

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

Desenvolvimento e caracterização de lipossomas peguilados para  
veiculação de L-asparaginase

Marina de Souza Guimarães

Dissertação para obtenção do título de Mestre

**Orientadora:** Profa. Dra. Carlota de O. Rangel Yagui

São Paulo  
2021

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

Desenvolvimento e caracterização de lipossomas peguilados para  
veiculação de L-asparaginase

Marina de Souza Guimarães

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de Mestre

**Orientadora:** Profa. Dra. Carlota de O. Rangel Yagui

São Paulo  
2021

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

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

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

G963d	Guimarães, Marina Desenvolvimento e caracterização de lipossomas peguilados para veiculação de L-asparaginase / Marina Guimarães. - São Paulo, 2021. 115 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica. Orientador: Rangel Yagui, Carlota de Oliveira
	1. Lipossoma. 2. lipossoma peguilado. 3. nanoreator. 4. nanotransportador. 5. L- asparaginase. I. T. II. Rangel Yagui, Carlota de Oliveira, orientador.

## AGRADECIMENTOS

À minha família por me apoiar sempre em minhas decisões, meus desafios com confiança e carinho mesmo vivendo à quilômetros de distância. Em especial aos meus amados pais Tereza e Humberto.

À Profa. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, que me aceitou com sua mestranda, por ter disponibilidade e sabedoria para me orientar durante toda a resolução da pesquisa.

Ao meu grande companheiro João, pelo apoio emocional nas horas difíceis e por sempre estar ao meu lado para o que for preciso.

Aos meus colegas de laboratório por me auxiliarem sempre que precisei nos momentos de dúvida ou de cansaço físico. Obrigada pelas pausas para um café.

Ao Zeca pela felicidade matinal que me enchia de coragem para fazer o que fosse preciso. E por torna minha casa mais alegre e repleta de amor.

Ao meus amigos querido que compreenderam minhas repentinas ausências, mas por nunca desistiram de mim.

Às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À todos que me ajudaram nessa trajetória de alguma forma. Muito obrigada.

Marina de Souza Guimarães

**Desenvolvimento e caracterização de lipossomas peguilados para veiculação de L-  
asparaginase**

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do título de Mestre

Profa. Dra. Profa. Dra. Carlota de O. Rangel Yagui  
Orientador/Presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021.

## RESUMO

GUIMARÃES, M.S. **Desenvolvimento e caracterização de lipossomas peguilados para veiculação de L-asparaginase.** 2021. 115p. Dissertação de (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é um câncer de maior incidência em crianças, e tem a L-asparaginase (ASNase) como fármaco amplamente utilizado no tratamento dos afetados. A ASNase catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina (Asn), presente na corrente sanguínea, a ausência do aminoácido no meio extracelular leva à morte células leucêmicas, que necessitam deste aminoácido para as funções celulares. Fatores envolvendo a eficiência do tratamento com ASNase como reações adversas e curta meia-vida, principalmente devido ao reconhecimento pelo sistema imune e degradação por proteases, limitam a sua eficácia. A encapsulação da enzima em lipossomas pode conferir proteção à degradação, melhorar seu perfil farmacocinético e diminuir os efeitos adversos, de forma a melhorar o tratamento da LLA sendo este o objetivo desse trabalho. Lipossomas de DOPC (1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina) e DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina) foram desenvolvidos empregando-se o método de hidratação do filme lipídico e diferentes protocolos de preparo contendo ou não diferentes concentrações de 18:0 1,2-distearoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000] (DSPE-PEG). Os lipossomas produzidos foram utilizados para encapsular a ASNase e os sistemas contendo ou não ASNase encapsulada foram caracterizados por espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e criomicroscopia de transmissão. Adicionalmente, foram avaliados a taxa de encapsulação e o perfil de permeabilidade das vesículas à L-asparagina. As análises de DLS mostraram que as nanoestruturas formadas empregando-se agitação magnética a partir de sistemas contendo 10% e 20% de DSPE-PEG possuem diâmetro hidrodinâmico menor (~ 25 nm a 60 nm) que os mesmos sistemas sem o fosfolípido peguilado (~ 190 nm a 222 nm), demonstrando a relação entre a diminuição do tamanho e o aumento da quantidade de fosfolípido peguilado e possível formação de estruturas micelares ou bicelares. O emprego de agitação em vórtex para hidratação do filme lipídico, adição do antioxidante  $\alpha$ -tocoferol e redução da concentração de DSPE-PEG (5% e 10%) levou à formação de sistemas com diâmetro hidrodinâmico maior, sendo esse protocolo e concentrações de PEG definidos como padrão. As análises de MET comprovaram a formação de lipossomas com diâmetro hidrodinâmico semelhante ao observado por DLS; com a utilização da criomicroscopia foi possível observar os lipossomas sem deformações. Os lipossomas de DMPC/DSPE-PEG 10% apresentaram maior permeabilidade à L-asparagina ao longo do tempo e, portanto, poderiam funcionar como nanoreatores, depletando o aminoácido da circulação. Estudos *in vitro* com células tumorais devem ser realizados e em seguida estudos *in vivo*, para confirmar este potencial.

Palavras-chave: Lipossoma, lipossoma peguilado, nanoreator, nanotransportador, L-asparaginase, Leucemia linfóide aguda.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, M.S. **Development and characterization of peg-grafted liposomes for L-asparaginase encapsulation.** 2021. 115p. Dissertação de (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

L-asparaginase (ASNase) is a first-choice drug, combined with other drugs, in therapeutic schemes to treat Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in children and adolescents. ASNase catalyzes the hydrolysis of L-asparagine (Asn) in the bloodstream; since ALL cells cannot synthesize this amino acid, protein synthesis is impaired leading to leukemic cells death by apoptosis. In spite of its therapeutic importance, treatment with ASNase is associated to side effects, mainly hypersensitivity and immunogenicity. Another drawback refers to degradation by plasma proteases that altogether with immunogenicity shortens the enzyme half-life. Encapsulation of ASNase in liposomes, vesicular nanostructures formed by the self-aggregation of phospholipids, is an attractive alternative that possibly will protect the enzyme from plasma proteases, resulting on better pharmacokinetics profile. In this work, we prepared by thin film hydration liposomal formulations of the phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) or 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) containing or not different concentrations of 18:0 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG), and encapsulated ASNase by electroporation. The systems containing or not ASNase were analyzed by Dynamic Light Scattering, zeta potential and Electron Microscopy. The encapsulation efficiency and vesicles permeability were also evaluated. According to the DLS analysis, the nanostructures formed by film hydration under magnetic stirring employing 10% or 20% DSPE-PEG presented smaller hydrodynamic diameter (~ 25 nm to 60 nm) than the same systems without the pegylated phospholipid (~ 190 nm to 222 nm), demonstrating the relation between size and the amount of pegylated phospholipid that results in formation of micellar or bicellar structures. The protocol was stabilize by hydration of the lipid film under vortex agitation, addition of the antioxidant  $\alpha$ -tocopherol and reduction of the concentration of DSPE-PEG (5% and 10%), what altogether led to the formation of nanostructures of higher hydrodynamic diameter and monodisperse systems. TEM analyzes confirmed the formation of liposomes with hydrodynamic diameter similar to that observed by DLS; with the use of cryomicroscopy it was possible to observe the liposomes without deformations. Liposomes of DMPC/DSPE-PEG 10% showed permeability to L-asparagine over time and, therefore, could function as nanoreactors, depleting the circulating amino acid.

Keywords: Liposome, pegylated liposome, nanoreactor, nanocarrier, L-asparaginase, acute lymphoblastic leukemia.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Enzima acetilcolinesterase
ASNase	L-asparaginase
Asn	L-asparagina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$a_0$	Área da seção transversal da cabeça polar da molécula anfifílica
Asp	Ácido aspártico
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CMC	Concentração micelar crítica
CPP	Parâmetro crítico de empacotamento ( <i>do inglês: Critical packing parameter</i> )
Crio-TEM	Crio-microscopia
CTSB	Catepsina B
Dh	Intensidade de luz espalhada
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção (do inglês: <i>Enhanced Permeability and Retention</i> )
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
GUVs	Vesícula unilamelar gigante (do inglês: <i>Giant Unilamellar Vesicles</i> )
GM1	Monossialotetra-hexosilgangliosídeo



GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
$l_c$	Comprimento da cadeia hidrofóbica
LUV	Vesícula unilamelar grandes (do inglês: <i>Large Unilamellar Vesicles</i> )
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MLV	Vesículas multilamelares (do inglês: <i>Multilamellar Vesicles</i> )
NH <sub>3</sub>	Amônia
PEG	Polietilenoglicol
PDI	Índice de polidispersão
P/L	Proteína/ Lipídio
SUS	Sistema Único de Saúde
SAXS	Espalhamento de raio-X em baixo ângulo
SUV	Vesículas unilamelares pequenas (do inglês: <i>Small Unilamellar Vesicles</i> )
SRPE	Evaporação de fase reversa supercrítica
T <sub>m</sub>	Temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina
V	Volume da cadeia hidrofóbica
$\zeta$	Potencial zeta
%EE	Eficiência de encapsulação

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação cristalográfica da proteína asparaginase II de *Escherichia coli* (Código PDB 3ECA)..... 23
- Figura 2.** Reação enzimática de L-asparaginase sob o aminoácido L-asparagina, originando ácido aspártico e amônia. Adaptado de CACHUMBA *et al.*, 2016. .... 23
- Figura 3.** Tipos de nanotransportadores para aplicação terapêutica. .... 27
- Figura 4.** Concentração micelar crítica (CMC), a partir da qual as moléculas anfifílicas são capazes de formar estruturas micelares em equilíbrio com os monômeros em solução. A partir da CMC, qualquer molécula anfifílica adicionada na solução sofre partição preferencial para os agregados e não se observam mais alterações significativas na tensão superficial por acúmulo dessas moléculas na superfície do líquido (Adaptado de CHEVALIER; ZEMB, 1990). .... 28
- Figura 5.** Relação entre o parâmetro crítico de agregação CPP, o formato da molécula anfifílica e agregado resultante:  $n$  é o volume ocupado pela cauda apolar,  $a_0$  é a área da seção transversal da cabeça polar e  $lc$  o comprimento do grupamento hidrofóbico (Adaptado de ISRAELACHVILI, 2011). .... 29
- Figura 6.** Representação esquemática de um lipossoma (1) e de um lipossoma peguilado (3); (2) bicamada fosfolipídica; (4) lipossoma unilamelar (Unilamellar Vesicles, ULVs) e lipossoma multilamelar (Multilamellar Vesicles, MLVs) (APOLINÁRIO *et al.*, 2017). .... 30
- Figura 7.** Imagem ilustrativa de lipossoma peguilado contendo L-asparaginase encapsulada, formando um nanoreator permeável L-asparagina. .... 37
- Figura 8.** Estruturas químicas dos lipídios empregados no preparo de lipossomas..... 39
- Figura 9.** Fluxograma de metodologias de preparo de formulações lipossomais. 1. Os lipossomas foram produzidos pelo método de hidratação do filme lipídico, seguida por hidratação em PBS com a utilização de agitação magnética nos Protocolos A e B ou vórtex no Protocolo B, as vesículas foram posteriormente extrusadas pela passagem das vesículas em membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ . 2. Caracterização das formulações lipossomais e encapsulação. Caracterização por espalhamento de luz dinâmico (DLS), análise de potencial zeta e

estabilidade ao longo do tempo seguindo variação de tamanho hidrodinâmico e PDI. Encapsulação de ASNase em lipossomas por eletroporação seguida por análise de eficiência de encapsulação indireta e análise morfológica por microscopia. **3.** Ensaio de permeabilidade de formulações, purificação inicial em SEC para retirada de proteína não encapsulada, incubação de 30-120 minutos das formulações contendo a ASNase em meio com L-asparagina, posterior leitura à 436 nm. .... 41

**Figura 10.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DOPC (Ai), DOPC/DSPE-PEG 10% (Bi) e DOPC/DSPE-PEG 20% (Ci) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo A. Curvas de correlação das amostras DOPC (A), DOPC/DSPE-PEG 10% (B) e DOPC/DSPE-PEG 20% (C). .... 47

**Figura 11.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DMPC (Ai), DMPC/DSPE-PEG 10% (Bi) e DMPC/DSPE-PEG 20% (Ci) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo A. Curvas de correlação das amostras DMPC (A), DMPC/DSPE-PEG 10% (B) e DMPC/DSPE-PEG 20% (C) . .... 48

**Figura 12.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DOPC (Ai), DOPC/DSPE-PEG 5% (Bi) , DOPC/DSPE-PEG 10% (Ci) e DOPC/DSPE-PEG 20% (Di) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo B. Curvas de correlação das amostras DOPC (A), DOPC/DSPE-PEG 5% (B) , DOPC/DSPE-PEG 10% (C) e DOPC/DSPE-PEG 20% (D)..... 52

**Figura 13.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DMPC (Ai), DMPC/DSPE-PEG 5% (Bi), DMPC/DSPE-PEG 10% (Ci) e DMPC/DSPE-PEG 20% (Di) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo B. Curvas de correlação das amostras DMPC (A), DMPC/DSPE-PEG 5% (B) , DMPC/DSPE-PEG 10% (C) e DMPC/DSPE-PEG 20% (D). .... 53

**Figura 14.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DOPC (Ai), DOPC/ DSPE-PEG 5% (Bi) e DOPC/DSPE-PEG 10% (Ci) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo C. Curvas de correlação das amostras DOPC (A), DOPC/DSPE-PEG 5% (B) e DOPC/DSPE-PEG 10% (C). .... 55

**Figura 15.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DMPC (Ai), DMPC/DSPE-PEG 5% (Bi) e DMPC/DSPE-PEG 10% (Ci) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo B. Curvas de correlação da amostras DMPC (A), DMPC/DSPE-PEG 5% (B) e DMPC/DSPE-PEG 10% (C).  
..... 56

**Figura 16.** Distribuição de média de tamanho Z-average, baseado na concentração crescente de DSPE-PEG, para sistemas preparados pelo protocolo C. # Amostra apresentou diferença significativa \*\*\* em relação a DOPC/DSPE-PEG 5%, DMPC/DSPE-PEG 5% e DOPC/DSPE-PEG 10%. ## Amostra apresentou diferença significativa \*\* em relação a DOPC/DSPE-PEG 5% e DMPC/DSPE-PEG 5% e \*\*\* em relação a DOPC/DSPE-PEG 10%. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$ ; n=3 experimentos independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão..... 57

**Figura 17.** Estabilidade física de formulações lipossomais estocadas a 4°C. A e B Z-average e PDI respectivamente de amostras DOPC, DOPC/DSPE-PEG 5% e DOPC/DSPE-PEG 10%; C e D Z-average e PDI respectivamente de amostras DMPC, DMPC/DSPE-PEG 5% e DMPC/DSPE-PEG 10%. N=3 experimentos independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão..... 58

**Figura 18.** Estabilidade física de formulações lipossomais estocadas a 37°C. A e B Z-average e PDI respectivamente de amostras DOPC, DOPC/DSPE-PEG 5% e DOPC/DSPE-PEG 10%; C e D Z-average e PDI respectivamente de amostras DMPC, DMPC/DSPE-PEG 5% e DMPC/DSPE-PEG 10%. N=3 experimentos independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão..... 59

**Figura 19.** Cromatografia de exclusão molecular, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. A- solução de L-asparaginase (5 mg/mL): pico n° 1 corresponde ao volume morto da coluna, pico n° 2 representa agregação proteica, pico n° 3 ASNase pura, área correspondente a 30.65 mAU\*mL. B- Formulação de DOPC/DSPE-PEG 5% após a eletroporação em presença de ASNase (5 mg/mL): pico n° 1 corresponde ao volume morto da coluna, pico n° 2 representa os lipossomas, pico n° 3 representa a ASNase não encapsulada, área correspondente a 27.37 mAU\*mL. .... 63

- Figura 20.** Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS), distribuição por intensidade, de formulações antes e após encapsulação da ASNase e purificação (formulações identificadas como pós purificação)..... 64
- Figura 21.** Microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas. Formulações: A. DMPC; B. DOPC; C. DMPC/DSPE-PEG 5%; D. DOPC/DSPE-PEG 5%; E. DMPC/DSPE-PEG 10% e F. DOPC/DSPE-PEG 10%. Aumentos de 25.000x (E) e 62.000x (A, B, C, D e F). As barras indicam tamanho de 200 nm (E) e 100 nm. As setas pretas indicam lamelas de lipossomas fragmentados e as setas brancas indicam aglomerados de lipossomas. .... 67
- Figura 22.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DMPC. Aumento de 62.000x. As barras indicam tamanho de 100 nm. .... 68
- Figura 23.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DMPC/DSPE-PEG 10%. Aumento de 62.000x. A barra indica tamanho de 100 nm. .... 69
- Figura 24.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DMPC/DSPE-PEG 10% contendo enzima ASNase. Aumento de 62.000x. A barra indica tamanho de 100 nm. .... 69
- Figura 25.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DOPC. Aumento de 25.000x. A barra indica tamanho de 200 nm..... 69
- Figura 26.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DOPC/DSPE-PEG 5%. Aumento de 62.000x. As barras indicam tamanho de 100 nm..... 70
- Figura 27.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DOPC/DSPE-PEG 5% contendo enzima ASNase. Aumento de 62.000x. A barra indica tamanho de 100 nm. .... 70
- Figura 28.** Ensaio de permeabilidade à L-asparagina dos lipossomas contendo L-asparaginase encapsulada, por quantificação da amônia liberada. # Formulação apresentou diferença significativa em relação as amostras as outras amostras; N=6 experimentos independentes. . 72
- Figura A 1.** Cromatografia de exclusão molecular da formulação de DOPC, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação DOPC antes de encapsulação de ASNase, pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DOPC, 1 ° pico

corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas e 3º pico representa a ASNase não encapsulada..... 89

**Figura A 2.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DOPC/DSPE-PEG 5%, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação antes de encapsulação de ASNase, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DOPC/DSPE-PEG 5%, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas e 3º pico representa a ASNase não encapsulada..... 90

**Figura A 3.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DOPC/DSPE-PEG 10%, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação antes de encapsulação de ASNase, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DOPC/DSPE-PEG 10%, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas e 3º pico representa a ASNase não encapsulada..... 91

**Figura A 4.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DMPC, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação antes de encapsulação de ASNase, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DMPC, 1º pico corresponde ao avolume volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas e 3º pico representa a ASNase não encapsulada..... 92

**Figura A 5.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DMPC/ DSPE-PEG 5%, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação antes de encapsulação de ASNase, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna , 2º pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DMPC/DSPE-PEG 5%, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas e 3º pico representa a ASNase não encapsulada..... 93

**Figura A 6.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DMPC/ DSPE-PEG 10%, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação DMPC/ DSPE-PEG 10% antes de encapsulação de ASNase, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna , 2º pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DMPC/DSPE-PEG 10%, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas e 3º pico representa a ASNase não encapsulada. .... 94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composições dos sistemas lipossomais investigadas.....	40
<b>Tabela 2</b> - Protocolos de preparação de formulações lipossomais. ....	40
<b>Tabela 3</b> - Resultados de análises de DLS de lipossomas preparados com protocolo A (hidratação do filme à temperatura ambiente). As amostras foram analisadas quanto ao tamanho de partículas baseado na distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada (Dh), índice de polidispersão (PDI) e Z-average. ....	49
<b>Tabela 4</b> - Resultados das análises de DLS de lipossomas preparados utilizando protocolo B (hidratação do filme a 40°C). As amostras foram analisadas quanto ao tamanho de partículas baseado na distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada (Dh), índice de polidispersão (PDI) e Z-average.....	51
<b>Tabela 5</b> - Resultados das análises de DLS de lipossomas preparados utilizando protocolo C (hidratação do filme e extrusão a 37°C). As amostras foram analisadas pelo tamanho de partículas baseado na média de tamanho Z-average, índice de polidispersão (PDI) e distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada (Dh). Dados correspondem a média $\pm$ SD de n = 3 experimentos independentes.....	54
<b>Tabela 6</b> - Potencial zeta das formulações lipossomais. ....	61
<b>Tabela 7</b> - Eficiência de encapsulação da enzima L-asparaginase nos sistemas lipossomais estudados . ....	65
<b>Tabela 8</b> - Tamanho e espessura média de membrana (bicamada lipídica) de lipossomas baseados em análise de imagens de criomicroscopia de transmissão eletrônica, empregando-se o software ImageJ, em comparação a valores de diâmetro hidrodinâmico (Dh) obtidos a partir das análises de DLS. Média $\pm$ SD.....	71

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução e Justificativa .....</b>	<b>18</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>20</b>
2.1. Leucemia Linfóide Aguda (LLA) .....	20
2.2. L-asparaginase .....	21
2.2.1. Mecanismo de ação e aspectos bioquímicos .....	22
2.2.2. Efeitos adversos de ASNase e novos biofármacos derivados .....	24
<b>2.3. Nanotransportadores .....</b>	<b>25</b>
2.3.1. Moléculas anfifílicas e autoagregação .....	27
2.3.2. Lipossomas – Aspectos gerais e classificação .....	29
2.3.2.1. Lipossomas Peguilados .....	31
2.3.2.2. Desenvolvimento de lipossomas .....	33
2.3.2.3. PEG e anticorpos anti-PEG .....	34
2.3.2.4. Lipossomas e ASNase .....	35
2.3.2.5. Nanoreatores .....	35
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>38</b>
<b>4. Material e métodos .....</b>	<b>39</b>
4.1. Preparo dos lipossomas .....	39
4.1.1. Protocolo A .....	41
4.1.2. Protocolo B .....	42
4.1.3. Protocolo C .....	42
4.2. Caracterização dos lipossomas .....	42
4.2.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico .....	42
4.2.2. Determinação do potencial zeta .....	43
4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	43
4.2.4. Criomicroscopia eletrônica (Crio-ME) .....	44
4.2.5. Encapsulação da L-asparaginase .....	44



4.2.6.	<i>Remoção de enzima não encapsulada</i> .....	44
4.2.7.	<i>Determinação da eficiência de encapsulação</i> .....	44
4.2.8.	<i>Estudos de permeação de L-asparagina nos lipossomas</i> .....	45
<b>5.</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>46</b>
5.1.	<i>Desenvolvimento de nanoestruturas</i> .....	46
5.1.1.	<i>Estabilidade dos lipossomas</i> .....	57
5.1.1.1.	<i>Estabilidade ao longo do tempo</i> .....	57
5.1.1.2.	<i>Determinação do potencial zeta</i> .....	60
5.2.	<i>Encapsulação da L-asparaginase nos sistemas lipossomais</i> .....	62
5.3.	<i>Estudos da morfologia dos sistemas lipossomais por Microscopia de Transmissão Eletrônica e Crio-Microscopia</i> .....	66
5.4.	<i>Estudos de permeação da L-asparagina nos lipossomas</i> .....	71
<b>6.</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Referências</b> .....	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>89</b>
8.1.	<i>Anexo A</i> .....	89
8.2.	<i>Anexo B: Currículo Lattes</i> .....	95
8.3.	<i>Anexo C: Ficha do Aluno</i> .....	98

## 1. Introdução e Justificativa

A leucemia linfóide aguda, um tipo de câncer que afeta prevalentemente crianças e adolescentes, se caracteriza pela proliferação e diferenciação anormal de linfócitos clonais e causa prejuízos graves como insuficiência medular (anemia, trombocitopenia e leucopenia) e granulocitopenia (vulnerabilidade a infecções). Nos casos mais avançados, ocorrem danos aos nervos cranianos e meningite (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). O tratamento consiste principalmente em quimioterapia padrão com alguns fármacos como vincristina, prednisona e L-asparaginase (ASNase), uma enzima que catalisa a hidrólise de L-asparagina (Asn) presente na corrente sanguínea em ácido aspártico (Asp) e amônia (NH<sub>3</sub>) (LOPES *et al.*, 2017). Essa hidrólise promove danos às células leucêmicas, que são incapazes de produzir Asn, ao contrário das células normais. A ASNase é essencial para o tratamento, após a sua introdução nos protocolos de tratamento, as taxas de sobrevivência aumentaram de 5% para 90% (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Atualmente, as ASNases comercializadas e utilizadas são provenientes das bactérias *Escherichia coli* e *Dickeya chrysanthemi* e, por serem de origem bacteriana, em geral estão associadas a respostas imunes, principalmente reações alérgicas e hipersensibilidade. Além disso, por ser uma proteína, a ASNase sofre degradação por enzimas proteolíticas e os epítomos provenientes exacerbam o reconhecimento imunológico, reduzindo a meia-vida plasmática do fármaco. A incorporação da ASNase em nanotransportadores pode ser considerada uma estratégia promissora para minimizar a imunogenicidade e ampliar a meia-vida do biofármaco.

Nanotransportadores são estruturas nanométricas utilizadas para entrega de fármacos (*drug delivery*), e têm como principais benefícios terapêuticos a redução de efeitos adversos e melhora na farmacocinética dos fármacos encapsulados (DIN *et al.*, 2017). Dentre as alternativas de nanotransportadores já bem estabelecidas, destacam-se os lipossomas, vesículas formadas a partir da autoagregação de fosfolipídios (APOLINÁRIO *et al.*, 2017).

Lipossomas promovem a biodistribuição do fármaco encapsulado, auxiliam na solubilidade e estabilidade química e protegem da biodegradação por enzimas plasmáticas, de forma a melhorar a eficácia do tratamento e diminuir os efeitos colaterais. Os primeiros lipossomas, nomeados convencionais e compostos principalmente por fosfolipídios, foram aprimorados com a adição de outras moléculas, como por exemplo moléculas de polietilenoglicol (PEG), originando os lipossomas furtivo (MILLA; DOSIO; CATTEL, 2012).

A função das moléculas de PEG é evitar que o sistema fagocitário mononuclear reconheça o lipossoma e promova a sua rápida eliminação, principal problemática dos lipossomas convencionais (LOMBARDO *et al.*, 2016).

A encapsulação de ASNase em lipossomas clássicos já foi investigada, os resultados demonstraram que o emprego da enzima encapsulada promove redução dos efeitos adversos, aumento da meia vida e melhor eficiência antitumoral *in vivo* em comparação à enzima livre (CRUZ *et al.*, 1993; GASPAR; PEREZ-SOLER; CRUZ, 1996; JORGE *et al.*, 1994). No entanto, não foi investigada a incorporação de ASNase em lipossomas peguilados, o que consiste em uma estratégia promissora para aperfeiçoar o tratamento de pacientes com LLA pois a peguilação aumenta o tempo de circulação das nanoestruturas, particularmente importante para a ASNase, que deve depletar a Asn circulante.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Leucemia Linfoide Aguda (LLA)

A Leucemia Linfoide Aguda (LLA) corresponde a um tipo de câncer que pode ter origem de alterações genéticas em células somáticas, aneuploidias e rearranjos cromossômicos (KANSAGRA, ANKIT, SAURABH DAHIYA, AND MARK LITZOW, 2018). A incidência mundial dos casos aumentou de 49,1 mil para 64,2 mil de 1990 a 2017, embora a taxa de incidência padronizada por idade tenha levemente decaído, sendo que o diagnóstico foi mais relatado entre crianças e jovens adultos de regiões em desenvolvimento (DONG *et al.*, 2020). Após o diagnóstico e tratamento, a taxa de sobrevivência de cinco anos é de 87,5% para crianças abaixo de 14 anos, já os adultos têm taxa de sobrevivência inferior, de 30-40% (KANSAGRA, ANKIT, SAURABH DAHIYA, AND MARK LITZOW, 2018).

A fisiopatologia de LLA se caracteriza pela proliferação e diferenciação anormal da população clonal de linfócitos (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017), células do sistema imune responsáveis pela defesa do organismo originadas e diferenciadas principalmente a partir de linfoblastos presentes na medula óssea (ALBERTS *et al.*, 2002). Na LLA, ocorre o acúmulo de linfoblastos com diferenciação e proliferação anormal na medula óssea, sangue periférico e em vários sítios extramedulares, devido a isso os quadros de insuficiência medular (anemia, trombocitopenia e leucopenia) e granulocitopenia (o afetado se torna vulnerável a infecções) são comuns. Em 20% dos casos os linfoblastos se espalham para sítios extramedulares como nódulos linfáticos, fígados e baço, resultando em linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia, respectivamente. Além disso, em 5% a 8% dos casos ocorre déficit dos nervos cranianos e meningite devido ao comprometimento do sistema nervoso central (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). A gravidade dos sintomas pode causar o óbito do paciente, se não tratado.

Na década de 60, o tratamento para LLA envolvia a quimioterapia padrão utilizando vincristina e prednisona. Em 1970, foi incluída a L-asparaginase, após a incorporação as taxas de sobrevivência de crianças e adolescentes com LLA aumentaram de 5% em 1960 para ~90% atualmente (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

O tratamento atual, envolve a utilização de vários fármacos a fim de evitar o desenvolvimento de resistência, entre eles a L-asparaginase, a intensidade da quimioterapia varia de paciente a paciente a depender do grupo de risco. O tratamento é dividido em etapas:

a indução (induz a remissão das células leucêmicas), a consolidação (terapia preventiva para eliminar caso subclínico de CNS), reindução (elimina as células leucêmicas resistentes residuais) e a manutenção (previne o reaparecimento de clones de células leucêmicas). (KATO, MOTOHIRO; MANABE, ATSUSHI, 2018)

## 2.2. L-asparaginase

Os novos produtos biotecnológicos chamados de biofármacos/biomedicamentos são derivados de fontes biológicas como micro-organismos, plantas e animais, a manufatura desses produtos geralmente envolve ferramentas biotecnológicas avançadas e bioprocessos (YEH; CHEN, 2018). As principais classes terapêuticas são enzimas, vacinas, anticorpos monoclonais, ácidos nucleicos (DNA e RNA), e terapia baseada em gene e/ou células (WALSH, 2010; ZEB *et al.*, 2020). Os biofármacos modernizaram o setor industrial farmacêutico e possuem grande potencial terapêutico para tratamento de câncer, diabetes, doenças imunes, entre outras.

A L-asparaginase (L-asparagina amino hidrolase, E.C.3.5.1.1) (ASNase) é uma enzima biotecnológica muito utilizada no tratamento de leucemias e na indústria alimentícia, nesse último caso é empregada para reduzir níveis de acrilamida (substância neurotóxica e cancerígena presente em frituras industrializadas) (DIAS; SANTOS AGUILAR; SATO, 2019).

A descoberta da ASNase como ferramenta terapêutica foi realizada a partir do trabalho de Kidd, em 1953, que relatou regressão no quadro de linfossarcoma em ratos tratados com soro de porquinho da índia (KIDD, 1953). Isso permitiu em 1961 a descoberta da ASNase como agente antilinfoma, presente nesse soro (BROOME, 1961). Em 1966, em estudo envolvendo camundongos, macacos e criança portadora de LLA tratados com ASNase purificada de soro de porquinho da índia, foi confirmado o efeito antileucêmico da enzima (DOLOWY *et al.*, 1966). Paralelamente, foi descrito o efeito antileucêmico da ASNase purificada de *Escherichia coli*. (*E. coli*) (MASHBURN; WRISTON, 1964).

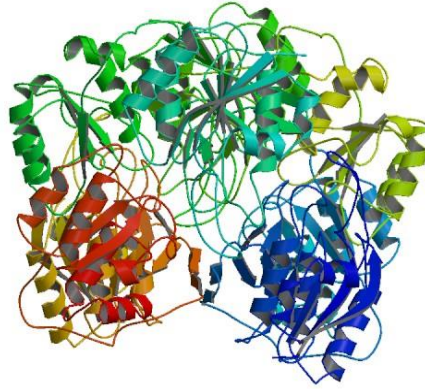
Atualmente, é sabido que a enzima ASNase é sintetizada por diversos organismos como microrganismos, vegetais e determinados mamíferos, incluindo alguns roedores e humanos (NOMME; SU; LAVIE, 2014). Na indústria farmacêutica as principais fontes utilizadas para a produção da enzima para fins terapêuticos são as bactérias *Escherichia coli* e *Dickeya chrysanthemi*, sendo a primeira a mais utilizada (CACHUMBA *et al.*, 2016).

Para fins de tratamento da LLA, apenas quatro tipos de ASNase estão aprovadas e disponíveis no mercado: ASNase produzida por *E. coli* (ex: Elspar®, Lundbeck, Deerfield, IL, USA); ASNase produzida por *E. coli* conjugada a cadeias de polietilenoglicol (pegaspargase) (Oncaspar®, Gaithersburg, MD); ASNase produzida por *Dickeya chrysanthemi* (crisantaspase) (Erwinase®, Jazz Pharmaceuticals, Palo Alto, CA); e a ASNase nativa de *E. coli* produzida de forma recombinante (Spectrila®, Medac GmbH, Wedel, Germany) (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). A ASNase de *E. coli*, é a primeira escolha para o tratamento de LLA, e a enzima proveniente de *D. chrysanthemi* a de segunda escolha, prescrita quando o paciente adquire alergia/hipersensibilidade à enzima de *E. coli* (DUVAL *et al.*, 2002), apesar de possuir meia-vida mais curta, farmacocinética e propriedades imunogênicas diferentes da ASNase de *E. coli*.

No Brasil, a enzima de primeira escolha desde 1970, utilizada e fornecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento dos pacientes LLA, é ASNase de *E. coli* não peguilada (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER-INCA, 2001). Em 2017, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o registro da ASNase peguilada (Oncaspar®) (“Registro ANVISA nº 1562800100015); já ASNase produzida por *D. chrysanthemi* só é fornecida para pacientes brasileiros quando é comprovada a necessidade e por ordem judicial.

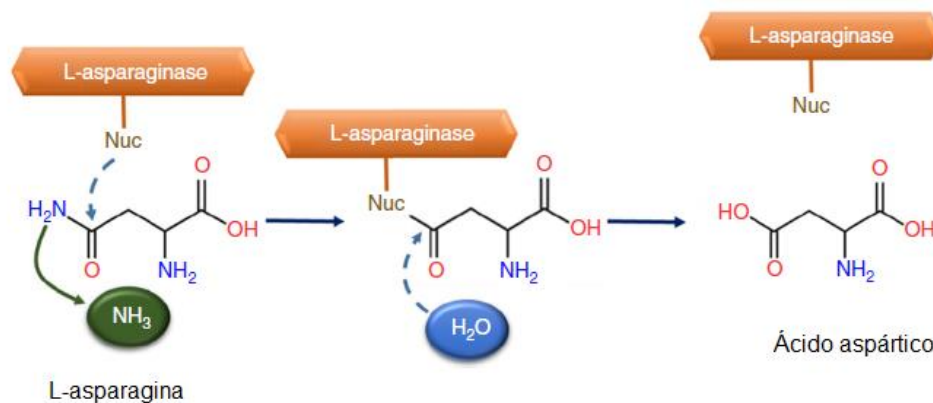
### **2.2.1. Mecanismo de ação e aspectos bioquímicos**

ASNase é composta por quatro subunidades idênticas (tetrâmero), apresenta massa molecular total entre 140-150 kDa (Figura 1). Dois tipos de ASNases são sintetizados por *E. coli*: a ASNase I produzida no citoplasma, que possui atividade L-glutaminolítica além da L-asparaginolítica; e a ASNase II encontrada no periplasma, que apresenta maior afinidade pela L-asparagina e atividade baixa a negativa em relação à L-glutamina. A ASNase II é a de maior interesse para a aplicação farmacêutica no tratamento de LLA, pois possui menor atividade L-glutaminolítica (BRUMANO *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Representação cristalográfica da proteína asparaginase II de *Escherichia coli* (Código PDB 3ECA).

A ASN catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina (Asn), a enzima promove um ataque nucleofílico no carbono carbonílico do grupo amida do substrato, resultando em um produto intermediário ( $\beta$ -acil+enzima) que por meio da atividade nucleofílica de uma molécula de água origina os produtos ácido aspártico (Asp), amônia ( $\text{NH}_3$ ) e enzima livre (regenerada) (Figura 2) (CACHUMBA *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Reação enzimática de L-asparaginase sob o aminoácido L-asparagina, originando ácido aspártico e amônia. Adaptado de CACHUMBA *et al.*, 2016.

A Asn é um aminoácido não-essencial envolvido na biossíntese de proteínas e glicoproteínas; é importante para a manutenção celular, principalmente a proliferação celular G1. As células saudáveis do nosso organismo normalmente são capazes de sintetizar esse aminoácido, pois expressam a enzima Asparagina sintetase, assim a manutenção celular ocorre normalmente se houver ausência de Asn na corrente sanguínea (DUVAL *et al.*, 2002). As células leucêmicas responsáveis pelo quadro de LLA, por outro lado, são incapazes de expressar ou expressam em baixos níveis a Asn sintetase, dependendo exclusivamente de Asn extracelular

para a sua sobrevivência (LOPES *et al.*, 2017). O estudo de Story *et al.*, demonstrou que a ausência de Asn extracelular leva a sérios danos nas células leucêmicas, como a interrupção da síntese proteica, comprometimento de suas funções celulares e, conseqüentemente, morte celular (STORY *et al.*, 1993). O quadro é agravado pelo perfil carcinogênico das células leucêmicas caracterizado pelo elevado metabolismo e, portanto, alta demanda de nutrientes, sendo que grandes quantidades de Asn são requeridas por essas células. Portanto, a atuação da ASNase no tratamento de LLA se refere à degradação de Asn presente na corrente sanguínea, de forma a promover a morte dessas células.

### **2.2.2. Efeitos adversos de ASNase e novos biofármacos derivados**

As asparaginases comercializadas são essenciais nas fases de tratamento de LLA. Muitos estudos ainda debatem a formulação e dose ideais para o tratamento, entretanto, ainda não foi estabelecido um valor crítico mínimo para a eficácia em depleção de Asn. Os protocolos variam principalmente em número de doses, concentração do biofármaco (30 000 IU/m<sup>2</sup> a 2500 IU/m<sup>2</sup>) e intervalo entre doses (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016; PIETERS *et al.*, 2011).

Apesar dos protocolos existentes, a maior limitação do uso das ASNase são as reações de hipersensibilidade e conseqüente formação de anticorpos anti-asparaginase o que diminui a atividade enzimática. As reações imunes causadas por ASNase relatadas por estudos são segmentadas em hipersensibilidade clínica, com reações alérgicas que podem partir de eritema local, anafilaxia e hipersensibilidade subclínica (BATTISTEL *et al.*, 2020; SARI; OSSEVA; SURYAWAN, 2020), o risco dessas reações pode aumentar com a reexposição à enzima na fase de pós-indução (BATTISTEL *et al.*, 2020).

A hipersensibilidade, efeito adverso comum aos biofármacos de origem bacteriana, é acentuada pela degradação da ASNase por proteases, os epítomos resultantes são mais facilmente reconhecidos pelo sistema imunológico, o que resulta em resposta imune contra as ASNases circulantes na corrente sanguínea (CACHUMBA *et al.*, 2016). Devido à inativação pelas proteases e reconhecimento pelo sistema imune, o tempo de meia-vida do biofármaco é diminuído e, conseqüentemente, a eficácia é comprometida. As cisteíno-proteases que degradam ASNase são proteínas lisossomais presentes nas células linfoblásticas normais e em células leucêmicas, elas são conhecidas com catepsina B (CTSB) e asparaginil endopeptidase (AEP) (OFFMAN *et al.*, 2011). A AEP é superexpressa em células leucêmicas (PATEL *et al.*,



2009). Já há estudos relacionados a ASNase resistente a essas proteases, porém a eficácia ainda não foi comprovada (RODRIGUES, 2016).

Outra estratégia para superar a degradação por proteases e imunogenicidade refere-se à encapsulação em nanotransportadores. A encapsulação promove uma barreira física entre a molécula encapsulada e o ambiente externo, por exemplo a corrente sanguínea. A barreira funciona como um “escudo” (do inglês *shell-like structure*) que diminui degradação química e enzimática, resultando não apenas no aumento da biodisponibilidade do fármaco, como também na redução dos indesejáveis efeitos colaterais (VEGA-VÁSQUEZ; MOSIER; IRUDAYARAJ, 2020).

### 2.3. Nanotransportadores

Os nanotransportadores ou nanocarreadores fazem parte de um campo da nanotecnologia que cresce e impacta a medicina há décadas. As características físico-química intrínsecas dos nanotransportadores os tornam ferramentas úteis para tratamento de doenças. Devido ao tamanho nanométrico, essas estruturas apresentam área superficial aumentada em relação ao volume, podem aumentar a solubilidade e estabilidade, bem como modificar a atividade de fármacos e, portanto, tem o potencial de modular a farmacocinética e farmacodinâmica (APOLINÁRIO *et al.*, 2017; DIN *et al.*, 2017).

A nanoencapsulação de um fármaco pode melhorar a biodistribuição de forma sítio-dirigida, promover estabilidade química e proteger da biodegradação por enzimas plasmáticas, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo os efeitos colaterais (WICKI *et al.*, 2015). Em tratamento de câncer, mais especificamente, os nanotransportadores são capazes de minimizar os problemas envolvidos na quimioterapia convencional, que incluem a baixa especificidade dos fármacos e a toxicidade (DIN *et al.*, 2017).

Na área da nanotecnologia farmacêutica, é possível ressaltar como nanotransportadores os lipossomas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas como polimerossomas e nanopartículas metálicas, entre outras que podem ser observadas na figura 3, cada um com suas peculiaridades (TAYO, 2017). Dendrímeros do grego “parte de galhos” devido à sua conformação tridimensional que se assemelha a galhos bem definidos, são compostos por macromoléculas poliméricas. São estruturalmente dividido em três componentes: core central, unidades ramificadas repetidas e, grupos terminais (BAKER, 2009; SHERJE *et al.*, 2018). Apesar do potencial para serem empregados como nanotransportadores, todas as classes de

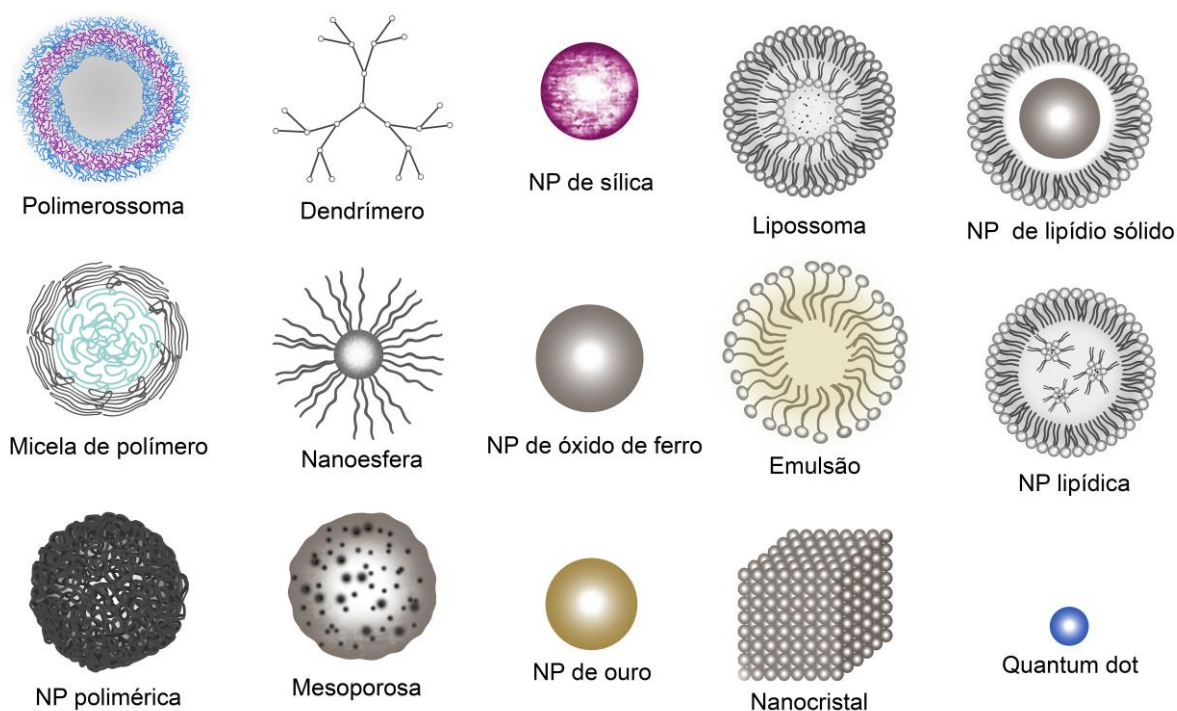
dendrimeros apresentam citotoxicidade e propriedades hemolíticas, na maioria dos casos a característica catiônica promove alta interação com a superfície negativa das células, levando à desestabilização celular e lise de membrana (PALMERSTON MENDES; PAN; TORCHILIN, 2017).

Os polimerossomas, por outro lado, são vesículas formadas por copolímeros anfifílicos compostos por blocos de diferentes composições e massas moleculares (ANAJAFI; MALLIK, 2015). São promissores como nanotransportadores pela estabilidade, robustez, facilidade metodológica de conjugação com ligantes e capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (SHARMA *et al.*, 2020). Entretanto, a robustez e a estabilidade de membrana dos polimerossomas podem ser desvantagens para liberação de fármaco e permeabilidade de moléculas. Apresentam baixa taxa de encapsulamento, principalmente para fármacos hidrofílicos, proteínas e quimioterápicos, que limitam a aplicação como nanotransportadores, a biodegradabilidade é um grande desafio também (SHARMA *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2017). Recentemente, Bueno e colaboradores, produziram polimerossomas carregados com ASNase, as vesículas exibiram taxa de encapsulação de aproximadamente 10% e permeabilidade, entretanto, estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para maiores conclusões sobre eficácia (BUENO *et al.*, 2020).

Lipossomas ou vesículas formadas por fosfolípidios são nanoestruturas estudadas há anos e aprovadas para uso em humanos por agências regulatórias mundiais (Food and Drug Administration (FDA) e European Medicines Agency (EMA) e ANVISA). Alguns exemplos de formulações lipossomais aprovadas são DepoCyt e Caelyx (tratamento de câncer), Exparel (anestésico), DepoDur (analgésico), Visudyne (Degeneração macular, miopia) AmBisome (infecção fúngica) (FLÜHMANN *et al.*, 2019). Os lipossomas variam em composição, tamanho, método de preparo caracterização de superfície, etc. Podem ser utilizados para transportar biofármacos devido à sua segurança, baixa ou nenhuma toxicidade e biodegradabilidade.

Cabe ainda ressaltar que desde 2019, o mundo tem sido terrivelmente afetado pela pandemia de Covid-19, após o surgimento dos primeiros casos da síndrome aguda respiratória causada pelo vírus *SARS-CoV-2*, no epicentro Wuhan (China). A pandemia de Covid-19 causou até 2 de fevereiro de 2021, 102.942.987 casos confirmados e 2.232.223 mortes, segundo a Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde, 2021), levando também a crises econômicas em muitos países. Após um ano de pesquisa e

desenvolvimento, entre as vacinas aprovadas estão as baseadas em mRNA desenvolvidas pela Pfizer/BioNTech e Moderna, que utilizam nanopartículas lipídicas para proteger o mRNA contra degradação por nucleases. Outras 77 vacinas ainda em estudo empregam nanoformulações (CHUNG *et al.*, 2020, p. 19; JACKSON *et al.*, 2020; MILANE; AMIJI, 2021). Fatos como esse demonstram o impacto e importância da nanotecnologia na saúde mundial.



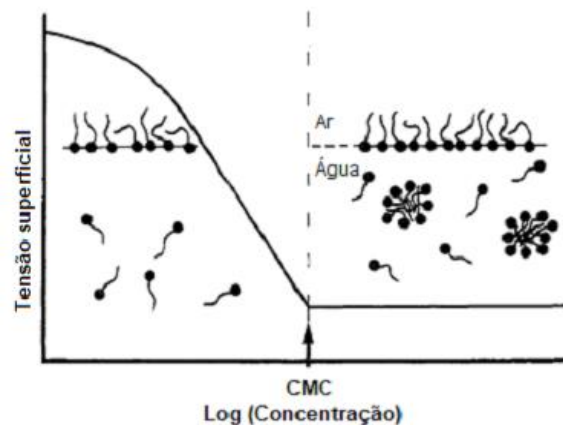
**Figura 3.** Tipos de nanotransportadores para aplicação terapêutica.

### 2.3.1. Moléculas anfifílicas e autoagregação

Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas lipídicas, que possuem uma porção hidrofóbica (cauda de hidrocarbonetos) e porção hidrofílica (a cabeça, composta por exemplo por fosfatidilcolinas, fosfoetanolaminas, fosfatidilserinas, ácido fosfático, fosfatidilinositol e fosfatidilglicerol) (LI *et al.*, 2015). De uma maneira geral, moléculas anfifílicas acima de uma determinada concentração em meio aquoso, conhecida como concentração micelar crítica (CMC), se auto associam em meio aquoso em agregados supramoleculares nanométricos termodinamicamente estáveis e não covalentes, como por exemplo micelas. Nas micelas, particularmente, as porções hidrofóbicas se associam no interior minimizando o contato com a

água e as cabeças polares permanecem na periferia das micelas maximizando seu contato com a água (Figura 4) (CHEVALIER, ZEMB, 1990; TANFORD, 1980).

A formação de agregados reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de van der Waals, eletrostáticas, estéricas, ligações de hidrogênio, mas se deve principalmente ao efeito hidrofóbico, que resulta da tendência das cadeias hidrofóbicas em minimizarem o contato com a água, de maneira a diminuir a penalidade entrópica envolvida nesse contato (CHEVALIER; ZEMB, 1990; MARSH, 2016; RANGEL-YAGUI; PESSOA-JR; BLANKSCHTEIN, 2004).

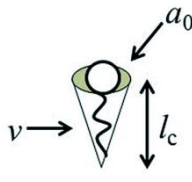


**Figura 4.** Concentração micelar crítica (CMC), a partir da qual as moléculas anfifílicas são capazes de formar estruturas micelares em equilíbrio com os monômeros em solução. A partir da CMC, qualquer molécula anfifílica adicionada na solução sofre partição preferencial para os agregados e não se observam mais alterações significativas na tensão superficial por acúmulo dessas moléculas na superfície do líquido (Adaptado de CHEVALIER; ZEMB, 1990).

A formação de diferentes estruturas a partir de moléculas anfifílicas ocorre por diferentes padrões de autoagregação. Esse padrão pode ser definido pelo parâmetro crítico de empacotamento (do inglês, *critical packing parameter* - CPP), conceito formulado por Israellachvili, (ISRAELACHVILI; MITCHELL; NINHAM, 1976) na seguinte equação (Eq. 1):

$$CCP = \frac{v}{a_0 \cdot l_c} \quad (\text{Eq. 1.})$$

em que  $v$  é o volume da cadeia hidrofóbica,  $a_0$  é a área da seção transversal da cabeça polar da molécula anfifílica e  $l_c$  é o comprimento da cadeia hidrofóbica (DEPLAZES *et al.*, 2018). Essa equação é definida a partir da geometria de uma única molécula anfifílica (Figura 5). Estruturas vesiculares como os lipossomas são obtidas para  $1/2 < CPP < 1$ .



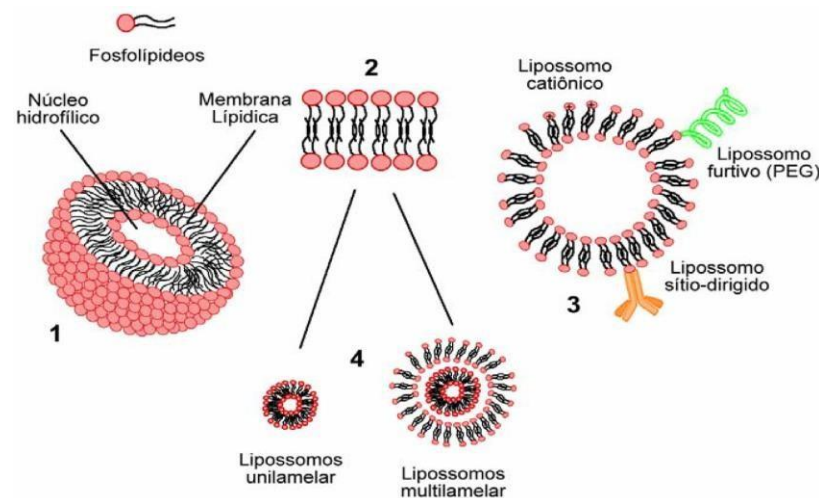
Parâmetro crítico de agregação ( $v/a_0l_c$ )	Formato da molécula	Estruturas formadas
$< 1/3$	Cone	Micelas esféricas
$1/3 - 1/2$	Cone truncado	Micelas cilíndricas
$1/2 - 1$	Cone truncado	Bicamadas flexíveis/vesículas
$\sim 1$	Cilindro	Bicamadas planas
$> 1$	Cone truncado invertido	Micelas reversas

**Figura 5.** Relação entre o parâmetro crítico de agregação CPP, o formato da molécula anfifílica e agregado resultante:  $v$  é o volume ocupado pela cauda apolar,  $a_0$  é a área da seção transversal da cabeça polar e  $l_c$  o comprimento do grupamento hidrofóbico (Adaptado de ISRAELACHVILI, 2011).

### 2.3.2. Lipossomas – Aspectos gerais e classificação

Os lipossomas foram descritos por Bangham e Horne na década de 60, enquanto estudavam a respeito de estruturas de membranas (BANGHAM; HORNE, 1964), desde então se iniciou o interesse da aplicação de lipossomas como transportadores de fármacos (*drug delivery*) em tratamentos para câncer e infecções bacterianas (GREGORIADIS, 1977). A princípio, lipossomas não representam risco à saúde humana pois são compostos por fosfolípídios biocompatíveis e biodegradáveis e, colesterol (ALAVI; KARIMI; SAFAEI, 2017).

Podem ser classificados a depender do método de preparação pela lamelaridade e tamanho. Os lipossomas são classificados como unilamelares ou multilamelares (possuem duas ou mais bicamadas lipídicas) (Figura 6) (APOLINÁRIO *et al.*, 2017). São subclassificados em vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles- LUV*) ou vesículas unilamelares gigantes (*giant unilamellar vesicles- GUVs*), vesículas unilamelares pequenas (*Small Unilamellar Vesicles- SUV*) e vesículas multilamelares (*Multilamellar Vesicles- MLV*)(LOMBARDO *et al.*, 2019). Quanto ao tempo de circulação sanguínea, são classificados em lipossomas convencionais e lipossomas de longa circulação.



**Figura 6.** Representação esquemática de um lipossoma (1) e de um lipossoma peguilado (3); (2) bicamada fosfolipídica; (4) lipossoma unilamelar (Unilamellar Vesicles, ULVs) e lipossoma multilamelar (Multilamellar Vesicles, MLVs) (APOLINÁRIO *et al.*, 2017).

Entre os benefícios dos lipossomas como nanotransportadores estão (BOZZUTO; MOLINARI, 2015; DEODHAR; DASH, 2018):

- a capacidade de encapsular compostos lipofílicos (na camada lipídica) e hidrofílicos (no interior da vesícula);
- facilitam a internalização celular do composto encapsulado, pois mimetizam uma membrana celular;
- prolongam o tempo de retenção;
- diminuem a toxicidade do composto encapsulado;

Todas essas propriedades contribuem para o aumento do potencial terapêutico de lipossomas.

Os lipossomas convencionais apresentam rápido *clearance* na circulação, provocado pela adsorção de proteínas circulantes na corrente sanguínea, como proteínas do sistema complemento, fibronectinas, albumina, imunoglobulinas entre outras, em fenômeno denominado opsonização (YAN; SCHERPHOF; KAMPS, 2005). A opsonização dos lipossomas reduz o seu tempo de circulação sanguínea por favorecer a captura pelo sistema fagocitário mononuclear ou sistema retículo endotelial (RES)(HARASHIMA *et al.*, 1994). Neste processo, os macrófagos e os monócitos reconhecem o lipossoma como “ameaça ou corpo estranho” e promovem a eliminação no fígado e baço (TRAN *et al.*, 2017). Alguns aspectos influenciam a maior taxa de captura pelo RES, como o tamanho e carga de superfície; lipossomas com carga negativa (contendo fosfatidilserinas-PS e ácido fosfático-PA) interagem mais com macrófagos peritoneais, já lipossomas catiônicos e neutros demonstraram baixa captura por macrófagos (ZAHEDNEZHAD *et al.*, 2019).

### 2.3.2.1. Lipossomas Peguilados

A estratégia de modificação da superfície de lipossomas surgiu visando aumentar a meia-vida na corrente sanguínea. Entre as modificações, há a incorporação de moléculas na superfície como, por exemplo, monossilotetra-hexosilgangliosídeo (GM1) ou polietilenoglicol (PEG), de forma a evitar o reconhecimento pelos macrófagos, sendo o PEG o mais eficiente e mais utilizado nos dias atuais (ALLEN *et al.*, 1991; LITZINGER; HUANG, 1992; MILLA; DOSIO; CATTEL, 2012) (Figura 6). As moléculas de PEG presentes em lipossomas peguilados ou lipossomas furtivos (*stealth*) promovem alterações físico-químicas, que incluem aumento da hidratação, como consequência, alteram o balanço hidrofóbico/hidrofílico, inibindo interações hidrofóbicas e eletrostáticas, por repulsão estérica (LOMBARDO *et al.*, 2016). A camada hidrofílica na superfície de lipossomas melhora a estabilidade das vesículas, evita a agregação e aumenta o tempo de meia-vida no plasma por impedir a opsonização dos lipossomas (EDWARDS *et al.*, 1997; LOMBARDO *et al.*, 2016; MILLA; DOSIO; CATTEL, 2012). *In vitro*, lipossomas não peguilados são significativamente mais capturados por células de Kupffer se comparados a lipossomas peguilados (SAMUELSSON *et al.*, 2017). Quanto à concentração plasmática, lipossomas peguilados apresentaram concentração significativamente maior e menor acúmulo no fígado que os lipossomas não peguilados em animais nude após 24 horas de injeção (SAMUELSSON *et al.*, 2017). Yau-Young e colaboradores, em estudo *in vivo*,

descreveram que lipossomas contendo determinadas porcentagens de fosfolipídios peguilados são menos fagocitados por macrófagos e permanecem por maior período de tempo na circulação sanguínea dos animais (ALLEN *et al.*, 1991).

Os lipossomas peguilados se provaram seguros e eficientes no tratamento de cânceres. O primeiro medicamento encapsulado em lipossomas peguilados aprovado pela FDA foi o Doxil®, esse medicamento é utilizado para o tratamento de sarcoma de Kaposi (relacionado com a SIDA-Síndrome da imunodeficiência adquirida), câncer de ovário e mieloma múltiplo. Estudos demonstram que a doxorubicina encapsulada em lipossomas peguilado apresenta menor *clearance*, menor volume de distribuição e maior tempo de meia vida. Além disso, os efeitos tóxicos encontrados no tratamento com a doxorubicina livre, como cardiotoxicidade e a supressão de medular, são reduzidos ou não observados, e a eficiência terapêutica prevalece igual (FRANCO; VAIDYA; AIT-OU DHIA, 2018; STEWART *et al.*, 1998).

Lipossomas peguilados podem ser obtidos de três formas: pela adsorção física de PEG na superfície do lipossoma formado; ligando PEG covalentemente à superfície do lipossoma já desenvolvido; ou obtidos pela autoagregação de fosfolipídios e fosfolipídios ligados covalentemente à molécula de PEG, sendo essa última de uso mais frequente (MILLA; DOSIO; CATTEL, 2012).

Com a melhora da meia-vida, os lipossomas conseguem circular por mais tempo, aumentando as chances de atingir sítios tumorais. Além disso, podem levar a um mecanismo denominado de aumento de permeabilidade e retenção (*Enhanced Permeability and Retention* - EPR), caracterizado pela capacidade de acúmulo nanoestruturas em sítios tumorais (MATSUMURA; MAEDA, 1986). A fisiopatologia do câncer permite o EPR, as células cancerígenas se multiplicam com grande frequência e desreguladamente, o que causa irregularidades na vasculatura que as permeia, como fenestras anormais entre as células endoteliais dos capilares. As fenestras possibilitam nanoestruturas como lipossomas peguilados, por exemplo, penetrarem de forma a extravasar o fármaco encapsulado nesses sítios tumorais em detrimento de tecidos normais que permitem a passagem apenas de moléculas de baixa massa molecular. Além disso, o sistema linfático da massa tumoral é deficiente, permitindo o acúmulo das nanoestruturas e fármaco encapsulado. (GOLOMBEK *et al.*, 2018). Esse fenômeno possibilita a entrega do fármaco encapsulado de forma mais eficiente e precisa para tratamento de cânceres de difícil acesso aos fármacos livres. No entanto, as diferenças fisiológicas entre o ser humano e as espécies empregadas para o estudo do efeito EPR (em geral



roedores) e a heterogeneidade de cânceres sólidos geram contrapontos à efetividade do efeito EPR em humanos (KALYANE *et al.*, 2019; NICHOLS; BAE, 2014). A heterogeneidade dos tumores sólidos e de suprimento sanguíneo, a elevada pressão de fluido intersticial e a distância grande entre interstício e tumor em humanos dificulta o EPR (NICHOLS; BAE, 2014). Além disso, a massa interna tumoral é de difícil acesso e cria um ambiente de hipóxia por ter baixa vascularização que não apenas induz resistência a radioterapia além de propiciar novas mutações, selecionando células tumorais malignas e com propriedades metastáticas (DANHIER, 2016). Neste sentido, devemos considerar com cautela o EPR, principalmente pela natureza heteróloga, o estudo dessa estratégia deve ser feita em caso a caso.

### **2.3.2.2.Desenvolvimento de lipossomas**

O desenvolvimento de formulações de lipossomas convencionais e lipossomas peguילים podem ser feito por diferentes métodos. Dentre eles destacam-se:

1. Injeção de solvente: envolve a dissolução dos lipídeos em solvente orgânico (por exemplo dietil éter, éter-metanol ou etanol), sendo que essa fase orgânica é então injetada em uma fase aquosa contendo o fármaco a ser encapsulado. O solvente é removido por evaporação sob pressão reduzida. Este método em geral resulta em uma população heterogênea de lipossomas (70-200 nm), e pode levar a danos a molécula a ser encapsulado dependendo da temperatura empregada na evaporação do solvente (AKBARZADEH *et al.*, 2013). Além disso, quando se emprega etanol como solvente a remoção é dificultada pela formação de uma mistura azeotrópica com a água (SHI; XIANRONG, 2018).

2. Evaporação de fase-reversa: baseia-se na formação de micelas reversas ou emulsão água em óleo. Inicialmente os lipídeos são dissolvidos em solvente orgânico que é evaporado formando um filme lipídico. Após a evaporação do solvente o filme é dissolvido novamente em éter isopropílico ou éter dietílico, o sistema de duas fases se forma com a adição de solução aquosa contendo o fármaco. Esse sistema pode então ser submetido ao efeito de ultrassom e, posteriormente, ocorre a evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida formando assim os lipossomas. Apesar desse método permitir boa taxa de encapsulação de moléculas hidrofílicas, a presença de traços dos solventes utilizados na formulação pode desestabilizar os lipossomas e alterar propriedade/atividade da molécula encapsulado (SHI; XIANRONG, 2018).

3. Hidratação do filme lipídico: é um método simples e reprodutível para se produzir lipossomas a partir da dissolução de fosfolipídios em um solvente orgânico, que usualmente é clorofórmio ou metanol, seguida da evaporação total do solvente com a formação do fino filme lipídico. O filme lipídico é então hidratado e origina uma população heterogênea de lipossomas, a qual é equalizada pelos métodos pós hidratação (por exemplo extrusão, centrifugação). Apesar da baixa eficiência de encapsulação, este é o método mais utilizado para produção de lipossomas, principalmente para a encapsulação de proteínas, em que o contato com solventes orgânicos e altas temperaturas leva à desnaturação de proteína, o que desfaz o envelhecimento adequado podendo causar a perda de atividade catalítica (LAPIDUS LJ, 2017).

Adicionalmente, novas técnicas como microfluídica e evaporação de fase reversa supercrítica (SRPE) têm sido empregadas no preparo de lipossomas (BUENO *et al.*, 2018).

### **2.3.2.3.PEG e anticorpos anti-PEG**

Como discutido, o PEG é atualmente muito utilizado como ferramenta de aprimoramento lipossomas e resulta em benefícios e melhorias no tratamento de doenças. O PEG é classificado como um polímero seguro pela categoria de *Generally Recognized As Safe* (GRAS) da FDA, sendo vastamente utilizado em aditivos alimentares, em formulações farmacêuticas e cosméticas (YANG; LAI, 2015). Por muitas décadas o PEG foi considerado não imunogênico, entretanto estudos relatam o crescente reconhecimento e formação de anticorpos anti-PEG pelo sistema imune, o que pode acelerar o *clearance* de medicamentos peguilados quando submetidos a repetidas administrações.

Armstrong e colaboradores relataram a presença de anticorpos anti-PEG em 25% de voluntários saudáveis nunca expostos a administração de medicamentos peguilados (ARMSTRONG *et al.*, 2007), assim como outros autores verificaram a presença de anticorpos anti-PEG em 42% de indivíduos sem histórico de tratamento com medicamentos peguilados (YANG; LAI, 2015). Muitos autores frequentemente atribuem a existência de anticorpos anti-PEG em indivíduos devido ao contato com produtos de beleza, cuidados pessoais e alimentos industrializados contendo este polímero; o uso frequente desses produtos resulta no contato de moléculas de PEG com sítios de inflamação, aonde a exposição ao sistema imune leva à produção de anticorpos anti-PEG (MOHAMED *et al.*, 2019; SHIRAIISHI; YOKOYAMA, 2019; YANG; LAI, 2015). Esses anticorpos pré-existentes podem limitar a eficácia terapêutica

e reduzir a tolerância a medicamentos peguilados, sejam proteínas, peptídeos ou lipossomas, por exemplo.

A presença de anticorpos anti-PEG em seres humanos leva a preocupações quanto à eficácia de medicamentos peguilados, entretanto, ainda é cedo para descartar o a utilização de PEG como ferramenta para melhoria de fármacos e medicamentos, visto os benefícios do seu uso, refletido na significativa quantidade de medicamentos peguilados aprovados, com benefícios e segurança comprovados para uso em tratamento de diversas patologias (GARAY *et al.*, 2012). O impacto da pré-existência de anticorpos anti-PEG em pacientes varia em relação ao fármaco peguilado e população de estudo, sendo que alguns estudos demonstram que a pré-existência desses anticorpos não afeta a eficácia terapêutica do tratamento (GOROVITS *et al.*, 2016). Assim como outros medicamentos peguilados, os lipossomas peguilados como ferramenta de *drug delivery* devem ser analisados *in vitro* e *in vivo* em diferentes espécies de animais para atestar a segurança para uso em seres humanos.

#### **2.3.2.4. Lipossomas e ASNase**

Poucos estudos foram realizados no sentido de encapsular ASNase em lipossomas. Os principais foram feitos na década de 90 e os dados obtidos demonstram vantagens em utilizar a enzima encapsulada. A ASNase de *E. coli* foi encapsulada em lipossomas e observou-se a diminuição da toxicidade *in vitro* se comparada à enzima livre (CRUZ *et al.*, 1993). O aumento da meia-vida na corrente sanguínea de animais, de 2,88 horas (enzima livre) para 23,7 h para enzima encapsulada, também foi observado em outro trabalho (JORGE *et al.*, 1994). Ainda, a ASNase encapsulada em lipossomas demonstrou ter sua atividade antitumoral aumentada *in vivo* se comparada à enzima livre (CRUZ *et al.*, 1993; GASPAR; PEREZ-SOLER; CRUZ, 1996).

#### **2.3.2.5. Nanoreatores**

Na classificação biológica dos seres vivos a complexidade aumenta conforme a compartimentalização evolui, por exemplo, a presença de compartimentos como organelas tornam os organismos eucariotos mais complexos e eficientes que os procariotos. Os compartimentos permitem individualizar funções fisiológicas celular criando microambiente específico para cada reação acontecer. Os nanoreatores trazem a mesma proposta, com promessa de serem úteis a diversas aplicações na biotecnologia e medicina (NISHIMURA; AKIYOSHI, 2018).

São capazes de criar um ambiente interno no qual reações enzimáticas, por exemplo, podem acontecer sem interferentes externos (Figura 7). Para essa funcionalização é necessário permeabilidade do substrato à membrana do nanorreator, seja via poros ou passagem direta pela membrana, ambas as alternativas são estudadas (NISHIMURA *et al.*, 2020; NISHIMURA; AKIYOSHI, 2018).

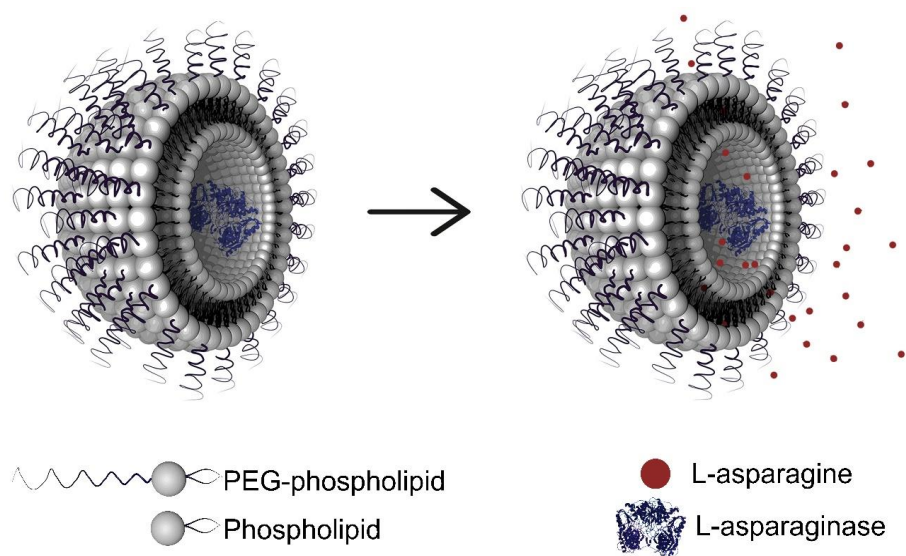
Para formação de nanorreatores de transporte de enzimas é necessário permeabilidade ao substrato, no caso da ASNase, à L-asparagina (Figura 7). A permeabilidade da bicamada de lipossomas a aminoácidos já foi estudada. M Naoi e grupo, demonstraram que a permeabilidade de lipossomas a aminoácidos depende da composição dos fosfolipídios da bicamada, da temperatura do sistema e do tipo de aminoácido (M *et al.*, 1977). Anos depois, Chakrabarti e David W. Deamer verificaram que a permeabilidade da bicamada lipídica a aminoácidos e fosfatos pode ser reduzida com o aumento da cadeia de hidrocarbonetos dos fosfolipídios, ou seja, a permeabilidade decresce de membranas compostas por fosfolipídios de cadeias de 14 carbonos (DMPC) para 18 carbonos (EPC), os autores ainda sugerem que a passagem dos aminoácidos pode ocorrer também via defeitos transientes na bicamada lipídica. Além disso, aminoácidos hidrofóbicos são mais permeáveis que os que apresentam carga (CHAKRABARTI; DEAMER, 1992).

Por outro lado, a temperatura está associada à mudança de permeabilidade de bicamadas lipídicas. As cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios permanecem naturalmente em estado rígido ordenado em fase gel em temperatura abaixo da temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina ( $T_m$ ) (do inglês, *gel liquid-crystalline phase transition temperature*,  $T_m$ ) que é específica para cada fosfolipídio. Quando a temperatura se aproxima da  $T_m$ , sítios de fosfolipídios da bicamada se tornam desordenados resultando em espaços entre os fosfolipídios, a bicamada se torna fluída e é possível a movimento rotacional dos fosfolipídios (CHEN *et al.*, 2018; WALDE; ICHIKAWA, 2001). Portanto, a permeabilidade da bicamada lipídica está ligada indiretamente à  $T_m$  (CHEN *et al.*, 2018), e aumenta quando a bicamada lipídica atinge a temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina ( $T_m$ ) tornando a bicamada lipídica mais permeável (WALDE; ICHIKAWA, 2001)

Em geral, como estratégia para modular a permeabilidade da bicamada lipídica de lipossomas, alguns autores relatam a variação da composição de fosfolipídios (PALAIOKOSTAS *et al.*, 2018), sendo que o colesterol, por exemplo, contribui para diminuição da permeabilidade. Estudo descrevem lipossomas termossensíveis, nos quais a

variação da composição dos fosfolipídios é responsável pela permeabilidade dependente de temperatura (BUENO *et al.*, 2018; CLERGEAUD *et al.*, 2013). O desenvolvimento de lipossomas com poros também já é descrito, neste caso poros formados por polímeros incorporados à bicamada lipídica (HU *et al.*, 2017; MUNICOY; BELLINO, 2016; WALDE; ICHIKAWA, 2001).

Sabendo que os fosfolipídios podem variar quanto à presença ou não de insaturações na cauda de hidrocarbonetos e que a presença ou não de insaturações bem como o tamanho (número de carbonos presente) influenciam na temperatura  $T_m$  e, conseqüentemente, permeabilidade da bicamada (MONTEIRO *et al.*, 2014), é possível gerar lipossomas permeáveis, que podem funcionar como nanoreatores. Nesse trabalho empregamos formações lipossomais com fosfolipídios de cadeia longa (18 carbonos) e insaturada, DOPC ( $T_m = -21^\circ\text{C}$ ), e lipossomas formados por fosfolipídios com cadeia curta e saturada (14 carbonos), o DMPC ( $T_m = 23^\circ\text{C}$ ). Os sistemas foram comparados quanto à permeabilidade ao substrato. Além disso, também investigamos a adição de diferentes concentrações de fosfolipídio peguilado (DSPE-PEG 2000), para melhorar a estabilidade das formulações em condições fisiológicas e assegurar a que os lipossomas formados sejam de longa circulação (Figura 7).



**Figura 7.** Imagem ilustrativa de lipossoma peguilado contendo L-asparaginase encapsulada, formando um nanoreator permeável L-asparagina.

### 3. Objetivos

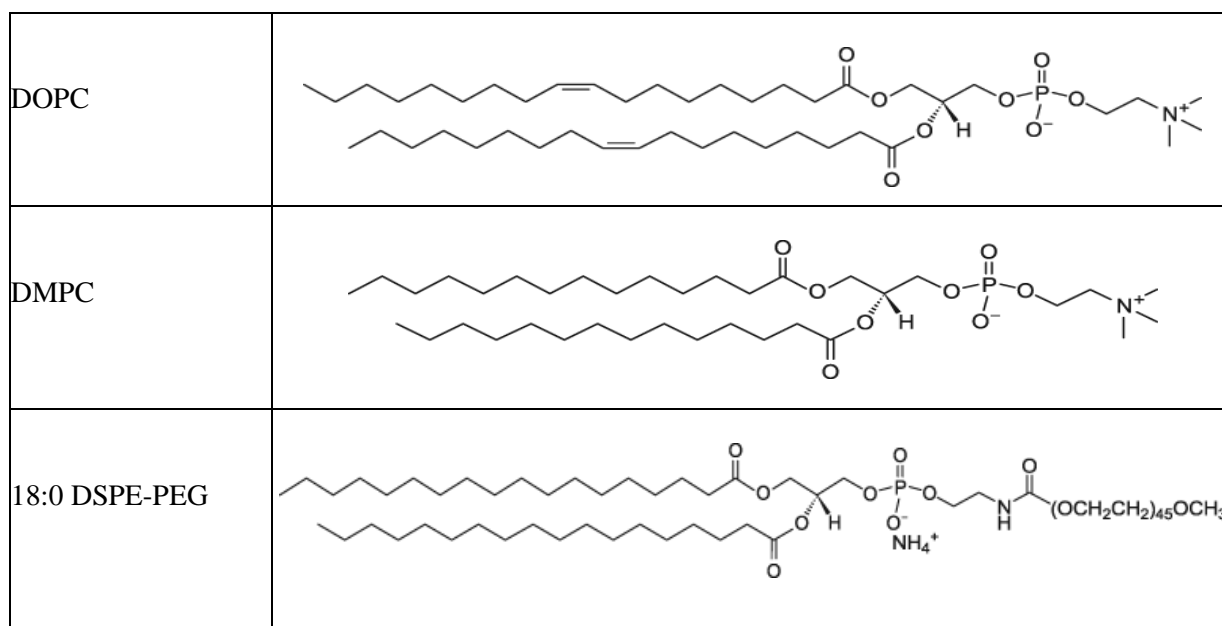
Desenvolver formulação de L-asparaginase em lipossomas peguilados, como futura alternativa ao tratamento da Leucemia Linfóide Aguda. Para que esse objetivo seja alcançado, as seguintes etapas foram estabelecidas:

- a. Desenvolvimento de lipossomas de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC), contendo ASNase comercial encapsulada;
- b. Desenvolvimento de lipossomas peguilados de DOPC e DMPC contendo ASNase comercial encapsulada;
- c. Caracterização dos lipossomas desenvolvidos;
- d. Estudo da permeabilidade dos lipossomas desenvolvidos à L-asparagina.

## 4. Material e métodos

### 4.1. Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme seguido por extrusão, empregando-se os seguintes lipídeos (Figura 8): 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:1 DOPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (14:0 DMPC), 18:0 DSPE-PEG (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metóxi(polietileno glicol)-2000]). Todos os lipídeos foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). A escolha de um lipídeo saturado (DMPC) e um insaturado (DOPC) nos permite verificar se os lipossomas compostos por lipídeo insaturado serão mais permeáveis ao substrato Asn, uma vez que resultam em bicamadas com empacotamento mais frouxo. Esse comportamento pode ser interessante pois dessa maneira os lipossomas poderiam depletar o aminoácido enquanto estivessem circulando na corrente sanguínea.



**Figura 8.** Estruturas químicas dos lipídios empregados no preparo de lipossomas.

As formulações lipossomais investigadas são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Composições dos sistemas lipossomais investigadas.

FORMULAÇÃO	FOSFOLIPÍDIO	FOSFOLIPÍDIO PEGUILADO DSPE-PEG (% molar)
1	DOPC	-
2	DOPC	5
3	DOPC	10
4	DOPC	20
5	DMPC	-
6	DMPC	5
7	DMPC	10
8	DMPC	20

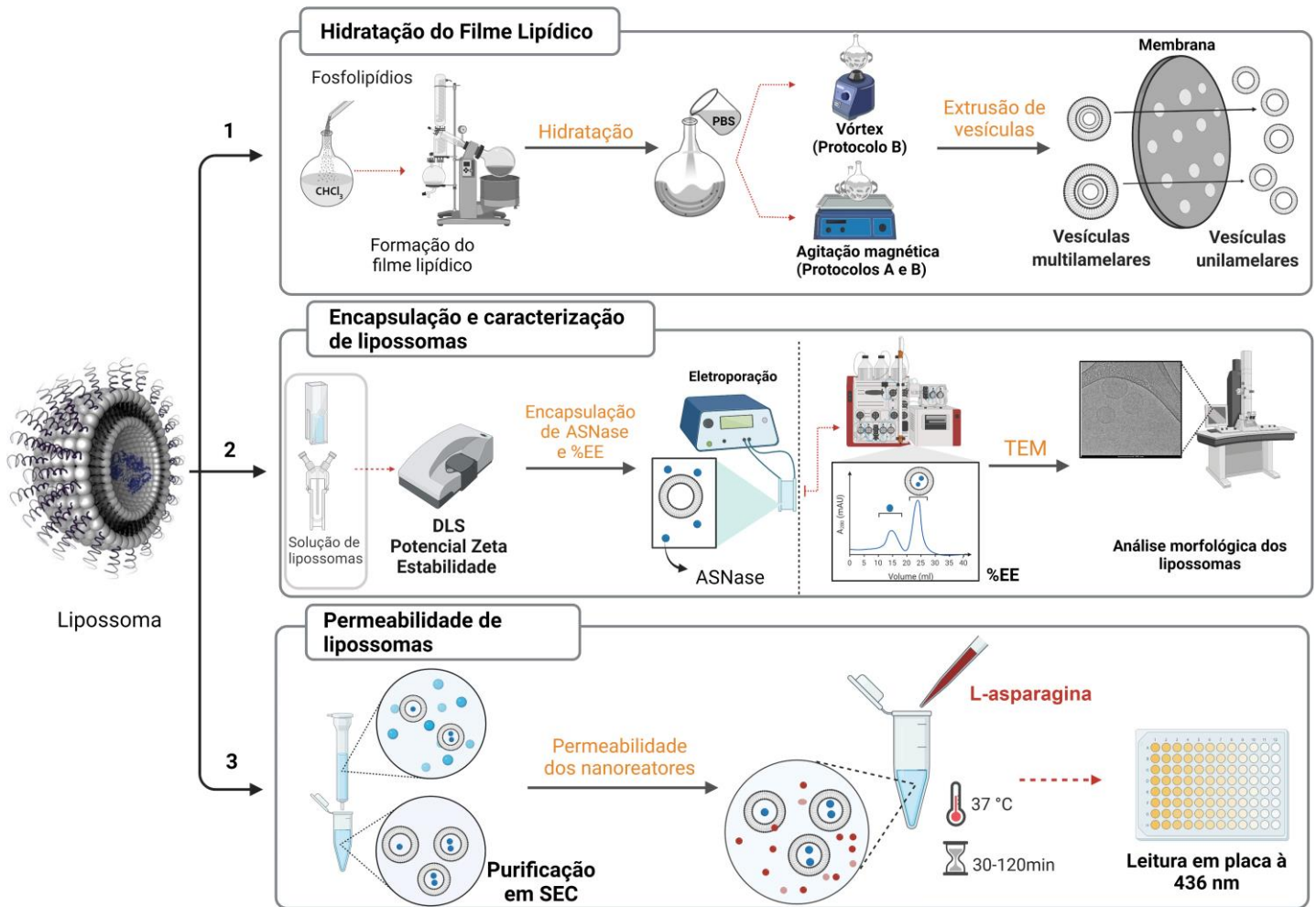
Para o preparo dos lipossomas três diferentes protocolos foram realizados no intuito de obter vesículas de tamanho adequado para encapsulação da enzima ASNase (Tabela 2). Um fluxograma geral do procedimento experimental é apresentado na figura 9.

**Tabela 2** - Protocolos de preparação de formulações lipossomais.

Etapas	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C
<b>Tipo de solvente</b>	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>
<b>Tempo de secagem</b>	2 h	1 h	1 h
<b>Solução hidratante</b>	2 mL de PBS	2 mL de PBS	2 mL de PBS
<b>Método de hidratação</b>	Agitação magnética (1150 rpm) por 2 h RT	Agitação magnética (1150 rpm) por 2 h 40 °C	Vórtex por 10 min em ciclos de 1 min/ 37 °C
<b>Extrusão</b>	7 vezes / RT	15 vezes / RT	15 vezes / 37 °C

\*PBS = tampão fosfato de sódio, pH 7,4; RT = *room temperature*/temperatura ambiente.





**Figura 9.** Fluxograma de metodologias de preparo de formulações lipossomais. 1. Os lipossomas foram produzidos pelo método de hidratação do filme lipídico, seguida por hidratação em PBS com a utilização de agitação magnética nos Protocolos A e B ou vórtex no Protocolo B, as vesículas foram posteriormente extrudadas pela passagem das vesículas em membrana de  $0.2\ \mu\text{m}$ . 2. Caracterização das formulações lipossomais e encapsulação. Caracterização por espalhamento de luz dinâmico (DLS), análise de potencial zeta e estabilidade ao longo do tempo seguindo variação de tamanho hidrodinâmico e PDI. Encapsulação de ASNase em lipossomas por eletroporação seguida por análise de eficiência de encapsulação indireta e análise morfológica por microscopia. 3. Ensaio de permeabilidade de formulações, purificação inicial em SEC para retirada de proteína não encapsulada, incubação de 30-120 minutos das formulações contendo a ASNase em meio com L-asparagina, posterior leitura à 436 nm.

#### 4.1.1. Protocolo A

Uma solução do(s) fosfolípido(s) (DOPC ou DMPC, acrescido ou não de DSPE-PEG) em clorofórmio foi preparada e subsequentemente o solvente foi evaporado por 2h em evaporador rotatório acoplado a bomba de vácuo Buchi (Flawil, Switzerland) para formação de um filme lipídico fino. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado à temperatura ambiente com

tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,4 sob agitação magnética de 1050 rpm, por 2 horas. A concentração total de lipídeos no sistema foi mantida em 5 mg/mL. Após a hidratação, os sistemas foram extrusados manualmente por 7 vezes utilizando uma membrana de extrusão de 0,2  $\mu\text{m}$  e extrusor Avanti mini extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL).

#### **4.1.2. Protocolo B**

Uma solução do(s) fosfolipídio(s) (DOPC ou DMPC, acrescido ou não de DSPE-PEG) em clorofórmio foi preparada e subsequentemente o solvente foi evaporado por 1h em evaporador rotatório acoplado a bomba de vácuo Buchi (Flawil, Switzerland) para formação de um filme lipídico fino. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,4 sob agitação magnética de 1050 rpm, por 2 horas à 40°C. A concentração total de lipídeos no sistema foi mantida em 5 mg/mL. Após a hidratação, os sistemas foram extrusados manualmente por 15 vezes utilizando uma membrana de extrusão de 0,2  $\mu\text{m}$  e extrusor Avanti mini extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL).

#### **4.1.3. Protocolo C**

Uma solução do(s) fosfolipídio(s) (DOPC ou DMPC, acrescido ou não de DSPE-PEG) em clorofórmio foi preparada e subsequentemente o solvente foi evaporado por 1h em evaporador rotatório acoplado a bomba de vácuo Buchi (Flawil, Switzerland) para formação de um filme lipídico fino. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 à 37°C utilizando agitação do tipo vórtex com ciclos de 1 minuto de agitação e 1 minuto no banho maria à 37°C, até completar 10 minutos. A concentração total de lipídeos no sistema foi mantida em 5 mg/mL e as formulações compostas por DOPC receberam 1% de  $\alpha$ -tocoferol (Sigma-Aldrich) para prevenção da oxidação dos fosfolipídios. Cabe ressaltar que esta concentração de 1% é próxima à encontrada em membranas celulares (cloroplasto ~2%) (HINCHA, 2008). Após a hidratação, os sistemas foram extrusados a 37°C manualmente por 15 vezes utilizando uma membrana de extrusão de 0,2  $\mu\text{m}$  e extrusor Avanti mini extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL).

### **4.2. Caracterização dos lipossomas**

#### **4.2.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico**

O diâmetro hidrodinâmico foi determinado por espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*). As medidas foram feitas a 25°C e com ângulo do detector de

90°. As amostras diluídas 1:10 em PBS foram equilibradas por 60s, com um ajuste automático de atenuador e foram realizadas três medidas para cada amostra. As partículas foram consideradas como esferas e a equação de Stokes-Einstein utilizada para análise do decaimento de correlação entre a intensidade medida e o coeficiente de difusão. As medidas de DLS foram realizadas no Laboratório de Corrosão da Escola Politécnica da USP, em equipamento *Zetasizer Nano*, Malvern Instruments® (Worcestershire, United Kingdom), sob responsabilidade da Profa. Idalina Vieira Aoki. Além disso, as medidas de DLS foram realizadas para avaliar a estabilidade das formulações de lipossomas seguindo dados de tamanho hidrodinâmico (Dh) e índice de polidispersão PDI das formulações incubadas em temperaturas de 4 °C e 37 °C por até 40 dias (MUPPIDI *et al.*, 2012).

#### **4.2.2. Determinação do potencial zeta**

Um método muito utilizado para a caracterização da superfície das nanopartículas é a medida do potencial zeta ( $\zeta$ ), que fornece uma aproximação do potencial elétrico de superfície das partículas. Geralmente, aceita-se que para obter sistemas nanoparticulados estabilizados pela carga fisicamente estáveis, o potencial zeta deve ser superior a aproximadamente 30 mV em valor absoluto (COUVREUR *et al.*, 2002). O potencial zeta também foi determinado em equipamento *Zetasizer Nano*, Malvern Instruments® (Worcestershire, United Kingdom). As amostras foram diluídas (2:10) em água Milli-Q ou PBS e foram realizadas três medidas a 25°C para cada amostra.

#### **4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

A microscopia eletrônica de transmissão permite a avaliação das características morfológicas das nanoestruturas (forma e tamanho). As análises foram realizadas na central analítica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP em um microscópio Jeol 100 CX II (com aceleração de voltagem de 80 kV). Foram empregados *grids* de cobre recobertos com filme de carbono previamente submetidos ao processo de descarga luminosa (*glow-discharge*) a 30 mA por 45 segundos. As amostras de lipossomas (5  $\mu$ L) foram depositadas sobre os *grids* e após um minuto realizou-se cuidadosa secagem do excesso de líquido com papel de filtro. Os *grids* foram então submersos em uma gota de 20  $\mu$ L de agente corante (acetato de uranila) e após um minuto realizou-se novamente secagem com papel de filtro.

#### 4.2.4. Criomicroscopia eletrônica (Crio-ME)

A visualização dos lipossomas contendo ou não a ASNase encapsulada também foi realizada em Microscópio de Transmissão JEOL-1400 PLUS (120kV) contendo suporte criogênico de amostras, localizado no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano, Campinas -São Paulo). As imagens foram processadas no software Digital Micrograph™.

#### 4.2.5. Encapsulação da L-asparaginase

Para a encapsulação da enzima nos lipossomas, 400 µL de solução de ASNase (ProSpec-Tany, Israel) a 5 mg/mL foram misturados a 400 µL de suspensão de lipossomas em uma cubeta de eletroporação de 800 µL (4 mm). A mistura obtida foi eletroporada em eletroporador Gene Pulser Xcell (BioRad, Hercules, EUA) a uma voltagem resultante de 1000 V, empregando-se 10 pulsos com intervalos de 60 segundos. Alternativamente, foi investigada a incorporação da enzima diretamente na solução de hidratação do filme lipídico, sendo essa etapa então realizada com uma solução de ASNase a 5 mg/mL em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4.

#### 4.2.6. Remoção de enzima não encapsulada

Os sistemas obtidos foram purificados por meio de cromatografia de exclusão molecular (SEC), para remoção de enzima não-encapsulada (ROBERTSON *et al.*, 2016). Inicialmente, 800 µL dos sistemas lipossomais foram eluídos através de uma coluna de Sefarose 4B (1 cm de diâmetro interno e 20 cm de altura), utilizando PBS como fase móvel. As frações eluídas foram coletadas em uma placa de 96 poços e a presença de lipossomas foi confirmada por meio de medidas de DLS.

#### 4.2.7. Determinação da eficiência de encapsulação

A Cromatografia de exclusão molecular foi utilizada para determinar indiretamente a eficiência de encapsulação das formulações lipossomais, seguindo protocolo adaptado de Bartenstein (BARTENSTEIN *et al.*, 2016). Os sistemas lipossomais contendo ASNase encapsulada foram injetados em coluna Superdex 200 Increase 0/300 GL (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Sweden) com eluição isocrática em aparelho de *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden), PBS, pH 7.4, sob fluxo de 0.5 mL/min, a absorbância foi monitorada a 280 nm. A concentração de proteína encapsulada foi calculada integrando-se o pico correspondente à proteína livre não encapsulada ( $P_{\text{não encapsulada}}$ ) nas amostras de sistemas lipossomais e o pico correspondente à

proteína em amostra da solução inicial de enzima pura utilizada para encapsulação ( $P_i$ ), tomando-se o cuidado de padronizar a concentração de enzima nas amostras. A partir dos valores obtidos, a %EE foi calculada com base na equação:

$$\%EE = \frac{(P_i - P_{\text{n\~{a}o encapsulada}})}{P_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

#### 4.2.8. Estudos de permeação de L-asparagina nos lipossomas

Neste trabalho empregamos o método de Nessler, que consiste na determinação colorimétrica da amônia liberada na clivagem da asparagina pela ASNase (IMADA *et al.* 1973), para medir a atividade enzimática dos sistemas lipossomais contendo ASNase encapsulada. Inicialmente, 50  $\mu\text{L}$  de PBS, 200  $\mu\text{L}$  de água e 50  $\mu\text{L}$  de asparagina (25mg/mL) foram misturados e incubados a 37 °C por 5 min. Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de amostra contendo enzima (lipossomas purificados contendo ASNase nanoencapsulada) foram adicionados e os tubos incubados a 37°C por 30, 60 ou 120 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) a 1,5 M. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo foram misturadas com 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Milli-Q), seguido pela adição de 250  $\mu\text{L}$  de reagente de Nessler. Após 1 minuto, 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e a absorbância a 436 nm determinada em leitor de placas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, San Jose- EUA). A enzima foi quantificada de acordo com uma curva de calibração construída a partir de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 6 mM. O número de unidades enzimáticas (U) foi calculado com base na informação que uma unidade de ASNase catalisa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de amônia por minuto a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

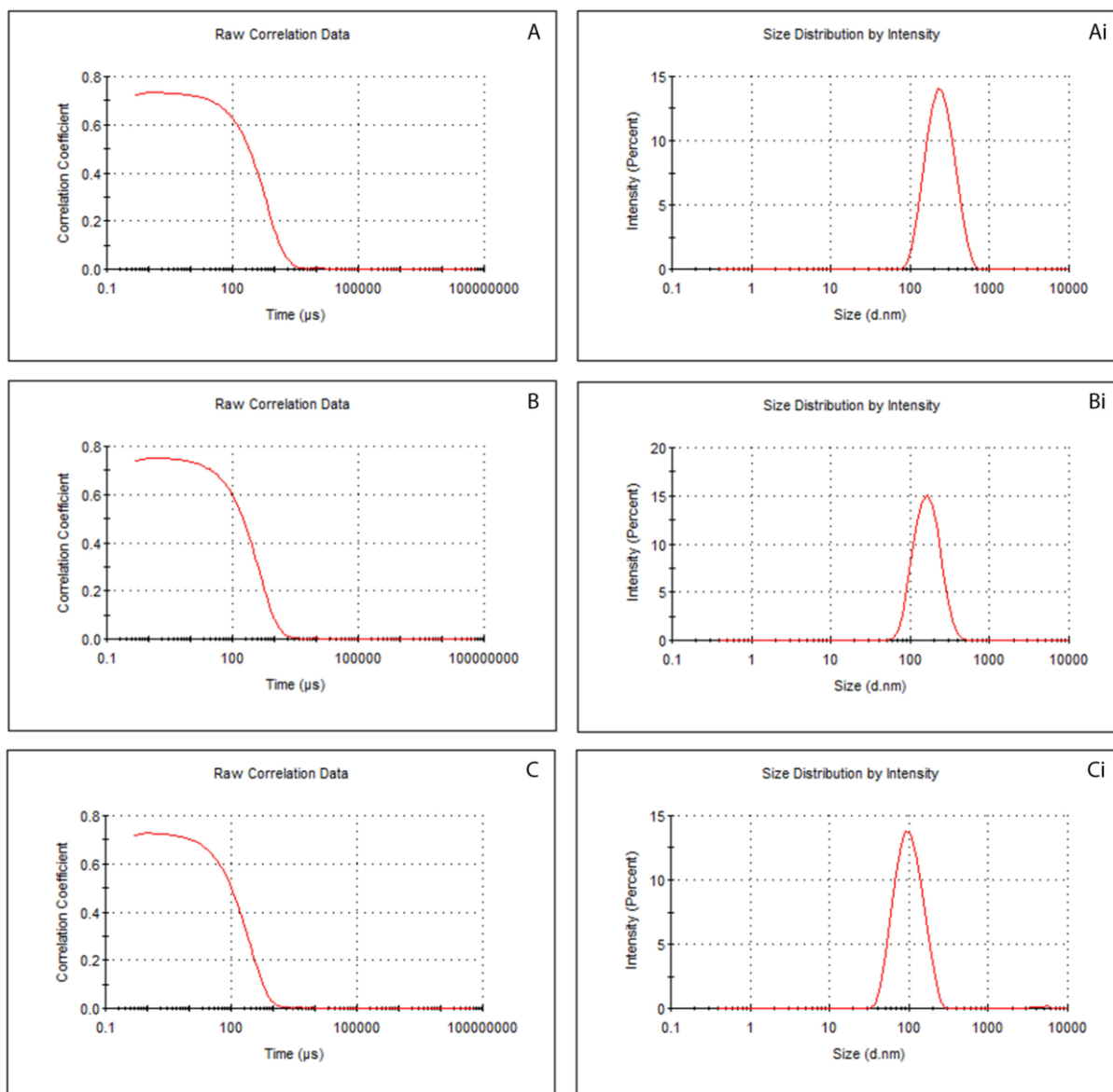
## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Desenvolvimento de nanoestruturas

Foram desenvolvidos três protocolos (A, B e C) baseados na metodologia de hidratação do filme lipídico, que resultaram em sistemas diferentes com relação ao tamanho de partícula segundo as análises de DLS, (Tabelas 3 a 5). O espalhamento de luz dinâmico (DLS), também denominado espectroscopia de correlação de fótons (PCS), é uma técnica vastamente utilizada para medir distribuição de tamanho hidrodinâmico de estruturas nanométricas e micrométricas dispersas em líquido, possibilitando caracterização rápida, não invasiva e que permite o reaproveitamento da amostra analisada.

O princípio do DLS se baseia no movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão, as quais se movem randomicamente. Partículas menores se movem mais rápido do que partículas maiores, resultando em diferente espalhamento de luz quando incidida por um laser, a variação da intensidade de espalhamento resultante do movimento Browniano permite o cálculo do tamanho hidrodinâmico das partículas pela equação de Stokes-Einstein (BHATTACHARJEE, 2016). A partir dessa técnica os lipossomas desenvolvidos pelos protocolos A, B e C foram analisados quanto ao tamanho e índice de polidispersão (PDI).

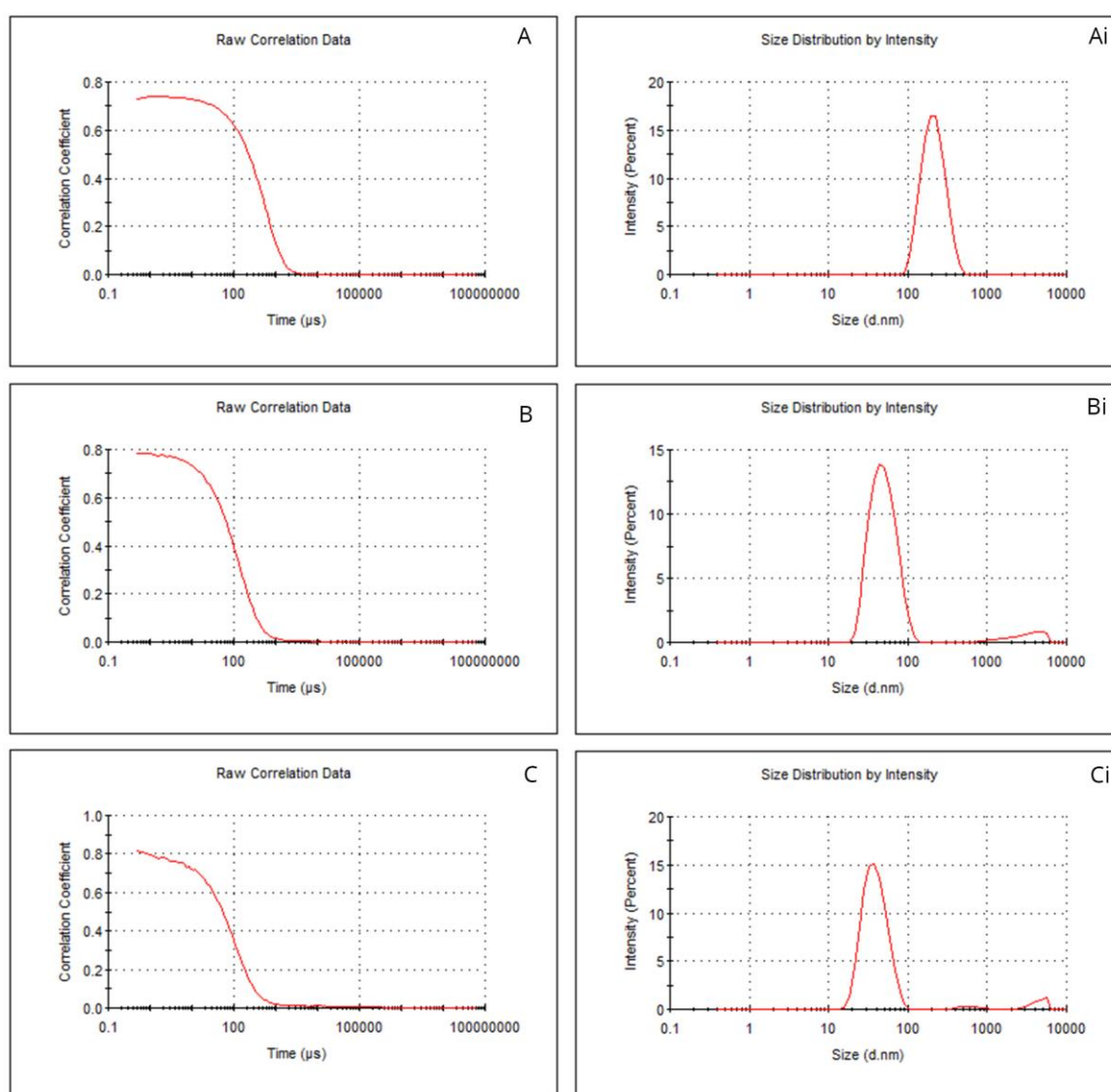
As formulações de DOPC obtidas empregando-se o protocolo A apresentaram *Z-average* (média do diâmetro hidrodinâmico por intensidade) de 221, 150 e 91 nm para os lipossomas contendo 0, 10 e 20% de DSPE-PEG, respectivamente (Tabela 3, Figura 10). Quanto ao tamanho de partícula por intensidade ( $D_h$ ), a mesma tendência foi observada. Portanto, a adição do fosfolípido peguilado, de cadeia alquílica saturada, favoreceu o empacotamento do DOPC, resultando na redução no tamanho das vesículas.



**Figura 10.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DOPC (Ai), DOPC/DSPE-PEG 10% (Bi) e DOPC/DSPE-PEG 20% (Ci) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo A. Curvas de correlação das amostras DOPC (A), DOPC/DSPE-PEG 10% (B) e DOPC/DSPE-PEG 20% (C).

Além do tamanho das partículas analisadas, o DLS fornece o PDI, que é um valor calculado a partir da análise de cumulantes e demonstra a heterogeneidade ou homogeneidade da amostra analisada. Amostras homogêneas (monodispersas) com tamanho semelhante entre todas as partículas, tendem a ter um PDI baixo ( $< 0,2$ ) (DANA EI *et al.*, 2018). Nossas análises de PDI evidenciaram populações monodispersas para os sistemas de DOPC, com valores de PDI variando de 0,113 a 0149.

Para os lipossomas de DMPC contendo DSPE-PEG, também se observou a redução dos valores de  $Z$ -average e  $D_h$  com a adição de fosfolípido peguilado. Nesse caso, os valores passaram de  $\sim 200$  nm para  $\sim 40$ -50 nm, sendo que o fato da cadeia alquílica de DSPE-PEG ser maior parece ter contribuído para empacotamento da bicamada, resultado em vesículas significativamente menores, o que pode ser observado nas curvas de DLS (Tabela 3, Figura 11). No entanto, os sistemas apresentaram valores de PDI superiores em relação às outras formulações (PDI = 0,223 para DMPC/DSPE-PEG 10% e PDI = 0,237 para DMPC/DSPE-PEG 20%) devido à menor homogeneidade da amostra que pode ser observada nos correlogramas e curvas de intensidade de espalhamento por tamanho (Figura 11 B-Bi e C-Ci).



**Figura 11.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DMPC (Ai), DMPC/DSPE-PEG 10% (Bi) e DMPC/DSPE-PE 20% (Ci) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento



obtidas empregando-se o protocolo A. Curvas de correlação das amostras DMPC (A), DMPC/DSPE-PEG 10% (B) e DMPC/DSPE-PEG 20% (C) .

**Tabela 3** - Resultados de análises de DLS de lipossomas preparados com protocolo A (hidratação do filme à temperatura ambiente). As amostras foram analisadas quanto ao tamanho de partículas baseado na distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada (Dh), índice de polidispersão (PDI) e Z-average.

<i>Amostra</i>	<i>Z-average (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Dh (nm) (distribuição por intensidade)</i>
<i>DOPC</i>	221	0,149	254
<i>DOPC/DSPE-PEG 10%</i>	150	0,113	172
<i>DOPC/DSPE-PEG 20%</i>	91	0,138	105
<i>DMPC</i>	199	0,082	219
<i>DMPC/DSPE-PEG 10%</i>	48	0,223	51
<i>DMPC/DSPE-PEG 20%</i>	38	0,237	39

Burkhard Bechinger e colaboradores descreveram o impacto de utilizar mistura de fosfolipídios de cadeia alquílica ( $l_c$ ) de comprimentos diferentes na formação de bicelas ou micelas, o que pode ter ocorrido com as formulações de DMPC e DSPE-PEG (BECHINGER; RESENDE; AISENBREY, 2011). Bicelas são estruturas discoides caracterizadas por uma bicamada formada por misturas de fosfolipídios, sendo que um deles, geralmente de cadeia longa, se acumula preferencialmente na porção central e fosfolipídios de cadeia curta nas bordas. Os autores descrevem que a formação de bicelas dependem da temperatura e proporção entre os fosfolipídios de cadeia curta e os de cadeia longa, denominada razão q (BECHINGER; RESENDE; AISENBREY, 2011). Estas estruturas podem ter se formado nas formulações de DMPC e DSPE-PEG pela diferença de hidrofobicidade e valor de parâmetro crítico de agregação dos fosfolipídios (Figura 5), o que é reforçado pelo fato de que o DSPE-PEG tende a se auto agregar espontaneamente em estruturas micelares e possui solubilidade limitada em bicamadas lipídicas, a concentração limitante é descrita na faixa de 4 a 10 mol % dos fosfolipídios peguilado, acima dessa faixa é induzida a formação de estruturas micelares variáveis (SANDSTRÖM; JOHANSSON; EDWARDS, 2007; VIITALA *et al.*, 2019). A formação de nanoestruturas micelares na presença de 25% de PEG-2000 também já foi descrita na literatura tanto para DOPC quanto DMPC em formulações DOPC/DSPE-PEG e DMPC/DMPE-PEG, com relato da formação simultânea de micelas e lipossomas dependendo da temperatura (SANDSTRÖM; JOHANSSON; EDWARDS, 2007).

A presença de PEG e o tamanho de lipossomas influenciam no tempo de circulação dessas nanoestruturas na corrente sanguínea. Estudos a partir de lipossomas formados por fosfolipídios radiotivamente marcados, peguados ou não, demonstraram que o tamanho do lipossoma influencia no acúmulo no baço e fígado, tendo como consequência um menor tempo na circulação em camundongos. Lipossomas de diâmetro entre 70-200 nm permaneceram por mais tempo na circulação sanguínea (lipossomas de longa-circulação), os lipossomas menores,  $d < 70\text{nm}$ , se acumularam no fígado, enquanto lipossomas de  $d > 200\text{nm}$  se acumularam no baço. Esse acúmulo e o menor tempo de circulação foram dependentes também da presença de PEG (LITZINGER *et al.*, 1994).

Levando em consideração os lipossomas de DMPC e DOPC obtidos pelo protocolo A (Tabela 3), desenvolvemos o protocolo B com intuito de diminuir a possível formação de agregados micelares ou bicelas e obter lipossomas com tamanho hidrodinâmico entre 100-200 nm que, portanto, possivelmente permaneçam por mais tempo na circulação sanguínea. Sabendo que a temperatura  $T_m$  influencia no estado líquido-gel dos fosfolipídios e, conseqüentemente, na sua organização na bicamada lipídica, a utilização de temperaturas acima da  $T_m$  ( $T_m = 23^\circ\text{C}$  para o DOPC e  $T_m = 24^\circ\text{C}$  para o DMPC) durante a hidratação do filme, bem como proporções adequadas de fosfolipídio peguado, pode levar à melhor acomodação das moléculas de fosfolipídio peguado para que não ocorra a formação de nanoestruturas menores.

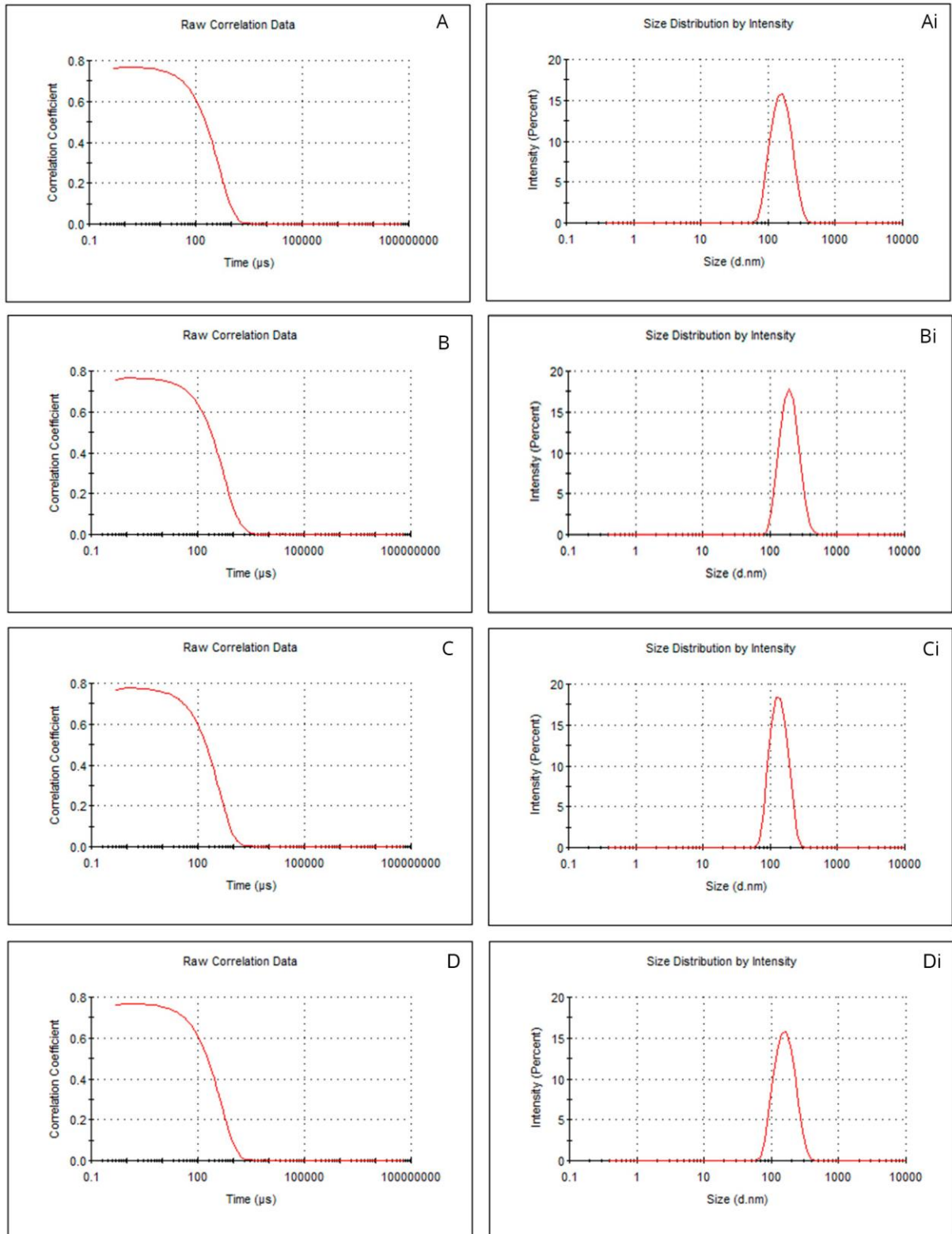
No protocolo B empregamos aquecimento a  $40^\circ\text{C}$  na etapa de hidratação do filme e, adicionalmente, estudamos uma proporção mais baixa de fosfolipídio peguado na formulação (Tabela 4 e Figuras 12 à 13). Com a diminuição do fosfolipídio peguado para 5%, observamos que o valor de *Z-average* das amostras permaneceu acima de 100 nm (Figuras 12 (Bi) e 13 (Bi)), compatível com a formação predominante de vesículas de tamanho desejável para emprego terapêutico. Quando comparamos as formulações contendo 10% de DSPE-PEG obtidas pelo protocolo B com as respectivas formulações obtidas pelo protocolo A, observamos que o emprego da temperatura acarretou aumento de tamanho e diminuição do PDI. Portanto, a utilização de aquecimento para a hidratação do filme lipídico contribuiu para o processo de auto agregação preferencialmente em estruturas vesiculares por facilitar a acomodação do fosfolipídio peguado na bicamada lipídica. No entanto, apesar do aumento de *Z-average* e  $D_h$  para as amostras de DMPC/DSPE-PEG 10% e DMPC/DSPE-PEG 20%, as curvas de espalhamento de luz em função da intensidade de luz espalhada apresentaram distribuição bimodal (Figuras 13 Ci e Di). Cabe ressaltar que a formulação de DMPC/DSPE-PEG 20%

também apresentou PDI bem acima do esperado (0,439) caracterizando uma amostra polidispersa e, como mencionado, com distribuição bimodal. Portanto, considerando a alta polidispersão e diâmetro hidrodinâmico menor que 70 nm, assim como dados da literatura sobre a proporção adequada para acomodação do fosfolípido peguilado na bicamada (SANDSTRÖM; JOHANSSON; EDWARDS, 2007; VIITALA *et al.*, 2019), os sistemas DSPE-PEG a 20% foram descartados.

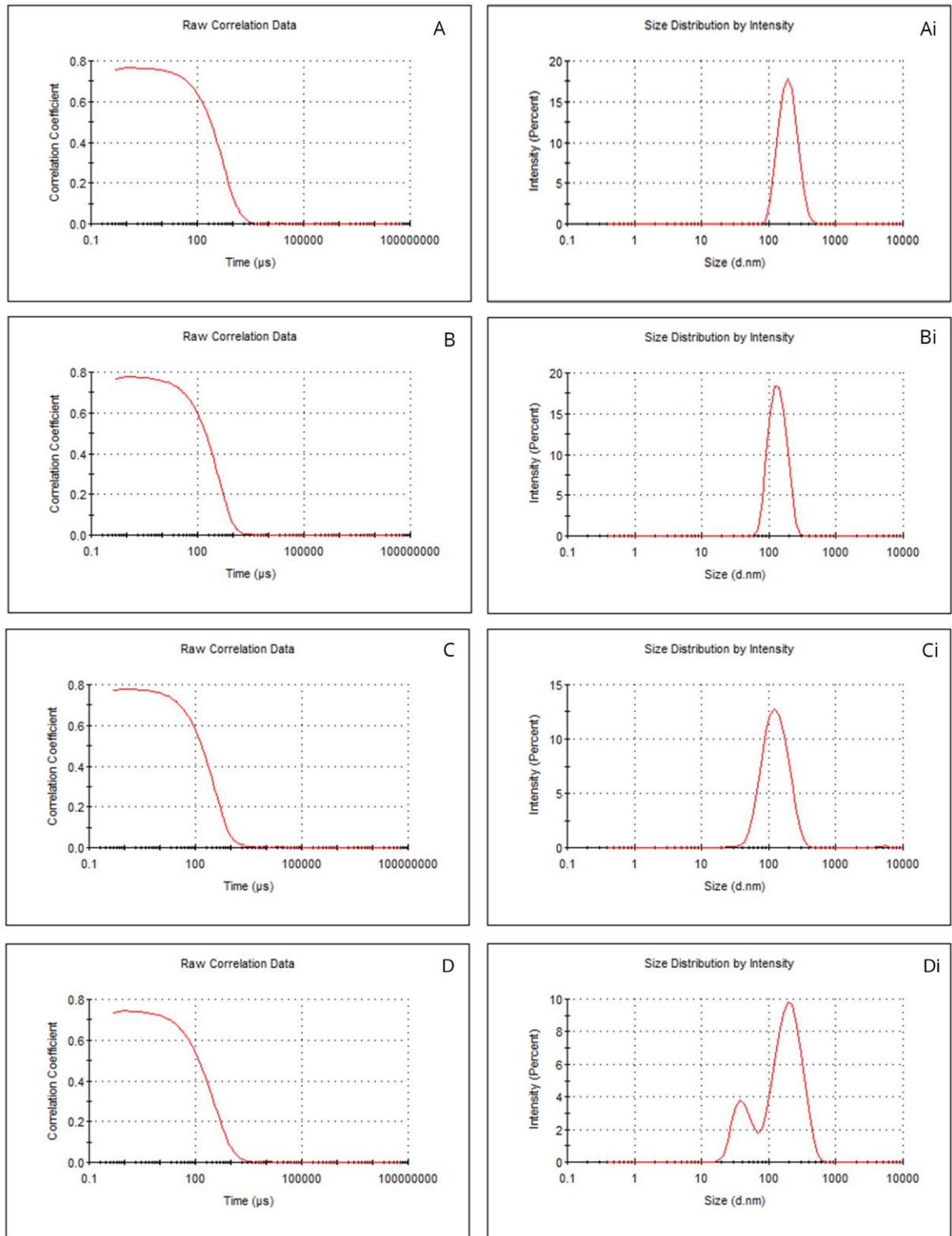
**Tabela 4** - Resultados das análises de DLS de lipossomas preparados utilizando protocolo B (hidratação do filme a 40°C). As amostras foram analisadas quanto ao tamanho de partículas baseado na distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada (Dh), índice de polidispersão (PDI) e Z-average.

<i>Amostra</i>	<i>Z-average (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Dh (nm) (distribuição por intensidade)</i>
<i>DOPC</i>	200	0,100	224
<i>DOPC/DSPE-PEG 5%</i>	164	0,096	184
<i>DOPC/DSPE-PEG 10%</i>	139	0,148	166
<i>DOPC/DSPE-PEG 20%</i>	147	0,099	165
<i>DMPC</i>	186	0,084	202
<i>DMPC/DSPE-PEG 5%</i>	128	0,065	138
<i>DMPC/DSPE-PEG 10%</i>	112	0,189	139 e 4954 <sup>a</sup>
<i>DMPC/DSPE-PEG 20%</i>	106	0,439	209 e 41 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Amostras apresentaram dois picos correspondendo a populações de diferentes tamanhos.



**Figura 12.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DOPC (Ai), DOPC/DSPE-PEG 5% (Bi), DOPC/DSPE-PEG 10% (Ci) e DOPC/DSPE-PEG 20% (Di) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo B. Curvas de correlação da amostras DOPC (A), DOPC/DSPE-PEG 5% (B), DOPC/DSPE-PEG 10% (C) e DOPC/DSPE-PEG 20% (D).

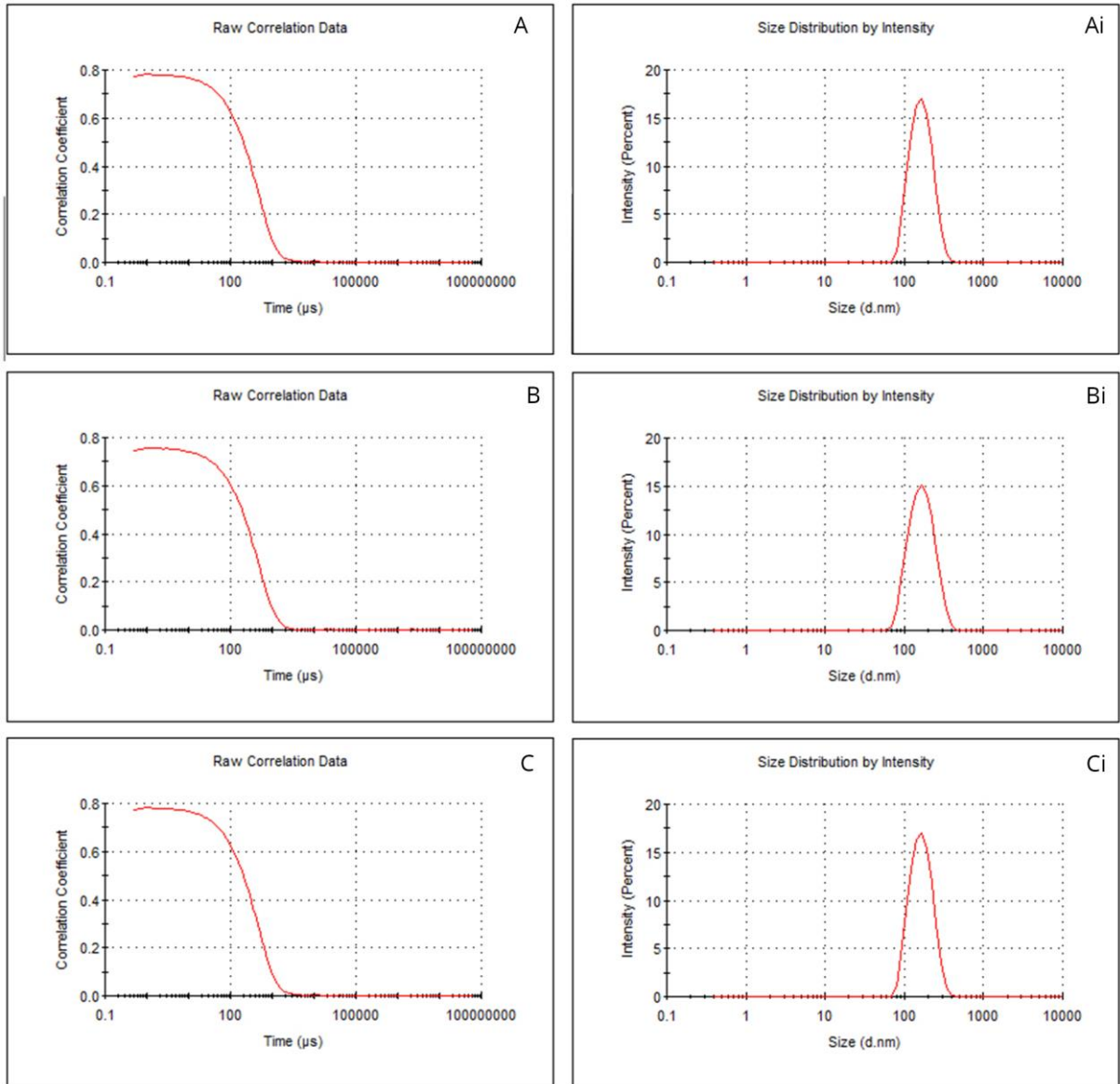


**Figura 13.** Curvas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras de DMPC (Ai), DMPC/DSPE-PEG 5% (Bi), DMPC/DSPE-PEG 10% (Ci) e DMPC/DSPE-PEG 20% (Di) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo B. Curvas de correlação da amostras DMPC (A), DMPC/DSPE-PEG 5% (B), DMPC/DSPE-PEG 10% (C) e DMPC/DSPE-PEG 20% (D).

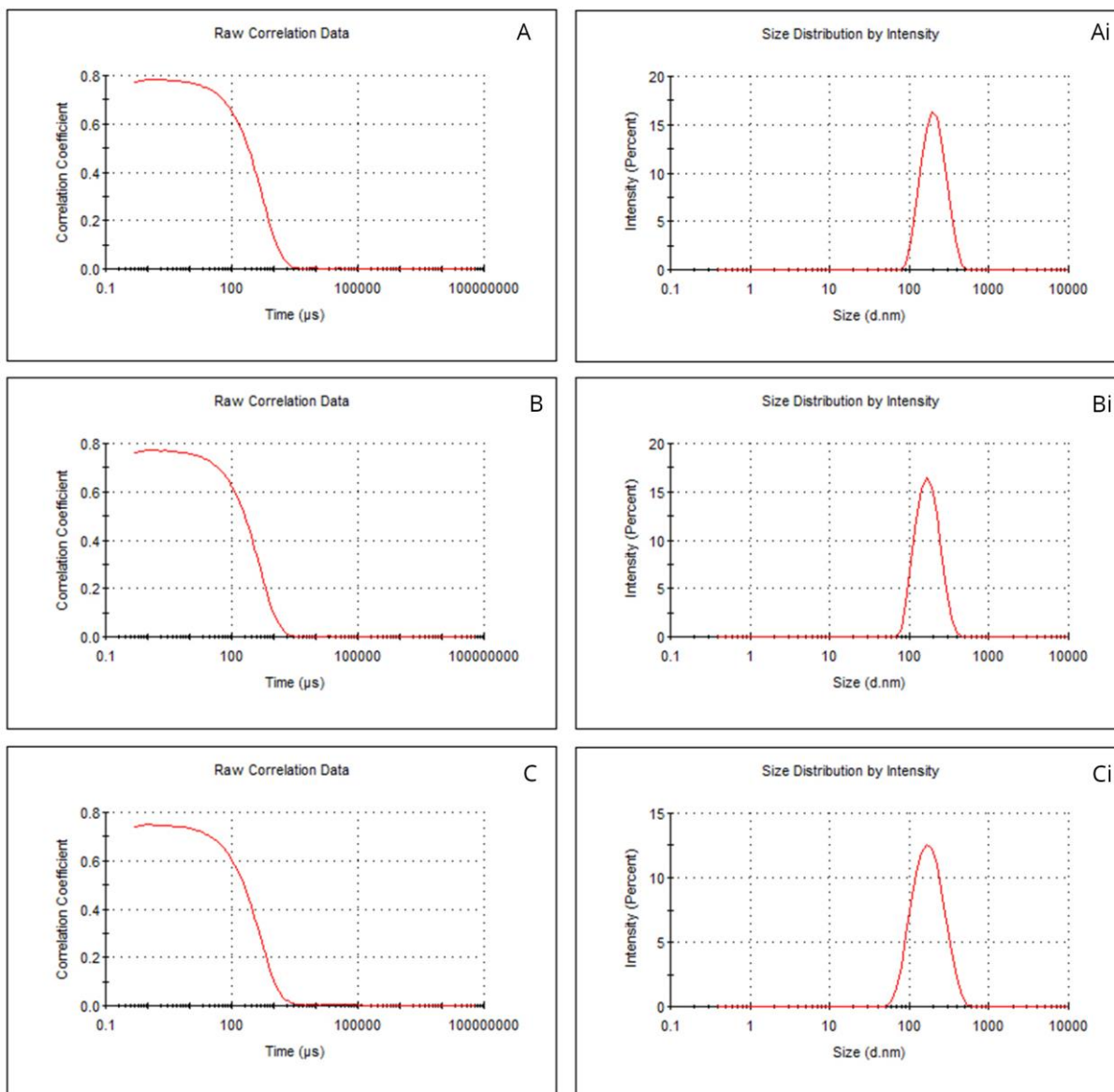
Na tentativa de melhorar o tamanho e PDI dos lipossomas peguilados, desenvolvemos o terceiro protocolo (Protocolo C), em que as amostras são aquecidas (37°C) não somente durante a hidratação do filme, mas também na etapa de extrusão. Verificamos que o aquecimento das amostras durante a extrusão resulta em aumento do tamanho e uniformidade das nanoestruturas contendo 10% de DSPE-PEG. O PDI permaneceu abaixo 0,2 para todas as amostras e os sistemas apresentaram distribuição monomodal (Tabela 5, Figura 14 e 15). Esses resultados reafirmam a importância da temperatura acima da  $T_m$  de fase líquido-gel do fosfolipídio que resulta na melhor acomodação dos fosfolipídios peguilados durante a formação da bicamada (WALDE; ICHIKAWA, 2001). Sendo assim, o protocolo C foi considerado mais adequado para a produção dos lipossomas e lipossomas peguilados.

**Tabela 5** - Resultados das análises de DLS de lipossomas preparados utilizando protocolo C (hidratação do filme e extrusão a 37°C). As amostras foram analisadas pelo tamanho de partículas baseado na média de tamanho Z-average, índice de polidispersão (PDI) e distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada (Dh). Dados correspondem a média  $\pm$  SD de n = 3 experimentos independentes.

<i>Amostra</i>	<i>Z-average (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Dh (nm) (distribuição por intensidade)</i>
<i>DOPC</i>	202 $\pm$ 9	0,143 $\pm$ 0,019	227 $\pm$ 10
<i>DOPC/DSPE-PEG 5%</i>	155 $\pm$ 10	0,084 $\pm$ 0,014	172 $\pm$ 9
<i>DOPC/DSPE-PEG 10%</i>	154 $\pm$ 7	0,079 $\pm$ 0,009	169 $\pm$ 9
<i>DMPC</i>	193 $\pm$ 6	0,069 $\pm$ 0,024	210 $\pm$ 3
<i>DMPC/DSPE-PEG 5%</i>	157 $\pm$ 7	0,090 $\pm$ 0,014	174 $\pm$ 8
<i>DMPC/DSPE-PEG 10%</i>	142 $\pm$ 10	0,190 $\pm$ 0,020	176 $\pm$ 9



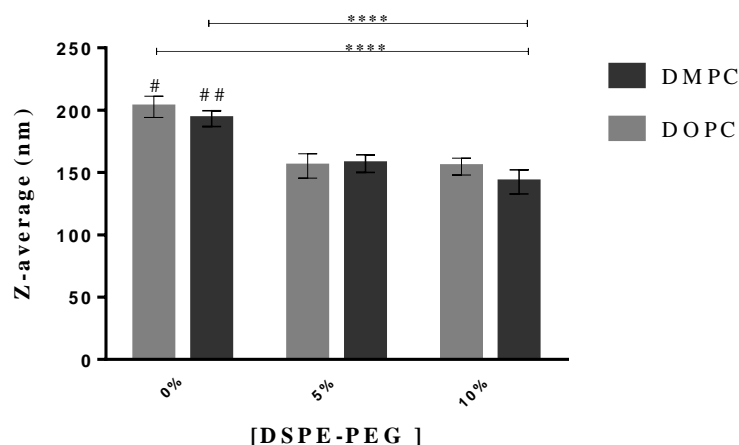
**Figura 14.** Curvas de espalhamento de luz dinâmica (DLS) para as amostras de DOPC (Ai), DOPC/ DSPE-PEG 5% (Bi) e DOPC/DSPE-PEG 10% (Ci) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo C. Curvas de correlação da amostras DOPC (A), DOPC/DSPE-PEG 5% (B) e DOPC/DSPE-PEG 10% (C).



**Figura 15.** Curvas de espalhamento de luz dinâmica (DLS) para as amostras de DMPC (Ai), DMPC/DSPE-PEG 5% (Bi) e DMPC/DSPE-PEG 10% (Ci) por distribuição de tamanho de partícula por intensidade de espalhamento obtidas empregando-se o protocolo B. Curvas de correlação da amostras DMPC (A), DMPC/DSPE-PEG 5% (B) e DMPC/DSPE-PEG 10% (C).

Em comparativo entre as formulações obtidas pelo protocolo C (Figura 16), é possível afirmar que a presença do fosfolípido peguilado resulta na redução significativa do tamanho médio (*Z-average*) das nanoestruturas se comparados aos lipossomas sem PEG, como já relatado na literatura (KONTOGIANNOPOULOS *et al.*, 2014; TSERMENTSELI *et al.*, 2018).



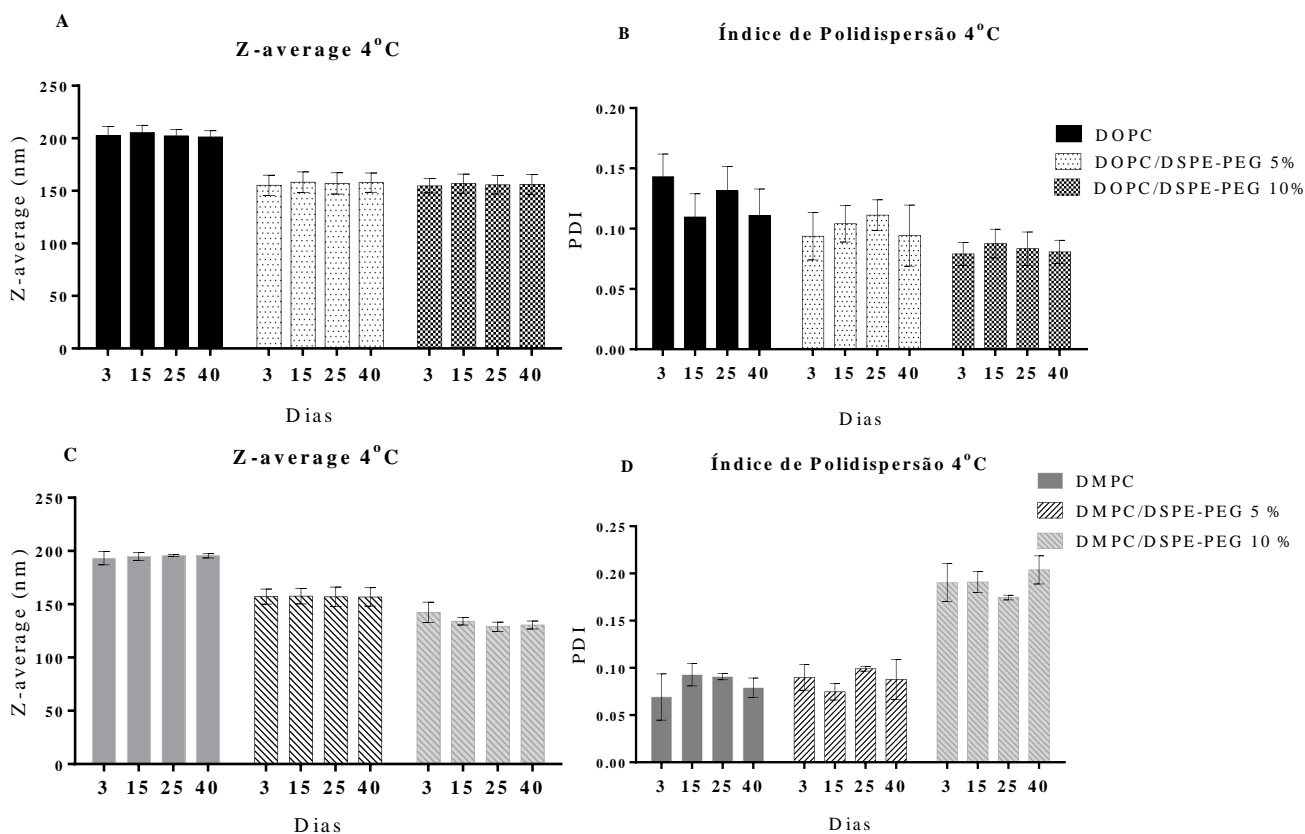


**Figura 16.** Distribuição de média de tamanho Z-average, baseado na concentração crescente de DSPE-PEG, para sistemas preparados pelo protocolo C. # Amostra apresentou diferença significativa \*\*\* em relação a DOPC/DSPE-PEG 5%, DMPC/DSPE-PEG 5% e DOPC/DSPE-PEG 10%. ## Amostra apresentou diferença significativa \*\* em relação a DOPC/DSPE-PEG 5% e DMPC/DSPE-PEG 5% e \*\*\* em relação a DOPC/DSPE-PEG 10%. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ ;  $n = 3$  experimentos independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão.

### 5.1.1. Estabilidade dos lipossomas

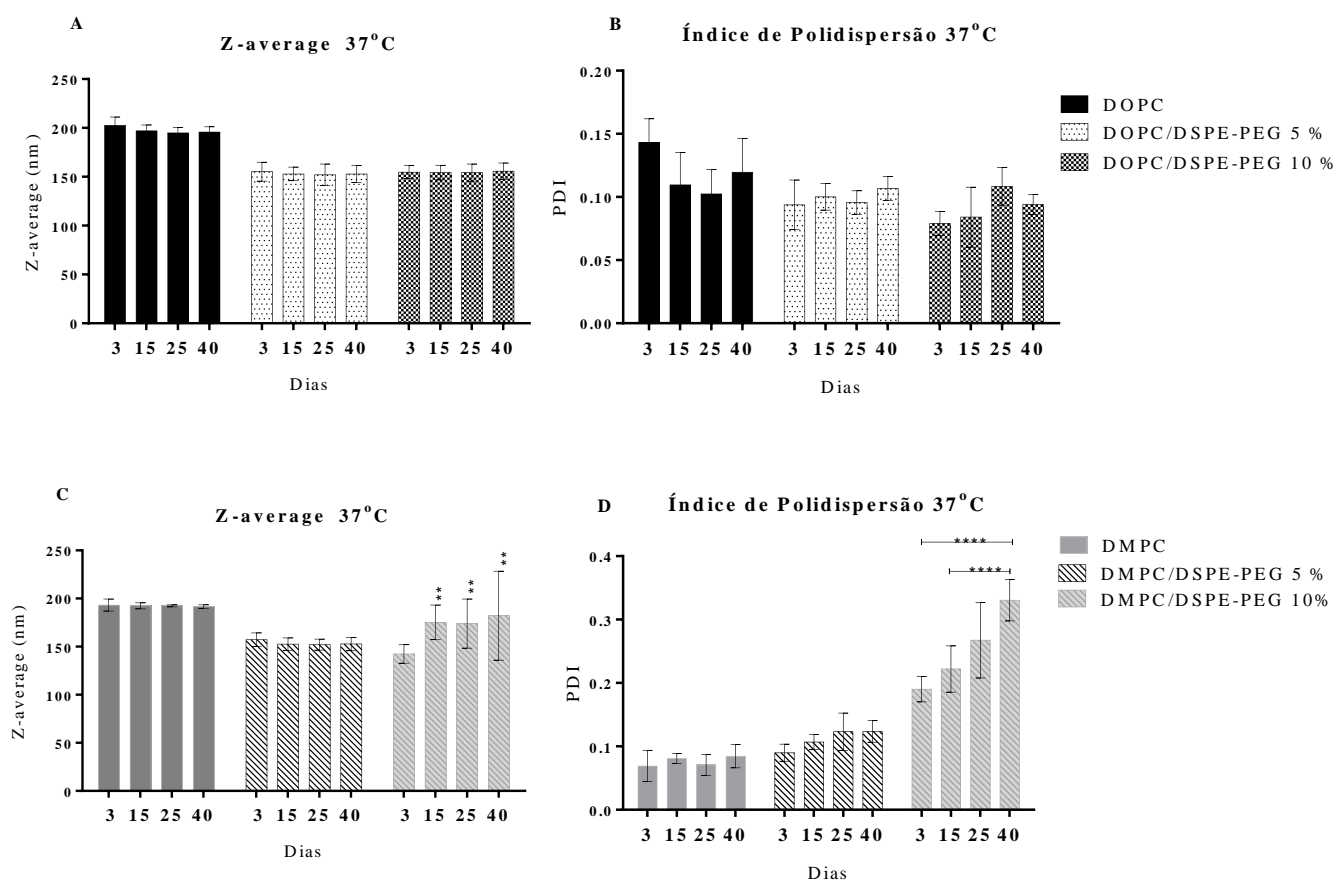
#### 5.1.1.1. Estabilidade ao longo do tempo

Alguns dos fatores importantes para se analisar em formulações lipossomais, além do tamanho e polidispersão, são a eficiência de encapsulação (%EE) e a estabilidade ao longo do tempo. Nesse sentido, as formulações lipossomais em forma hidratada foram analisadas quanto à estabilidade ao longo de 40 dias, quando estocadas a 4°C e 37°C (MUPPIDI *et al.*, 2012) (Figuras 17 e 18).



**Figura 17.** Estabilidade física de formulações lipossomais estocadas a 4°C. A e B Z-average e PDI respectivamente de amostras DOPC, DOPC/DSPE-PEG 5% e DOPC/DSPE-PEG 10%; C e D Z-average e PDI respectivamente de amostras DMPC, DMPC/DSPE-PEG 5% e DMPC/DSPE-PEG 10%. N=3 experimentos independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Como pode ser observado na Figura 17, as formulações de lipossomas e lipossomas peguilados vazias (sem enzima) são estáveis à 4°C durante 40 dias, sendo que não houve alterações significativas na média *Z-average* e no índice de polidispersão durante o período. A estabilidade das nanoestruturas a 37°C também foi avaliada por 40 dias (Figura 18). As formulações DOPC, DOPC/DSPE-PEG 5%, DOPC/DSPE-PEG 10% não apresentaram variação significativa na média *Z-average* e PDI (A e B, Figura 18). As formulações DMPC, DMPC/DSPE-PEG 5% também permaneceram estáveis, sem variação significativa no *Z-average* e PDI, no entanto a formulação DMPC/DSPE-PEG 10% apresentou variação significativa em *Z-average* e PDI (Figura 18, C e D).



**Figura 18.** Estabilidade física de formulações lipossomais estocadas a 37°C. A e B Z-average e PDI respectivamente de amostras DOPC, DOPC/DSPE-PEG 5% e DOPC/DSPE-PEG 10%; C e D Z-average e PDI respectivamente de amostras DMPC, DMPC/DSPE-PEG 5% e DMPC/DSPE-PEG 10%. N=3 experimentos independentes. As barras de erro indicam o desvio padrão.

A instabilidade de lipossomas pode ser perceptível quando ocorre alteração no tamanho, devido à agregação/fusão de vesículas e/ou extravasamento do material encapsulado devido à degradação (ANDERSON; OMRI, 2004; GULDIKEN *et al.*, 2018; MUPPIDI *et al.*, 2012). Dois parâmetros estão ligados à degradação e desestabilização: oxidação ou hidrólise dos fosfolipídios (ANDERSON; OMRI, 2004). A desestabilização da bicamada lipídica ocorre devido à oxidação das cadeias insaturadas de hidrocarbonetos dos fosfolipídios que compõem os lipossomas, como no caso das formulações compostas por DOPC. A oxidação, promovida por compostos oxigenados, resulta em instabilidade e aumenta a permeabilidade da bicamada (GULDIKEN *et al.*, 2018). Para evitar a oxidação, usualmente são adicionados agentes antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol (ANDERSON; OMRI, 2004; GULDIKEN *et al.*, 2018; HEURTAULT *et al.*, 2003). O  $\alpha$ -tocoferol se intercala entre os fosfolipídios da bicamada e é

retido no espaço formado pela duplas ligações dos fosfolipídios insaturados, promovendo maior estabilidade à membrana lipídica (HINCHA, 2008; URANO *et al.*, 1990).

Para as formulações de DOPC, a presença de  $\alpha$ -tocoferol (1%) possivelmente evitou a alteração do tamanho hidrodinâmico nas diferentes temperaturas (Figura 17 e 18) e possível fusão de membranas lipídicas (HINCHA, 2008), contribuindo para a estabilidade. Já para as formulações de DMPC, apenas a DMPC/DSPE-PEG 10%, demonstrou alteração de tamanho no estudo de estocagem a 37°C, o que não era esperado devido ao efeito estérico do PEG, que previne agregação das vesículas. É possível que o aumento da temperatura desestabilize o fosfolipídio peguado e resulte em sua expulsão da membrana dos lipossomas, com consequente alteração na curvatura da bicamada e tamanho dos lipossomas. Também devemos considerar a possibilidade de contaminação das amostras, sendo que o experimento deve ser repetido para que se confirme o efeito observado, o que infelizmente não foi possível até o momento. Não obstante, a análise visual de todas as formulações não indicou contaminação por microrganismos como fungos ou aspecto anormal (MUPPIDI *et al.*, 2012).

#### **5.1.1.2.Determinação do potencial zeta**

O potencial zeta é um importante indicador de estabilidade coloidal de lipossomas. Em geral, para nanoestruturas que são estabilizadas pela presença de carga, valores de potencial zeta acima de 30mV e abaixo de -30mV são considerados adequados e associados a elevada estabilidade coloidal. Em outras palavras, a carga de superfície é suficientemente alta para resultar em repulsão eletrostática entre as nanoestruturas, evitando agregação (KUMAR; DIXIT, 2017). A medida do potencial zeta depende de vários parâmetros que incluem a temperatura da amostra, o pH, a concentração iônica e a viscosidade do solvente utilizado. Mudanças nessas condições podem alterar o valor final da medida da mesma amostra e sem esses parâmetros pré-determinados, a reprodutibilidade e a caracterização do potencial de superfície podem ser afetadas (KUMAR; DIXIT, 2017; SMITH *et al.*, 2017).

O potencial zeta das formulações de DOPC, DOPC/DSPE-PEG 5%, DOPC/DSPE-PEG 10%, DMPC, DMPC/DSPE-PEG 5%, e DMPC/DSPE-PEG 10%, determinado em amostras diluídas e preparadas em PBS (Tabela 6), permaneceu negativo e próximo a zero. A formulação DOPC/DSPE-PEG 10% foi a que apresentou potencial zeta mais elevado em módulo. As medidas demonstram que a presença de DSPE-PEG, nas concentrações empregadas, parece não alterar o potencial de superfície de lipossomas (Tabela 6).

A concentração de íons presentes nas soluções influencia no potencial zeta de lipossomas formados por fosfolipídios zwitteriônicos (DMPC e DOPC) como observado nos nossos resultados. O potencial zeta de lipossomas de DOPC já é descrito na literatura por outros autores, que obtiveram resultados similares, ou seja próximo a zero em PBS (CHIBOWSKI; SZCZEŚ, 2016; DISALVO; BOUCHET, 2014; MAITY *et al.*, 2016).

A presença de fosfolipídios peguilados em baixas concentrações, como descrito na literatura, não altera o potencial zeta das nanoestruturas, que permanecem aproximadamente neutras (-10mV a +10mV) (SMITH *et al.*, 2017). No caso dos lipossomas peguilados, a estabilidade coloidal é adquirida pela repulsão estérica, promovida pela presença de DSPE-PEG.

A deterioração dos eletrodos de ouro das cubetas para determinação de potencial zeta, comum devido à alta concentração salina do meio (MAITY *et al.*, 2016), impossibilitou realizar novas análises das formulações. Portanto, realizamos medidas de potencial zeta em meio aquoso, sendo que para isso foram preparados lipossomas com as mesmas concentrações de fosfolipídios e o mesmo protocolo, com exceção da hidratação do filme que foi realizada com água deionizada (Tabela 5). As formulações de lipossomas de DOPC e DMPC em água apresentaram potencial zeta de -20,4 e -17 mV respectivamente. As demais formulações apresentaram baixa resolução de leitura; cabe ressaltar que as formulações em água não demonstraram diferenças de tamanho significativas em relação às formulações preparadas em PBS (Tabela 6).

**Tabela 6** – Potencial zeta das formulações lipossomais.

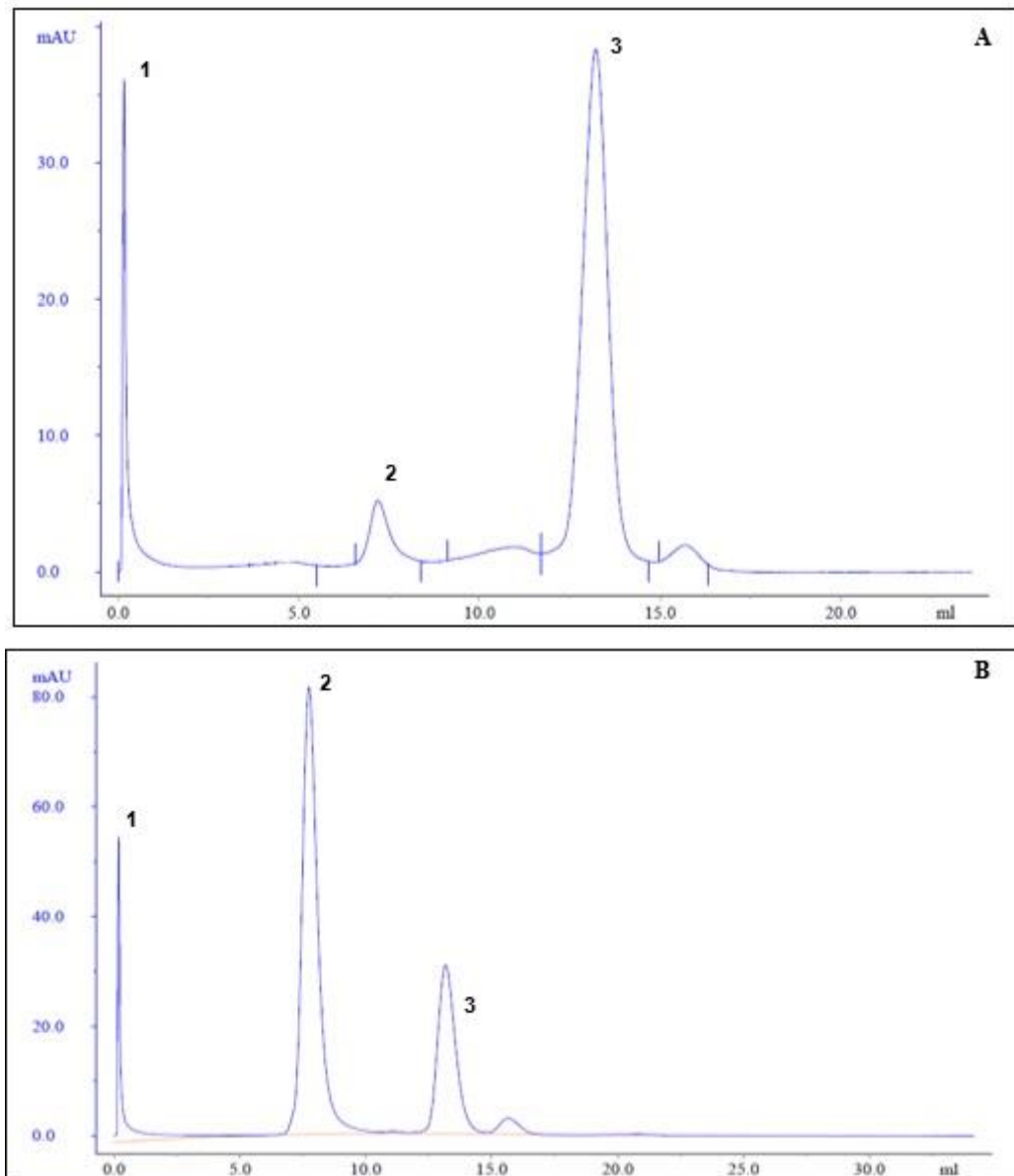
<i>Amostra</i>	<i>Potencial zeta (mV)<sup>a</sup></i>	<i>Potencial zeta (mV) H<sub>2</sub>O<sup>b</sup></i>	<i>Z-average (nm)/PDI<sup>b</sup></i>
<i>DOPC</i>	-3,57	-20,4	181,5/ 0,069
<i>DOPC/DSPE-PEG 5%</i>	-3,69	*	-
<i>DOPC/DSPE-PEG 10%</i>	-5,89	*	-
<i>DMPC</i>	-4,55	-17,0	179,1/0,063
<i>DMPC/DSPE-PEG 5%</i>	-3,73	*	-
<i>DMPC/DSPE-PEG 10%</i>	-2,57	*	-

<sup>a</sup>Amostras preparadas e diluídas em PBS. <sup>b</sup>Amostras preparadas e diluídas em água deionizada. \*formulações apresentaram leitura de potencial zeta de baixa qualidade.

## 5.2. Encapsulação da L-asparaginase nos sistemas lipossomais

A encapsulação da enzima ASNase nas formulações lipossomais pode ser feita por dois métodos: 1- encapsulação passiva, em que a biomolécula é encapsulada durante a formação do lipossoma ou 2- encapsulação ativa, em que a biomolécula é incorporada após a formação do lipossoma. Nesse trabalho utilizamos a segunda opção, que tem por vantagem ser independente do tempo e local de produção dos lipossomas e preservar a enzima do contato com solventes utilizados na produção dos lipossomas (MONTEIRO *et al.*, 2014).

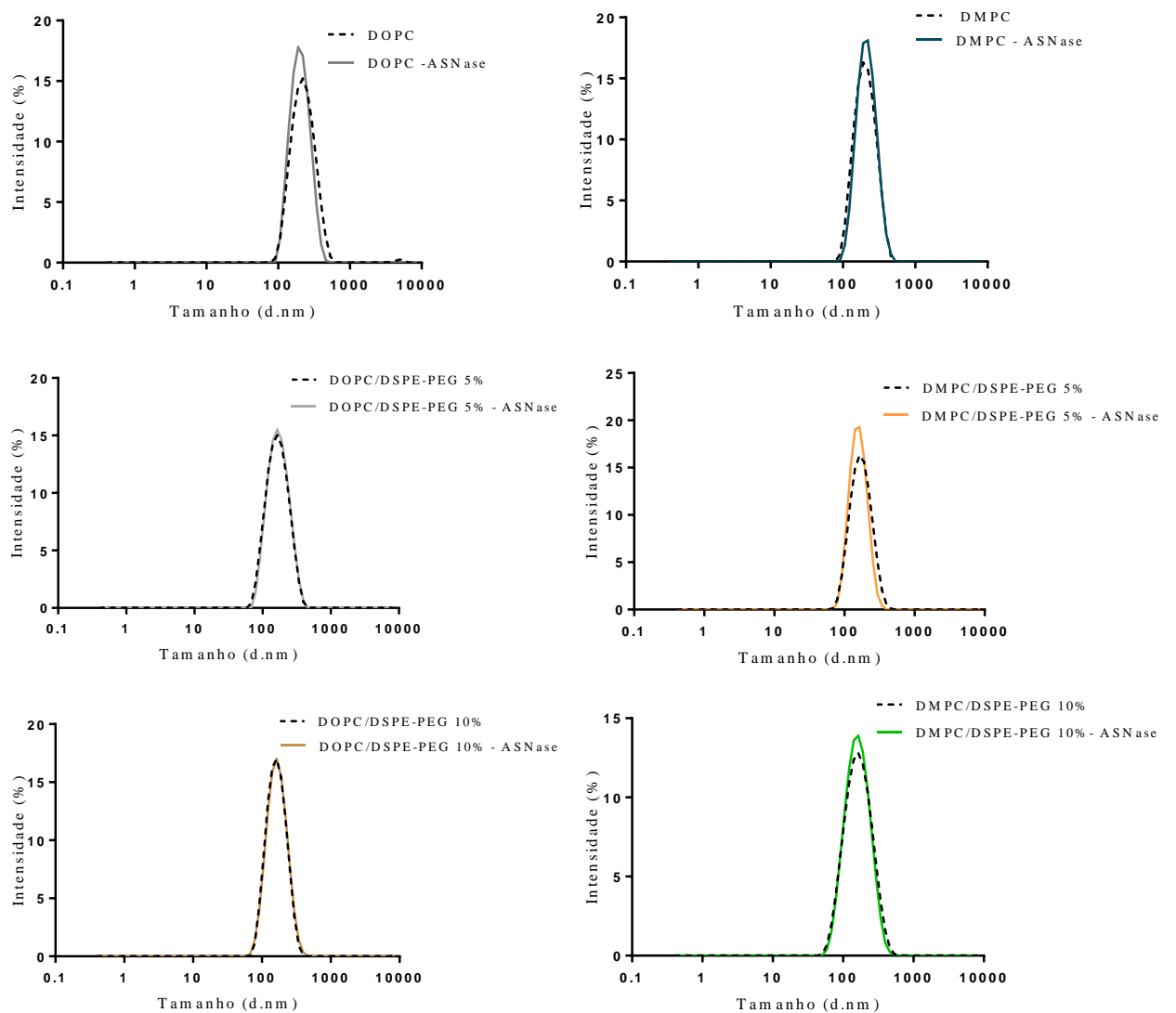
A ASNase foi encapsulada em lipossomas pelo método de eletroporação, seguindo o protocolo descrito por Bueno (BUENO *et al.*, 2020). A técnica é baseada no uso de campo elétrico que gera poros temporários na membrana da nanoestrutura permitindo a entrada da proteína. É uma metodologia muito utilizada para a transfecção gênica celular (CORREA; SCHELLY, 1998; WANG *et al.*, 2012), além de inserção e liberação de biomoléculas em células e vesículas, como lipossomas (YI *et al.*, 2013). Após a eletroporação, as amostras foram analisadas por cromatografia de exclusão molecular (Figura 19). No cromatograma referente à ASNase pura em PBS, (Figura 19-A), o pico 1 refere-se ao volume morto (resíduos que permanecem na coluna de cromatografia de corridas anteriores), o pico 2 provavelmente corresponde a proteína agregada e o pico 3 se refere à ASNase pura e solúvel, sendo a área calculada 30.65 mAU\*mL, correspondendo ao total de enzima da solução inicial injetada (5 mg/ml de ASNase) (HWANG *et al.*, 2012).



**Figura 19.** Cromatografia de exclusão molecular, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** solução de L-asparaginase (5 mg/mL): pico n° 1 corresponde ao volume morto da coluna, pico n° 2 representa agregação proteica, pico n° 3 ASNase pura, área correspondente a 30.65 mAU\*mL. **B-** Formulação de DOPC/DSPE-PEG 5% após a eletroporação em presença de ASNase (5 mg/mL): pico n° 1 corresponde ao volume morto da coluna, pico n° 2 representa os lipossomas, pico n° 3 representa a ASNase não encapsulada, área correspondente a 27.37 mAU\*mL.

Na Figura 19B, o pico 1 se refere ao volume morto, o pico 2 corresponde aos lipossomas de DOPC/DSPE-PEG 5% contendo ASNase em seu interior, e o pico 3 equivale à ASNase da solução inicial que não foi encapsulada durante a eletroporação; esse perfil se repete para todas as outras formulações (Figuras A1 a A6). As frações correspondentes aos lipossomas (pico 2) foram combinadas e analisadas por DLS (Figura 20). Como pode ser observado, para todos os

sistemas investigados picos semelhantes foram obtidos para os sistemas lipossomais vazios e contendo a ASNase, comprovando que o processo de encapsulação e purificação dos lipossomas contendo ASNase não alterou as características das nanoestruturas. Adicionalmente, não se observa o pico referente à enzima livre, comprovando a eficiência da purificação.



**Figura 20.** Análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS), distribuição por intensidade, de formulações antes e após encapsulação da ASNase e purificação (formulações identificadas como pós purificação).

A eficiência de encapsulação (%EE) dos sistemas foi calculada e os valores são apresentados na Tabela 7. Como pode ser observado, os valores variaram entre 10% a 16%, e não foi observada correlação entre a %EE e a presença de fosfolípido pegulado. Os valores obtidos foram similares aos encontrados por WANG *et al.*, 2012 para a encapsulação da



proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*) em polimerossomas, ainda que utilizando voltagem superior (2,50 kV) para eletroporação das vesículas poliméricas. Os dados de encapsulação de proteínas em lipossomas são variáveis na literatura, Yuko Okamoto e colaboradores relataram a encapsulação de BSA em lipossomas pela metodologia de hidratação do filme, segundo descrito a concentração da proteína em lipossomas foi 2,64 mg/mL para uma concentração de 200 mg/mL de solução inicial de BSA, correspondendo a EE = 1% (OKAMOTO *et al.*, 2018). Sanyog Jain e grupo, relataram para lipossomas peguilados e doxorubicina que a capacidade de carregamento variou entre 12-50 % (%w/w, razão entre fosfolipídio e proteína) (JAIN *et al.*, 2012). No entanto, deve-se considerar que este parâmetro, não é equivalente à %EE.

A encapsulação de ASNase em lipossomas já foi relatada por outros autores (GASPAR; PEREZ-SOLER; CRUZ, 1996), o parâmetro fração P/L (Proteína/ Lipídio) foi utilizado para quantificação da capacidade de carregamento, que variou entre 30-70 (%w/w). Cabe ressaltar que os autores utilizaram método de Lowry para quantificar a proteína encapsulada, entretanto, os valores de concentração de proteína podem ter sido superestimados visto o rompimento das vesículas com o tensoativo Triton X-100, que em concentrações altas interfere na metodologia empregada para quantificação proteica. Além disso, o emprego de ultracentrifugação para coleta dos lipossomas pode ter levado à sedimentação de agregados de proteína ou de proteínas aderidas à pedaços de membrana, o que por sua vez pode resultar em valores de taxa de encapsulação superestimados (HWANG *et al.*, 2012). Vale ressaltar que fatores como, carga do fosfolipídio, composição do tampão utilizado, concentração de fosfolipídios e a metodologia empregada para encapsulação podem também influenciar na encapsulação (BRGLES *et al.*, 2008). O método de encapsulação por congelamento e descongelamento, por exemplo, pode levar à desnaturação da proteína, resultando na formação de agregados que influenciam na encapsulação (CHAIZE *et al.*, 2004)

**Tabela 7** - Eficiência de encapsulação da enzima L-asparaginase nos sistemas lipossomais estudados.

<b>Formulação</b>	<b>Eficiência de encapsulação (%)</b>	<b>Erro Padrão (n = 4)</b>
DOPC	10	1
DOPC/DSPE-PEG 5%	16	0,8
DOPC/DSPE-PEG 10%	12	4
DMPC	14	8
DMPC/DSPE-PEG 5%	15	5
DMPC/DSPE-PEG 10%	13	8

Colletier e colaboradores relataram que lipossomas com diferentes composições de fosfolipídios, diferentes tamanhos de cadeia alquílica e graus de saturação, porém com mesma polaridade de cabeça/grupo polar, não apresentaram diferença significativa na %EE da enzima acetilcolinesterase (AChE), sugerindo que este parâmetro não depende do componente hidrofóbico do fosfolipídio, mas sim das interações eletrostáticas entre a proteína e o grupo polar dos fosfolipídios (COLLETIER *et al.*, 2002; HWANG *et al.*, 2012). Nesse sentido, a presença maior de sal na solução de proteína diminui as interações eletrostáticas e assim a %EE (COLLETIER *et al.*, 2002). Suleiman *et al.* corroboram este resultado e complementam que este efeito não é significativo em lipossomas neutros (SULEIMAN *et al.*, 2019).

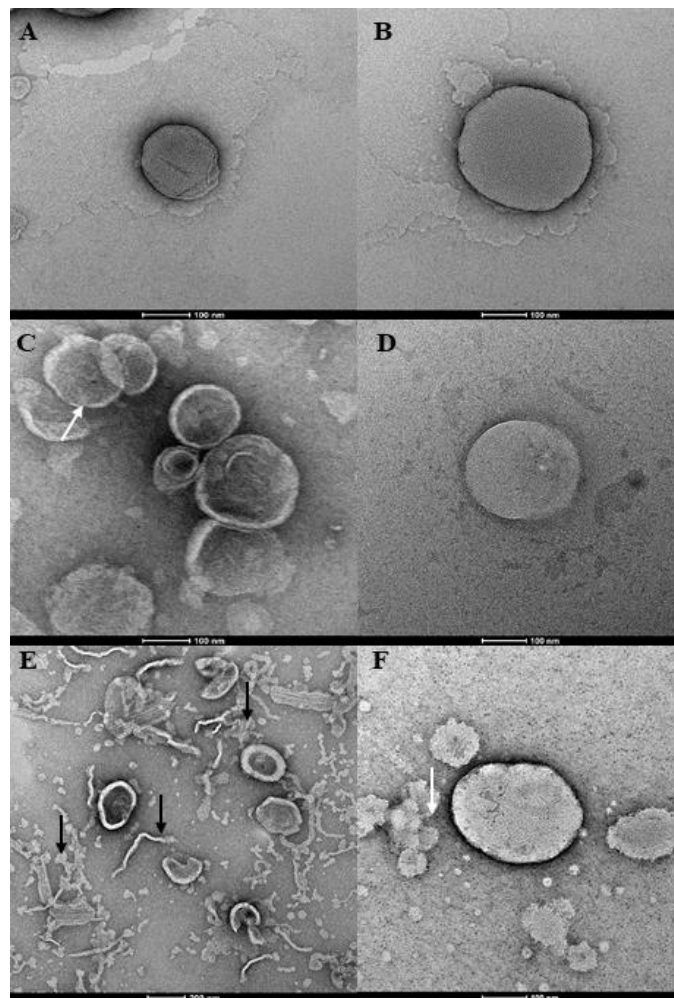
Para outras metodologias de encapsulação, alguns autores relatam que a eficiência de encapsulação pode variar a depender da composição lipídica da bicamada, método de preparo e características físicoquímicas do fármaco encapsulado. Maritim *et al.* demonstraram que a capacidade de encapsulação é maior em lipossomas formados por fosfolipídios de cadeia alquílica longa (18 C) em comparação com fosfolipídios de cadeia alquílica curta (14 C) a encapsulação aumenta de 40% para 90% respectivamente utilizando mesma proteína (MARITIM; BOULAS; LIN, 2021), o mesmo fato foi relatado por outro grupo, porém a %EE foi substancialmente menor, devido ao método de preparo (encapsulação via hidratação do filme lipídico) e propriedades da molécula encapsulada (ANDERSON; OMRI, 2004).

### **5.3. Estudos da morfologia dos sistemas lipossomais por Microscopia de Transmissão Eletrônica e Crio-Microscopia**

Como já mencionado, a caracterização morfológica dos lipossomas é importante para o desenvolvimento de formulações mais eficientes e seguras para o uso em humanos. Portanto, os lipossomas desenvolvidos foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e crio-microscopia (Crio-TEM). A MET é uma metodologia de alta magnificação e resolução, que permite a observação de nanoestruturas de forma rápida a partir de pequenos volumes de amostra, depositados na superfície de *grids*. Para a visualização das partículas é usado um corante como acetato de uranila ou tetróxido de ósmio, por exemplo. O corante não cora os lipossomas, mas sim o suporte aonde eles estão depositados, ressaltando a região interna do lipossoma pelo contraste branco no preto (BIBI *et al.*, 2011).

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 21) condizem com imagens de lipossomas previamente descritas, na literatura (BIBI *et al.*, 2011; LI; HUANG,

2009; LI *et al.*, 2019). No entanto, algumas amostras apresentaram deformações na morfologia das estruturas, estruturas que acreditamos serem lamelas de lipossomas fragmentados (setas pretas) e aglomerados de lipossomas (setas brancas) (Figura 21: C, D, E e F). Essas estruturas podem ter se formado durante o preparo dos *grids*; pois rompimento ou danificação de estruturas lipídicas podem acontecer durante a secagem do *grid* pela desidratação da amostra (FRANKEN; BOEKEMA; STUART, 2017). Além disso, no procedimento de obtenção das imagens o *grid* é colocado sob vácuo na câmara do microscópio eletrônico, o que pode causar desidratação adicional da amostra e provocar mais alterações morfológicas (BIBI *et al.*, 2011). Cabe ressaltar que por essa metodologia não foi possível delimitar a bicamada lipídica dos lipossomas.



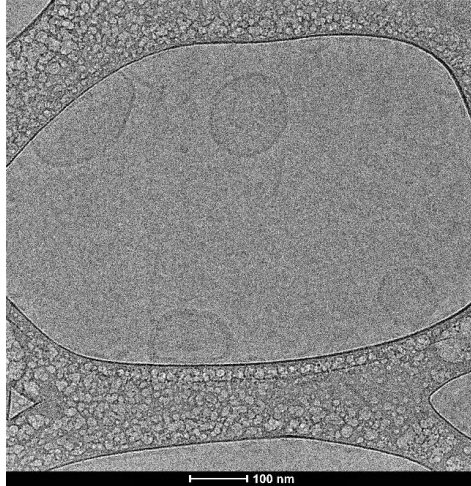
**Figura 21.** Microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas. Formulações: A. DMPC; B. DOPC; C. DMPC/DSPE-PEG 5%; D. DOPC/DSPE-PEG 5%; E. DMPC/DSPE-PEG 10% e F. DOPC/DSPE-PEG 10%. Aumentos de 25.000x (E) e 62.000x (A, B, C, D e F). As barras indicam tamanho de 200 nm (E) e 100 nm. As setas pretas indicam lamelas de lipossomas fragmentados e as setas brancas indicam aglomerados de lipossomas.

Semelhantemente à MET convencional, a criomicroscopia eletrônica permite a visualização das nanoestruturas no microscópio eletrônico, com a diferença que a amostra analisada é congelada rapidamente, formando um fino filme vitrificado (BIBI *et al.*, 2011). A vitrificação, por ser um processo rápido, preserva fisicamente a amostra evitando as deformações causadas pela desidratação (FRANKEN; BOEKEMA; STUART, 2017). É uma técnica que resulta em menos artefatos e não necessita emprego de corante.

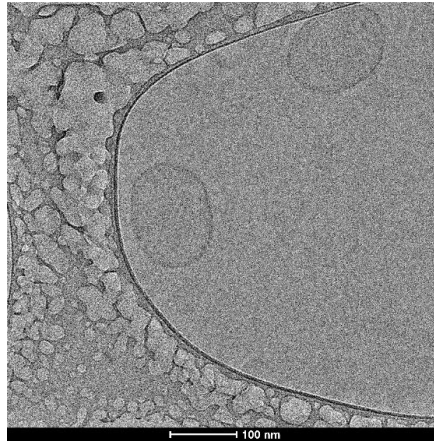
As imagens de criomicroscopia permitiram visualizar os lipossomas e a bicamada lipídica sem as deformações promovidas pelo preparo de amostras para MET (Figura 22, 23, 24, 25, 26 e 27). As análises de microscopia eletrônica apresentadas foram importantes para validar a morfologia das vesículas, e complementar os dados obtidos a partir das análises de DLS (Tabela 5) em relação ao tamanho das vesículas.



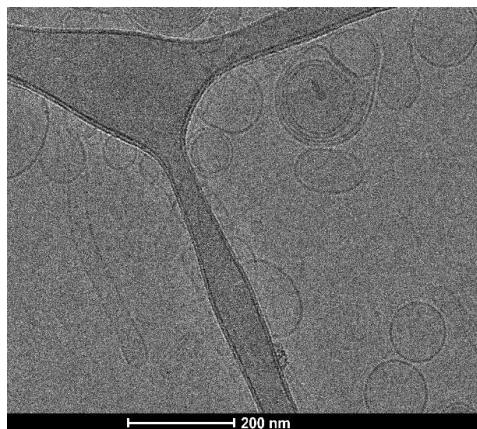
**Figura 22.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DMPC. Aumento de 62.000x. As barras indicam tamanho de 100 nm.



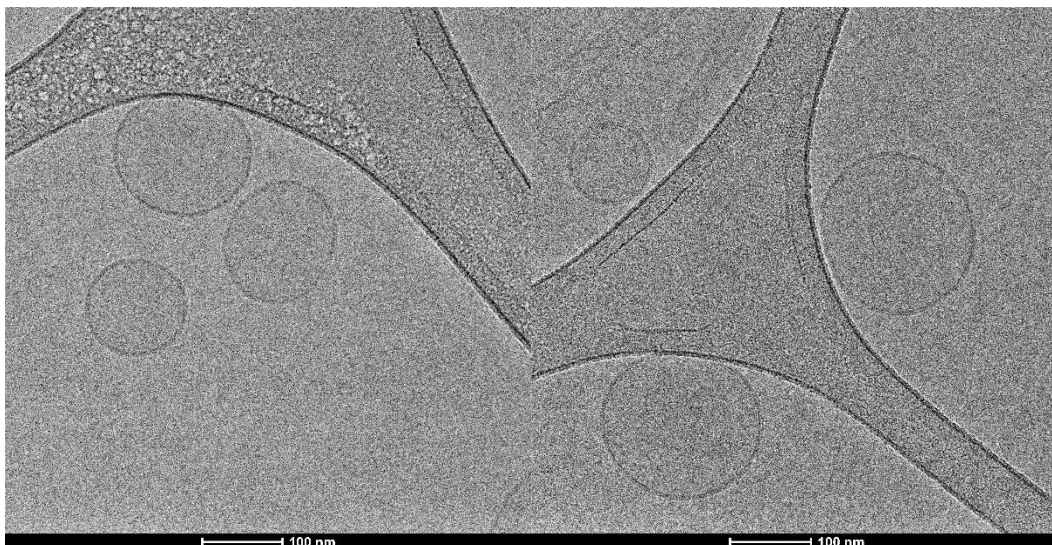
**Figura 23.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DMPC/DSPE-PEG 10%. Aumento de 62.000x. A barra indica tamanho de 100 nm.



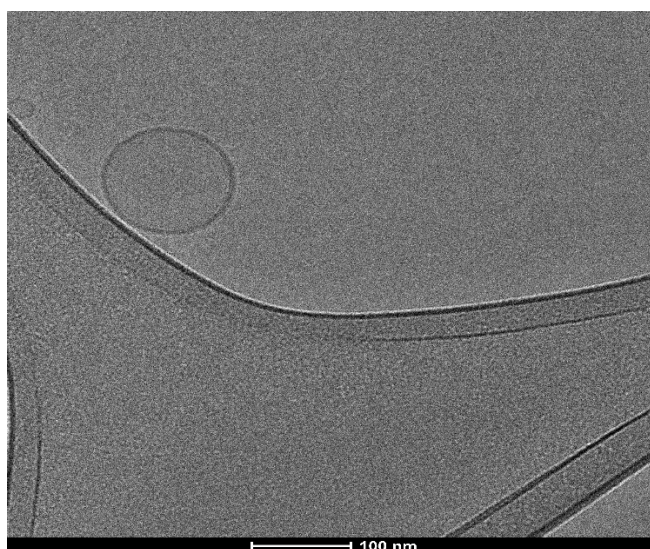
**Figura 24.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DMPC/DSPE-PEG 10% contendo enzima ASNase. Aumento de 62.000x. A barra indica tamanho de 100 nm.



**Figura 25.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DOPC. Aumento de 25.000x. A barra indica tamanho de 200 nm.



**Figura 26.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DOPC/DSPE-PEG 5%. Aumento de 62.000x. As barras indicam tamanho de 100 nm.



**Figura 27.** Criomicroscopia eletrônica de lipossomas de DOPC/DSPE-PEG 5% contendo enzima ASNase. Aumento de 62.000x. A barra indica tamanho de 100 nm.

A partir das imagens de crio-MET, analisamos o tamanho médio dos lipossomas e a espessura da bicamada lipídica, com auxílio do software ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, USA). De acordo com os resultados, apresentados na Tabela 8, o tamanho médio (nm) das nanoestruturas permaneceu próximo ao obtido a partir dos dados de DLS de distribuição por número (Tabela 8). A espessura de membrana para as formulações não peguiladas foi de 4,7 nm para DOPC e 4,9 nm para DMPC, próximo ao próximo ao descrito na literatura (3,75 nm e 3,67 nm) (TAHARA; FUJIYOSHI, 1994), enquanto que para as formulações peguiladas

foi por volta de 6,0 nm, entretanto para afirmar que a presença de DSPE-PEG nas formulações influenciaram na espessura de membrana seria necessário uma análise mais específica empregando-se espalhamento de raio-X em baixo ângulo (SAXS) (VIITALA *et al.*, 2019). A presença da enzima e o emprego de eletroporação aparentemente não afetam o tamanho médio e espessura de membrana dos lipossomas (Tabela 8, Figura 22, 23, 24, 25, 26 e 27).

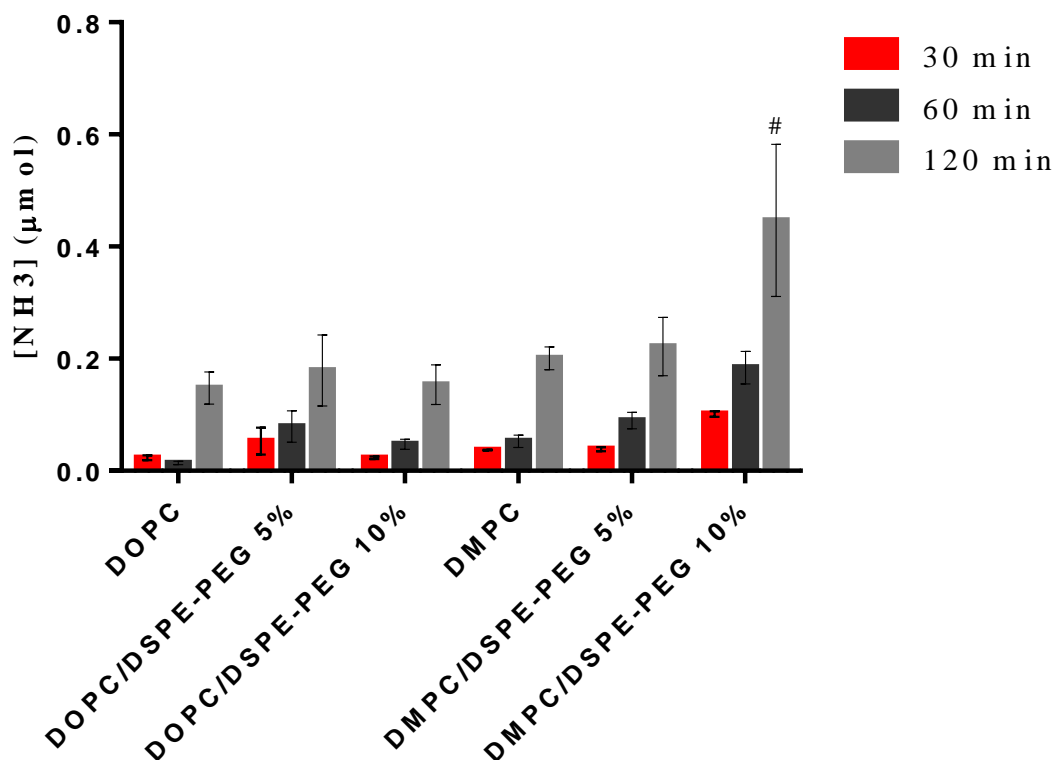
**Tabela 8** - Tamanho e espessura média de membrana (bicamada lipídica) de lipossomas baseados em análise de imagens de criomicroscopia de transmissão eletrônica, empregando-se o software ImageJ, em comparação a valores de diâmetro hidrodinâmico (Dh) obtidos a partir das análises de DLS. Média  $\pm$  SD.

<i>Amostras</i>	<i>Tamanho médio (nm) (microscopia)</i>	<i>Dh (nm) (distribuição por número)</i>	<i>Espessura média de membrana (nm)</i>
<i>DOPC</i>	114	142 $\pm$ 7	4,7
<i>DOPC/DSPE-PEG 5%</i>	140	109 $\pm$ 14	6,0
<i>DOPC/DSPE-PEG 5% + ASNase</i>	148	105 $\pm$ 8	5,8
<i>DMPC</i>	157	147 $\pm$ 15	4,9
<i>DMPC/DSPE-PEG 10%</i>	126	84 $\pm$ 6	5,8
<i>DMPC/DSPE-PEG 10% + ASNase</i>	145	81 $\pm$ 8	6,6

#### 5.4. Estudos de permeação da L-asparagina nos lipossomas

Após a purificação (Figura 19, 20 e Figuras A1 à A6), as formulações foram analisadas quanto à permeabilidade a asparagina, por meio da quantificação de atividade enzimática ao longo do tempo (Figura 28).

### Ensaio de permeabilidade



**Figura 28.** Ensaio de permeabilidade à L-asparagina dos lipossomas contendo L-asparaginase encapsulada, por quantificação da amônia liberada. # Formulação apresentou diferença significativa em relação as amostras as outras amostras; N=6 experimentos independentes.

Nossos resultados indicam baixa liberação de amônia, que pode ocorrer devido a diferentes fatores: (i) baixa concentração de ASNase encapsulada nos lipossomas; (ii) baixa penetração de L-asparagina no interior das vesículas e (iii) volatilização da amônia resultante. Não obstante, para todos os sistemas, a concentração de amônia aumenta significativamente após 120 minutos, indicando atividade enzimática relacionada ao tempo, que possivelmente está associada à penetração do substrato no interior dos lipossomas nesse período (Figura 28). Estes resultados também indicam que a metodologia de eletroporação se apresentou adequada para o trabalho com proteínas e não resultou em perda de atividade pela enzima.

Por serem compostas por fosfolipídios de cadeia insaturada, que geralmente resultam em membranas de empacotamento mais frouxo e permeável, esperávamos que as formulações de DOPC, DOPC/DSPE-PEG 5% e DOPC/DSPE-PEG 10% se mostrassem mais permeáveis à L-



asparagina e, portanto, mais promissoras. No entanto, os maiores valores de amônia liberada, que podem corresponder à maior penetração de L-asparagina, foram observados para lipossomas peguilados de DMPC (Figura 28). A permeabilidade da bicamada lipídica dessas formulações pode estar relacionada ao menor tamanho da cadeia anfifílica de DMPC(14 C) em relação ao DOPC (18 C), já que a passagem de aminoácido pela membrana é relacionada também ao tamanho da cadeia de fosfolipídio que compõe bicamada decrescendo com o aumento da cadeia lipídica (CHAKRABARTI; DEAMER, 1992) .

Outra hipótese levantada para explicar o resultado refere-se ao possível aprisionamento de moléculas de ASNase na malha de PEG que envolve os lipossomas, visto que as soluções de lipossomas não apresentaram ASNase livre após purificação (Figura 19, 20 e Figuras A1 à A6). No entanto, caso essa hipótese fosse a principal causa do aumento de atividade enzimática, deveria ser observado também para as vesículas de DOPC/DSPE-PEG, o que não ocorreu.

É possível observar relação entre a permeabilidade da bicamada lipídica e a concentração de DSPE-PEG principalmente nas formulações de DMPC (Figura 28). O aumento da concentração de amônia já é observado na formulação contendo 5% de DSPE-PEG. A influência de DSPE-PEG na permeabilidade de lipossomas é um fator considerável e pode variar conforme a concentração utilizada (NICHOLAS *et al.*, 2000; NIKOLOVA; JONES, 1996). Autores descrevem a ocorrência de duas fases de transição dimensionais do PEG acoplado ao fosfolipídio, de cogumelo (*mushroom*) ou compactado para escova (*brush*) ou estendido. A passagem do aminoácido ou substrato pode ocorrer por transporte passivo entre fendas (defeitos) na membrana por conta da incompatibilidade estrutural entre o DOPC ou DMPC e o DSPE-PEG, e a concentração dessas fendas ocorrem nas regiões de transição entre as conformações compactada e estendida das moléculas de DSPE-PEG (CHAKRABARTI; DEAMER, 1992; NICHOLAS *et al.*, 2000; NIKOLOVA; JONES, 1996; STEPNIEWSKI *et al.*, 2011).

Acreditamos que a concentração de alfa-tocoferol nas formulações de DOPC tenham contribuído para a obstrução desses defeitos transientes na bicamada, já que o mesmo permanece inserido na bicamada e interfere na biodinâmica da mesma, assim como o DSPE-PEG (HINCHA, 2008). É importante salientar que, apesar das fendas transiente, as formulações de DMPC/DSPE-PEG permaneceram estáveis, não apresentando vazamento da enzima, como demonstrado nos resultados de DLS (Figura 20). Dessa forma, a amônia quantificada no ensaio de permeabilidade corresponde ao liberado pela hidrólise da L-asparagina que entrou em

contato com a ASNase no interior dos lipossomas, sendo a formulação DMPC/DSPE-PEG 10% mais permeável em comparação às outras. Esses dados demonstram o potencial desta formulação como nanorreatores para veiculação de ASNase no tratamento de LLA, bem como em outras aplicações que demandem permeabilidade das nanoestruturas ao substrato e maior viabilidade de enzimas terapêuticas na circulação sanguínea, como por exemplo o tratamento de gota empregando-se a enzima uricase. No entanto, para maiores conclusões, ensaios *in vivo* são necessários.

## 6. Conclusões

Neste trabalho, foram desenvolvidas formulações lipossomais de DOPC e DMPC, peguiladas ou não, contendo a enzima L-asparaginase. O estudo das condições de preparo dos lipossomas demonstrou a importância de se empregar aquecimento para as etapas de hidratação do filme e extrusão no preparo de lipossomas para garantir a fluidez das cadeias alquílicas, de acordo com a  $T_m$ , e facilitar a acomodação das moléculas de fosfolípido peguilado na bicamada, no caso dos lipossomas peguilados.

Foram produzidos lipossomas de DOPC, DOPC/DSPE-PEG 5%, DOPC/DSPE-PEG 10%, DMPC, DMPC/DSPE-PEG 5% e DMPC/DSPE-PEG 10%, que variaram de ~ 200 nm (não peguilados) a ~ 150 nm (peguilados). Portanto, a adição de fosfolípido peguilado resultou na diminuição do tamanho das vesículas formadas, bem como possível formação de micelas e/ou bicelas em altas concentrações de DSPE-PEG. A estabilidade dos sistemas foi estudada por 40 dias a 4 °C e 37 °C, sendo que em geral os sistemas apresentaram-se estáveis. O potencial zeta das formulações também foi avaliado e permaneceu entre -3 mV à -5 mV. Com relação à encapsulação da ASNase por eletroporação, para todos os sistemas foram obtidas %EE de 10-15%. Embora esses valores aparentem serem baixos em comparação aos valores obtidos para encapsulação de fármacos clássicos em nanoestruturas, cabe ressaltar que valores semelhantes são descritos na literatura para outras proteínas, e enzimas em geral são empregadas em baixas concentrações devido ao alto potencial catalítico.

Foram realizados ensaios enzimáticos de permeabilidade dos lipossomas ao aminoácido Asn e a maior atividade ocorreu após 2 horas de incubação, sendo observadas diferenças significativas de permeação no caso do sistema de DMPC/DSPE-PEG 10%. Portanto, concluímos que as formulações de lipossomas peguilados apresentam potencial para emprego como nanotransportadores do biofármaco L-asparaginase e, sobretudo, o sistema DMPC/DSPE-PEG 10% se caracteriza como potencial nanoreator, permeável ao substrato L-asparagina, o que permitiria sua circulação no organismo depletando este aminoácido. Estudos futuros *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para investigação da eficácia e nanotoxicidade das formulações, a fim de resultar em uma nova alternativa para tratamento de LLA.

## 7. Referências

**3ECA: CRYSTAL STRUCTURE OF ESCHERICHIA COLI L-ASPARAGINASE, AN ENZYME USED IN CANCER THERAPY.** Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/3ECA>>. Acesso em: 4 set. 2019.

ALAVI, M.; KARIMI, N.; SAFAEI, M. Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 1, p. 3–9, abr. 2017.

ALBERTS, B. *et al.* Lymphocytes and the Cellular Basis of Adaptive Immunity. **Molecular Biology of the Cell. 4th edition**, 2002.

ALLEN, T. M. *et al.* Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1061, n. 1, p. 56–64, 9 jan. 1991.

ANAJAFI, T.; MALLIK, S. Polymersome-based drug-delivery strategies for cancer therapeutics. **Therapeutic delivery**, v. 6, n. 4, p. 521–534, abr. 2015.

ANDERSON, M.; OMRI, A. The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. **Drug Delivery**, v. 11, n. 1, p. 33–39, 1 jan. 2004.

APOLINÁRIO, A. C. *et al.* POLIMEROSSOMOS VERSUS LIPOSSOMOS: A EVOLUÇÃO DA “BALA MÁGICA”. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 810–817, ago. 2017.

ARMSTRONG, J. K. *et al.* Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. **Cancer**, v. 110, n. 1, p. 103–111, 2007.

BAKER, J. R. Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 708–719, 2009.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **Journal of Molecular Biology**, v. 8, n. 5, p. 660-IN10, 1 jan. 1964.

BARTENSTEIN, J. E. *et al.* Stability of polymersomes prepared by size exclusion chromatography and extrusion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 739–746, 5 out. 2016.

BATTISTEL, A. P. *et al.* Allergic reactions to asparaginase: Retrospective cohort study in pediatric patients with acute lymphoid leukemia. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 22 jan. 2020.

BECHINGER, B.; RESENDE, J. M.; AISENBREY, C. The structural and topological analysis of membrane-associated polypeptides by oriented solid-state NMR spectroscopy: Established concepts and novel developments. **Biophysical Chemistry**, v. 153, n. 2, p. 115–125, 1 jan. 2011.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 235, p. 337–351, 10 2016.

BIBI, S. *et al.* Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1–2, p. 138–150, 30 set. 2011.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2 fev. 2015.

BRGLES, M. *et al.* Entrapment of Ovalbumin into Liposomes—Factors Affecting Entrapment Efficiency, Liposome Size, and Zeta Potential. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 3, p. 235–248, 1 jan. 2008.

BROOME, J. D. Evidence that the L -Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. **Nature**, v. 191, n. 4793, p. 1114–1115, set. 1961.

BRUMANO, L. P. *et al.* Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, 10 jan. 2019.

BUENO, C. Z. *et al.* l-Asparaginase Encapsulation into Asymmetric Permeable Polymersomes. **ACS Macro Letters**, v. 9, n. 10, p. 1471–1477, 20 out. 2020.

BUENO *et al.* **Polymeric and liposomal nanomaterials** - ScienceDirect. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081007167000179>>. Acesso em: 1 out. 2019.

CACHUMBA, J. J. M. *et al.* Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47 Suppl 1, p. 77–85, dez. 2016.

CHAIZE, B. *et al.* Encapsulation of Enzymes in Liposomes: High Encapsulation Efficiency and Control of Substrate Permeability. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 67–75, 1 jan. 2004.

CHAKRABARTI, A. C.; DEAMER, D. W. Permeability of lipid bilayers to amino acids and phosphate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1111, n. 2, p. 171–177, 9 nov. 1992.

CHEN, W. *et al.* Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14815, 4 out. 2018.

CHEVALIER, Y.; ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. **Reports on Progress in Physics**, v. 53, n. 3, p. 279–371, mar. 1990.

CHIBOWSKI, E.; SZCZESÍ, A. Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme. **Adsorption**, v. 22, n. 4, p. 755–765, 1 maio 2016.

CHUNG, Y. H. *et al.* COVID-19 Vaccine Frontrunners and Their Nanotechnology Design. **ACS Nano**, 9 out. 2020.

CLERGEAUD, G. *et al.* Liposomal Nanoreactors for the Synthesis of Monodisperse Palladium Nanoparticles Using Glycerol. **Langmuir**, v. 29, n. 49, p. 15405–15413, 10 dez. 2013.

COLLETIER, J.-P. *et al.* Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. **BMC Biotechnology**, v. 2, p. 9, 10 maio 2002.

CORREA, N. M.; SCHELLY, Z. A. Dynamics of Electroporation of Synthetic Liposomes Studied Using a Pore-Mediated Reaction,  $\text{Ag}^+ + \text{Br}^- \rightarrow \text{AgBr}$ . **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 46, p. 9319–9322, 1 nov. 1998.

COUVREUR, P. *et al.* Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99–134, 2002.

CRUZ, M. E. M. *et al.* Liposomal l-asparaginase: in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 96, n. 1–3, p. 67–77, 31 jul. 1993.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, 18 maio 2018.

DANHIER, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? **Journal of Controlled Release**, v. 244, p. 108–121, 28 dez. 2016.

DEODHAR, S.; DASH, A. K. Long circulating liposomes: challenges and opportunities. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 12, p. 857–872, 2018.

DEPLAZES, E. *et al.* The effect of H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> on the membrane morphology and hydrogen bonding of a phospholipid bilayer. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 5, p. 1371–1376, 15 set. 2018.

DIAS, F. F. G.; SANTOS AGUILAR, J. G. DOS; SATO, H. H. l-Asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotech**, v. 9, n. 7, p. 289, 27 jun. 2019.

DIN, F. UD *et al.* Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 7291–7309, 5 out. 2017.

DISALVO, E. A.; BOUCHET, A. M. Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, The 10th International Symposium on Electrokinetic Phenomena. v. 440, p. 170–174, 5 jan. 2014.

DOLOWY, W. C. *et al.* Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. Study of mice with lymphoma and normal monkeys and report on a child with leukemia. **Cancer**, v. 19, n. 12, p. 1813–1819, dez. 1966.

DONG, Y. *et al.* Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 9, n. 1, p. 14, 19 jun. 2020.

DUVAL, M. *et al.* Comparison of Escherichia coli–asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children’s Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2734–2739, 15 abr. 2002.

EDWARDS, K. *et al.* Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 1, p. 258–266, jul. 1997.

EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62–71, 2016.

FLÜHMANN, B. *et al.* Nanomedicines: The magic bullets reaching their target? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 128, p. 73–80, 1 fev. 2019.

**Folha informativa COVID-19 - Escritório da OPAS e da OMS no Brasil - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19>>. Acesso em: 3 fev. 2021.

FRANCO, Y. L.; VAIDYA, T. R.; AIT-OU DHIA, S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. **Breast Cancer : Targets and Therapy**, v. 10, p. 131–141, 11 set. 2018.

FRANKEN, L. E.; BOEKEMA, E. J.; STUART, M. C. A. Transmission Electron Microscopy as a Tool for the Characterization of Soft Materials: Application and Interpretation. **Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, v. 4, n. 5, p. 1600476, 2017.

GARAY, R. P. *et al.* Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 11, p. 1319–1323, 1 nov. 2012.

GASPAR, M. M.; PEREZ-SOLER, R.; CRUZ, M. E. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 373–377, 1996.



GOROVITS, B. *et al.* Pre-existing Antibody: Biotherapeutic Modality-Based Review. **The AAPS Journal**, v. 18, n. 2, p. 311–320, 1 mar. 2016.

GREGORIADIS, G. Targeting of drugs. **Nature**, v. 265, n. 5593, p. 407–411, fev. 1977.

GULDIKEN, B. *et al.* Physical and chemical stability of anthocyanin-rich black carrot extract-loaded liposomes during storage. **Food Research International**, v. 108, p. 491–497, 1 jun. 2018.

HARASHIMA, H. *et al.* Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 3, p. 402–406, mar. 1994.

HEURTAULT, B. *et al.* Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 1 out. 2003.

HINCHA, D. K. Effects of alpha-tocopherol (vitamin E) on the stability and lipid dynamics of model membranes mimicking the lipid composition of plant chloroplast membranes. **FEBS letters**, v. 582, n. 25–26, p. 3687–3692, 29 out. 2008.

HU, Y. *et al.* SNARE-Reconstituted Liposomes as Controllable Zeptoliter Nanoreactors for Macromolecules. **Advanced Biosystems**, v. 1, n. 1–2, p. e1600018, fev. 2017.

HWANG, S. Y. *et al.* Effects of operating parameters on the efficiency of liposomal encapsulation of enzymes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 296–303, 1 jun. 2012.

IMADA, A. *et al.* Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85–99, maio 1973.

ISRAELACHVILI. **Intermolecular and Surface Forces**. [s.l.] Elsevier, 2011.

ISRAELACHVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v. 72, n. 0, p. 1525–1568, 1 jan. 1976.

JACKSON, L. A. *et al.* An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. **The New England Journal of Medicine**, 14 jul. 2020.

JAIN, S. *et al.* Oral Delivery of Doxorubicin Using Novel Polyelectrolyte-Stabilized Liposomes (Layersomes). **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 9, p. 2626–2635, 4 set. 2012.

JORGE, J. C. S. *et al.* Liposomal palmitoyl-L-asparaginase: characterization and biological activity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 230–234, 1 maio 1994.

KALYANE, D. *et al.* Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, p. 1252–1276, 1 maio 2019.

KANSAGRA, ANKIT, SAURABH DAHIYA, AND MARK LITZOW, K. A. KANSAGRA, Ankit; DAHIYA, Saurabh; LITZOW, Mark. Continuing challenges and current issues in acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 59, n. 3, p. 526-541, 2018. 2018.

KATO, MOTOHIRO; MANABE, ATSUSHI., K., Motohiro; MANABE, Atsushi. **Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatrics International**, v. 60, n. 1, p. 4-12, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ped.13457>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–582, dez. 1953.

KONTOGIANNOPOULOS, K. N. *et al.* Sterically stabilized liposomes as a potent carrier for shikonin. **Journal of Liposome Research**, v. 24, n. 3, p. 230–240, set. 2014.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. 3 - Methods for characterization of nanoparticles. In: NIMESH, S.; CHANDRA, R.; GUPTA, N. (Eds.). . **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2017. p. 43–58.

LI, J. *et al.* A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 81–98, 1 abr. 2015.

LI, S.-D.; HUANG, L. Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: role of the supported bilayer. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 10, p. 2259–2266, out. 2009.

LI, T. *et al.* Controlling the size and shape of liposomal ciprofloxacin nanocrystals by varying the lipid bilayer composition and drug to lipid ratio. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 555, p. 361–372, 28 jul. 2019.

LITZINGER, D. C. *et al.* Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1190, n. 1, p. 99–107, 23 fev. 1994.

LITZINGER, D. C.; HUANG, L. Amphipathic poly(ethylene glycol) 5000-stabilized dioleoylphosphatidylethanolamine liposomes accumulate in spleen. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1127, n. 3, p. 249–254, 19 ago. 1992.

LOMBARDO, D. *et al.* Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 7, 25 jun. 2016.

LOMBARDO, D. *et al.* Colloidal stability of liposomes. **AIMS Materials Science**, v. 6, n. 2, p. 200–213, 2019.

LOPES, A. M. *et al.* Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82–99, fev. 2017.

M, N. *et al.* Permeability of amino acids into liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 471, n. 2, p. 305–310, 1 dez. 1977.

MAITY, P. *et al.* Binding of monovalent alkali metal ions with negatively charged phospholipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 4, p. 706–714, 1 abr. 2016.

MARITIM, S.; BOULAS, P.; LIN, Y. Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, p. 120051, 5 jan. 2021.

MARSH, D. Equation of State for Phospholipid Self-Assembly. **Biophysical Journal**, v. 110, n. 1, p. 188–196, 5 jan. 2016.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. TUMOR INHIBITORY EFFECT OF L-ASPARAGINASE FROM ESCHERICHIA COLI. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 105, p. 450–452, maio 1964.

MILANE, L.; AMIJI, M. Clinical approval of nanotechnology-based SARS-CoV-2 mRNA vaccines: impact on translational nanomedicine. **Drug Delivery and Translational Research**, 29 jan. 2021.

MILLA, P.; DOSIO, F.; CATTEL, L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 105–119, jan. 2012.

MOHAMED, M. *et al.* PEGylated liposomes: immunological responses. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 20, n. 1, p. 710–724, 31 dez. 2019.

MONTEIRO, N. *et al.* Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 11, n. 101, p. 20140459, 6 dez. 2014.

MUNICOY, S.; BELLINO, M. G. A liposome-actuated enzyme system and its capability as a self-biomineralized silica nanoreactor. **RSC Advances**, v. 7, n. 1, p. 67–70, 20 dez. 2016.

MUPPIDI, K. *et al.* Development and Stability Studies of Novel Liposomal Vancomycin Formulations. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, p. e636743, 26 jan. 2012.

NICHOLAS, A. R. *et al.* Effect of grafted polyethylene glycol (PEG) on the size, encapsulation efficiency and permeability of vesicles. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1463, n. 1, p. 167–178, 1 jan. 2000.

NICHOLS, J. W.; BAE, Y. H. EPR: Evidence and fallacy. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 190, p. 451–464, 28 set. 2014.

NIKOLOVA, A. N.; JONES, M. N. Effect of grafted PEG-2000 on the size and permeability of vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1304, n. 2, p. 120–128, 22 nov. 1996.

NISHIMURA, T. *et al.* Substrate-Sorting Nanoreactors Based on Permeable Peptide Polymer Vesicles and Hybrid Liposomes with Synthetic Macromolecular Channels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 142, n. 1, p. 154–161, 8 jan. 2020.

NISHIMURA, T.; AKIYOSHI, K. Biotransporting Biocatalytic Reactors toward Therapeutic Nanofactories. **Advanced Science**, v. 5, n. 11, p. 1800801, 2018.

NOMME, J.; SU, Y.; LAVIE, A. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human L-asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 13, p. 2471–2485, 26 jun. 2014.

OFFMAN, M. N. *et al.* Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood**, v. 117, n. 5, p. 1614–1621, 3 fev. 2011.

OKAMOTO, Y. *et al.* Albumin-Encapsulated Liposomes: A Novel Drug Delivery Carrier With Hydrophobic Drugs Encapsulated in the Inner Aqueous Core. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 1, p. 436–445, 1 jan. 2018.

PALAIOKOSTAS, M. *et al.* Effects of lipid composition on membrane permeation. **Soft Matter**, v. 14, n. 42, p. 8496–8508, 31 out. 2018.

PALMERSTON MENDES, L.; PAN, J.; TORCHILIN, V. P. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1401, set. 2017.

PATEL, N. *et al.* A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1964–1973, 1 jul. 2009.

PIETERS, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 15 jan. 2011.

RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA-JR, A.; BLANKSCHTEIN, D. Two-phase aqueous micellar systems: an alternative method for protein purification. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 4, p. 531–544, dez. 2004.

**Registro ANVISA nº 1562800100015 - ONCASPAR - VÁLIDO.** Disponível em: <<https://www.smerp.com.br/anvisa/?ac=prodDetail&anvisaId=1562800100015>>. Acesso em: 4 set. 2019.

ROBERTSON, J. D. *et al.* Purification of Nanoparticles by Size and Shape. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27494, 8 jun. 2016.

RODRIGUES, M. A. D. **Avaliação da atividade e resistência à clivagem proteolítica de L-asparaginases recombinantes obtidas por reação em cadeia da polimerase propensa a erro.** text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 30 mar. 2016.

SAMUELSSON, E. *et al.* Contribution of Kupffer cells to liposome accumulation in the liver. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 158, p. 356–362, 1 out. 2017.

SANDSTRÖM, M. C.; JOHANSSON, E.; EDWARDS, K. Structure of mixed micelles formed in PEG-lipid/lipid dispersions. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 23, n. 8, p. 4192–4198, 10 abr. 2007.

SARI, N. M.; OSSEVA, N. P.; SURYAWAN, N. ALLERGIC REACTION TO ESCHERICHIA COLI-ASPARAGINASE IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: A STUDY IN A TERTIARY HOSPITAL IN INDONESIA. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, p. 142–146, 7 abr. 2020.

SHARMA, A. K. *et al.* Emerging era of “somes”: polymersomes as versatile drug delivery carrier for cancer diagnostics and therapy. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 5, p. 1171–1190, 1 out. 2020.

SHERJE, A. P. *et al.* Dendrimers: A versatile nanocarrier for drug delivery and targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 548, n. 1, p. 707–720, 5 set. 2018.

SHIRAISHI, K.; YOKOYAMA, M. Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 20, n. 1, p. 324–336, 2019.

SMITH, M. C. *et al.* Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, 1 set. 2017.

STEPNIEWSKI, M. *et al.* Study of PEGylated Lipid Layers as a Model for PEGylated Liposome Surfaces: Molecular Dynamics Simulation and Langmuir Monolayer Studies. **Langmuir**, v. 27, n. 12, p. 7788–7798, 21 jun. 2011.

STEWART, S. *et al.* Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi’s sarcoma. **International**

Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 16, n. 2, p. 683–691, fev. 1998.

STORY, M. D. *et al.* L-asparaginase kills lymphoma cells by apoptosis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 129–133, 1993.

SULEIMAN, E. *et al.* Electrostatically Driven Encapsulation of Hydrophilic, Non-Conformational Peptide Epitopes into Liposomes. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 619, 18 nov. 2019.

TAHARA, Y.; FUJIYOSHI, Y. A new method to measure bilayer thickness: Cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation. **Micron**, v. 25, n. 2, p. 141–149, 1 abr. 1994.

TAYO, L. L. Stimuli-responsive nanocarriers for intracellular delivery. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 6, p. 931–940, 25 nov. 2017.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, v. 7, n. 6, p. e577, jun. 2017.

TRAN, S. *et al.* Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, n. 1, p. 44, 11 dez. 2017.

TSERMENTSELI, S. K. *et al.* Comparative Study of PEGylated and Conventional Liposomes as Carriers for Shikonin. **Fluids**, v. 3, n. 2, p. 36, jun. 2018.

URANO, S. *et al.* Membrane Stabilizing Effect of Vitamin E: Existence of a Hydrogen Bond between  $\alpha$ -Tocopherol and Phospholipids in Bilayer Liposomes. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 36, n. 6, p. 513–519, 1990.

VEGA-VÁSQUEZ, P.; MOSIER, N. S.; IRUDAYARAJ, J. Nanoscale Drug Delivery Systems: From Medicine to Agriculture. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

VIITALA, L. *et al.* Shape and Phase Transitions in a PEGylated Phospholipid System. **Langmuir**, v. 35, n. 11, p. 3999–4010, 19 mar. 2019.

WALDE, P.; ICHIKAWA, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 4, p. 143–177, 31 out. 2001.

WANG, L. *et al.* Encapsulation of Biomacromolecules within Polymersomes by Electroporation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 44, p. 11122–11125, 29 out. 2012.

WICKI, A. *et al.* Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138–157, 28 fev. 2015.

YAN, X.; SCHERPHOF, G. L.; KAMPS, J. A. A. M. Liposome opsonization. **Journal of Liposome Research**, v. 15, n. 1–2, p. 109–139, 2005.

YANG, Q.; LAI, S. K. Anti-PEG immunity: emergence, characteristics, and unaddressed questions. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 655–677, out. 2015.

YI, J. *et al.* Efficient electroporation of liposomes doped with pore stabilizing nisin. **Journal of Liposome Research**, v. 23, n. 3, p. 197–202, 1 set. 2013.

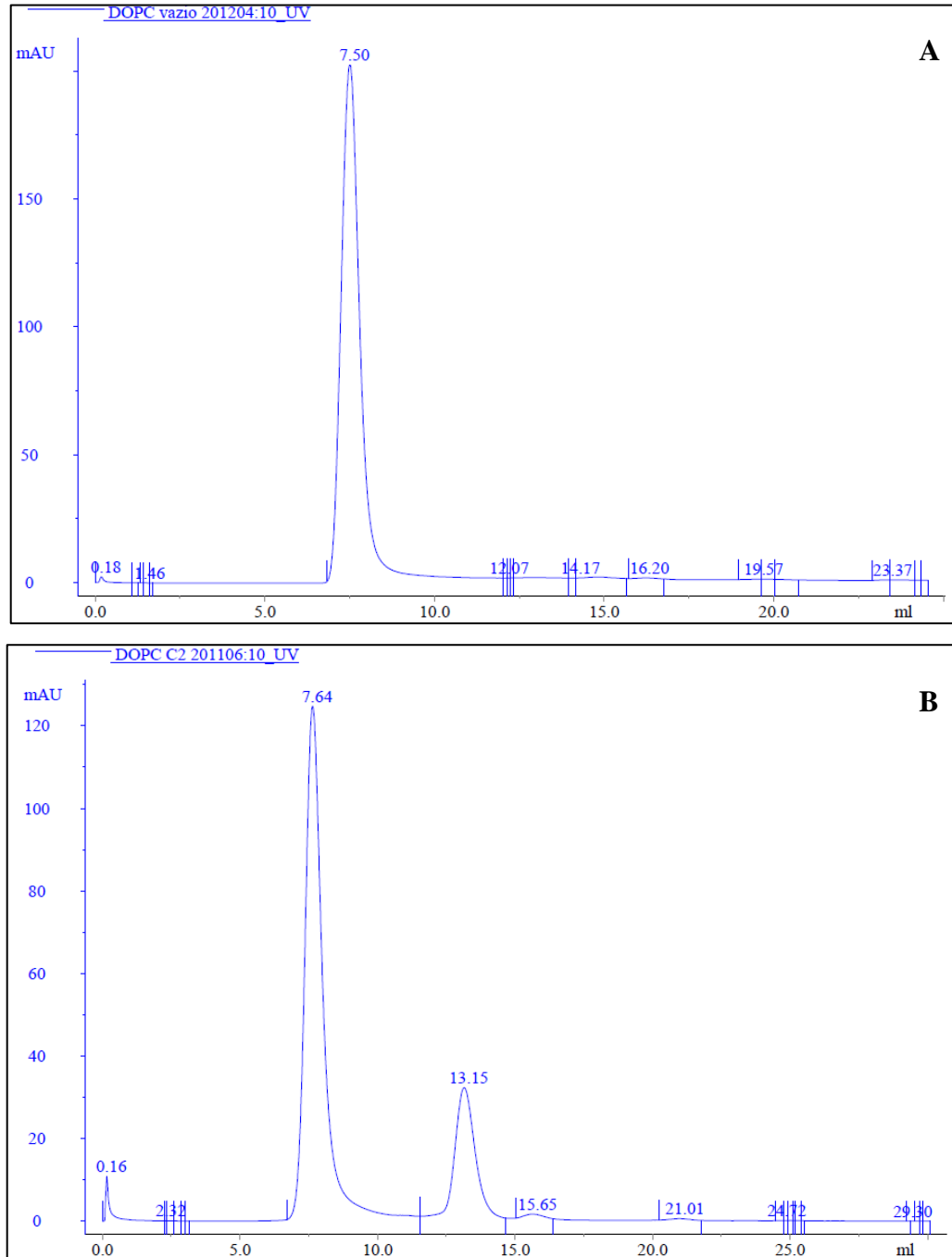
ZAHEDNEZHAD, F. *et al.* Liposome and immune system interplay: Challenges and potentials. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 305, p. 194–209, maio 2019.

ZHAO, Y. *et al.* Asymmetrical Polymer Vesicles for Drug delivery and Other Applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 20 jun. 2017.

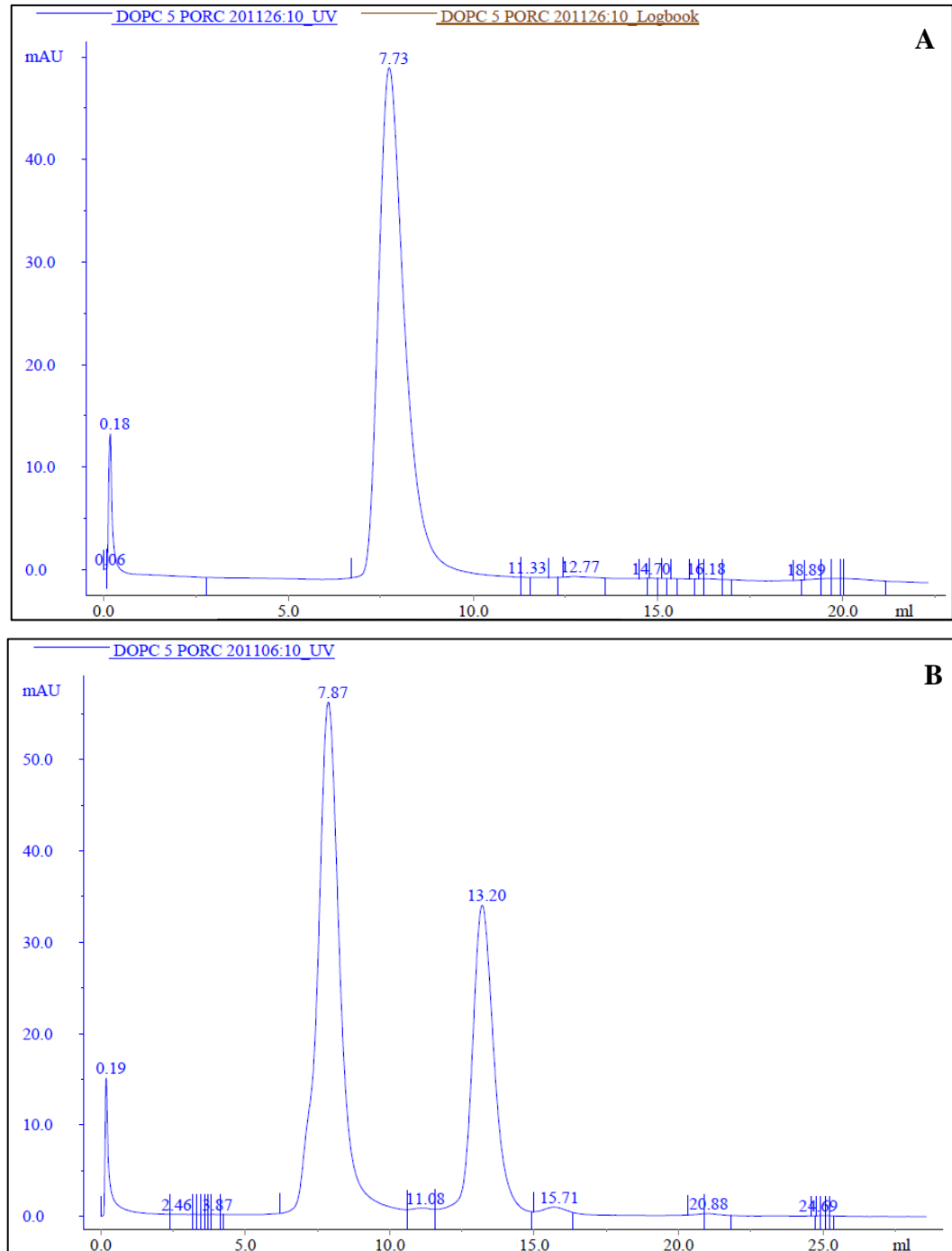


## 8. Anexos

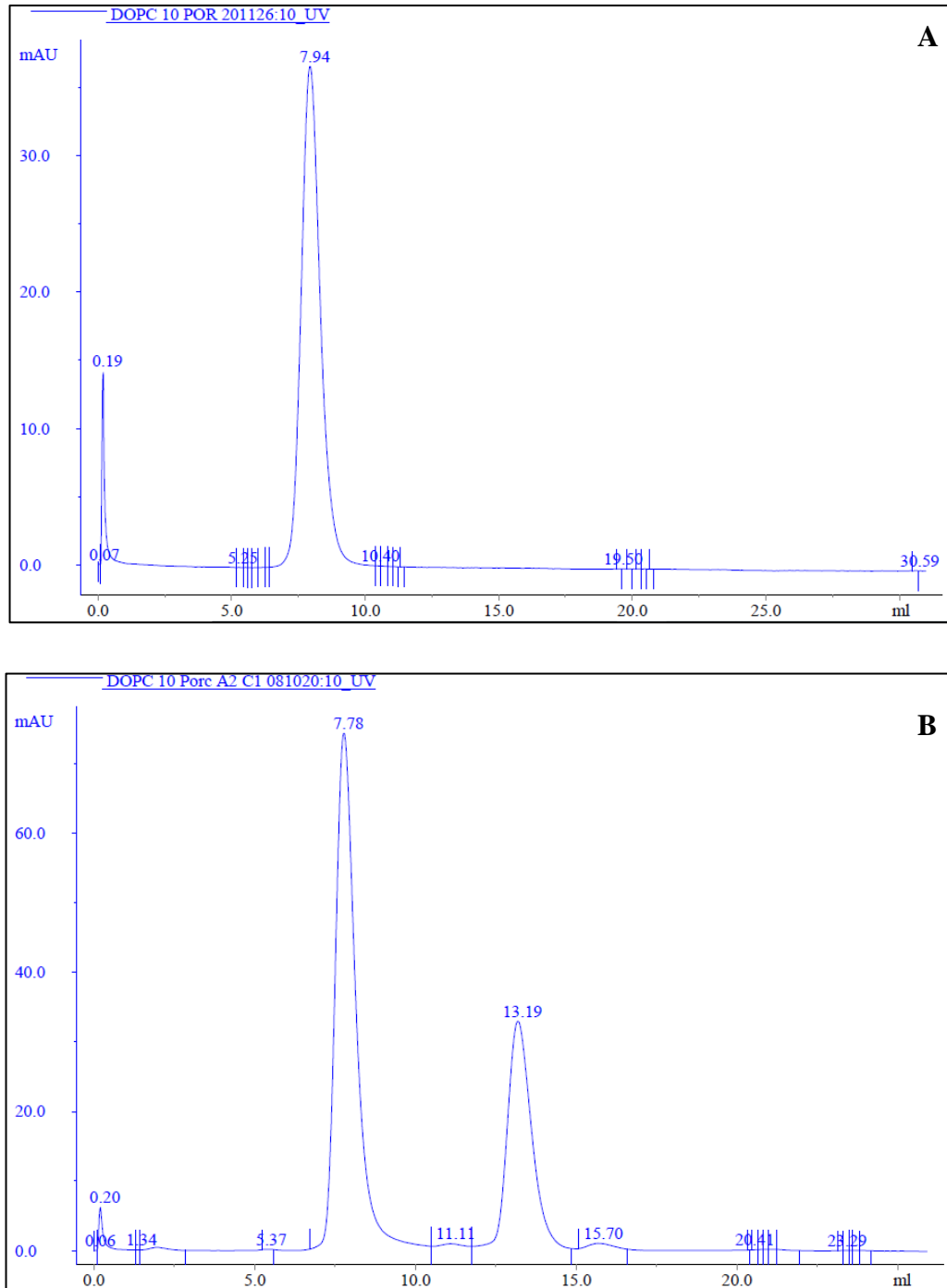
### 8.1. Anexo A



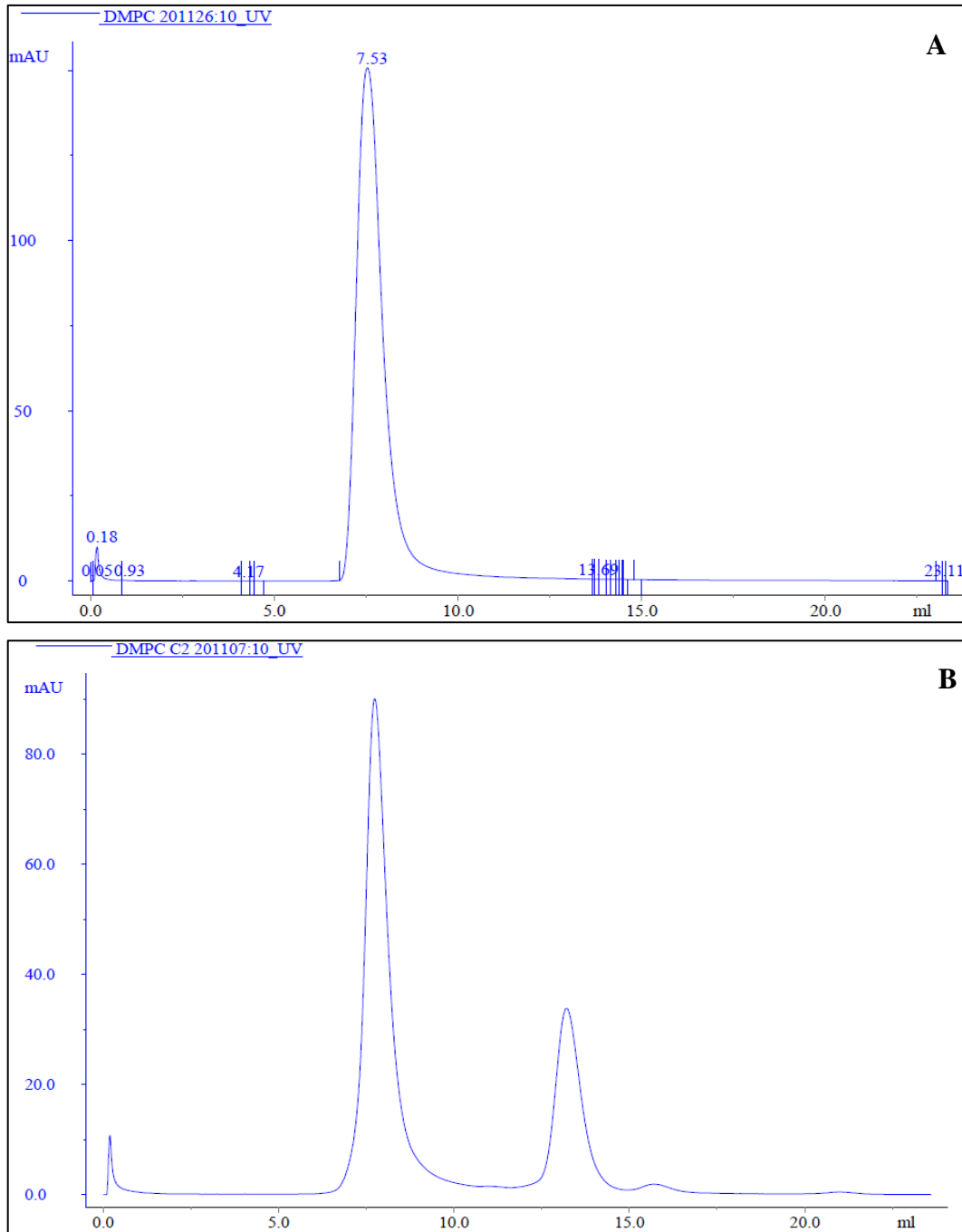
**Figura A 1.** Cromatografia de exclusão molecular da formulação de DOPC, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação DOPC antes de encapsulação de ASNase, pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DOPC, 1º pico corresponde ao volume morto da coluna, 2º pico representa os lipossomas e 3º pico representa a ASNase não encapsulada.



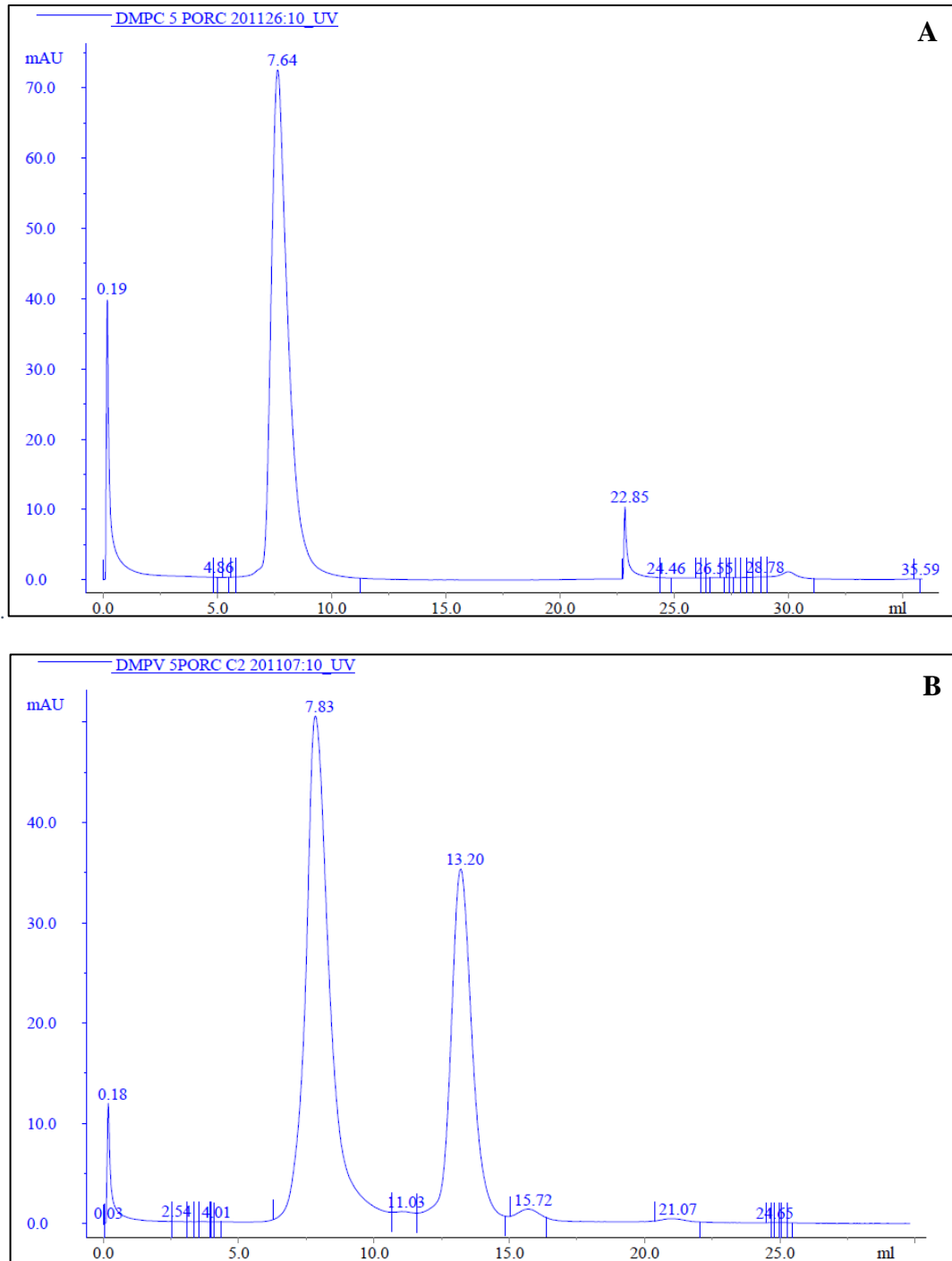
**Figura A 2.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DOPC/DSPE-PEG 5%, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação antes de encapsulação de ASNase, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DOPC/DSPE-PEG 5%, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas e 3° pico representa a ASNase não encapsulada.



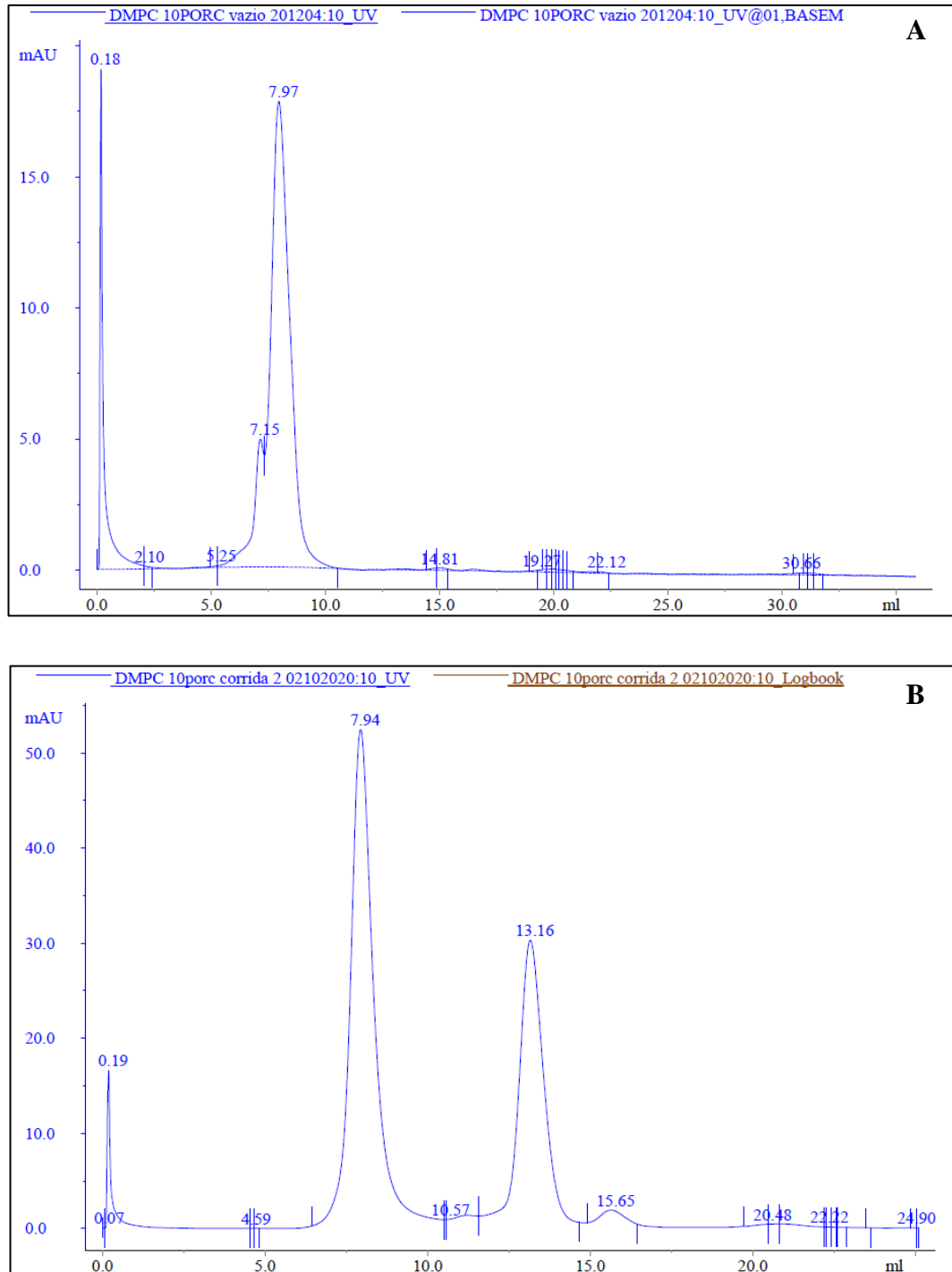
**Figura A 3.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DOPC/DSPE-PEG 10%, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação antes de encapsulação de ASNase, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DOPC/DSPE-PEG 10%, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas e 3° pico representa a ASNase não encapsulada.



**Figura A 4.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DMPC, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. A- cromatograma de formulação antes de encapsulação de ASNase, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas. B- Formulação de DMPC, 1° pico corresponde ao avolume volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas e 3° pico representa a ASNase não encapsulada.



**Figura A 5.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DMPC/ DSPE-PEG 5%, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. A- cromatograma de formulação antes de encapsulação de ASNase, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas. B- Formulação de DMPC/DSPE-PEG 5%, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas e 3° pico representa a ASNase não encapsulada.



**Figura A 6.** Cromatografia de exclusão molecular formulação de DMPC/DSPE-PEG 10%, eluição ocorreu de forma isocrática com tampão PBS pH 7,5. **A-** cromatograma de formulação DMPC/DSPE-PEG 10% antes de encapsulação de ASNase, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas. **B-** Formulação de DMPC/DSPE-PEG 10%, 1° pico corresponde ao volume morto da coluna, 2° pico representa os lipossomas e 3° pico representa a ASNase não encapsulada.

## 8.2. Anexo B: Currículo Lattes



### Marina de Souza Guimarães

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8707019763478188>

ID Lattes: **8707019763478188**

Última atualização do currículo em 25/10/2021

Aluna de mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. Bacharel em Ciências Biomédicas, pelo Instituto de Ciências Biomédicas (USP). Foi aluna de Iniciação Científica pela Faculdade de Medicina-USP, atuou na área de Bioquímica, com ênfase em Biologia Molecular e Celular, desenvolveu células-tronco de pluripotência induzida geneticamente modificadas, visando tratamento alternativo para paciente Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1). Atualmente trabalha com o desenvolvimento e caracterização de lipossomos peguilados; produção e purificação de enzima recombinante. **(Texto informado pelo autor)**

### Identificação

<b>Nome</b>	Marina de Souza Guimarães
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	GUIMARÃES, M. S.
<b>Lattes iD</b>	<a href="http://lattes.cnpq.br/8707019763478188">http://lattes.cnpq.br/8707019763478188</a>

### Endereço

<b>Endereço Profissional</b>	Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Avenida Professor Lineu Prestes Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 26480236
------------------------------	--

### Formação acadêmica/titulação

<b>2019</b>	Mestrado em andamento em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMOS PEGUILLADOS PARA VEICULAÇÃO DE L-ASPARAGINASE MUTANTE RESISTENTE À PROTEASES, Orientador: Carlota de Oliveira Rangel Yagui. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: Lipossomos Peguilados; ASNase; ASNase recombinante. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Microbiologia. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Biotecnologia / Subárea: Biotecnologia.
<b>2014 - 2018</b>	Graduação em Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA (HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, HIPSCS) GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA PERDA DA EXPRESSÃO DO GENE TXNIP. Orientador: Mari Cleide Sogayar. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

### Formação Complementar

<b>2016 - 2016</b>	Uso de animais em experimentação. (Carga horária: 10h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
<b>2014 - 2014</b>	Treinamento Pipetting Academy da Biohit. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2014 - 2014

Treinamento em Biossegurança. (Carga horária: 4h).  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

## Atuação Profissional

---

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

### Vínculo institucional

2018 - Atual

#### Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica  
Núcleo de Terapia Celular e Molecular-FMUSP; desenvolvimento de e caracterização de células-tronco de pluripotência induzida geneticamente modificadas. Sob orientação Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar.

### Vínculo institucional

2014 - 2018

#### Atividades

03/2016 - 12/2016

Vínculo: ,, Enquadramento Funcional: .

Estágios , Instituto de Ciências Biomédicas.  
Estágio realizado  
Estágio obrigatório, no Laboratório de Biologia Vascular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a orientação de Profa.Dra. Eliana Hiromi Akamine.

08/2015 - 12/2015

Estágios , Instituto de Ciências Biomédicas.

Estágio realizado  
Estágio obrigatório, no laboratório de Biologia da Reprodução e Matriz Extracelular do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa.Dra. Telma Maria.

08/2014 - 12/2014

Estágios , Instituto de Ciências Biomédicas.

Estágio realizado  
Estágio obrigatório, no laboratório de Biologia do Trofoblasto do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa.Dra. Estela M. A. F. Bevilacqua.

04/2014 - 06/2014

Estágios , Instituto de Ciências Biomédicas.

Estágio realizado  
Estágio obrigatório, no laboratório de Fisiologia Endócrina:Regulação Hormonal e Expressão Gênica no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

Instituto Butantan, IBU, Brasil.

### Vínculo institucional

2021 - Atual

Vínculo: Formal labor contract, Enquadramento Funcional: Clinial Trial Assistant

## Áreas de atuação

---

1.  
2.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.  
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Nanobiotecnologia.

## Idiomas

---

Português

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

## Produções

---

Produção bibliográfica

## Eventos

---



**Participação em eventos, congressos, exposições e feiras**

1. ACFB/ANF- ABDI Métodos Alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil. 2019. (Oficina).
2. 26º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP.CHARACTERIZATION OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS (HIPSCS) GENETICALLY MODIFIED FOR TXNIP GENE LOSS OF EXPRESSION.. 2018. (Simpósio).
3. Congresso da Associação Brasileira de Terapia Celular (ABTCEL). CHARACTERIZATION OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS (HIPSCS) GENETICALLY MODIFIED FOR TXNIP GENE LOSS OF EXPRESSION.. 2018. (Congresso).
4. Etapa Internacional do 26º SIICUSP.-. 2018. (Simpósio).
5. Etapa Internacional do 26º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP.CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA (HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, HIPSCS) GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA PERDA DA EXPRESSÃO DO GENE TXNIP. 2018. (Simpósio).
6. VII Simpósio de Inovações Biológicas e Biotecnológicas Aplicadas à Saúde (SIBBAS). 2018. (Simpósio).

### 8.3. Anexo C: Ficha do Aluno

9135 - 9040144 / 1 - Marina de Souza Guimarães

**Email:** marina.souza.guimaraes@usp.br

**Data de Nascimento:** 01/04/1994

**Cédula de Identidade:** RG - 14.624.674-82 - BA

**Local de Nascimento:** Estado da Bahia

**Nacionalidade:** Brasileira

**Graduação:** Bacharela em Ciências Biomédicas - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2018

**Curso:** Mestrado

**Programa:** Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

**Área:** Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Data de Matrícula:** 13/02/2019

**Início da Contagem de Prazo:** 13/02/2019

**Data Limite para o Depósito:** 11/11/2021

**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Carlota de Oliveira Rangel Yagui - 13/02/2019 até o presente Email: corangel@usp.br

**Proficiência em Línguas:**

Inglês, Aprovado em 13/02/2019

**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 06/03/2020



Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 13/02/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5756-5/2	Segurança Biológica de Produtos Farmacêuticos, Biotecnológicos e Biomateriais	11/03/2019	14/04/2019	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5833-1/1	Qualidade por Design Analítica (AQbD) Aplicado às Análises Farmacêuticas	19/03/2019	27/05/2019	90	6	100	A	N	Concluída
BTC5782-2/3	Enzimologia Básica e Aplicações em Processos Industriais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	03/06/2019	16/06/2019	60	4	100	A	N	Concluída
SMA5839-18/7	Preparação Pedagógica (Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação - Universidade de São Paulo)	06/08/2019	03/12/2019	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBT5773-8/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	12/08/2019	20/10/2019	30	2	90	A	N	Concluída
ESC5710-2/1	Preparação Pedagógica (Escola de Artes, Ciências e Humanidades - Universidade de São Paulo)	15/08/2019	06/11/2019	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBF5805-2/7	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas	20/08/2019	28/10/2019	90	6	100	A	N	Concluída

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Aplicadas às Ciências Farmacêuticas									
TNA5812-1/1	Segurança, boas práticas em laboratório de pesquisa multidisciplinar e tratamento de resíduos (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	04/09/2019	26/11/2019	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
PGF5357-1/1	Técnicas de Caracterização de Sistemas de Relevância Biológica (Instituto de Física - Universidade de São Paulo)	11/10/2019	17/10/2019	15	1	100	A	N	Concluída
QBQ5903-1/1	Técnicas Aplicadas ao Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	17/02/2020	31/05/2020	105	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5747-3/2	Toxicologia Forense	05/03/2020	08/04/2020	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5736-7/1	Métodos Gerais de Esterilização com Aplicações no Campo Farmacêutico	10/03/2020	20/04/2020	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
PSC5964-5/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	11/03/2020	21/04/2020	30	0	-	-	N	Turma cancelada
EFP5757-5/5	Docência no Ensino Superior em Educação Física e Esporte (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	11/03/2020	01/07/2020	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-4/9	Aprimoramento Pedagógico	17/03/2020	13/04/2020	60	0	-	-	N	Turma cancelada
IOC5816-3/5	Preparação Pedagógica em Oceanografia (Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo)	01/07/2020	14/07/2020	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ODO5700-5/2	Docência Universitária e Estratégias de Ensino-Aprendizagem (Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo)	03/08/2020	23/11/2020	75	5	100	A	S	Concluída
ERM5780-3/4	Docência no Ensino da Saúde: Saberes e Práticas (Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	07/08/2020	15/10/2020	60	0	-	-	S	Pré-matrícula indeferida
EAH5001-1/3	Preparação Pedagógica (Escola de Artes, Ciências e Humanidades -	18/08/2020	09/11/2020	60	0	-	-	S	Pré-matrícula indeferida

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Universidade de São Paulo)									

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	25
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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



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

Documento emitido às 18:15:39 horas do dia 31/10/2021 (hora e data de Brasília)

Código de controle: YWS8-URE9-BVNF-LPK3

Código de controle válido até: 30/11/2021