direto com o ambiente, tem como função primária a proteção contra agentes externos ao nosso organismo. É composto por corneócitos, corpos lamelares e enzimas responsáveis pela manutenção da homeostase da camada e sua constante renovação (ELIAS, 2005; VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010). Essa camada confere alta impermeabilidade à pele, devido à presença de compostos hidrofóbicos – ceramidas, colesterol, ácidos graxos e queratina (CAON, 2016; HONARI; MAIBACH, 2014; NAFISI; MAIBACH, 2018). O *stratum lucidum* é uma camada de transição entre a camada superior (*S. corneum*) e a camada inferior (*S. granulosum*), é responsável por conter as células de Malpighi que exocitam corpos lamelares essenciais para manutenção da função primária da pele (NORLÉN, 2001; PROCHAZKOVA et al., 2015). O *stratum granulosum* possui células organizadas com junções de oclusão responsáveis pela formação correta do *S. corneum* e sua função física (SUGAWARA et al., 2013). Além disso, essas junções também são responsáveis por impedir a entrada de patógenos e

a perda de eletrólitos, permitindo a passagem de substâncias de tamanhos intermediários (332 Da) à macromoléculas (4 – 40 kDa) (BRANDNER; SCHULZKE, 2015; DE BENEDETTO et al., 2011; KIRSCHNER et al., 2011). Essa camada contém grânulos de proteínas que reticulam a queratina no interior das células (PROCHAZKOVA et al., 2015).

O *Stratum spinosum* é uma grossa camada de células poligonais com a queratina pré-formada, além disso, nessa camada os desmossomos são formados e aqui se encontram células de Langherhans (NAFISI; MAIBACH, 2018; THAKUR et al., 2009). A camada mais interna é o *Stratum basale* que contém as células-tronco as quais dão origem a todas as outras células presentes nas camadas superiores (PROCHAZKOVA et al., 2015).

Alterações na pele podem afetar diretamente a autoestima e o bem-estar psicológico de indivíduos na sociedade. Portanto, compreender as modificações morfológicas que ocorrem de acordo com o envelhecimento é essencial para o desenvolvimento de terapias que possam revertê-lo (FERNANDEZ-FLORES; SAEB-LIMA, 2019).

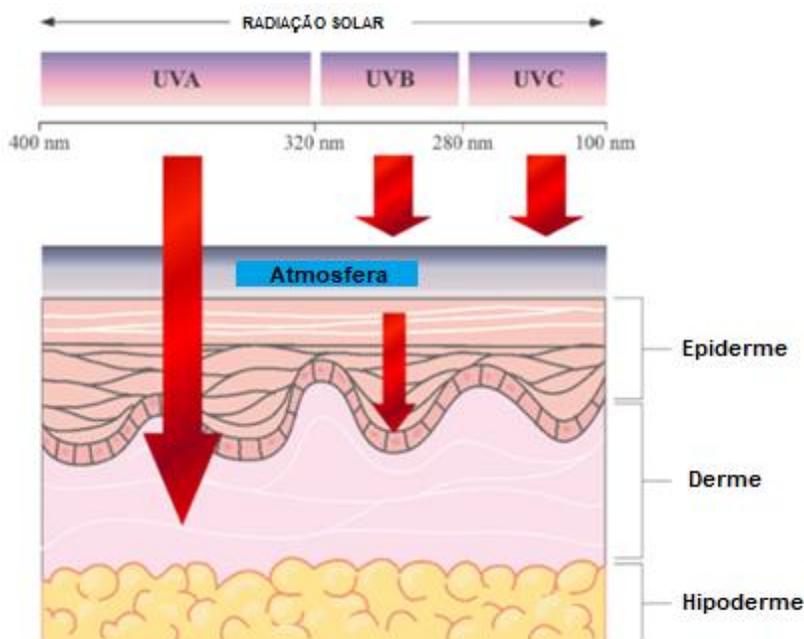
De acordo com a literatura, a radiação solar ultravioleta (UV), poluição ambiental e materiais particulados, são responsáveis pelos sinais mais marcantes refletidos na aparência física (BURKE, 2018; PASSERON; PICARDO, 2018; SCHIKOWSKI; HÜLS, 2020). Elucidar os mecanismos por trás do envelhecimento cutâneo é essencial para o desenvolvimento de terapias de reversão efetivas (FERNANDEZ-FLORES; SAEB-LIMA, 2019).

2.2 Radiação Solar

A radiação solar é composta pelo infravermelho (IV), espectro visível (VIS) e ultravioleta (UV), sendo o VIS 50% de toda a radiação solar que atinge a superfície terrestre. O UV compreende aproximadamente 5% da radiação solar na superfície terrestre, apresenta comprimentos de onda entre 100 – 400 nm (AUSTIN et al., 2021) dividida em três tipos: radiação ultravioleta A (UVA), radiação ultravioleta B (UVB) e radiação ultravioleta C (UVC). A radiação UVA engloba os comprimentos de onda 315 – 400 nm, a UVB 280 – 315 nm, UVC 100 – 280 nm (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Seu alcance nas camadas atmosféricas e na pele humana pode ser observado na Figura 2.

A radiação solar auxilia a produção de vitamina D no nosso organismo e a manutenção da homeostase (HOLMES; RODNEY HARRIS; LUCAS, 2019), além de induzir a produção de β -endorfina nos queratinócitos da pele (JUSSILA et al., 2016) e controlar o ciclo circadiano (GEHRING; ROSBASH, 2003). Contudo, a exposição prolongada, em conjunto com a localização geográfica, infere diretamente no maior risco de desenvolvimento de patologias como neoplasias, especialmente em pessoas de pele mais clara (QURESHI et al., 2008). No Brasil, isso não é diferente, pesquisas demonstram que a depender da região do país e da estação do ano, há uma diferença considerável entre os números de casos de câncer de pele, sendo mais comum nas regiões sul e sudeste, em relação às regiões centro, norte e nordeste (CORRÊA; DUBUISSON; PLANA-FATTORI, 2003). Isso ocorre mesmo com a diferença de conteúdo de ozônio na superfície terrestre, a depender da latitude, sendo menor quanto mais próximo da região equatorial, e maior com a proximidade dos polos (CORRÊA, 2015; D'ORAZIO et al., 2013).

Figura 2: Tipos de radiação ultravioleta (UV) solar e seu poder de penetração nas camadas estratosféricas e da pele. Sendo, UVC, raios ultravioleta C, UVB, raios ultravioletas B, UVA, raios ultravioleta A.



Fonte: PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2018. Tradução da autora.

O processo de fotoenvelhecimento está correlacionado a mecanismos moleculares e à produção de biomoléculas como citocinas pró-inflamatórias, ativando fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento de tumores, inflamação e fibrose (BERNEBURG; PLETTENBERG; KRUTMANN, 2000; FISHER et al., 2002; HUANG et al., 2019). Não obstante, após a exposição à radiação UV é comum ocorrer o influxo de neutrófilos para a pele, também causando inflamação (ZAWROTNIAK; BARTNICKA; RAPALA-KOZIK, 2019).

Pode-se observar na Figura 2, que a radiação UVA está numa região do espectro de baixa energia, porém é mais abundante e tem maior capacidade de ultrapassar a camada de ozônio e penetrar nas camadas profundas da pele

humana (BATTIE et al., 2014). Após a exposição à radiação UVA, foi observada a alta expressão de ferritina nas camadas basais e suprabasais de queratinócitos na derme, indicando a indução de estresse oxidativo (BATTIE et al., 2014; BIOIONZV et al., 1998). Essas e outras pesquisas indicam que, mesmo que a radiação UVB comumente seja considerada a maior responsável pelo fotoenvelhecimento, a radiação UVA também é responsável pelos processos de eritema, elastose e câncer de pele (AUL; STRICKLAND, 1986; LAN et al., 2019; SITUM et al., 2010). Além disso, mesmo em casos de utilização de filtros solares, o processo de fotoenvelhecimento e o aparecimento de rugas pode ser observado (LAN et al., 2019).

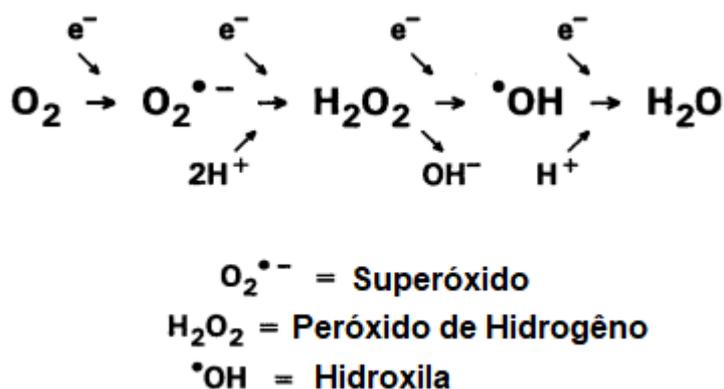
A radiação UVB compõe cerca de 10% de toda a radiação solar que chega à superfície terrestre (BLACK, 2014). Apesar de compor em menor escala o total da radiação solar na superfície terrestre, em comparação à UVA, a radiação UVB apresenta maior capacidade de penetração nas camadas da pele, a qual é responsável por iniciar e promover a formação de tumores na pele (D'ORAZIO et al., 2013; WILLIS; MENTER; WHYTE, 1981). Ela é absorvida pelas moléculas de DNA, causando a formação de fotoprodutos como dímeros de ciclobutano (D'ORAZIO et al., 2013).

2.3 Estresse Oxidativo

Organismos aeróbios utilizam processos oxidativos para geração de energia necessária para manutenção de seu funcionamento. Contudo, mesmo o oxigênio sendo vital para a conservação das espécies, ele também é considerado potencialmente prejudicial (DAVIES, 1995; SEN, 2001; SIES, 1997,

2015). Na Figura 3, observa-se os diferentes intermediários que podem ser produzidos a partir de uma molécula de oxigênio.

Figura 3: Via univalente não-enzimática da redução do Oxigênio (O₂).



Fonte: DAVIES, 2015. Tradução da autora.

Os íons superóxido, hidroxila e a molécula de peróxido de hidrogênio são exemplos de espécies reativas de oxigênio que são naturalmente produzidas por todas as células aeróbicas e apresentam a capacidade de induzir danos oxidativos nos organismos (LIGUORI et al., 2012; SEN, 2001).

Em 1985, Helmut Sies escreveu o livro “*Oxidative Stress*”, em seu primeiro capítulo são discutidas as espécies reativas de oxigênio (pró-oxidantes), antioxidantes e a natureza do dano oxidativo (SIES, 1985, 2015). A partir desta publicação e da compreensão da interação entre as substâncias pró-oxidantes e antioxidante, o conceito de estresse oxidativo pôde ser elucidado. Esse processo ocorre quando há um desbalanço entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e as antioxidantes, no qual as EROS se apresentam em maior quantidade (SIES, 1985, 2015), ocasionando desenvolvimento de patologias e o

processo de envelhecimento (LIGUORI et al., 2012; POLJŠAK; DAHMANE, 2012).

2.4 Peróxido de Hidrogênio

A pele, por se tratar de um órgão externo e extenso, apresenta mecanismos de defesa contra estressores externos como a radiação UV. A pele possui melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina quando expostas à radiação UV (NORDLUND, 2007) e a síntese de melanina gera como subprodutos espécies reativas de oxigênio, em especial o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KARG et al., 1993; URABE et al., 1994). Além disso, este também é produzido por fibroblastos após a exposição à radiação UV (MASAKI; ATSUMI; SAKURAI, 1995)

O H_2O_2 é apresentado como o principal regulador de óxido-redução em atividades biológicas em concentrações nanomolares e um importante agente sinalizador celular, o qual é ativado por agentes estressores como quimiocinas e estressores físicos (SIES; JONES, 2020). Tem capacidade de se difundir por células e tecidos para realizar seus efeitos tais como mudanças na estrutura celular, proliferação e recrutamento de células imunes (SIES, 2017) Apesar do H_2O_2 não ser caracterizado como um radical livre, é uma molécula com alto poder oxidante (SEN, 2001) e vem sendo apontado como intermediário tóxico no desenvolvimento de diversas doenças, como por exemplo Parkinson (ZARKOVIC, 2020) e Alzheimer (YIN et al., 2016). Nesse caso, os astrócitos transmitem sinais inflamatórios via H_2O_2 e assim que o microambiente se torna cronicamente inflamado, hipoteticamente, leva à neurodegeneração. Grandes quantidades de H_2O_2 em células pancreáticas, por deficiência da enzima

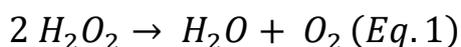
catalase, aumentam os riscos do desenvolvimento de diabetes (TAKEMOTO et al., 2009) e de catarata em diabéticos (ÖZMEN et al., 2002). Além disso, o H_2O_2 está relacionado ao desenvolvimento de doenças autoimunes da pele (JANKOVSKAJA et al., 2020). O H_2O_2 induz apoptose em fibroblastos (SUGANO; ITO; MURAI, 1999) e a oxidação das moléculas de ACTH epidérmico (a-MSH e b-endorfina) a partir da oxidação da metionina, que podem afetar a pigmentação da pele (SPENCER et al., 2007); além disso, encontra-se acumulado numa faixa de 10^{-3} M na epiderme em pacientes com vitiligo (SCHALLREUTER et al., 2004).

Para evitar que o organismo chegue ao estresse oxidativo, existem diferentes proteínas como enzimas antioxidantes naturais que regulam os níveis celulares não apenas do H_2O_2 , mas também de outras espécies reativas. Na pele, pode-se citar glutathiona, vitamina C, vitamina E, glutathiona redutase, glutathiona S-transferase, quinona redutase, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase (BICKERS; ATHAR, 2006; HEKIMI; LAPOINTE; WEN, 2011; MILTON, 1999; POLJŠAK; DAHMANE, 2012; SIES, 2017; VALKO et al., 2007; ZEIDA et al., 2019).

2.5 Catalase

Diferentes enzimas apresentam a capacidade de catalisar a reação de decomposição do H_2O_2 , como peroxirredoxinas (PRX) e a glutathiona peroxidase (GPX), que apresentam alta afinidade ao peróxido de hidrogênio (SENA; CHANDEL, 2012). Porém, a GPX é responsável pela eliminação de apenas 17% do H_2O_2 presente em eritrócitos humanos, sendo o restante removido pela catalase (GAETANI et al., 1996). A catalase apresenta alta eficiência em

catalisar a conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 (GOYAL; BASAK, 2010; ZEIDA et al., 2019). Abaixo são apresentadas as equações químicas envolvidas na degradação de H_2O_2 pela catalase, sendo a Equação 1, a equação geral da reação catalisada pela enzima e as Equações 2 e 3, os estágios 1 e 2 da reação, respectivamente (NICHOLLS; FITA; LOEWEN, 2001).

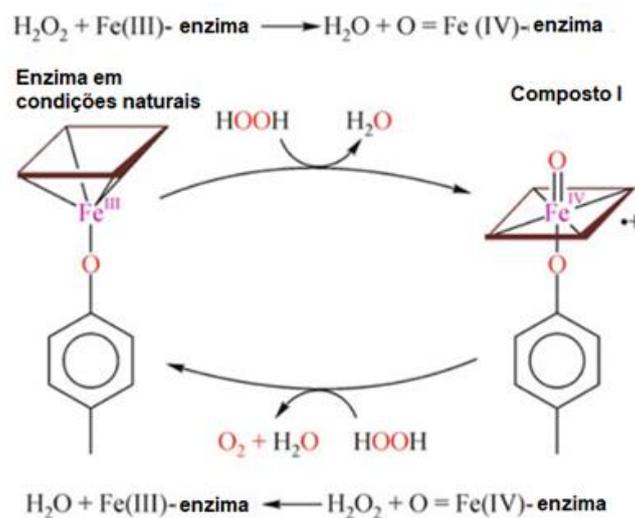


Em que: CAT = catalase, Comp. I = composto intermediário I.

Com auxílio da Figura 4, é possível compreender a atividade da enzima. A catálise ocorre quando o H_2O_2 entra em contato com o sítio ativo da enzima. O grupamento heme Fe^{III+} reduz a molécula de peróxido de hidrogênio a água e resulta na formação do composto intermediário I (Comp. I). Esse é uma espécie de oxiferril, $Fe^{IV+=O}$, apresentando uma porfirina catiônica resultante da redução de uma molécula de H_2O_2 . Na segunda etapa da reação, o Comp. I é reduzido pela segunda molécula de H_2O_2 resultando na enzima livre, liberando O_2 e o oxigênio ferril como água (NANDI et al., 2019; PUTNAM et al., 2000). Estudos cinéticos indicam que assim que o Comp. I é formado, a segunda etapa ocorre depressa a partir da reação com H_2O_2 . Ela ocorre muito mais rápido em

comparação às outras enzimas que possuem o grupo heme (cloroperoxidase, mioglobina etc.) (ZEIDA et al., 2019). Esse processo é capaz de decompor aproximadamente 10^7 moléculas por segundo sem gerar radicais livres (GOYAL; BASAK, 2010; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Algumas catalases ainda podem estar ligadas ao NADPH – a humana por exemplo, para que este funcione como redutor, evitando o estado oxidado da enzima (PUTNAM et al., 2000).

Figura 4: Representação do sítio ativo da enzima antes e durante a catálise da reação.



Fonte: GOYAL, BASAK, 2010. Tradução da autora.

A catalase é uma oxirredutase encontrada na maioria dos organismos aeróbios. Suas isoformas normalmente são tetraméricas, compostas por subunidades de massa molecular aproximada de 60 kDa, contendo um grupamento heme como grupo prostético (NANDI et al., 2019; VAINSHTEIN et al., 1981).

Na pele, a catalase é superexpressa e aumentada em um ambiente rico em O₂, especialmente na epiderme. O mais interessante é que a enzima é presente nas células viáveis da derme e epiderme, mas também na parte mais superficial da pele, o *stratum corneum* (HELLEMANS et al., 2003; STÜCKER et al., 2002).

A relação da catalase com algumas patologias cutâneas vem sendo elucidada. Um grupo de pesquisa realizou um experimento relacionado ao câncer de pele, no qual ratos machos e fêmeas foram expostos à radiação UVB e observaram que os machos apresentavam uma concentração de catalase cutânea inferior às fêmeas, tornando-os mais propensos ao desenvolvimento de câncer de pele do que as fêmeas (SULLIVAN et al., 2012). Esse achado também foi observado na espécie humana (SULLIVAN et al., 2012; SYED; MUKHTAR, 2012). Em pacientes com dermatite atópica, os níveis de catalase também se apresentam reduzidos (SIVARANJANI; VENKATA RAO; RAJEEV, 2013). Sendo assim, a utilização da enzima catalase, apresenta-se promissora em diversas áreas da medicina e cosmética. Porém, por se tratar de uma proteína, a catalase apresenta desafios relacionados à sua utilização na terapêutica, principalmente devido à instabilidade química em relação a condições extremas de pH e temperatura (SANTOS et al., 2021).

Além de seu potencial terapêutico, a catalase apresenta uma gama extensa de aplicações, como por exemplo na área de biorremediação, indústria alimentícia (KAUSHAL et al., 2018), têxtil e como biossensor (MIŁEK, 2020). A catalase mais descrita para uso em indústria alimentícia e como suplemento alimentar é produzida pelo fungo *Aspergillus niger* (MIŁEK, 2018). A catalase de *A. niger*, de tamanho aproximado de 385 kDa (KIKUCHI-TORII et al., 1982) é

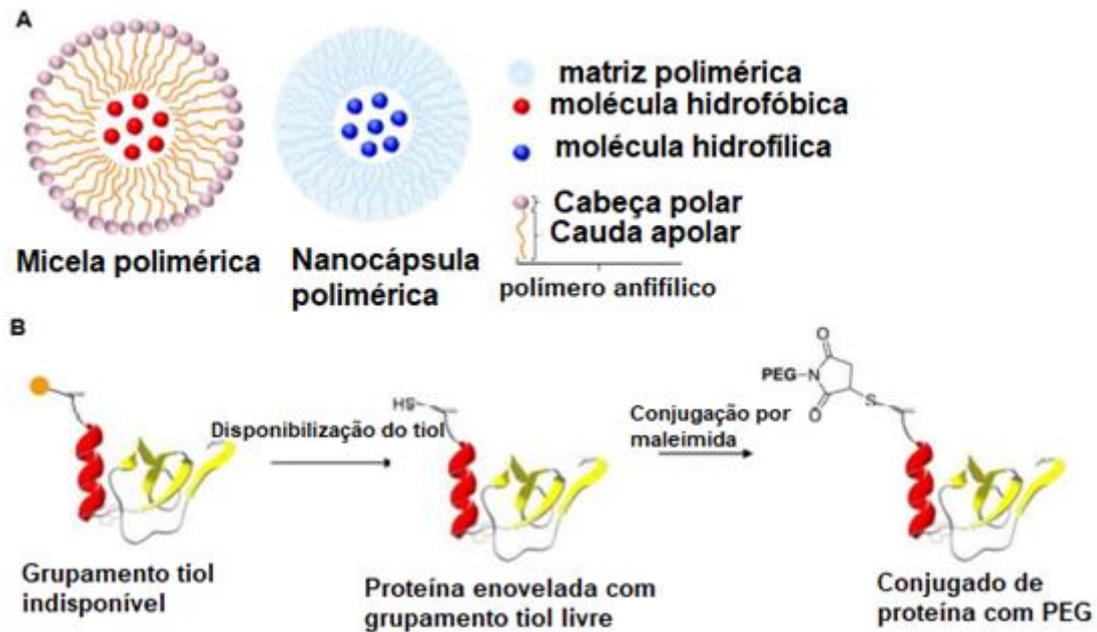
utilizada na indústria alimentícia para remoção de H₂O₂ em alimentos (MIŁEK, 2020; SCHUSTER et al., 2002). O *A. niger* é normalmente tido como um organismo seguro, afinal é um fungo amplamente difundido na natureza e de contato comum com seres humanos, resultando em infecções oportunistas em raros casos (SCHUSTER et al., 2002).

2.6 Sistemas de Liberação de Fármacos e Polímeros Terapêuticos

A necessidade de aumentar o índice terapêutico de fármacos é responsável pela constante inovação no desenvolvimento de ferramentas de *delivery*, especialmente na área de câncer, inflamação e doenças infecciosas (HAAG; KRATZ, 2006). Dentre essas ferramentas, destaca-se a nanotecnologia e, particularmente, o emprego de polímeros para a produção de nanotransportadores. De acordo com o *National Nanotechnology Institute* (nano.gov), nanotecnologia é a ciência, engenharia e tecnologia conduzida na nanoescala – 1 – 100 nanômetros (nm) em pelo menos uma dimensão, sendo frequentemente estendido para a faixa de até 500 nm (NAFISI; MAIBACH, 2018).

A nanobiotecnologia, por sua vez, é uma área multidisciplinar que reúne conhecimentos e técnicas da nanotecnologia com a biotecnologia. Do ponto de vista industrial, estes medicamentos em escala nanométrica levam o conceito de ‘sistemas de liberação de fármacos’ (*drug delivery systems*) a outro patamar, tendo em vista que polímeros compartilham muitas características com fármacos proteicos (DUNCAN, 2003). Os polímeros terapêuticos irão formar estruturas complexas com o fármaco que pode ser encapsulado ou conjugado ao polímero como ilustrado na Figura 5 (LUCKY; SOO; ZHANG, 2015; MVANGO et al., 2018).

Figura 5: Comparação estrutural entre encapsulação e conjugação de fármacos. (A) Encapsulação de substâncias em micelas utilizando polímero anfifílico e nanocápsulas; (B) Conjugação de proteína utilizando o polímero polietileno glicol (PEG).



Fonte: LUCKY; SOO; ZHANG, 2015; ALMAC, 2021. Tradução da autora.

Existem diversas possibilidades de nanotransportadores poliméricos, neste trabalho iremos focar em duas alternativas que vêm recentemente atraindo atenção para o *delivery* de biofármacos: polimerossomas e PEGuilação.

2.6.1 Polimerossomas

Polimerossomas são vesículas poliméricas formadas espontaneamente pelo autoagregação de copolímeros anfifílicos em ambientes aquosos. São caracterizados por um interior (lúmen) aquoso, rodeado por uma membrana hidrofóbica (HU; QIU, 2019; LIAO et al., 2012). Eles são considerados análogos

aos lipossomas – porém estes são compostos por lipídios. Em comparação aos lipossomas, os polimerossomas apresentam uma espessura de membrana de aproximadamente 5 – 50 nm (lipossomas ~3 nm) (RIDEAU et al., 2018) e suas dimensões podem variar de nanômetros à micrômetros a depender do método de preparação utilizado e ambiente (LIAO et al., 2012). Polimerossomas de até 10 µm apresentaram estabilidade em soluções aquosas contendo proteínas, sendo carreadores terapêuticos promissores para enzimas (MENG; ZHONG; FEIJEN, 2009). A membrana polimérica garante uma maior estabilidade e menor permeabilidade, tornando-os carreadores de moléculas tanto hidrofílicas, quanto hidrofóbicas.

Diversos tipos de copolímeros são utilizados para formar polimerossomas, destacando-se os poloxamers ou Pluronic®, copolímeros anfifílicos tri-bloco polimórficos compostos por segmentos de poli (óxido de etileno) (PEO) e segmentos de poli (óxido de propileno) (PPO) (GIULIANO et al., 2018; PITTO-BARRY; BARRY, 2014). A nomenclatura desses copolímeros é específica, com uma letra indicando a morfologia (líquido – L; pasta - P; flocos – F), seguida por uma combinação de números que se correlaciona com a massa molar da cadeia hidrofóbica (PPO) e a porcentagem de cadeias hidrofílicas (PEO) (PITTO-BARRY; BARRY, 2014).

A formação espontânea de nanocarreadores pelos copolímeros anfifílicos em solução aquosa pode ser ajustada de acordo com a massa molecular dos blocos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos, visando a obtenção de diferentes morfologias (OLTRA; NAIR; DISCHER, 2014). O Pluronic L-121 (PEO₅-PPO₆₈-PEO₅), é um copolímero conhecido por espontaneamente formar vesículas unilamelares quando dissolvido em água (LI et al., 2009).

2.6.2 Peguilação

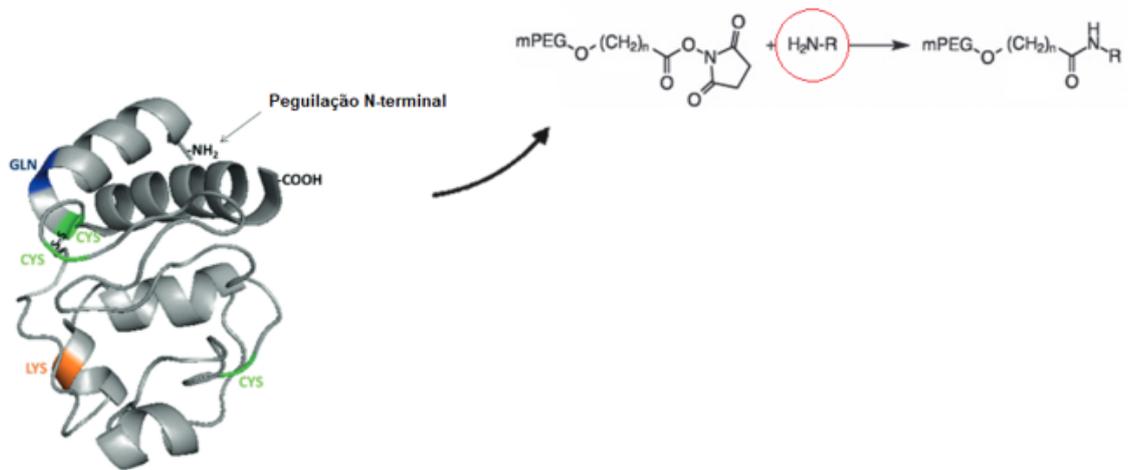
A técnica de peguilação surgiu em 1970, a partir da conclusão de J. Daves que o polímero hidrofílico polietilenoglicol (PEG), também denominado poli(óxido de etileno) (PEG), poderia reduzir a imunogenicidade e aumentar a meia-vida *in vivo* de proteínas conjugadas. O polímero PEG é composto por monômeros de óxido de etileno, de massa molecular de 44 Da (FOSTER, 2010; LI et al., 2013). Por ser não tóxico, não imunogênico e não antigênico, é aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para aplicação oral, intravenosa e dérmica (LI et al., 2013). Com relação à administração intravenosa, a adição de moléculas de PEG às proteínas lhes confere furtividade contra as células do sistema imune (HUSSAIN et al., 2019), promovendo um maior tempo de retenção da proteína no sangue, aumentando seu efeito terapêutico e o intervalo entre as doses de medicamentos (FOSTER, 2010).

Para que a ligação entre a proteína e o PEG ocorra, o polímero deve ser funcionalizado, mas o grupo funcional deve ser escolhido de acordo com o grupo reativo disponível na molécula que será acoplada ao PEG (FINN, 2009; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012). Os PEGs lineares são os agentes de conjugação mais utilizados e simples. O número de cadeias de PEG ligadas à proteína de interesse vai depender da massa molecular e estrutura do polímero, a localização das ligações entre o polímero e a molécula e a natureza química utilizada para a ligação (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012).

Diversos sítios da estrutura de proteínas podem ser alvo para o processo de peguilação, ela pode acontecer em grupos ϵ -amino, tióis, ligações dissulfídicas, N-terminal e C-terminal (SANTOS et al., 2018). Um método comum, ilustrado na Figura 6, para ligar o PEG ao N-terminal de proteínas é via

alquilação redutiva, o PEG formado reage preferencialmente com a região amino-terminal das proteínas devido às diferenças relativas nos valores de pKa entre os grupos ϵ -amino da lisina e o grupo α -amino no N-terminal (FINN, 2009).

Figura 6: Esquema visual de uma possível peguilação sítio-específica N-terminal em proteínas. Na esquerda, tem-se os possíveis sítios de peguilação em proteínas, como GLN, CYS, LYS, COOH e NH₂. O sítio N-terminal (NH₂) é onde a molécula de mPEG se liga para ocorrer a peguilação N-terminal da proteína. Na direita, a molécula de mPEG, ligando-se a uma amina primária em proteínas, formando uma ligação amida.



Fonte: SANTOS et al., 2018; modificado. Tradução da autora.

3. OBJETIVOS

Estudar o efeito da catalase livre, peguilada ou incorporada em polimerossomas no estresse oxidativo na pele. Para isso, as seguintes etapas foram estabelecidas:

1. Purificação da catalase de *Aspergillus niger*, a partir de uma preparação de grau alimentício;

2. Preparo do sistema nanoestruturado de catalase em polimerossomas de Pluronic L121;

3. Síntese e purificação da catalase peguilada (PEG-CAT);

4. Determinar *in vitro* a penetração/permeação em pele de porco da catalase livre, nanoestruturada e peguilada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A enzima catalase de *Aspergillus niger* em grau alimentício utilizada foi obtida da Prozyn (São Paulo – SP). Os polímeros metóxi-poli (etilenoglicol) carboximetil N-hidroxisuccinimidil (mPEG-NHS) de diferentes massas moleculares, foram adquiridos da Nanocs (New York, NY). O Pluronic L121 (PEO₅-PPO₆₈-PEO₅, MW = 4.400 Da) foi gentilmente cedido pela Basf Brasil (São Paulo, SP). As soluções utilizadas foram preparadas utilizando água ultrapurificada pelo equipamento Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA).

4.2 Métodos

4.2.1 Análise *in silico* da estrutura da catalase de *A. niger*

A análise *in silico* da estrutura da catalase de *A. niger* foi realizada com a utilização das bases de dados: Protein Data Bank (PDB) e UniProt; e das palavras-chave: “catalase *a. niger*” e “catalase *aspergillus niger*”. A sequência de aminoácidos da enzima foi encontrada apenas na base de dados UniProt (A2Q7T1) e foi utilizada para estimativa do seu pKa. Aplicando-se o *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, foi possível obter parâmetros químicos e físicos da catalase como o ponto isoelétrico (pI), o

número total de resíduos carregados negativamente, o número total de resíduos carregados positivamente e o coeficiente de extinção molar. A proporção de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas foi analisada de acordo com a sequência de aminoácidos. O modelo 3D da enzima foi obtido utilizando o servidor de predição de estrutura proteica *Robetta* (*Baker Lab, University of Washington*) e a estrutura 3D analisada através da ferramenta *Calculation of Solvent Accessible Surface Areas, Atomic Solvation Energies and Their Gradients for Macromolecules, GETAREA* (curie.utmb.edu/getarea.html).

4.2.2. Atividade enzimática

A atividade enzimática da catalase foi avaliada a partir da análise da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em H₂O e O₂ com auxílio de um espectrofotômetro, por meio de leitura de absorbância a $\lambda = 240$ nm ao longo do tempo. As soluções enzimáticas (catalase) e de H₂O₂ foram diluídas em tampão fosfato 0,05 M; pH = 7. A enzima foi diluída em 1:250, enquanto o peróxido de hidrogênio foi diluído para uma concentração de 0,05 M. A Tabela 1 apresenta a composição das amostras analisadas. O valor da absorbância “Branco” foi descontado da absorbância do teste. O valor de “M” foi retirado da absorbância do teste como fator de correção.

As leituras foram realizadas a 37 °C em intervalo de 3 minutos cada em triplicata. A atividade enzimática da enzima (kU) foi obtida de acordo com a equação abaixo (HADWAN; ABED, 2016; SANTOS et al., 2021):

$$kU = \frac{2,303}{t} \times \log \frac{S^{\circ}}{S-M} \times \frac{Vt}{Vs} \quad \text{Eq. (4)}$$

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas no ensaio de atividade enzimática. Sendo, 'Branco', o valor de absorbância de referência, composto pelo tampão fosfato utilizado nas outras soluções. 'S°' se refere a absorção do H₂O₂. 'M', a amostra em tampão. 'S', o ensaio definitivo, com H₂O₂ e a amostra contendo catalase

Soluções	Branco	S°	M	S
Catalase	-	-	0,1 mL	0,1 mL
Tampão	1,1 mL	0,1 mL	1 mL	-
H ₂ O ₂	-	1 mL	-	1 mL

Fonte: Autoria própria, 2021.

Em que, 'kU' é a atividade enzimática da catalase, 't' o tempo, 'S°' absorbância do tubo padrão, 'S' absorbância do tubo teste, 'M' a absorbância do controle, 'Vt' o volume total da reação e 'Vs' o volume da amostra. O valor obtido então é transformado em U/mg, levando em consideração a concentração de proteína. Uma unidade de catalase (U) é responsável pela decomposição de 1 µmol de H₂O₂ por minuto em tampão fosfato pH = 7,0; 0,1 M; à 37 °C (HADWAN; ABED, 2016; ROBERTS; GIBB, 2013).

4.2.3 Purificação da catalase por ultrafiltração

Os ensaios foram realizados utilizando o equipamento Sartorius Sartoflow Slice 200 Benchtop Tandem (Sartorius, Alemanha). O equipamento foi desmontado e suas partes limpas com água destilada. Após ser remontado, a membrana (30,100 e 300 kDa) foi encaixada no suporte metálico e o sistema de mangueiras e sensores foi conectado, formando um circuito fechado, para dar início ao protocolo de limpeza, inicialmente com água ultrapura; os sensores foram retirados logo após para limpeza com NaOH a 300 mM. Logo depois, o

sistema foi limpo com água ultrapura novamente, para aplicação da amostra (solução comercial de catalase diluída) com o fluxo de filtração de 300 ml/min, pressão zero. Foram investigadas membranas de ultrafiltração de 30, 100 e 300 kDa. Posteriormente ao ensaio, o equipamento foi limpo seguindo as mesmas instruções e a membrana foi armazenada em etanol 20%.

4.2.4. Eletroforese em gel (SDS-PAGE)

O gel de corrida foi polimerizado na concentração de 12% de Tris-Glicina-SDS-Poliacrilamida em suporte de 0,75 mm e gel de empacotamento de 5%. O gel de corrida foi preparado com 4,9 mL de água, 6 mL de mix de acrilamida 30%, 3,8 mL de Tris (pH = 8,8) 1,5 M, 0,15 mL de SDS 10%, 0,15 mL de persulfato de amônio (PSA) 10% e 0,006 mL de tetraetilenodiamina (TEMED). Já o gel empacotador foi preparado com 2,1 mL de água, 0,5 mL de mix de acrilamida 30%, 0,38 mL de Tris (pH = 8) 1 M, 0,03 mL de SDS 10%, 0,03 mL de PSA e 0,003 mL de TEMED. Enquanto o gel polimerizava, as amostras foram preparadas da seguinte forma: 10 µL de amostra foram transferidos para microtubos de centrifuga e adicionados de 10 µL de tampão de carga (Laemmli). Os sistemas foram incubados por 10 minutos à 90 °C. Aos poços nos géis, já polimerizados, foram adicionados 15 µL da mistura de solução amostra e 15 µL tampão de carga, o tampão de corrida utilizado foi Tris-Glicina 1x, em 0,12 A à 120 V. Após a corrida, os géis foram retirados da cuba e submetidos à solução corante (Comassie Brilliant Blue 2,5 g, metanol 450 mL, ácido acético glacial 100 mL e água 450 mL) *overnight*. No dia seguinte, os géis foram descorados com a solução descorante (metanol 450 mL, ácido acético glacial 100 mL e água 450 mL).

4.2.5. Precipitação Induzida por *salting out*

O processo de precipitação induzida por *salting out* pode ser observado na Figura 7. A catalase em grau alimentício foi adicionada de uma solução saturada de sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄], 4 °C, sob agitação constante, à 4 °C, overnight, em diferentes proporções de sal/extrato bruto. A solução saturada de sal foi preparada a partir da dissolução em água ultrapurificada com uma concentração molar final de sal de 3,93 M (ENCOR, 2020; WILLOT LAB PROCEDURES, 2001). Após este processo, 350 mL da solução salina foram adicionados a 150 mL de extrato bruto. Após 16 horas, o sistema foi centrifugado a 2608 x g, 4°C, por 45 min, para isolar a enzima precipitada. Após a retirada do sobrenadante, o precipitado de enzima foi ressuspenso em tampão, em volume equivalente ao volume de extrato bruto inicialmente utilizado. A solução foi então lavada a 2608 x g utilizando filtros Amicon de 30 kDa, a 4°C. A quantidade de lavagens necessárias foi definida a partir da determinação da condutividade dos lavados obtidos, em geral, foram necessárias 10 a 30 lavagens.

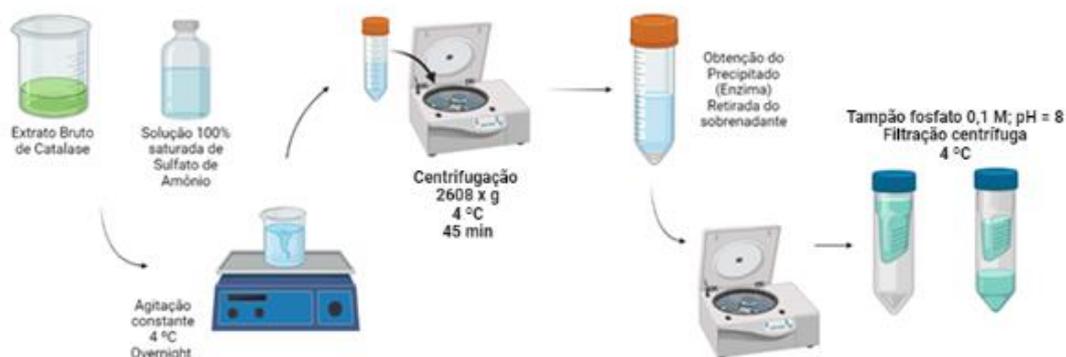
Com a atividade enzimática inicial sendo considerada 100%, o rendimento é calculado de acordo com a equação 5 abaixo:

$$Rendimento = \frac{Atividade\ Enzimática}{Atividade\ Enzimática\ Inicial} \times 100\% \quad (5)$$

O fator de purificação foi calculado com base na equação 6 e representa uma medida de quão eficaz a etapa da purificação é, a partir do aumento da pureza da proteína de interesse.

$$Fator\ de\ Purificação = \frac{\frac{U}{mg}\ da\ etapa\ de\ purificação}{\frac{U}{mg}\ do\ extrato\ bruto} \quad (6)$$

Figura 7: Procedimento de purificação pelo método de Precipitação Induzida (*Salting out*) utilizando uma solução saturada de sulfato de amônio, para induzir a precipitação da enzima catalase. O processo foi conduzido a 4 °C.



Fonte: Autoria própria, 2022.

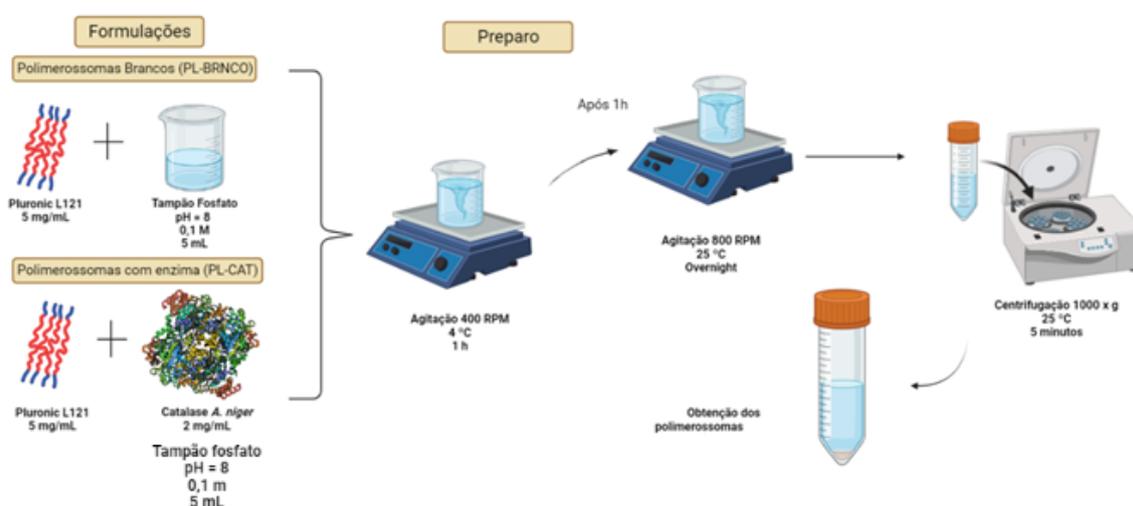
4.2.6. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de catalase nas soluções obtidas a partir da ultrafiltração tangencial – filtrado e retentado, bem como após os processos de purificação, foi determinada a partir do método de BCA (ácido bicinonínico), empregando-se uma curva padrão de BSA (albumina de soro bovino). Para a construção da curva padrão, empregou-se uma solução estoque de BSA a 1 mg/mL em PBS pH = 8; 0,1 M, a partir desta, foram realizadas diluições nas concentrações: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL. Alíquotas de 25 µL das amostras de padrão foram transferidas para uma placa de 96 poços e adicionados 200 µL de BCA, cada um em triplicata e incubados à 37 °C por 30 min. Após o tempo estipulado, foi realizada a leitura em 562 nm.

4.2.7. Nanoencapsulação da catalase em polimerossomas

Os polimerossomas foram produzidos a partir do método de dissolução direta, o qual consiste na dissolução do polímero Pluronic L-121 (5 mg/mL) e da catalase (2 mg/mL) em tampão fosfato pH = 8, a 4 °C, por 1h, sob agitação constante a 400 RPM, como é possível observar na Figura 8. Após o processo de dissolução ser completo, a formação de vesículas foi induzida em temperatura ambiente, sob agitação constante a 800 RPM, overnight. O polímero residual foi removido por centrifugação a 1000 x g, 25 °C, por 5 min.

Figura 8: Procedimento de preparação dos polimerossomas de Pluronic L121.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Com o objetivo de determinar a porcentagem de enzima encapsulada, os sistemas foram purificados utilizando cromatografia de exclusão molecular (SEC) com Sepharose 4B, como fase estacionária, em uma coluna de 15 mL. Para o empacotamento em coluna, a resina (em etanol 20%) foi lavada com

água, seguida de centrifugação a 3000 x g por 5 minutos e depois lavada cinco vezes com PBS pH 8.0, e finalmente centrifugada nas mesmas condições (3000 x g, 5 minutos). A coluna foi preenchida com Sepharose 4B e eluída com tampão PBS pH 8.0. As frações eluídas foram recolhidas e os cálculos de eficiência de encapsulação (EE%) foram realizados, em triplicata, como descrito a seguir.

4.2.7.1. Cálculo da Eficiência de Encapsulação pelo método Indireto

Após o processo de purificação dos polimerossomas a concentração de proteína na fração contendo a enzima não encapsulada foi determinada pelo método de BCA. Dessa maneira, a eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada de forma indireta de acordo com a Equação 7 (OLIVEIRA et al., 2020).

$$EE\%_{indireta} = \frac{[Proteína]_{inicial} - [Proteína]_{não\ encapsulada}}{[Proteína]_{Inicial}} \times 100\% \text{ (Eq. 7)}$$

4.2.7.2. Cálculo da Eficiência de Encapsulação pelo método Direto

Para realizar o cálculo da EE% de forma direta, foi necessário realizar o rompimento/desagregação dos polimerossomas utilizando clorofórmio na proporção de 1:1. Após a adição e mistura das duas fases, o sistema foi centrifugado a 2655 x g por 60 minutos, a 4°C. Em seguida, uma alíquota da fase aquosa foi coletada e a absorbância determinada a 280 nm. O cálculo para determinar a concentração da enzima foi realizado, utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280nm}=163415 \text{ L}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) antes e depois do processo de rompimento dos polimerossomas. O cálculo de eficiência de encapsulação (EE%) foi realizado de acordo com a Equação 8 (OLIVEIRA et al., 2020).

$$EE\%_{direta} = \frac{[Proteína] Encapsulada}{[Proteína] Inicial} \times 100\% \text{ (Eq. 8)}$$

4.2.8. Espalhamento Dinâmico de Luz

O diâmetro hidrodinâmico dos polimerossomas (Dh) e o índice de polidispersão (PDI) foram analisados com o auxílio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), empregando-se o instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS, laser He-Ne 633 nm e detector em ângulo de 173° no Laboratório de Sistemas Biomiméticos, coordenado pela Professora Dra. Iolanda Midea Cuccovia. As amostras foram diluídas na proporção de 1:10 em tampão PBS pH = 8, filtrado em filtro 0,22 µm, e analisadas em cubetas de poliestireno (Malvern, DTS0012). As análises foram realizadas em triplicata e o diâmetro médio das partículas nas amostras foi obtido a partir da equação de Stokes-Einstein.

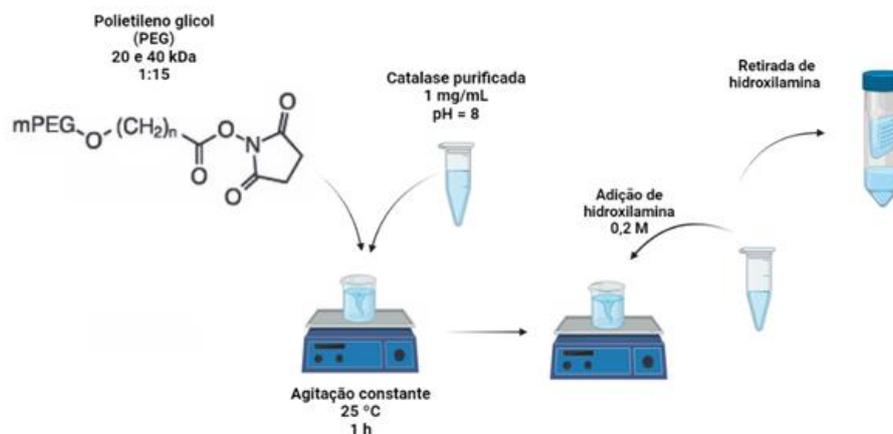
4.2.9. Peguilação

Para a peguilação, foi preparada uma solução de catalase a 1 mg/mL em tampão fosfato (pH = 8.0) e então adicionada uma solução de mPEG-NHS na proporção de 1:25 (catalase:PEG). Como ilustrado na Figura 9, a mistura reacional foi mantida a 22°C por 30 minutos por meio de agitação magnética. Visando parar a reação e eliminar ligações instáveis do polímero com a enzima, uma solução de hidroxilamina 0,2 M foi adicionada sob agitação constante por mais 1h, na proporção de 1:10. Uma amostra do meio reacional foi submetida a análise de eletroforese (SDS-PAGE) para confirmação da reação e da intensidade das bandas. Após o processo de bioconjugação ser finalizado, a

mistura reacional foi ultrafiltrada a 2.906 xg em sistemas Amicon 30 kDa (Merck Millipore) por 5 minutos em temperatura de 4°C para remoção do NHS originário da reação de peguilação e do PEG que não reagiu. A separação das proteínas peguiladas das não peguiladas foi realizada por cromatografia de exclusão molecular, operando em coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences) em fluxo de 0,750 mL/min de tampão fosfato 0,1 M; pH 8,0 como solução de fase móvel, no equipamento FPLC Äkta Purifier (GE Life Sciences). A partir da área dos picos obtidos, foi calculado o rendimento da reação de peguilação. As frações correspondentes à catalase peguilada foram coletadas, combinadas, analisadas em SDS-PAGE e armazenadas para posterior realização do ensaio biológico.

O rendimento das reações de peguilação foi calculado com o auxílio dos cromatogramas. Inicialmente amostras de 0,5 mL de extrato bruto, assim como a catalase após o processo de purificação, foram analisadas utilizando o *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC), em coluna SEC (Superdex 200 Increase 10/300 GL, cytiva) com fluxo de 0,750 mL/min, em tampão fosfato pH = 8. Este estudo inicial, conferiu alíquotas purificadas da enzima, que foram utilizadas como padrão da enzima e para fins comparativos. Os cálculos de rendimento foram realizados pela integração da área dos picos, relativos à catalase pura e à catalase peguilada, e a proporção de cada pico em relação ao todo analisado.

Figura 9: Procedimento de realização da bioconjugação do polímero polietilenoglicol (PEG) com a enzima catalase.



Fonte: Autoria própria, 2022.

4.2.10. Estudos de penetração/permeação cutânea

Os estudos de penetração/permeação cutânea foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, empregando-se células verticais de difusão do tipo Franz, com área de difusão média de $0,67\text{ cm}^2$. Como meio receptor, tampão fosfato 50 mM , $\text{pH} = 7,0$ foi utilizado em fluxo constante à $32\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação constante (200 rpm), por 24 h . O ensaio foi realizado em triplicata e uma solução de tampão fosfato foi utilizada como controle negativo. A pele de orelha de porco foi cortada em tamanhos apropriados para as células e encaixadas. Um mililitro de cada amostra foi aplicado nos compartimentos doadores, e então, fechados com aparatos oclusivos, visando evitar a evaporação das fases. Após 24 h , cada área exposta às amostras teve seu estrato córneo retirado 20 vezes com fita adesiva e então

adicionados a uma solução de 3 mL de metanol, para então serem submetidos a um banho de ultrassom em 40 KHz por 15 min, e posterior filtração em filtros de seringa de polietersulfona (PES) com porosidade 0,45 µm. A pele restante (epiderme e derme) foi triturada e adicionada ao mesmo volume de metanol e submetida ao banho de ultrassom nas mesmas condições. O fluido receptor foi armazenado para posterior análise de atividade enzimática. Antes de realizar o ensaio de atividade enzimática, as alíquotas obtidas em cada extrato da pele foram secas em evaporador rotatório (Rotavapor R-215, Buchi; Vacuum Controller V-850, Buchi, São Paulo) para retirada do metanol e ressuspensas em tampão fosfato 50 mM, pH = 7,0, preservando-se o volume inicial.

4.2.11. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software RStudio 2023.06.0 (Posit Software, PBC) integrado para R, e o Minitab19®. Todas as análises foram realizadas com o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Os testes de normalidade dos dados obtidos assim como a análise de outliers foi realizada no Minitab19®, sendo os testes de normalidade empregados: Anderson-Darling, Ryan-Joiner (Similar a Shapiro-Wilk) e Kolmogorov-Smirnov, e o teste de outlier utilizado foi o Teste de Grubbs. Os gráficos de BoxPlot foram produzidos no aplicativo, após a determinação da normalidade dos dados e a retirada de outliers (quando houve).

Os testes ANOVA foram realizados em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), utilizando o *software* RStudio e os pacotes: *data.table*, *rstudioapi*, *easyanova* e *ExpDes.pt*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

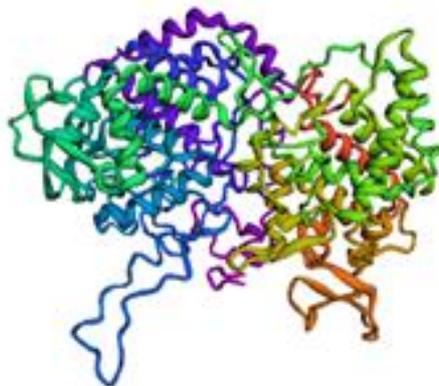
5.1 Análise *in silico* da estrutura da catalase de *A. niger*

Um levantamento da literatura foi realizado, visando obter informações acerca da massa molecular, composição e estrutura da enzima de *A. niger*. Infelizmente, a estrutura da catalase de *A. niger* não está disponível no *Protein Data Bank*, nem no *UniProt*. Contudo, empregamos a sequência de aminoácidos do gene da catalase de *A. niger* (formato FASTA) disponível no site *UniProt* sob o código A2Q7T1. A catalase apresenta 762 aminoácidos, e os três principais resíduos relacionados com a atividade enzimática são: arginina na posição 93, histidina na posição 97 e histidina na posição 283. Utilizando o *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, foi possível obter parâmetros físico-químicos da catalase (Tabela 2).

Como se pode observar nos dados da Tabela 2, o ponto isoelétrico (pI) teórico se aproxima do valor experimental encontrado na literatura, pI = 6,5, e é maior que o da enzima de origem bovina, pI = 5,4 (MOSAVI-MOVAHEDI; WILKINSON; JONES, 1987). O grupamento N-terminal, composto pela metionina, apresenta pKa entre 9,2 e 9,5 (DRUGBANK, 2021a; PUBCHEM, 2021a), enquanto a cadeia lateral da lisina possui pKa entre 10,29 e 10,53 (DRUGBANK, 2021b; PUBCHEM, 2021b). Essas informações são importantes para o planejamento experimental da etapa de purificação e peguilação.

O modelo 3D da enzima pode ser observado na Figura 10. De acordo com a ferramenta, o intervalo de confiança do método é de 0.82 (quanto mais próximo de 1.0, melhor).

Figura 10: Modelo 3D de uma subunidade da enzima catalase de *A. niger*, gerado a partir do RoseTTAFold, 23/12/2021



Fonte: RoseTTAFold, 2021.

As estruturas 3D foram analisadas utilizando a ferramenta *Calculation of Solvent Accessible Surface Areas, Atomic Solvation Energies and Their Gradients for Macromolecules, GETAREA* (curie.utmb.edu/getarea.html) e os resultados obtidos em relação à polaridade da enzima podem ser observados na Tabela 3.

O parâmetro “área de superfície acessível ao solvente” (*solvent-accessible surface area* – SASA) é utilizado para localizar os resíduos acessíveis e não acessíveis da biomolécula ao solvente, de acordo com as interações de van der Waals (GROMIHA; NAGARAJAN; SELVARAJ, 2018). Esses dados foram utilizados para o desenvolvimento do protocolo de purificação por *Salting Out*.

Tabela 2: Parâmetros obtidos pela análise da sequência de aminoácidos de A2Q7T1, utilizando a ferramenta *Protein Identification and Analysis* (ProtParam).

Parâmetro	Resultado
Massa Molecular da subunidade	84 kDa
pI teórico	6,19
Nº total de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu)	95
Nº total de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys)	86
Coefficiente de extinção molecular (0,1%, g/L)	1,940
N-Terminal	Metionina
Tempo de meia vida estimada (levedura, <i>in vivo</i>)	20 h

Fonte: Autoria própria, 2021.

Tabela 3: Proporção hidrofóbica - hidrofílica da enzima catalase de *A. niger*, de acordo como *Solvent Accessible Surface Areas* (SASA - Sealy Center for Structural Biology, University of Texas Medical Branch, Galveston). A2Q7T1 (*AlphaFold*), corresponde ao modelo 3D da enzima desenvolvido pela base de dados de estrutura de proteínas *AlphaFold*. A2Q7T1(*RoseTTAFold*), corresponde ao modelo 3D da enzima, desenvolvido pelo servidor de predição de estrutura proteica *Robetta*.

Estrutura	Porções Hidrofóbicas	Porções Hidrofílicas
A2Q7T1 (<i>AlphaFold</i>)	61,19%	38,81%
A2Q7T1 (<i>RoseTTAFold</i>)	59,39%	40,60%

Fonte: Autoria própria, 2021.

5.2. Precipitação Induzida ou *Salting Out*

Proteínas com um maior número e tamanho de regiões hidrofóbicas tendem a precipitar em condições salinas mais baixas – cerca de 20 a 30% em relação àquelas que possuem uma maior porcentagem hidrofílica (UNIVERSITY COLLEGE LONDON, 2021; VITOLO et al., 2015). De acordo com os dados obtidos anteriormente, no ponto 5.1, há a previsão de que a catalase de *A. niger* apresente uma maior proporção, de área de superfície acessível ao solvente, hidrofóbica. De acordo com a literatura, baixas concentrações salinas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentam uma boa capacidade de precipitar proteínas em *A. niger* (FALAHATI et al., 2016). Logo, a técnica de precipitação induzida foi realizada a uma concentração relativamente baixa de sal, 40% de $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Porém, após a etapa de centrifugação, não foi possível observar a formação de precipitado ou quaisquer alterações visuais no extrato bruto.

A partir disso, a concentração salina foi aumentada para 70% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o processo repetido. A formação de precipitado foi observada assim como alterações visuais – o extrato bruto apresenta coloração verde e, após a adição de 70% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o processo de centrifugação, o sobrenadante se tornou mais claro em relação à solução original. Apesar de ter contrariado os primeiros achados na literatura acerca do processo de purificação, a precipitação de catalase em uma concentração de 70% de sal corrobora com estudos prévios com a enzima (FERNANDES; GREGORIADIS, 1996). Outros artigos relatam a precipitação de catalase em diferentes concentrações de sal: 80% (BAYKAL SARI; YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ, 2020; TAKIO et al., 2021), 65 – 85 % (YANG; YANG; TANI, 1988). Contudo, esses artigos relatam o processo de purificação, utilizando o extrato bruto obtido diretamente dos micélios do fungo e

apresentando também outras etapas de purificação, que não são necessárias no presente trabalho. Esses dados sugerem que outros fatores também podem influenciar na precipitação de proteínas.

Na literatura, são encontrados poucos e antigos trabalhos que relatam a purificação da enzima catalase utilizando o sulfato de amônio. Sendo assim, a partir do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para encontrar regiões similares entre sequências de aminoácidos, alguns microrganismos foram adicionados à pesquisa para ampliar a discussão e analisar a coerência dos dados de acordo com a semelhança das enzimas de diferentes espécies. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Catalase de diferentes microrganismos que apresentam similaridade com a catalase de *A. niger* de acordo com análise realizada pelo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Código UniProt	Nome da Proteína	Microrganismo	Identidade
B0YAK0/Q7Z7W6	Catalase-Peroxidase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	76,7%
Q8X182	Catalase-Peroxidase	<i>Neurospora crassa</i>	70,0%

Fonte: Autoria própria, 2021.

Em 1986, Harvey e Longbottom, realizaram a purificação da enzima catalase proveniente de *A. fumigatus* utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido diretamente do extrato bruto dos micélios até atingir a saturação (HARVEY; LONGBOTTOM, 1986). A catalase de *A. fumigatus* também foi purificada, usando-se uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 0 – 50% (HEARN; WILSON; MACKENZIE, 1992).

Falahati e colaboradores (2016), por sua vez, empregaram concentrações de 20, 50 e 80% para purificar proteínas produzidas por três espécies de *Aspergillus*: *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*. Das concentrações empregadas, a de 20% demonstrou ser mais eficaz para a purificação de proteínas, mais especificamente a catalase dos micélios (FALAHATI et al., 2016).

Em 1979, Jacob e Orme-Johnson, realizaram a purificação da catalase de *Neurospora crassa* em seis etapas, sendo duas utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A etapa 2 foi realizada utilizando uma solução saturada de sal em 50%, homogeneizando-se por 30 minutos. A fase 4 utilizou o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido na fração do sobrenadante, até atingir uma concentração de 35%, após 1h, o precipitado foi retirado e mais sal foi adicionado ao sobrenadante, atingindo 50% de saturação (JACOB; ORME-JOHNSON, 1979). A catalase de *Neurospora crassa* foi precipitada com uma concentração de 35% (p/v) de sal (DÍAZ et al., 2001). Em outro artigo, os autores utilizaram entre 20 e 80% de solução saturada de sulfato de amônio e observaram que 60% é a saturação ótima de sal para precipitação da enzima deste microrganismo (SURYANI; AMBARSARI; LINDAWATI, 2017).

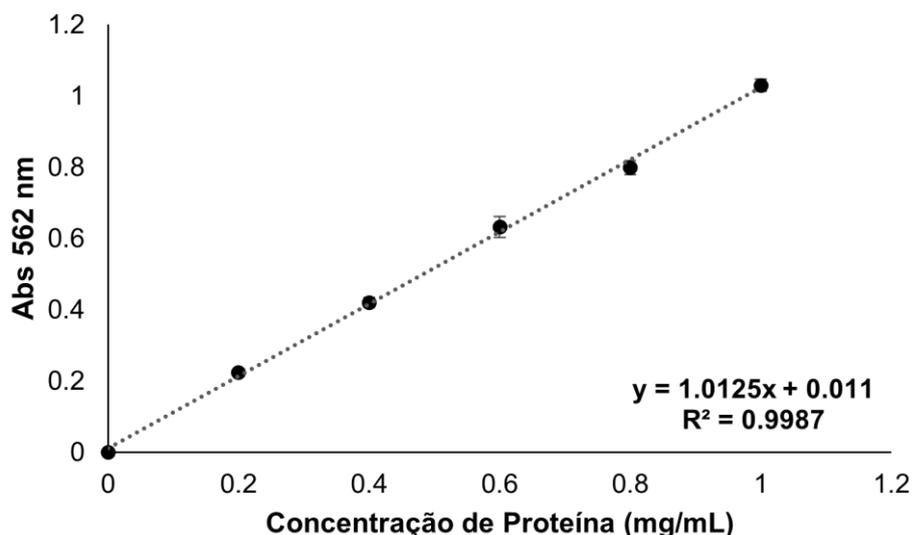
Pode-se observar que diversos artigos se referem à purificação utilizando o extrato bruto obtido diretamente dos micélios do fungo, contudo a presença de meio e *debris* celulares torna necessária a utilização de outras etapas de purificação, que no presente projeto não são aplicáveis. Apesar disso, se observa a variação de informações relacionadas sobre a concentração salina utilizada para induzir a precipitação da proteína de interesse, entre 20% e 80%, e a utilização ou não da solução saturada em detrimento do sal sólido diretamente no extrato bruto.

Após o processo de precipitação induzida, comumente, há uma etapa de retirada do excesso de sal residual na enzima recuperada, normalmente pelo processo de diálise (JACOB; ORME-JOHNSON, 1979), especialmente pela toxicidade do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (SIVA KUMAR et al., 2017). Portanto, o precipitado foi ressuspenso em tampão e ultrafiltrado utilizando filtros de 30 kDa, com o objetivo de retirar o sal residual. A condutividade do sistema foi analisada e comparada com a do tampão para confirmar a retirada total do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

De acordo com a literatura, “os requisitos básicos para um processo eficiente de purificação de enzimas são (1) alto grau de pureza final; (2) alta recuperação geral da atividade enzimática; e (3) reprodutibilidade” (RAMOS; XAVIER MALCATA, 2019). Logo, a quantificação de proteínas totais foi realizada a partir do método de BCA, descrito anteriormente em 4.2.5. A curva de padrão pode ser observada na Figura 11, assim como a equação da reta e o valor de R^2 . A partir desta, as concentrações de proteína do extrato bruto, da enzima purificada e do padrão sigma de *A. niger* foram calculadas.

A concentração de proteínas obtida no sobrenadante foi 1,56 mg/mL e no precipitado ressuspenso em tampão foi 10,64 mg/mL. A atividade enzimática também foi determinada para a estimativa da atividade específica e análise do processo de purificação, como pode ser observado na Tabela 3. Os valores correspondentes à atividade enzimática do sobrenadante não constam na tabela, devido à falta de atividade enzimática expressiva (> 0).

Figura 11: Curva de calibração para a quantificação de proteína pelo método de BCA empregando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.



Fonte: Autoria própria, 2021.

De acordo com os resultados expressos na Tabela 5, aparentemente houve uma diminuição na concentração de proteína após o processo de purificação. Isso pode ter sido ocasionado pela retirada de componentes presentes na solução do extrato bruto que interferem na quantificação de proteína pelo método BCA, como por exemplo: a glicose e alguns sais, tais quais: o sulfato de amônia e anfólitos (bases e ácidos de Brønsted) (BROWN; JARVIS; HYLAND, 1989), bem como pela eliminação de proteínas contaminantes. Não apenas a presença de substâncias que interfiram na quantificação proteica pelo método utilizado, como também, possivelmente, impeça a maior eficiência da atividade da enzima, tendo em vista o aumento em 10x da atividade específica da enzima após o processo de purificação.

Tabela 5: Dados obtidos da purificação da catalase por precipitação induzida.

Amostra	Volume (mL)	Concentração de proteínas totais (mg/mL)	Atividade enzimática (kU)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento atividade enzimática recuperada (%)	Fator de Purificação
Extrato Bruto	15	84,4	3,1	2,47	-	-
Padrão	1	13,6	1,9	138,70	-	-
Purificada	15	10,6	4,0	25,12	128%	10,5

Fonte: Autoria própria, 2021.

O aumento na atividade específica deve ser interpretado como um aumento na pureza da enzima na solução em relação ao extrato bruto original. Afinal, a atividade específica (U/mg) é a razão da atividade enzimática pela concentração total da proteína e reflete a pureza da amostra (ROBERTS; GIBB, 2013). O aumento na atividade específica corrobora com o que foi discutido anteriormente, ou seja, que há no extrato bruto substâncias que interferem na atividade da enzima e/ou na quantificação de proteínas totais.

A atividade enzimática da proteína purificada excedeu em 28% a atividade da enzima no extrato bruto, portanto, um valor de rendimento de purificação superior a 100% foi obtido. Essa observação corrobora com o resultado analisado de atividade específica, considerando a remoção de possíveis inibidores ou outras impurezas que interfiram na atividade da enzima. Este resultado se assemelha com pesquisas anteriores, com concentrações semelhantes de sais, em que o fator de purificação obtido foi de 7,9, com 263% de recuperação de atividade enzimática (BAYKAL SARI; YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ, 2020).

O fator de purificação é uma medida de quão eficaz a etapa da purificação é, a partir do aumento da pureza da proteína de interesse. Neste trabalho obtivemos um fator de purificação de 10,5, indicando significativo aumento da pureza, maior do que o relatado por Baykal e Yüzügüllü (2020), em que a enzima foi purificada a partir do meio de cultivo de *A. niger* e o fator de purificação obtido foi 7,9. Como visamos aplicação tópica da enzima, o grau de pureza obtido se demonstra satisfatório. No entanto, é preciso considerar que a atividade específica ainda é significativamente inferior à do padrão de catalase (5,5 vezes menor).

Após a purificação utilizando o processo de precipitação induzida, uma alíquota da enzima purificada foi analisada por cromatografia de exclusão molecular (SEC). O método utilizado separa as moléculas presentes em uma solução, de acordo com o tamanho. As proteínas maiores são eluídas primeiro na coluna, pois devido ao volume não conseguem penetrar nos poros da resina, o que acontece com as menores moléculas, levando-as a apresentarem maior tempo de retenção.

Além da alíquota da enzima purificada, uma alíquota do extrato bruto, antes do processo de purificação, também foi analisada utilizando a mesma coluna. Como pode-se observar, as frações obtidas nos tempos de retenção 15.72 (Figura 12) e 15.60 (Figura 13) se referem à mesma molécula, a enzima catalase (analisada pelo ensaio de atividade enzimática).

Figura 12: Cromatograma do extrato bruto de catalase, diluído em PBS pH = 8, 1:100. Em azul, a absorção UV, marrom, a condutividade, vermelho, as frações obtidas, rosa, injeção da amostra.

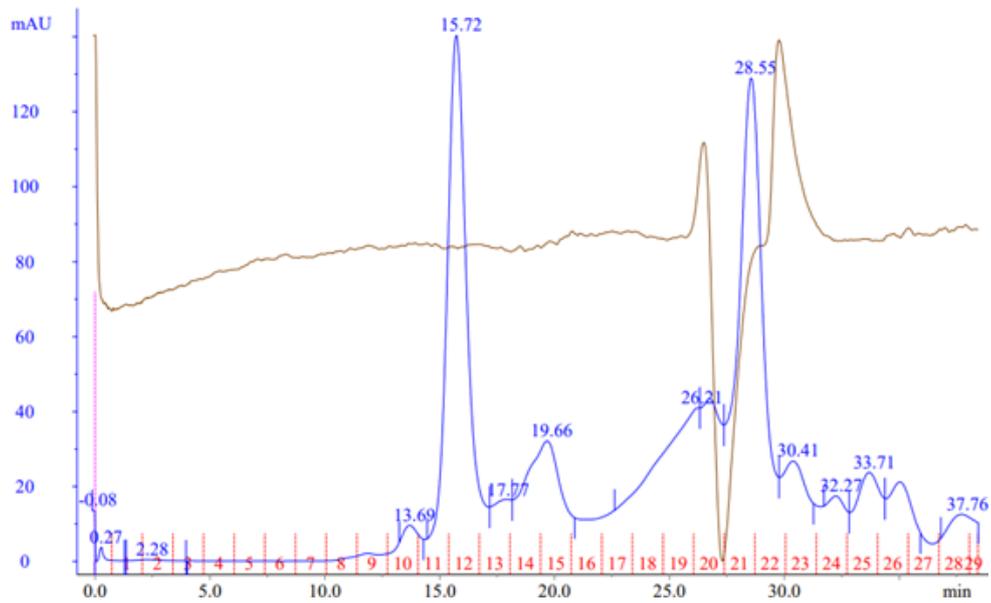
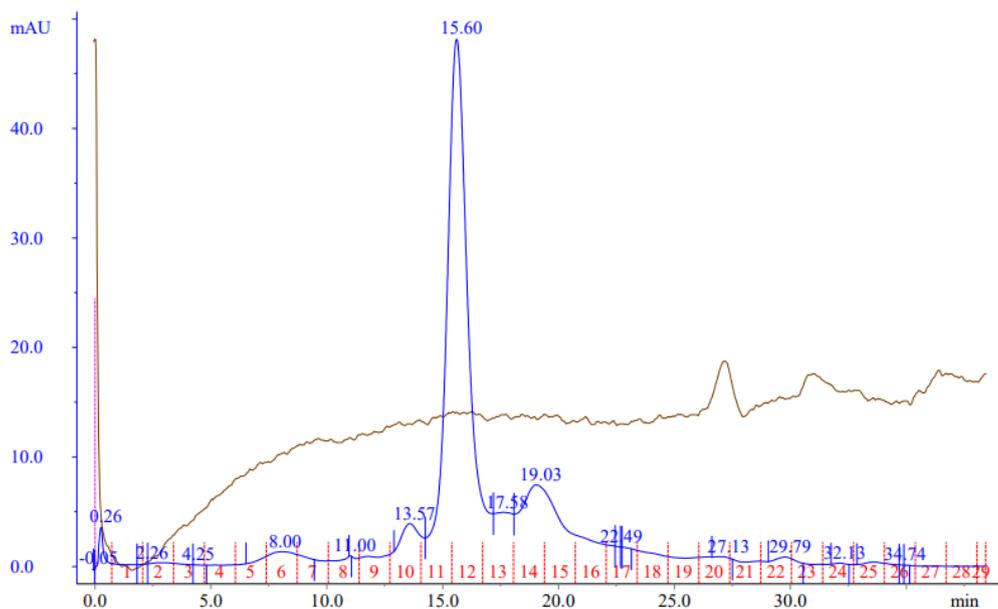


Figura 13: Cromatograma da enzima catalase purificada pelo processo de precipitação induzida, diluída em PBS pH = 8, 1:100. Em azul, a absorção UV, marrom, a condutividade, vermelho, as frações obtidas, rosa, injeção da amostra.



Na Figura 12, observa-se a presença de impurezas de diferentes tamanhos no extrato bruto, o que já era esperado, considerando uma formulação purificada em grau alimentício, ou seja, que segue a Resolução-RDC N° 205 de 14 de novembro de 2006 da ANVISA. Além disso, é possível observar a alta condutividade do sistema, em marrom, indicando a presença de sais no extrato bruto.

Na Figura 13, após o processo de purificação por precipitação induzida, é possível observar a manutenção de uma molécula eluída em 15.60 min, assim como a diminuição na intensidade das outras frações, também presentes no extrato bruto (Figura 12). O grau de pureza da enzima após o processo de purificação foi calculado pela integração dos picos, visto que o pico em 15.70 min apresenta uma área de 46,1822 mAU*min, representando um grau de pureza de 72%.

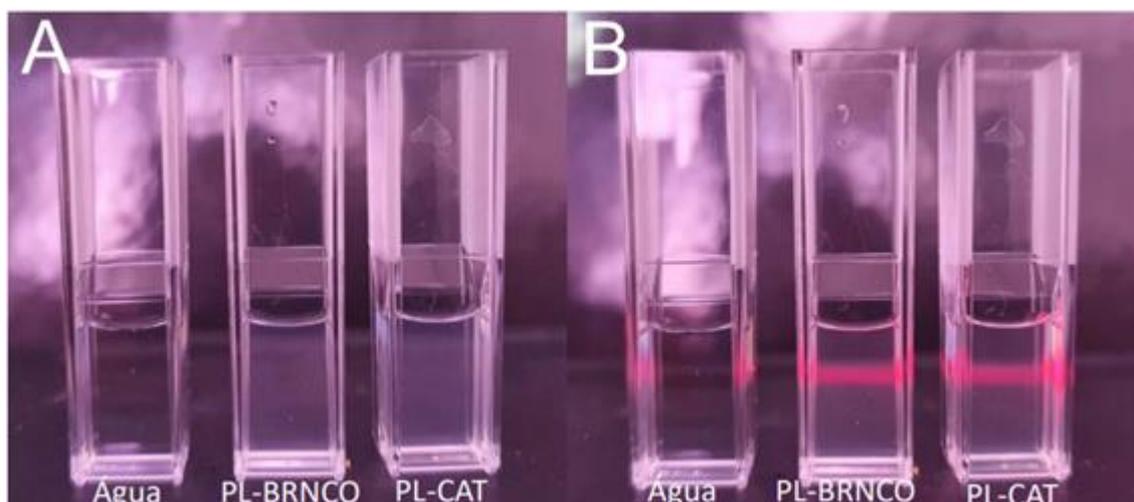
Em comparação com o extrato bruto, também pode ser observada a diminuição da condutividade do sistema, corroborando com as medidas de condutividade realizadas.

5.3 Nanoencapsulação da catalase em Polimerossomas

Foram produzidos dois sistemas dispersos de nanoestruturas, um contendo a enzima catalase (PL-CAT) e o outro sem enzima (PL-BRNCO). Após o processo de agitação em temperatura ambiente, e a consequente diminuição de solubilidade do polímero, a formação das nanoestruturas ocorre instantaneamente e é possível observar a turbidez dos sistemas (Figura 14), correspondente ao efeito Faraday-Tyndall, característico de sistemas dispersos ou coloidais, dada pela capacidade de difração da luz (ELMER KRAEMER;

DEXTER, 1927). As propriedades das soluções coloidais são ocasionadas pela grande proporção entre a área de superfície e o volume de partículas em escala nanométrica (KINGSLEY OGEMDI, 2019).

Figura 14: Diferença visual entre três soluções, da esquerda para direita, nas figuras A e B, respectivamente: água, PL-BRNCO (polimerossomas brancos) e PL-CAT (polimerossomas com a enzima catalase), sendo as amostras de nanoestruturas obtidas após o processo de purificação. Na figura B, pode-se observar a linha vermelha que corresponde ao feixe de laser, e o efeito Faraday-Tyndall nas soluções coloidais



Fonte: Autoria própria, 2022.

A EE% foi calculada a partir de duas metodologias: indireta e direta. A primeira, indica uma eficiência de encapsulação de $85 \% \pm 1 \%$, enquanto a segunda $2,3 \% \pm 0,9 \%$. Em trabalhos prévios do nosso grupo, foram produzidos polimerossomas de Pluronic L-121 encapsulando a enzima catalase de fígado bovino, e a EE% direta foi entre 2% e 5%. Enquanto a EE% indireta, ficou entre 0,5 e 46 % (OLIVEIRA et al., 2020). Contudo, a discrepância dos valores

calculados por cada metodologia é expressiva. Apolinário et al., 2019 descrevem que há uma superestimação da quantificação de proteínas quando a metodologia indireta é realizada, possivelmente, pela interação da cadeia polimérica, é possível aprisionamento de moléculas de enzima livre, que acabam sendo consideradas no cálculo da concentração de enzima encapsulada. Essa questão é abordada por outros autores, os quais levantam o questionamento sobre a possibilidade de falhas na estimativa da EE%, especialmente pela metodologia indireta (APOLINÁRIO et al., 2019; CLERICI et al., 2021).

5.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A caracterização dos sistemas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) pode ser observada na Figura 15. Os resultados da caracterização das formulações realizadas são apresentados na Tabela 6. A figura 15 apresenta a distribuição gaussiana de tamanho por intensidade dos polimerossomas contendo a enzima catalase (PL-CAT). Como foi observado, após a formulação das partículas, um sistema bimodal e as três leituras realizadas (curvas em diferentes cores) apresentaram a mesma tendência, atestando a reprodutibilidade da leitura.

Utilizando o método de dissolução direta para encapsulação de catalase de fígado bovino em condições semelhantes ao presente trabalho, Oliveira e colaboradores (2020) obtiveram partículas de 427 ± 16 nm, com um pdl de $0,562 \pm 0,061$. Valores esses, semelhantes aos obtidos neste trabalho. O diâmetro por intensidade pelo método de DLS é proporcional ao diâmetro hidrodinâmico da partícula, tornando o método analítico influenciado por populações de grandes partículas, como é característico de polimerossomas provenientes de

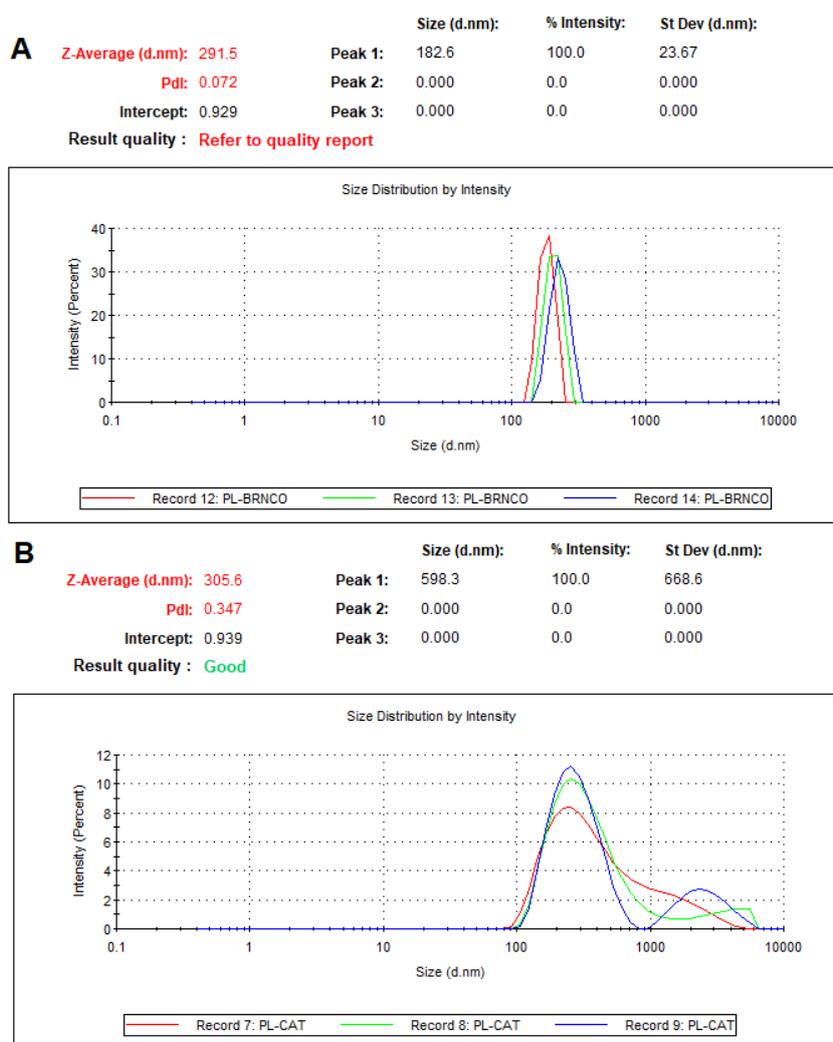
copolímeros anfifílicos (DAUBIAN et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020). Para resultados de DLS, deve-se adotar a ISO 22412-2008 para reportar valores de índice de polidispersão (pdl) (ISO, 2008). Esse índice é adimensional e compreende valores entre 0,05 e 0,7; números acima do máximo, indicam que provavelmente há uma distribuição de tamanho muito ampla, tornando a leitura pelo DLS inadequada (MALVERN PANALYTICAL, 2017).

O pdl pode ser definido como o desvio padrão da distribuição do diâmetro das partículas, dividido pelo diâmetro médio das partículas, sendo então utilizado para estimar a uniformidade das partículas em uma solução. Quanto maior o valor de pdl, maior a diferença de tamanho entre as partículas na amostra, porém também pode indicar a agregação de nanopartículas (CLAYTON et al., 2016).

Para a amostra de PL-CAT, observa-se um leve aumento na média do tamanho das nanoestruturas, contudo análises estatísticas indicam que a diferença entre a média do diâmetro de partículas, não é significativa (p -valor = 0,817). As análises de DLS indicam a existência de um sistema bimodal (Figura 15B), diferente da formulação com apenas os polimerossomas (Figura 15A) e como a técnica empregada neste trabalho envolve a formação das nanoestruturas a partir da mudança de temperatura em presença da enzima, um questionamento que deve surgir é se a proteína pode influenciar o processo de autoagregação e conseqüentemente a morfologia das nanoestruturas resultantes. Com o objetivo de responder este questionamento, foram analisados outros parâmetros além da distribuição de tamanho de partícula, sendo esses: o Potencial Zeta (Z) e a condutividade do sistema. Os valores indicam que a enzima não interferiu no processo de agregação do polímero e formação dos polimerossomas (todas as características mencionadas obtiveram

um p-valor > 0,05). O aumento em valor absoluto do potencial zeta em presença de catalase indica possível adsorção de moléculas de proteína na superfície das nanoestruturas. Porém, é necessário o emprego de outras metodologias de caracterização como microscopia eletrônica para averiguar a existência, ou não, de alterações morfológicas das nanoestruturas.

Figura 15: Curvas de DLS - distribuição de tamanho de nanopartículas em função da intensidade de luz espalhada para as formulações de polimerossomas. Em A, tem-se o DLS da formulação dos polimerossomas brancos (PL-BRNCO), ou seja, sem a enzima catalase. Em B, a formulação dos polimerossomas com catalase (PL-CAT).



Fonte: Autoria própria, 2023

Tabela 6: Caracterização das formulações de polimerossomas brancos e polimerossomas contendo catalase. Onde, Dh é o diâmetro médio dos polimerossomas; PDI o índice de polidispersão; Zp o potencial zeta. PL-BRNCO, são os polimerossomas brancos, sem a enzima; PL-CAT, são os polimerossomas que contém a enzima catalase.

Amostra	Dh (nm)	PDI	Zp (mV)	Condutividade (mS/cm)
PL-BRNCO	353 ± 161	0,383 ± 0,534	-9 ± 7	1057 ± 31
PL-CAT	389 ± 221	0,480 ± 0,228	-17 ± 13	1118 ± 126

Fonte: Autoria própria, 2023.

Outras metodologias envolvendo a utilização do Pluronic L121 para produção de polimerossomas, demonstraram a produção de vesículas menores, porém é válido ressaltar a utilização da técnica de extrusão, ou filtradas em filtros de policarbonato, sendo a primeira rotineiramente utilizado após a produção de nanopartículas, visando diminuir e homogeneizar o tamanho das partículas (SANSON et al., 2010; SCHILÉN; BRYSKHE; MEL'NIKOVA, 1999). Contudo, neste trabalho não foi necessário a utilização de tais metodologias, considerando que as partículas não obtiveram um tamanho exacerbado em comparação à formulação dos polimerossomas brancos e que são destinadas a uso tópico (BOS; MEINARDI, 2000; OLIVEIRA et al., 2021).

Apesar do tamanho aumentado dos polimerossomas contendo catalase – em comparação com a enzima livre e da “Regra dos 500 Da” para a penetração cutânea – que argumenta que apenas moléculas abaixo de 500 Da são

absorvidas pela pele (BOS; MEINARDI, 2000), acredita-se que polimerossomas formados por Pluronic L121 apresentem maior flexibilidade e resistência mecânica em comparação a outras nanoestruturas poliméricas (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2011). A sua capacidade de deformação e manutenção da estrutura, torna esse tipo de sistema veículos promissores para utilização tópica na pele (OLIVEIRA et al., 2021).

5.5 Peguilação

O processo de peguilação N-terminal é diretamente influenciado por variáveis como pH, temperatura, tempo de reação e força (GONZÁLEZ-VALDEZ; RITO-PALOMARES; BENAVIDES, 2012; SANTOS, 2019; SANTOS et al., 2018). O efeito da força iônica do tampão PBS na bioconjugação de moléculas de mPEG à enzima L-asparaginase foi recentemente investigado em diferentes concentrações molares, e foi observado que o melhor rendimento de reação foi obtido utilizando PBS 100 mM (SANTOS, 2019). Ainda de acordo com a literatura, a peguilação da catalase apresenta maior rendimento em pH = 8, durante 60 min, 22 °C, sob agitação constante (SANTOS et al., 2021).

O processo de peguilação ocorreu com PEG de 20 e 40 kDa. Logo após a conjugação do polímero com a enzima, o meio reacional foi analisado por eletroforese em gel nativo e o resultado pode ser observado na Figura 16. Nas duas colunas da direita, observa-se que houve a bioconjugação da enzima com o polímero. No entanto, apesar de ter ocorrido a peguilação, há uma grande quantidade de enzima que não reagiu com o PEG (linha 3). Para a amostra correspondente ao meio reacional da peguilação, é possível observar duas bandas: a banda superior corresponde à enzima poli-peguilada (linha 1), e a inferior (linha 2) correspondente à enzima mono-peguilada.

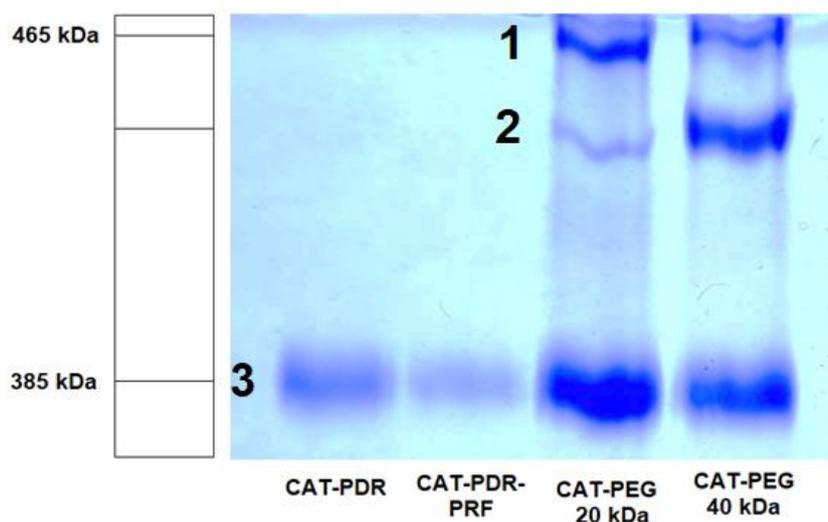
Observa-se na Figura 16, que as enzimas peguiladas, aparentemente, apresentam o mesmo tamanho, independente do tamanho da cadeia de PEG. Esse não é um comportamento incomum. No trabalho de Santos e colaboradores, em 2020, o gel nativo contendo as enzimas peguiladas, a catalase com PEG 20 e 40 kDa, apresentaram um comportamento semelhante ao da Figura 16. Na literatura, autores relatam a diminuição relativa na motilidade das frações peguiladas, sendo mais pronunciada com o aumento de massa molecular do polímero (AKBARZADEHLALEH et al., 2021; PARK et al., 2015). Além disso, a molécula linear de PEG não se comporta como proteínas globulares (SANTOS et al., 2019). Esses fatores interferem nos resultados obtidos por alguns métodos analíticos como o HPLC, FPLC e SDS-PAGE (AKBARZADEHLALEH et al., 2021; ZHENG; MA; SU, 2007), tornando os dados obtidos, em estimativas. Para confirmar essa hipótese, é necessário a realização de outros métodos analíticos para a caracterização das amostras como espectrometria de massas.

As amostras de enzima peguilada foram submetidas à purificação em coluna SEC, como pode-se observar nas Figuras 17 e 18. Os cromatogramas obtidos, corroboram com o gel da Figura 16. Na Figura 17, o cromatograma apresenta cinco frações eluídas em maior intensidade, assim como na Figura 18.

As amostras eluídas em 12.65 (Figura 17) e 12.69 (Figura 18) devem corresponder à enzima poli-peguilada, isto é, a catalase conjugada a mais de uma molécula de PEG. Como o método de cromatografia utilizado é de exclusão por tamanho, moléculas de maiores tamanhos não se difundem nos poros da fase estacionária da coluna, sendo então arrastadas por ela e eluídas primeiro

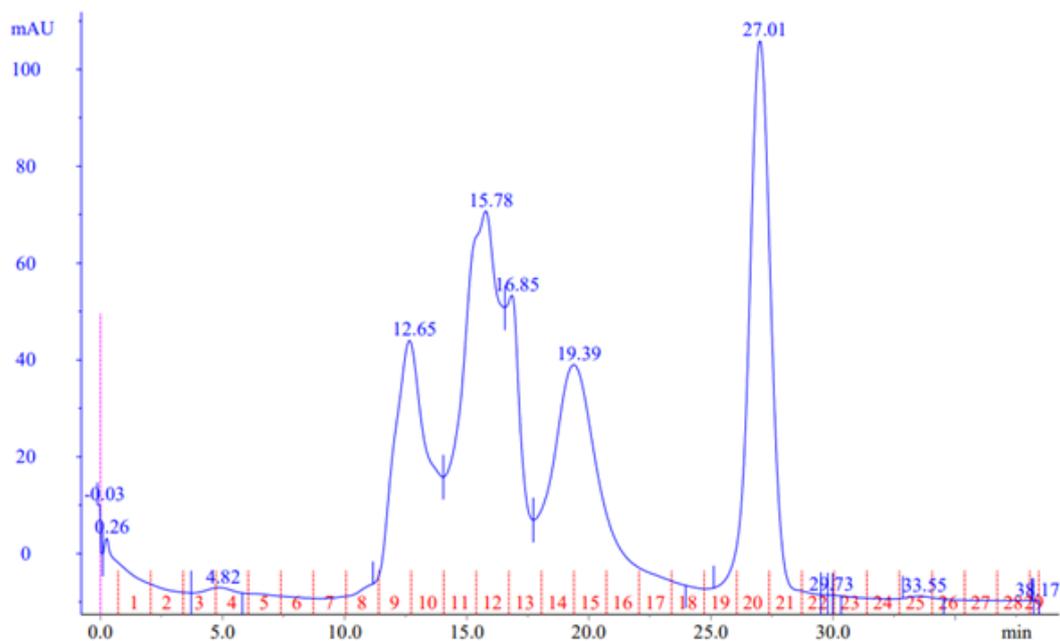
(GE HEALTHCARE, 2018; YOSHIMOTO; YAMAMOTO, 2012). Como o processo de peguilação se trata de uma reação química, a mistura reacional apresenta além do produto de interesse, produtos indesejados como espécies poli-peguiladas, por exemplo, as moléculas de PEG podem ter se ligado a outros resíduos de aminoácidos presentes na proteína, além de não conseguirem se ligar a todas as subunidades da enzima. Esse é um processo comum das reações de peguilação e normalmente ocorre, devido ao baixo rendimento de reação de peguilação (YOSHIMOTO; YAMAMOTO, 2012).

Figura 16: Gel nativo de eletroforese com amostras de catalase padrão e peguilada com PEG 20 e 40 kDa. Onde CAT-PDR, catalase padrão do extrato bruto, CAT-PDR-PRF, catalase purificada, CAT-PEG 20 kDa, catalase peguilada com PEG 20 kDa, CAT-PEG 40 kDa, catalase peguilada com PEG 40 kDa. A numeração 1, corresponde a enzima poli-peguilada, 2, a enzima mono-peguilada, 3, a enzima não peguilada.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 17: Cromatograma em coluna SEC, da enzima peguilada com PEG 20 kDa. Sendo as linhas em azul, a absorbância UV, a marrom pontilhada, a rosa, a injeção da amostra e os números em vermelho no inferior da imagem, as frações eluídas em volume de 1,0 mL.

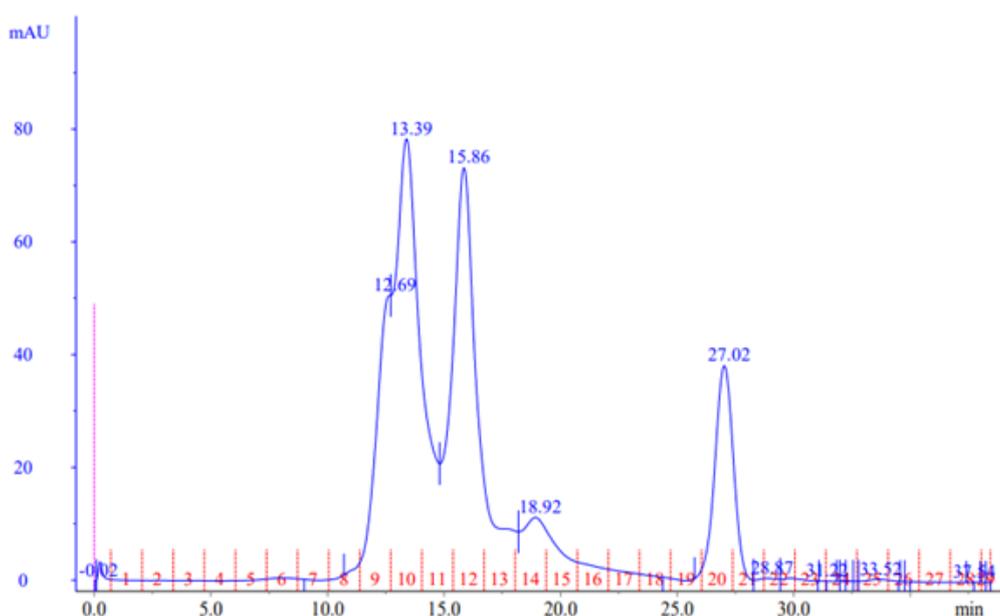


As amostras eluídas em 15.78 (Figura 17) e 13.39 (Figura 18), possivelmente correspondem à enzima mono-peguilada, ou seja, uma molécula de PEG em cada N-terminal de suas subunidades. Afinal, a segunda eluição, se trata da segunda maior molécula, maior que a enzima nativa, porém menor do que a enzima poli-peguilada. Na Figura 16 é possível observar a banda numeração 2, em ambos os tamanhos de PEG.

As amostras eluídas em 16.85 (Figura 17) e 15.86 (Figura 18), provavelmente correspondem à enzima não peguilada. Apesar dos tempos de retenção não serem os mesmos, e a mesma quantidade de amostra ter sido utilizada em todas as análises cromatográficas neste trabalho, a presença da enzima não peguilada é evidente na Figura 16, em ambas as reações de

peguilação. Possivelmente, os tempos de retenção apresentam essas pequenas variações devido à retirada de bolhas no interior da seringa, antes da injeção da amostra no equipamento.

Figura 18: Cromatograma da enzima peguilada com PEG 40 kDa. Sendo as linhas em azul, a absorbância UV, a marrom pontilhada, a rosa, a injeção da amostra e os números em vermelho no inferior da imagem, as frações eluídas em volume de 1,0 mL.



Devido à significativa sobreposição dos picos, infelizmente não conseguimos separar as formas poli e monopeguiladas. No entanto, a partir da integração dos picos dos cromatogramas, o rendimento total da peguilação, considerando as formas mono e poli-peguiladas, calculado para a reação com PEG 20 e 40 kDa, foi de $52\% \pm 5\%$, e $44\% \pm 12\%$, respectivamente. Analisando a Figura 16, pode-se observar que ao comparar ambas formulações, a enzima peguilada com o PEG 40 kDa, apresentou um maior rendimento na

monopeguilação à enzima peguilada com o PEG 20 kDa. Esse fato pode ter sido ocasionado pelo processo de impedimento estérico causado pelo maior tamanho do primeiro PEG mencionado, em relação ao outro (diferença de 20,000 Da) e ao grande tamanho da enzima catalase de *A. niger*. Como a formulação é composta por uma maior quantidade de moléculas grandes em relação a outra, os sítios disponíveis para peguilação da enzima, acabam sendo afastados das moléculas de PEG 40 kDa com maior facilidade, em relação ao PEG 20 kDa, e esta situação acaba favorecendo, em conjunto com as condições experimentais, a monopeguilação pelo maior PEG. Cabe ressaltar que para aplicação tópica a mistura dos dois tipos de peguilação (mono e poli) seria mais adequada. O maior rendimento observado na amostra com PEG 20 kDa em relação ao de 40 kDa, possivelmente ocorreu devido ao menor impedimento estérico da molécula de PEG e a catalase, promovendo uma maior possibilidade de ligação entre o polímero e a enzima.

As amostras eluídas em 19.39 (Figura 17) e 18.92 (Figura 18) podem corresponder ao mesmo pico em 19.03 na Figura 13. Essa fração pode ser tanto uma impureza, que não foi observada no gel nativo, ou derivada da degradação enzimática por fatores externos, como o processo de purificação, mudanças de temperatura, entre outros. A confirmação sobre a identidade destas amostras será obtida a partir do cálculo do tamanho aproximado da molécula, a partir da análise dos cromatogramas do FPLC em ensaios de atividade enzimática. Por último, as moléculas de mPEG-NHS que não reagiram foram eluídas em 27.01 (Figura 17) e 27.02 (Figura 18).

5.6. Estudos de penetração cutânea

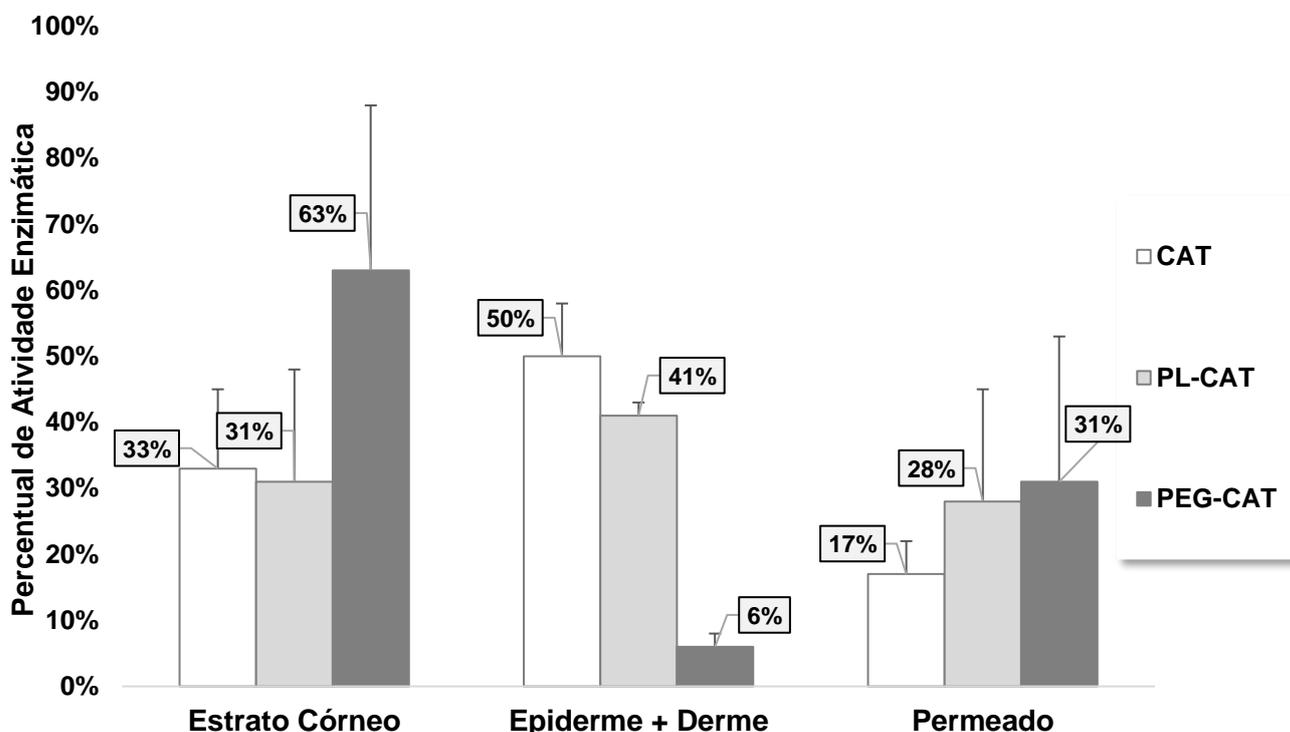
A penetração da enzima livre, nanoencapsulada e peguilada foi estudada em modelo de pele de porco. Os ensaios da atividade enzimática foram realizados após 24h de difusão cutânea nas células de Franz. Nas Figuras 19 e 20, observam-se os resultados de atividade enzimática determinada nas amostras de estrato córneo, epiderme viável (epiderme + derme) e permeado, em porcentagem e em kU/cm².

Como observado na Figura 19, no estrato córneo (EC), houve um acúmulo de 63% da atividade da formulação PEG-CAT, sendo seguida pela catalase nativa (CAT) em 33% e por 31% de PL-CAT. A enzima livre, CAT, acumulou em maior quantidade na epiderme + derme (E+D), assim como a PL-CAT (50% e 41%, respectivamente). No entanto, observa-se que no geral a penetração e permeação da enzima nanoencapsulada foi superior. A enzima livre acumulou 88% da atividade nas camadas de EC e E+D, enquanto que a enzima nanoencapsulada acumulou 68% nas regiões de E+D e P. A média de atividade enzimática das formulações por camada pode ser observada na Figura 20.

Sendo a catalase descrita como mais ativa nas camadas mais externas da epiderme (SHINDO; WITT; PACKER, 1993), a formulação PEG-CAT se demonstra uma excelente candidata para utilização local tópica da enzima, considerando a concentração de atividade enzimática no EC. Com o auxílio da Figura 20, observa-se o aumento da média da atividade da enzima peguilada (0,252 kU/cm²) em relação à enzima livre (0,195 kU/cm²) e a enzima nanoencapsulada (0,180 kU/cm²), no EC. Do ponto de vista estatístico, com o valor de significância de 5%, a atividade das amostras no EC não apresenta diferenças significativas entre si (contraste de médias < 0,08; p-valor > 0,05),

porém ao se comparar as percentagens de atividade das formulações PL-CAT e PEG-CAT no EC (Figura 19) é possível afirmar que, percentualmente, a formulação PEG-CAT apresenta uma atividade superior em relação a PL-CAT e CAT.

Figura 19: Percentual de atividade enzimática por área (cm²) das formulações estudadas por camada da pele. Na primeira coluna, os resultados correspondem as proporções em percentagem das formulações de catalase nativa (CAT), catalase encapsulada em polimerossomas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

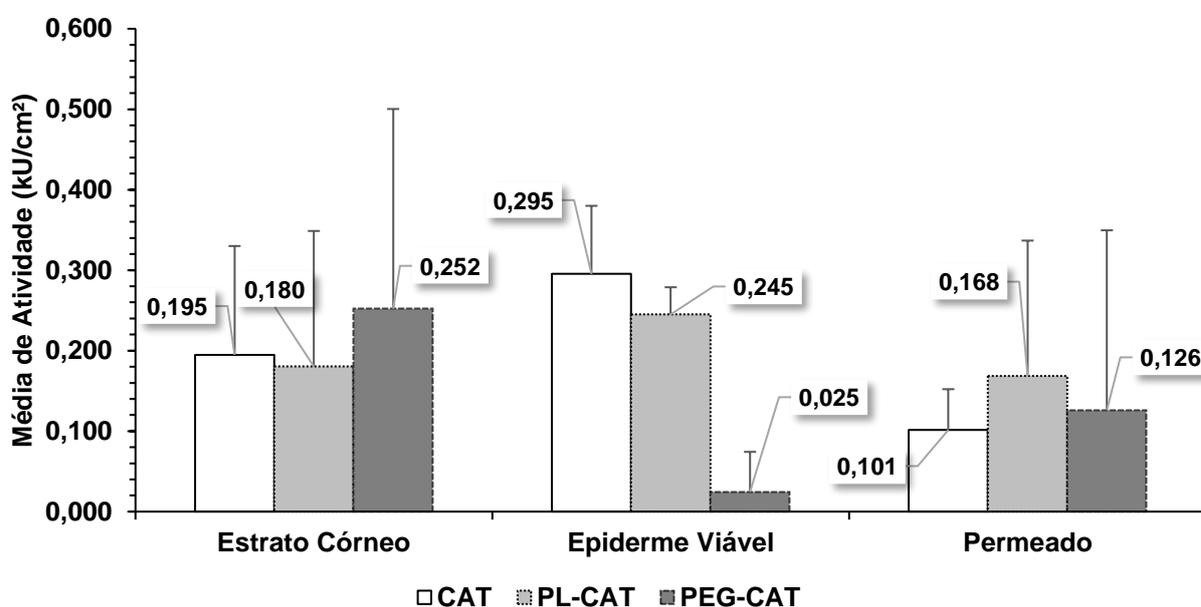


Fonte: Autoria própria, 2023.

A diferença observada entre o acúmulo de CAT e PEG-CAT no EC pode resultar do aumento do raio hidrodinâmico da enzima, oriundo da bioconjugação com o PEG (SANTOS et al., 2018), não somente a influência no aumento de sua

estrutura, mas também a hidrofiliçidade concedida pelo PEG dificulta a permeaçãõ pela camada lipofílica do EC. Além disso, a camada de PEG ao redor da enzima apresenta o potencial de proteçãõ contra proteases e peptidases por impedimento estérico, diminuindo as chances de degradaçãõ da enzima (SWIERCZEWSKA; LEE; LEE, 2015). É válidõ ressaltar que nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, as formulações ficaram 24h em contato direto em soluçãõ de tampãõ com a pele de porco, facilitando a manutençãõ da hidrataçãõ da pele, especialmente do EC, que é caracterizado por ser a camada hidrofóbica da pele.

Figura 20: Média de atividade enzimática por área (cm²) das formulações estudadas por camada. Sendo CAT, a catalase nativa; PL-CAT, os polimerossomas contendo catalase; PEG-CAT, a catalase peguilada. As barras de erro correspondem ao desvio padrãõ.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Porém, é possível observar o decaimento expressivo na atividade da formulação PEG-CAT nas camadas subsequentes, sendo praticamente 0 na epiderme viável (E+D), restaurando sua atividade no permeado (P). A baixa atividade na E+D, pode estar relacionada com a “Regra dos 500 Da” para a penetração cutânea em que, de acordo com esta regra, apenas moléculas abaixo de 500 Da são absorvidas pela pele (BOS; MEINARDI, 2000). Apesar de neste trabalho, a penetração cutânea não tenha sido avaliada de forma quantitativa, é muito provável que a baixa de atividade na E+D, derive da grande ausência da enzima peguilada nesta camada. Estudos prévios, corroboram com esta hipótese, em que pesquisadores utilizando a bioconjugação do mPEG com a azitromicina demonstraram que a permeação cutânea variou de acordo com o tamanho da cadeia de PEG, visto que quanto maior, menor o potencial de penetração do fármaco peguilado nas camadas da pele (N’DA; BREYTENBACH, 2009). Contudo, a permeação cutânea de moléculas peguiladas pode ser incrementada utilizando técnicas que facilitem o processo, como por exemplo: o microagulhamento (MILEWSKI et al., 2010).

É válido ressaltar que, até o presente momento, existem poucos estudos que avaliem a permeação cutânea de moléculas peguiladas, que não sejam nanopartículas, demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados acerca dos mecanismos que interferem na permeação dérmica dos sistemas peguilados.

A formulação PL-CAT, por sua vez, resultou em aumento significativo de atividade no fluido receptor, tornando esta formulação candidata promissora para a aplicação de enzimas visando penetração dérmica mais eficiente e permeação cutânea. Os mecanismos que podem estar relacionados à maior

penetração e permeação são: 1- o caráter promotor de permeação atribuído ao Pluronic L121 e 2 - a capacidade de translocação de membranas atribuída aos polimerossomas (CAPPEL; KREUTER, 1991; PEGORARO et al., 2014). Essa característica lábil dos carreadores, somado aos achados deste trabalho, indicam que uma formulação tópica contendo polimerossomas encapsulando catalase, é uma forte candidata para utilização em tratamentos dermatológicos específicos para as camadas intermediárias da pele. Por exemplo, problemas de acne (AL-SHOBAILI, 2014), vitiligo (MARESCA et al., 1997) e aumento das defesas do sistema antioxidante na epiderme após a radiação UVB (PENGE; NAYLOR, 1990).

No fluido receptor das células de Franz, tem-se o permeado, tudo o que conseguiu permear pelas camadas da pele, (P). Do ponto de vista estatístico, observa-se uma diferença pequena entre as médias de atividades para as formulações estudadas (p -valor = 0,149). De acordo com a Figura 20, a média de atividade no P decaiu em relação à atividade no EC para todas as formulações, especialmente para a catalase nativa, o que já era esperado, considerando a dificuldade de permeação de moléculas grandes e hidrofílicas.

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, enzima catalase do fungo *Aspergillus niger* foi purificada por precipitação com sulfato de amônio, resultando em rendimento aparente em relação à atividade enzimática específica de 128% fator de purificação de 10,5 e aumento de 10 vezes na atividade específica da enzima. A enzima purificada foi nanoencapsulada em polimerossomas ou alternativamente peguilada. Os polimerossomas contendo catalase nanoencapsulada apresentaram diâmetro

hidrodinâmico de 388 ± 221 nm, PDI de $0,480 \pm 0,228$, e EE% de $2,3 \% \pm 0,9 \%$. Enquanto a reação de peguilação ocorreu com PEG de 20 e 40 kDa, com rendimentos de $52\% \pm 5\%$, e $44\% \pm 12\%$, respectivamente.

Ensaio *in vitro* de penetração/permeação em pele de orelha porco foram realizados e, a partir do cálculo da atividade enzimática média por área, é possível observar diferentes tendências, a depender da finalidade desejada. Com a superioridade de atividade da formulação peguilada em se acumular no estrato córneo, esta formulação se torna ideal para aplicação tópica, visando uma atividade mais externa na pele. Sua adição em produtos pré-exposição solar, por exemplo, pode ser vantajosa e deve ser aprofundada. A encapsulação em polimerossomas, por sua vez, promoveu maior permeação. Essa formulação deve ser mais explorada, considerando o seu potencial de atingir camadas mais profundas da pele, podendo ser útil em condições como acne e o vitiligo, por exemplo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase. Em: **Methods of Enzymatic Analysis**. 2. ed. 1974. p. 673–684.
- AKBARZADEHLALEH, P. et al. The effect of length and structure of attached polyethylene glycol chain on hydrodynamic radius, and separation of PEGylated human serum albumin by chromatography. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 11, n. 4, p. 728–738, 2021.
- AL-SHOBAILI, H. A. Oxidants and Anti-Oxidants Status in Acne Vulgaris Patients with Varying Severity. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 44, p. 202–207, 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts and Figures 2023 Atlanta: American Cancer Society**. 2023.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. Quality-by-Design Approach for Biological API Encapsulation into Polymersomes Using “Off-the-Shelf” Materials: a Study on L-Asparaginase. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 1–12, 2019.
- ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 3–13, jan. 2014.
- AUL, P.; STRICKLAND, T. **Photocarcinogenesis by Near-Ultraviolet (UV A) Radiation in Sencar Mice**The Society of Investigative Dermatology. 1986.
- AUSTIN, E. et al. Visible light. Part I: Properties and cutaneous effects of visible light. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 84, n. 5, p. 1219–1231, 1 maio 2021.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, 1 dez. 2019.
- BATTIE, C. et al. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. **Experimental dermatology**, v. 23, p. 7–12, 1 out. 2014.
- BAYKAL SARI, E.; YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ, Y. Aspergillus niger Katalazının Üretimi, Üçlü-Faz Ayırma ile Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, p. 12–24, 20 abr. 2020.
- BENNET, D.; KIM, S. Evaluation of UV radiation-induced toxicity and biophysical changes in various skin cells with photo-shielding molecules. **Royal Society of Chemistry**, v. 140, n. 18, p. 6343–6353, 2015.
- BERNEBURG, M.; PLETTENBERG, H.; KRUTMANN, J. Photoaging of human skin. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v. 16, p. 239–244, 2000.
- BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2565–2575, 2006.
- BIOIONZV, B. : et al. Photochemistry Photobiology Mexoryl SX: a broad absorption UVA filter protects human skin from the effects of repeated suberythemal doses of UVA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 44, p. 69–76, 1998.
- BLACK, A. T. Ultraviolet B. Em: **Encyclopedia of Toxicology: Third Edition**. Elsevier, 2014. p. 896–898.

- BOS, J. D.; MEINARDI, M. M. H. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 3, p. 165–169, jun. 2000.
- BRANDNER, J. M.; SCHULZKE, J. D. Hereditary barrier-related diseases involving the tight junction: lessons from skin and intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 360, n. 3, p. 723–748, 2015.
- BRASH, D. E. et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 22, p. 10124–10128, 1991.
- BROWN, R. E.; JARVIS, K. L.; HYLAND, K. J. Protein Measurement Using Bicinchoninic Acid: Elimination of Interfering Substances. **ANALYTICALBIOCHEMISTRY**, v. 180, p. 136–139, 1989.
- BURKE, K. E. Mechanisms of aging and development—A new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 172, n. November 2017, p. 123–130, 2018.
- CAON, M. **Examination Questions and Answers in Basic Anatomy and Physiology**. 3. ed. Springer, 2016.
- CAPPEL, M. J.; KREUTER, J. K. Effect of nanoparticles on transdermal drug delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 8, n. 3, p. 369–374, 1991.
- CHEN, X. et al. Catalase transgenic mice: Characterization and sensitivity to oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 422, n. 2, p. 197–210, 15 fev. 2004.
- CLAYTON, K. N. et al. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. **Biomicrofluidics**, v. 10, n. 5, 1 set. 2016.
- CLERICI, M. et al. Pitfalls of Accurate Protein Determination inside PLGA Nanoparticles Using the Micro BCA Assay. **Proceedings**, v. 78, n. 28, p. 1–8, 4 fev. 2021.
- CORRÊA, M. D. P. Solar ultraviolet radiation: Properties, characteristics and amounts observed in Brazil and south America. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 3, p. 297–313, 7 jul. 2015.
- CORRÊA, M. P.; DUBUISSON, P.; PLANA-FATTORI, A. An Overview of the Ultraviolet Index and the Skin Cancer Cases in Brazil. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 1, p. 49–54, 2003.
- DAUBIAN, D. et al. One-Pot Synthesis of an Amphiphilic ABC Triblock Copolymer PEO- b-PEHOx- b-PEToz and Its Self-Assembly into Nanoscopic Asymmetric Polymersomes. **Macromolecules**, v. 53, n. 24, p. 11040–11050, 22 dez. 2020.
- DAVIES, K. J. A. **Oxidative stress: the paradox aerobic life of Biochem. SOC. Symp. 6 I**. [s.l.: s.n.].
- DE BENEDETTO, A. et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 773- 786, 2011.
- DÍAZ, A. et al. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1323–1333, 2001.
- D’ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 2013.

DRUGBANK. **Methionine**. Disponível em: <go.drugbank.com/drugs/DB00134>. Acesso em: 19 out. 2021a.

DRUGBANK. **Lysine**. Disponível em: <go.drugbank.com/drugs/DB00123>. Acesso em: 19 out. 2021b.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 347–360, 2003.

EIDT, L. M. Cutaneous Aging and Dermatoses in Geriatric Patients. **Dermatology in Public Health Environments**, p. 689–716, 2018.

ELIAS, P. M. Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 125, p. 183–200, 2005.

ELMER KRAEMER, B. O.; DEXTER, S. T. THE LIGHT-SCATTERING CAPACITY (TYNDALL EFFECT) AND COLLOIDAL BEHAVIOUR OF GELATIN SOLS AND GELS. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 764–782, 1927.

ENCOR, B. I. **Ammonium Sulfate Calculator**. Disponível em: <www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>. Acesso em: 4 set. 2022.

FAITH, W. T.; NEUBECK, C. E.; REESE, E. T. Production and Applications of Enzymes. Em: **Advances in Biochemical Engineering**. [s.l.: s.n.]. v. 1.

FALAHATI, M. et al. Fractionation and identification of the allergic proteins in *Aspergillus* species. **Current Medical Mycology**, v. 2, n. 4, p. 37–45, 1 dez. 2016.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FERNANDES, A. I.; GREGORIADIS, G. Synthesis, characterization and properties of sialylated catalase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1293, p. 90–96, 1996.

FERNANDEZ-FLORES, A.; SAEB-LIMA, M. Histopathology of Cutaneous Aging. **American Journal of Dermatopathology**, v. 41, n. 7, p. 469–479, 2019.

FINN, R. F. PEGylation of human growth hormone: strategies and properties. **PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications**, p. 187–203, 2009.

FISHER, G. J. et al. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. **Arch Dermatol**, v. 138, p. 1462–1470, 2002.

FOSTER, J. PEGylation and BioPEGylation of Polyhydroxyalkanoates: Synthesis, Characterisation and Applications. Em: **Biopolymers**. [s.l.: s.n.].

FRANCO, A. C.; AVELEIRA, C.; CAVADAS, C. Skin senescence mechanisms and impact on whole-body aging. **Trends in Molecular Medicine**, v. 28, n. 2, 2022.

GAETANI, G. F. et al. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. **Blood**, v. 87, n. 4, p. 1595–1599, 1996.

GE HEALTHCARE, G. H. **Size Exclusion Chromatography Principles and Methods**. [s.l.: s.n.].

GEHRING, W.; ROSBASH, M. The Coevolution of Blue-Light Photoreception and Circadian Rhythms. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. S1, 2003.

- GIULIANO, E. et al. Drug-Loaded Biocompatible Nanocarriers Embedded in Poloxamer 407 Hydrogels as Therapeutic Formulations. **Medicines**, v. 6, n. 1, p. 7, 2018.
- GONZÁLEZ-VALDEZ, J.; RITO-PALOMARES, M.; BENAVIDES, J. Advances and trends in the design, analysis, and characterization of polymer-protein conjugates for “PEGylated” bioprocesses. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 8, p. 2225–2235, jun. 2012.
- GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: Looking for complete identity. **Protein and Cell**, v. 1, n. 10, p. 888–897, 2010.
- GROMADA, A.; FIEDUREK, J. Optimization of catalase biosynthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* mutant. **Journal of Basic Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 85–91, 1997.
- GROMIHA, M. M.; NAGARAJAN, R.; SELVARAJ, S. Protein structural bioinformatics: An overview. Em: **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 1–3p. 445–459.
- HAAG, R.; KRATZ, F. Polymer therapeutics: Concepts and applications. **Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 1198–1215, 2006.
- HADWAN, M. H.; ABED, H. N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. **Data in Brief**, v. 6, p. 194–199, 1 mar. 2016.
- HARVEY, C.; LONGBOTTOM, J. L. **Characterization of a major antigenic component of *Aspergillus fumigatus*** *Clin. exp. Immunol.* [s.l.: s.n.].
- HEARN, V. M.; WILSON, E. V.; MACKENZIE, D. W. R. **Analysis of *Aspergillus fumigatus* catalases possessing antigenic activity** *J. Med. Microbiol.* [s.l.: s.n.].
- HEKIMI, S.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 569–576, 2011.
- HELLEMANS, L. et al. Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 3, p. 434–439, 2003.
- HOLMES, E. A.; RODNEY HARRIS, R. M.; LUCAS, R. M. Low Sun Exposure and Vitamin D Deficiency as Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease, With a Focus on Childhood Onset. **Photochemistry and Photobiology**, v. 95, n. 1, p. 105–118, 1 jan. 2019.
- HONARI, G.; MAIBACH, H. **Skin Structure and Function in Applied Dermatotoxicology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 1–10
- HU, Y.; QIU, L. Polymersomes: Preparation and characterization. **Methods in Molecular Biology**, v. 2000, p. 247–265, 2019.
- HUANG, Y. et al. UVA-induced photoaging inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal function in dermal fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 518, n. 4, p. 611–618, 22 out. 2019.
- HUSSAIN, Z. et al. PEGylation: a promising strategy to overcome challenges to cancer-targeted nanomedicines: a review of challenges to clinical transition and promising resolution. **Drug Delivery and Translational Research**, p. 721–734, 2019.

- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 2018.
- IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide : analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical Journal**, v. 320, p. 61–67, 1996.
- JACOB, G. S.; ORME-JOHNSON. Catalase of *Neurospora crassa*. 1. Induction, Purification, and Physical Properties. **American Chemical Society**, v. 18, n. 14, p. 2967–2975, 1979.
- JANKOVSKAJA, S. et al. Visualisation of H₂O₂ penetration through skin indicates importance to develop pathway-specific epidermal sensing. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 12, 2020.
- JUSSILA, A. et al. Narrow-band ultraviolet B radiation induces the expression of β -endorphin in human skin in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 155, p. 104–108, 1 fev. 2016.
- KARG, E. et al. Hydrogen Peroxide as an Inducer of Elevated Tyrosinase Level in Melanoma Cells. **The Society of Investigative Dermatology**, v. 100, 1993.
- KAUSHAL, J. et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192–199, 1 out. 2018.
- KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, maio 2011.
- KIKUCHI-TORII, K. et al. Properties of *Aspergillus Niger* catalase. **Journal of Biochemistry**, v. 92, n. 5, p. 1449–1456, 1982.
- KINGSLEY OGEMDI, I. Properties and Uses of Colloids: A Review. **Colloid and Surface Science**, v. 4, n. 2, p. 24, 2019.
- KIRSCHNER, N. et al. CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 4, p. 932–943, 2011.
- LAN, C. C. E. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. **Experimental Dermatology**, v. 28, p. 23–27, 2019.
- LAN, C. C. E. et al. Effects of irradiance on UVA-induced skin aging. **Journal of Dermatological Science**, v. 94, n. 1, p. 220–228, 1 abr. 2019.
- LI, F. et al. Pluronic polymersomes stabilized by core cross-linked polymer micelles. **Soft Matter**, v. 5, n. 20, p. 4042–4046, 2009.
- LI, W. et al. Current drug research on PEGylation with small molecular agents. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3–4, p. 421–444, 2013.
- LIAO, J. et al. Recent Advances in Formation, Properties, and Applications of Polymersomes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 23, p. 3432–3441, 2012.
- LIGUORI, I. et al. Oxidative Stress and Diseases. **Oxidative Stress and Diseases**, p. 757–772, 2012.
- LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013.

LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1990–2042, 2015.

MALVERN PANALYTICAL. **Dynamic Light Scattering - Common Terms Defined**. Disponível em: <www.malvernpanalytical.com/br/learn/knowledge-center/whitepapers/wp111214dlstermsdefined>. Acesso em: 26 set. 2022.

MARESCA, V. et al. Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 3, p. 310–313, 1997.

MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Detection of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radicals in Murine Skin Fibroblasts under UVB Irradiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, n. 2, p. 474–479, 1995.

MENG, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Stimuli-responsive polymersomes for programmed drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 2, p. 197–209, 2009.

MIŁĘK, J. Estimation of the kinetic parameters for H₂O₂ enzymatic decomposition and for catalase deactivation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 995–1004, 2018.

MIŁĘK, J. Thermodynamics and kinetics of thermal deactivation of catalase *Aspergillus Niger*. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 22, n. 2, p. 67–72, 2020.

MILEWSKI, M. et al. In vitro permeation of a pegylated naltrexone prodrug across microneedle-treated skin. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 1, p. 37–44, ago. 2010.

MILTON, N. G. N. Amyloid- β binds catalase with high affinity and inhibits hydrogen peroxide breakdown. **Biochemical Journal**, v. 344, n. 2, p. 293–296, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **INCA lança a Estimativa 2023 - Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/inca-lanca-a-estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil/>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

MOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; WILKINSON, A. E.; JONES, M. N. Characterization of *Aspergillus niger* catalase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, p. 327–332, 1987.

MVANGO, S. et al. Nanomedicines for Malaria Chemotherapy: Encapsulation vs. Polymer Therapeutics. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 12, 2018.

NAFISI, S.; MAIBACH, H. I. Skin penetration of nanoparticles. Em: **Emerging Nanotechnologies in Immunology: The Design, Applications and Toxicology of Nanopharmaceuticals and Nanovaccines**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 47–88.

NANDI, A. et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–19, 2019.

N’DA, D. D.; BREYTENBACH, J. C. Synthesis of methoxypoly(ethylene glycol) carbonate prodrugs of zidovudine and penetration through human skin in vitro. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 6, p. 721–731, 21 maio 2009.

NICHOLLS, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. ENZYMOLOGY AND STRUCTURE OF CATALASES. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 51–106, 2001.

- NORLUND, J. J. The Melanocyte and the Epidermal Melanin Unit: An Expanded Concept. **Dermatologic Clinics**, v. 25, n. 3, p. 271–281, jul. 2007.
- NORLÉN, L. Skin Barrier Formation: The Membrane Folding Model. **The Society for Investigative Dermatology**, 2001.
- OLIVEIRA, C. A. et al. Development of triblock polymersomes for catalase delivery based on quality by design environment. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 126–135, 2020.
- OLIVEIRA, C. A. et al. Catalase-loaded polymersomes as a promising safe ingredient to active photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 7, p. 100056, 2021.
- 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. 281–299, 2014.
- ÖZMEN, B. et al. Lens superoxide dismutase and catalase activities in diabetic cataract. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 69–72, 2002.
- PAPACCIO, F. et al. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. **Antioxidants**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2022.
- PARK, E. J. et al. Differences in electrophoretic behavior between linear and branched PEG-conjugated proteins. **Electrophoresis**, v. 36, n. 6, p. 918–923, 1 mar. 2015.
- PASSERON, T.; PICARDO, M. Melasma, a photoaging disorder. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 31, n. 4, p. 461–465, 2018.
- PEGORARO, C. et al. Translocation of flexible polymersomes across pores at the nanoscale. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 5, p. 680–692, 2014.
- PENCE, B. C.; NAYLOR, M. F. Effects of Single-Dose Ultraviolet Radiation on Skin Superoxide Dismutase, Catalase, and Xanthine Oxidase in Hairless Mice. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 95, p. 213–216, 1990.
- PERCY, M. E. Catalase: an old enzyme with a new role?'. **Can J Biochem Cell Biol**, v. 62, 1983.
- PITTO-BARRY, A.; BARRY, N. P. E. Pluronic® block-copolymers in medicine: From chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 3291–3297, 2014.
- POLJŠAK, B.; DAHMANE, R. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatology Research and Practice**, v. 2012, 2012.
- POLJŠAK, B.; DAHMANE, R. G.; GODIĆ, A. Intrinsic skin aging: The role of oxidative stress. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 21, n. 2, p. 33–36, 2012.
- PROCHAZKOVA, M. et al. Embryonic Versus Adult Stem Cells. Em: **Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 249–262.
- PUBCHEM. **Methionine** | **C5H11NO2S** - **PubChem**. Disponível em: <pub.chem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methionine>. Acesso em: 19 out. 2021a.
- PUBCHEM. **Lysine** | **C6H14N2O2** - **PubChem**. Disponível em: <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5962#section=pKa>. Acesso em: 19 out. 2021b.

- PUTNAM, C. et al. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 1, p. 295–309, 2000.
- QURESHI, A. A. et al. Geographic Variation and Risk of Skin Cancer in US Women Differences Between Melanoma, Squamous Cell Carcinoma, and Basal Cell Carcinoma. **American Medical Association**, v. 168, n. 5, p. 501–507, 2008.
- RAMOS, O. L.; XAVIER MALCATA, F. Food-grade enzymes. Em: **Comprehensive Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 587–603.
- RAVEENDRAN, S. et al. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16–30, 2018.
- RIDEAU, E. et al. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. **Chemical Society reviews**, v. 47, n. 23, p. 8572–8610, 2018.
- ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 116–127, 2012.
- ROBERTS, S. M.; GIBB, A. J. Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs. Em: **Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development: Theory and Case Studies**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 1–55.
- RODRÍGUEZ-GARCÍA, R. et al. Polymersomes: Smart vesicles of tunable rigidity and permeability. **Soft Matter**, v. 7, n. 4, p. 1532–1542, 21 fev. 2011.
- RUIS, H. The biosynthesis of catalase. **National Research Council of Canada**, v. 57, n. 9, p. 1122–1130, 1979.
- SANSON, C. et al. Biocompatible and biodegradable poly(trimethylene carbonate)-b-Poly (L-glutamic acid) polymersomes: Size control and stability. **Langmuir**, v. 26, n. 4, p. 2751–2760, 16 fev. 2010.
- SANTOS, J. H. P. M. et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: From reaction to purification processes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–17, 2018.
- SANTOS, J. H. P. M. **PEGylation strategy to the development of analytical and therapeutic proteins**. [s.l.] Universidade de Aveiro, 2019.
- SANTOS, J. H. P. M. et al. An integrated process combining the reaction and purification of PEGylated proteins. **Green Chemistry**, v. 21, n. 23, p. 6407–6418, 2019.
- SANTOS, J. H. P. M. et al. Pegylated catalase as a potential alternative to treat vitiligo and UV induced skin damage. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 30, 15 jan. 2021.
- SCHALLREUTER, K. U. et al. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: More evidence for oxidative stress in vitiligo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 2, p. 502–508, 2004.
- SCHIKOWSKI, T.; HÜLS, A. Air Pollution and Skin Aging. **Current environmental health reports**, v. 7, n. 1, p. 58–64, 1 mar. 2020.

- SCHILÉN, K.; BRYSKHE, K.; MEL'NIKOVA, Y. S. Vesicles formed from a poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in dilute aqueous solution. **Macromolecules**, v. 32, n. 20, p. 6885–6888, 1999.
- SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger* - A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4–5, p. 426–435, 2002.
- SEN, C. K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. **Med. Sci. Sports Exerc**, v. 33, n. 3, p. 368–370, 2001.
- SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular Cell**, v. 48, n. 2, p. 158–167, 2012.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant Defense Mechanisms in Murine Epidermis and Dermis and Their Responses to Ultraviolet Light. **The Society of Investigative Dermatology**, v. 100, p. 260–265, 1993.
- SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. Em: **Oxidative Stress**. [s.l.] Elsevier, 1985. p. 1–8.
- SIES, H. PHYSIOLOGICAL SOCIETY SYMPOSIUM: IMPAIRED ENDOTHELIAL AND SMOOTH MUSCLE CELL FUNCTION IN OXIDATIVE STRESS OXIDATIVE STRESS: OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291–295, 1997.
- SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 1 abr. 2015.
- SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, n. 2017, p. 613–619, 2017.
- SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020.
- SITUM, M. [et al. Skin Changes in the Elderly People-How Strong is the Influence of the UV Radiation on Skin Aging? **Collegium Antropologicum**, v. 34, p. 9–13, 2010.
- SIVA KUMAR, T. et al. Toxicity evaluation of ammonium sulfate to albino rat. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 1, p. 313–316, 1 jan. 2017.
- SIVARANJANI, N.; VENKATA RAO, S.; RAJEEV, G. Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 12, p. 2683–2685, 2013.
- SPENCER, J. D. et al. Oxidative stress via hydrogen peroxide affects proopiomelanocortin peptides directly in the epidermis of patients with vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 2, p. 411–420, 2007.
- STÜCKER, M. et al. The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. **Journal of Physiology**, v. 538, n. 3, p. 985–994, 2002.
- SUGANO, N.; ITO, K.; MURAI, S. Cyclosporin A inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human fibroblasts. **FEBS Letters**, v. 447, n. 2–3, p. 274–276, 1999.

SUGAWARA, T. et al. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 70, n. 1, p. 12–18, abr. 2013.

SULLIVAN, N. J. et al. UV light B-mediated inhibition of skin catalase activity promotes Gr-1 + CD11b+ myeloid cell expansion. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 695–702, 2012.

SURYANI; AMBARSARI, L.; LINDAWATI, E. **Isolation, Fractionation and Characterization of Catalase from Neurospora crassa (InaCC F226)**. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...**Institute of Physics Publishing, 4 abr. 2017.

SWIERCZEWSKA, M.; LEE, K. C.; LEE, S. What is the future of PEGylated therapies? **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 20, n. 4, p. 531–536, 2 out. 2015.

SYED, D. N.; MUKHTAR, H. Gender bias in skin cancer: Role of catalase revealed. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 512–514, 2012.

TAKEMOTO, K. et al. Low catalase activity in blood is associated with the diabetes caused by alloxan. **Clinica Chimica Acta**, v. 407, n. 1–2, p. 43–46, 2009.

TAKIO, N. et al. Purification, characterization, immobilization and kinetic studies of catalase from a novel source *Sechium edule*. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 53, n. 5, p. 596–610, 1 maio 2021.

THAKUR, R. et al. Structural and Biochemical Changes in Aging Skin and Their Impact on Skin Permeability Barrier. Em: **Skin Aging Handbook**. [s.l.] William Andrew Inc., 2009. p. 55–90.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, v. 26, n. 1, p. 37–46, 2017.

UNIVERSITY COLLEGE LONDON. **Ammonium Sulphate Fractionation**. Disponível em: <www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzpur/amso4.htm>. Acesso em: 11 ago. 2022.

URABE, K. et al. The inherent Cytotoxicity of Melanin precursors: a revision. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1221, p. 272–278, 1994.

VAINSHTEIN, B. K. et al. Three-dimensional structure of the enzyme catalase. **Nature**, v. 293, p. 411–412, 1981.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 471–474, 2010.

VITOLLO, M. et al. **Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial**. São Paulo: Blucher, 2015.

WATSON, R. E. B. et al. Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 21, p. 1063–1077, 1 set. 2014.

WHO. Radiation: Ultraviolet (UV) radiation and skin cancer. **Radiation: Ultraviolet (UV) radiation and skin cancer 16 October 2017 | Q&A**, n. October 2017, p. 3–6, 2017.

WILLIS, I.; MENTER, J. M.; WHYTE, H. J. The Rapid Induction of Cancers in the Hairless Mouse Utilizing the Principle of Photoaugmentation. **THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY**, v. 76, n. 5, p. 404–408, 1981.

WILLOTT LAB PROCEDURES, W. **AMMONIUM SULPHATE PRECIPITATION**. Disponível em: <<http://research.biology.arizona.edu/mosquito/willott/ewlab.html>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ultraviolet Radiation**. Disponível em: <www.who.int/health-topics/ultraviolet-radiation#tab=tab_1>. Acesso em: 1 abr. 2021.

YANG, H.-S.; YANG, H.-C.; TANI, Y. Catalase from *Aspergillus niger* KUF-04. **Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.**, v. 16, n. 3, 1988.

YIN, F. et al. Energy Metabolism and Inflammation in Brain Aging and Alzheimer's Disease. **Free Radical Biol Med**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.

YOSHIMOTO, N.; YAMAMOTO, S. PEGylated protein separations: Challenges and opportunities. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 5, p. 592–593, maio 2012.

ZARKOVIC, N. Roles and Functions of ROS and RNS in Cellular Physiology and Pathology. **Cells**, v. 9, n. 3, 2020.

ZAWROTNIAK, M.; BARTNICKA, D.; RAPALA-KOZIK, M. UVA and UVB radiation induce the formation of neutrophil extracellular traps by human polymorphonuclear cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 196, p. 111511, 2019.

ZEIDA, A. et al. Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 19, p. 10829–10855, 2019.

ZHENG, C. Y.; MA, G.; SU, Z. Native PAGE eliminates the problem of PEG-SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation. **Electrophoresis**, v. 28, n. 16, p. 2801–2807, ago. 2007.

ZIMMERMAN, A.; BAI, L.; GINTY, D. D. The gentle touch receptors of mammalian skin. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 950–954, 21 nov. 2014.