

# Teorias e Métodos da **BIOFÍSICA**

Sabrina Passoni Maravieski  
(Organizadora)

 **Atena**  
Editora  
Ano 2019

**Sabrina Passoni Maravieski**  
(Organizadora)

# **Teorias e Métodos da Biofísica**

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © da Atena Editora  
**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
**Diagramação e Edição de Arte:** Lorena Prestes e Geraldo Alves  
**Revisão:** Os autores

**Conselho Editorial**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

T314 Teorias e métodos da biofísica [recurso eletrônico] / Organizadora  
Sabrina Passoni Maravieski. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora,  
2019.

Formato: PDF  
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader  
Modo de acesso: World Wide Web  
Inclui bibliografia  
ISBN 978-85-7247-189-3  
DOI 10.22533/at.ed.893191403

1. Biofísica. I. Maravieski, Sabrina Passoni.

CDD 571.4

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de  
responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos  
autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

A obra “Teorias e Métodos da Biofísica” faz parte de uma série de livros publicados pela Atena Editora, e neste volume único, em seus 12 capítulos, apresenta uma diversidade de estudos realizados nas diversas áreas da biofísica, bem como relação com outras áreas que esta exige nos dias atuais.

A biofísica é uma ciência interdisciplinar na qual se emprega as teorias, os métodos ou técnicas específicas da física para resolver questões biológicas. Atualmente, com o avanço tecnológico a biofísica está presente na maioria das ciências da saúde, tais como: Medicina, Fonoaudiologia, Odontologia, Enfermagem, Terapia Ocupacional, Fisioterapia, Bioengenharia e Biomedicina. Na área de Ecologia, temos também a biofísica Ambiental. Algumas especializações em biofísica podem ser ainda multidisciplinares, como por exemplo: a Bioinformática, a Biologia Estrutural, Toxicologia Ambiental e Biologia de Sistemas.

Dessa forma, o leitor poderá encontrar nesta obra, uma variedade pesquisas cujas áreas que envolvem a biofísica estão interligadas nas quais muitos pesquisadores buscam por soluções emergentes. A interdisciplinaridade entre estas diversas áreas aqui citadas é um processo natural e inevitável, pois a formação dos profissionais das ciências da saúde ou biológicas, seja qual for a sua formação, necessita da relação entre diversas áreas do conhecimento.

Hoje o profissional se destaca pela capacidade de saber inovar e alcançar resultados positivos em suas pesquisas com base nas diversas ciências, utilizando uma ou mais tecnologias. Isso se faz possível se este profissional tiver conhecimento das demais áreas, pois não basta ser bom em uma única ciência, é preciso ser multi-intelectual.

Nesta obra, portanto, o leitor poderá encontrar parcerias estabelecidas entre diversas áreas do conhecimento de diversos departamentos de pesquisa: Engenharia Elétrica e de Computação, Semicondutores, Biocalorimetria, Bioquímica Médica, Nanotecnologia e Nanomedicina, Bioquímica e Biofísica, Farmácia, Química do Estado Sólido, Ciências Médica, Clínica Médica (Nefrologia), Radioterapia, Histologia e Embriologia, Biofísica e Radiobiologia, Morfologia e Fisiologia Animal, Nanociências e Materiais Avançados.

Logo, este volume é dedicado à interdisciplinaridade nas diversas áreas das Ciências da Saúde e Biológica, pois o mercado atual exige uma revolução tecnológica e cabe a aos pesquisadores, dessas diversas áreas, buscar conhecer as demandas atuais para promover essas inovações de forma interdisciplinar, e não isoladamente. Neste sentido, esta obra foi dividida em 6 áreas temáticas da Biofísica: Bioeletricidade, Bioestatística, Biomecânica, Biofísica Ambiental, Biomedicina, e Radiobiologia.

Na área de Bioeletricidade, composta apenas de um capítulo (capítulo1), apresentamos uma pesquisa realizada entre os cursos de Engenharias de Computação e Elétrica e o curso de Ciências Médicas, em que envolve os Departamentos de Química de Estado Sólido, Semicondutores, Instrumentos e Fotônica e o de Clínica Médica

(Nefrologia). Trata-se da investigação do nível de fósforo no sangue, em que, quando este apresenta-se acima do normal está associado a casos de óbitos de pacientes renais crônicos. Para isto os autores propõem o desenvolvimento de um transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET) que possa ser utilizado para quantificar a massa de fósforo no dialisato total final extraída durante o processo de hemodiálise.

Na área de Bioestatística, apresentamos dois capítulos. No capítulo 2, a pesquisa foi desenvolvida pelos Departamentos de Morfologia e Fisiologia em conjunto com o Departamento de Biofísica e Radiobiologia de uma Faculdade Rural. Na pesquisa foi utilizando o método da complexidade de Lempel-Ziv (CLZ), o qual permite calcular a complexidade de uma série temporal sem a necessidade de longos segmentos de dados. Este método, estatístico é baseado em dinâmica não linear e costumam ser são amplamente empregado na análise e descrição adequada de processos nas áreas de química, física e biologia. Neste, o método foi desenvolvido com o objetivo de determinar a complexidade de sequências finitas na análise do particionamento do polietilenoglicol no nanoporo unitário de alfa-hemolisina inserido em uma bicamada lipídica plana. O objetivo foi investigar o processo de chegada e permanência da molécula polimérica (analito) no nanoporo (biossensor). No capítulo 3, os pesquisadores avaliaram diferentes espectrômetros utilizados em análises clínicas e laboratórios de pesquisa os quais permitem determinar as concentrações de espécimes químicas diversas. Por considerarem a aplicabilidade destes dispositivos importante no quesito qualidade dos resultados fornecidos, os autores apresentam técnicas de estatística e os métodos de obtenção de indicadores de qualidade, por meio da realização de experimentos laboratoriais utilizando espectrofotômetros.

O capítulo 4, inserido na área temática de Biomecânica, trata-se de uma pesquisa onde a Oftalmologia e a Estética Funcional, estão intimamente ligadas aos fenômenos de transferência de massa estudados na Física. Neste, os autores mostraram como a falha da transferência de massa intraocular, por convecção forçada, pode afeta o movimento oculomotor e provoca diversas enfermidades, tais como: erro de refração, ceratocone, glaucoma de ângulo aberto ou fechado. Sugerindo por fim, a necessidade do SUS incluir, em seus procedimentos, a cirurgia corretiva de elevação de sobrancelhas, assim como a ANS regulamentar esta cirurgia em todos os planos de saúde.

Na área temática de Biofísica Ambiental, pesquisadores do Laboratório de Nanociências e Materiais Avançados realizaram estudos por meio da técnica de espectroscopia UV-visível com o intuito de promover uma formação interdisciplinar entre alunos de Pós-Graduação. Nesse sentido, os autores desenvolveram estratégias experimentais que permitem aos estudantes dominarem o uso da técnica de espectroscopia UV-visível para análises qualitativas e quantitativas com uso de um corante altamente conhecido e de larga aplicação como é o azul de metileno (capítulo 5). No capítulo 6, pesquisadores realizaram um levantamento do número de veículos na cidade de Recife para verificação da poluição atmosférica. Para eles, a poluição

atmosférica é comprovadamente um agente causador e de piora do quadro de diversas doenças, entre elas doenças respiratórias, câncer de pulmão, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. No capítulo 7, pesquisadores do Departamento de Biofísica e Radiobiologia utilizaram o ensaio cometa em hemócitos do moluscos de água doce *Biomphalaria glabrata*, é um biodicador natural utilizados para a detecção de possíveis danos no DNA após a exposição ao MMS e para avaliar a potencial aplicação para monitoramento da genotoxicidade do ambiente de água doce.

Na área temática de Biomedicina, o leitor poderá aprofundar seus estudos em três capítulos. No capítulo 8, os autores do Departamento de Histologia e Embriologia, analisaram e avaliaram a atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico do *Allium sativum* L. frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Na área de Bioquímica Médica no Laboratório de Biocalorimetria (capítulo 9), pesquisadores realizaram estudos de uma importante enzima a L-asparaginase, a qual é amplamente utilizada no tratamento da leucemia. Tendo em vista a importância de seu uso, surgiu a necessidade de buscar alternativas para reduzir seus efeitos adversos e aumentar sua estabilidade. Assim a pesquisa resultou na obtenção de nanopartículas de quitosana de alto peso molecular sem e com ZnCl<sub>2</sub>. A alta concentração de quitosana, segundo os autores, permite maior incorporação de fármaco, mas aumenta o tamanho da partícula, o que não é interessante para a liberação intravenosa de fármaco. Já no capítulo 10, os autores analisaram e caracterizaram nanopartículas de quitosana-tripolifosfato (QT-TPP) associadas ao fármaco sumatriptano (SMT) como uma alternativa na terapia de enxaqueca via uso tópico.

A última área temática é a Radiobiologia, composta de dois capítulos promissores para as pesquisas atuais. Essa área vem crescendo em interdisciplinaridade, principalmente devido o crescimento das pesquisas em Medicina Nuclear, em Engenharia Biomédica e das técnicas de obtenção de imagem, as quais sofrem constantes avanços tecnológicos. Com isso, no capítulo 11, os autores investigaram a ação radioprotetora do extrato bruto da casca de *Anadenanthera colubrina* sobre os embriões de *Biomphalaria glabrata* e os resultados obtidos mostraram que o extrato da casca de A. colubrina apresentou uma discreta atividade radioprotetora. E por fim, no capítulo 12, com o intuito de fornecer mais dados sobre os efeitos da radiação ionizante no sistema nervoso central, os pesquisadores avaliaram a atividade elétrica cerebral de ratos expostos à radiação ionizante através do exame de eletrocorticograma (ECoG) e pode-se observar alterações nas ondas cerebrais através do uso de dois métodos matemáticos: a Transformada de Fourier (TF) Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) concluindo que a exposição a essa radiação causa alterações eletrofisiológicas, que incluem diminuição da complexidade e modificações nas ondas cerebrais.

Aos autores dos diversos capítulos, pela dedicação e esforços sem limites, que viabilizaram esta obra que retrata os recentes avanços científicos e tecnológicos nas Ciências da Saúde e Biofísica, os agradecimentos dos Organizadores e da Atena Editora.

Por fim, esperamos que este livro possa colaborar e instigar mais estudantes, professores e pesquisadores na constante busca de novas tecnologias promovendo a interdisciplinaridade nas diferentes áreas das Ciências da Saúde e Biofísica.

Sabrina Passoni Maravieski

## SUMÁRIO

### ÁREA TEMÁTICA BIOELETRICIDADE

#### CAPÍTULO 1 ..... 1

DESENVOLVIMENTO DE TRANSISTOR DE EFEITO DE CAMPO SENSÍVEL A ÍONS (ISFET) PARA QUANTIFICAÇÃO DA MASSA DE FÓSFORO REMOVIDO DE PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS NAS SESSÕES DE HEMODIÁLISE

*Sergio Henrique Fernandes*

*Leandro Tiago Manera*

*Helder José Ceragioli*

*Rodrigo Bueno de Oliveira*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914031**

### ÁREA TEMÁTICA BIOESTATÍSTICA

#### CAPÍTULO 2 ..... 17

COMPLEXIDADE DE LEMPEL-ZIV NA ANÁLISE DO TRANSPORTE DO POLIETILENOGLICOL ATRAVÉS DO NANOPORO DE ALFA-HEMOLISINA

*Gesilda Florenço das Neves*

*Dijanah Cota Machado*

*Carlos Manuel Machado Carneiro*

*Luiz Hamiel Almeida Consoni*

*Cláudio Gabriel Rodrigues*

*Romildo Albuquerque Nogueira*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914032**

#### CAPÍTULO 3 ..... 25

METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESPECTROFOTÔMETROS:ANÁLISE DA DISPERSÃO DAS MEDIDAS

*Cleonilde Maria do Nascimento*

*Carla Luiza Barros Bernardes Borja*

*Bruno Edberg Alves de Lira*

*Jabson Herber Profiro de Oliveira*

*Dijanah Cota Machado*

*Milton Marcelino Filho*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914033**

### ÁREA TEMÁTICA BIOMECÂNICA

#### CAPÍTULO 4 ..... 36

MOVIMENTO OCULOMOTOR E ALGUMAS PATOLOGIAS

*Humberto Dória Silva*

*Eduardo Dória Silva*

*Maria Tamires Dória Silva*

*Cristiana Pereira Dória*

*Cristiane Pereira Dória*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914034**

**CAPÍTULO 5 ..... 43**

ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE ESTADOS AGREGADOS DE CORANTES

*Adrienne Marlise Mendes Brito*

*Hebert Freitas dos Santos*

*Iseli Lourenço Nantes-Cardoso*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914035**

**CAPÍTULO 6 ..... 60**

POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E POSSÍVEIS EFEITOS À POPULAÇÃO DE RECIFE

*Cleonilde Maria do Nascimento*

*Nicolas Nunes Ferreira*

*Helotônio Carvalho*

*Sheilla Andrade de Oliveira*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914036**

**CAPÍTULO 7 ..... 66**

UTILIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA DETECTAR EFEITO GENOTÓXICO DO METANOSULFONATO DE METILA EM CÉLULAS DE *Biomphalaria glabrata*

*Dewson Rocha Pereira*

*Maíra de Vasconcelos Lima*

*Willams Nascimento de Siqueira*

*Gabrielly Christynne Nascimento Sales*

*Hianna Arely Milca Fagundes Silva*

*José Luiz Ferreira Sá*

*Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914037**

ÁREA TEMÁTICA BIOMEDICINA

**CAPÍTULO 8 ..... 73**

AValiação DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DO *Allium sativum* L

*Gleyka Daisa de Melo Santos*

*Erwelly Barros de Oliveira*

*Paloma Lys de Medeiros*

*Eliete Cavalcanti da Silva*

*João Soares Brito da Luz*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914038**

**CAPÍTULO 9 ..... 82**

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE ALTO PESO MOLECULAR - TRIPOLIFOSFATO PARA CARREAMENTO DE PROTEÍNA

*Caroline Dutra Lacerda*

*Patrícia Severino*

*Maria Lucia Bianconi*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914039**

**CAPÍTULO 10 ..... 94**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-TRIPOLIFOSFATO PARA APLICAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS**

*Aryane Alves Vigato*

*Renato Grillo*

*Leonardo Fernandes Fraceto*

*Daniele Ribeiro de Araújo*

**DOI 10.22533/at.ed.89319140310**

**ÁREA TEMÁTICA RADIOBIOLOGIA**

**CAPÍTULO 11 ..... 109**

**AÇÃO RADIOPROTETORA DO EXTRATO BRUTO DA CASCA DE *Anadenanthera colubrina* SOBRE OS EMBRIÕES DE *Biomphalaria glabrata***

*José Luís Ferreira Sá*

*Williams Nascimento Siqueira*

*Hianna Arely Milca Fagundes Silva.*

*Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra*

*Dewson Rocha Pereira*

*Larissa Silva de Azevedo Melo*

*Maíra de Vasconcelos Lima*

*Luiz Alberto Lira Soares*

*Márcia Vanusa Silva*

*Maria Tereza Santos Correia*

*Ana Maria Mendonça Albuquerque Melo*

**DOI 10.22533/at.ed.89319140311**

**CAPÍTULO 12 ..... 117**

**MÉTODOS MATEMÁTICOS DE ANÁLISE DA ATIVIDADE ELÉTRICA CEREBRAL DE RATOS EXPOSTOS A RADIAÇÃO IONIZANTE**

*Camilla de Andrade Tenorio Cavalcanti*

*Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes*

*Leandro Álvaro de Alcântara Aguiar*

*Alexandre Parisio Barbosa de Oliveira*

*Jonas Sérgio de Oliveira Filho*

*Romildo de Albuquerque Nogueira*

**DOI 10.22533/at.ed.89319140312**

**SOBRE A ORGANIZADORA..... 126**

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE ALTO PESO MOLECULAR - TRIPOLIFOSFATO PARA CARREAMENTO DE PROTEÍNA

### **Caroline Dutra Lacerda**

Laboratório de Biocalorimetria, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

### **Patrícia Severino**

Laboratório de Nanotecnologia e Nanomedicina (LNMED), Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

### **Maria Lucia Bianconi**

Laboratório de Biocalorimetria, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

**RESUMO:** Proteínas têm sido utilizadas e estudadas para o tratamento de inúmeras doenças, devido à sua alta especificidade e ação potente. Várias formulações estão sendo desenvolvidas para melhorar a biodisponibilidade e atividade de proteínas. As nanopartículas foram estudadas para aplicações biotecnológicas, tais como para liberação controlada de drogas. O polímero de quitosana (CS), devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, é uma boa escolha para essa finalidade. Entre os métodos de obtenção de nanopartículas, a gelificação ionotrópica é vantajosa por sua simplicidade e não utilizar solventes orgânicos e altas temperaturas. A L-asparaginase é uma importante enzima

amplamente utilizada no tratamento da leucemia, entretanto, alguns fatores limitam seu uso na clínica, como o desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase, reações de hipersensibilidade e outros efeitos adversos. Tendo em vista a importância de seu uso, são necessárias alternativas para reduzir seus efeitos adversos e aumentar sua estabilidade. Objetivou-se obter nanopartículas de quitosana de alto peso molecular sem e com  $ZnCl_2$ , além da incorporação de asparaginase como proteína modelo, por gelificação ionotrópica com razão CS/tripolifosfato de 3. A alta concentração de quitosana permite maior incorporação de fármaco, mas aumenta o tamanho da partícula, o que não é interessante para a liberação intravenosa de fármaco. A adição de  $ZnCl_2$  na formulação leva ao decréscimo de tamanho com o aumento da capacidade de carga. Todas as formulações apresentaram valores satisfatórios de potencial zeta indicando boa estabilidade físico-química e a asparaginase dentro das nanopartículas apresentou maior velocidade de catálise, em comparação com a enzima livre.

**ABSTRACT:** Proteins has been used and studied for the treatment of numerous diseases because of their high selectivity and potent action. Several formulations are being developed to improve the bioavailability and activity of proteins. Nanoparticles have been

studied for biotechnological applications, such as drug delivery for controlled release. The chitosan (CS) polymer, due to its biodegradability, biocompatibility and low toxicity, is a good choice for this purpose. Among the methods of obtaining nanoparticles ionotropic gelation is advantageous for its simplicity and does not use organic solvents and high temperatures. L-asparaginase is an important enzyme widely used in leukemia treatment, however, some factors limit its use in the clinic, such as the development of antibodies anti-asparaginase, hypersensitivity reactions and other adverse effects. In view of the importance of its use, alternatives are needed to reduce its adverse effects and increase its stability. This work aimed to obtain high molecular weight chitosan nanoparticles without and with  $ZnCl_2$ , in addition to incorporation of asparaginase like a model protein, by ionotropic gelation using CS/tripolyphosphate ratio of 3. High concentration of chitosan allows larger drug incorporation, but increases the size of the particle, which is not interesting for intravenous drug delivery. The addition of  $ZnCl_2$  in the formulation leads to size decrease with increased load capacity, good zeta potential, indicating good physico-chemical stability and the asparaginase inside the nanoparticle show higher enzymatic velocity compared to free form.

## 1 | INTRODUÇÃO

As proteínas têm sido muito estudadas e empregadas na terapia de diversas patologias humanas, mas a sua utilização acaba sendo limitada devido à vulnerabilidade da sua estrutura, o que é muito crítico, uma vez que a sua atividade é altamente dependente da conformação. Além disso, estão susceptíveis à degradação enzimática por proteases endógenas e à imunogenicidade. A nanotecnologia tem sido muito explorada no desenvolvimento de sistemas que possam contornar essas limitações e permitir o aproveitamento do potencial terapêutico dessas moléculas. (Yu *et al.*, 2016)

A nanotecnologia vem sendo empregada em diversas áreas, com a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas através do controle da matéria em escala de tamanho nanométrico. Especificamente na área da saúde, tem se tornado cada vez mais comum a sua aplicação, já que a entrega eficiente de fármacos é um dos grandes desafios da indústria farmacêutica e biotecnológica. Muitos fármacos apresentam uso limitado devido à baixa solubilidade, alta toxicidade, agregação, entrega não específica, degradação *in vivo* e meia-vida curta. Nesse contexto, a nanotecnologia vem sendo empregada no desenvolvimento de novos sistemas para a entrega de princípios ativos a fim diminuir os efeitos colaterais e aumentar sua estabilidade, além de possibilitar maior biodisponibilidade. (Parveen, Misra e Sahoo, 2012; Zhang *et al.*, 2008)

### Polímeros biocompatíveis

O desenvolvimento e a obtenção de polímeros biocompatíveis representam uma revolução na medicina, proporcionando significativos avanços biotecnológicos na

entrega de medicamentos, biomateriais, engenharia de tecidos e desenvolvimento de dispositivos médicos. A degradabilidade e biocompatibilidade desses materiais são de suma importância, pois seus subprodutos, em meio biológico não são tóxicos. Embora grande parte dos trabalhos pioneiros no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos tenham sido conduzidos com polímeros não-degradáveis, polímeros degradáveis e biodegradáveis são os preferíveis para tal aplicação. (Kamaly *et al.*, 2016)

Os polímeros degradáveis de ocorrência natural têm sido extensivamente aplicados em sistemas de direcionamento específico de princípios ativos, devido à abundância na natureza e biocompatibilidade, incluindo polímeros proteicos, tais como, colágeno, albumina, gelatina e os polissacarídeos, como agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextrano, quitosana e as ciclodextrinas. (Pillai e Panchagnula, 2001)

Os polissacarídeos naturais, em especial, têm sido amplamente utilizados em projetos de engenharia de tecidos e fabricação de nanopartículas para entrega de ativos. Apesar da grande vantagem de serem biodegradáveis, apresentam a limitação de variabilidade lote a lote e ampla distribuição de peso molecular, quando comparados com os polímeros sintéticos. A quitosana e o ácido hialurônico são dois dos polímeros naturais mais utilizados para carregamento de fármacos. (Kamaly *et al.*, 2016)

A quitosana é um polímero natural, hidrofílico, biodegradável, biocompatível, com baixa toxicidade, e tem sido muito utilizada para a produção de nanopartículas para direcionamento específico de fármacos (Nagpal, Singh e Mishra, 2010). Este biopolímero é um mucopolissacarídeo estreitamente semelhante à celulose, obtido pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos, entre outros, composto pelas unidades monoméricas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, como exemplificado na Figura 1. Propriedades importantes podem influenciar na sua solubilidade e capacidade de reticulação, como o grau de desacetilação, a distribuição de peso molecular e o conteúdo de impurezas, os quais dependem das fontes naturais da matéria-prima e dos métodos de preparação. (Kumar, 2000)

Quando o grau de desacetilação da quitina atinge aproximadamente 50%, esta se torna solúvel em meio aquoso ácido, passando a ser denominada de quitosana. A solubilização ocorre pela protonação do grupo funcional  $-NH_2$  na posição C-2 da unidade D-glucosamina e, com isso, o polissacarídeo é convertido em um polieletrólito catiônico quando em meios ácidos. Este polímero catiônico pseudonatural apresenta muitas aplicações, como: tratamento de águas, produção de cosméticos e medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e desenvolvimento de biomateriais. (Rinaudo, 2006)

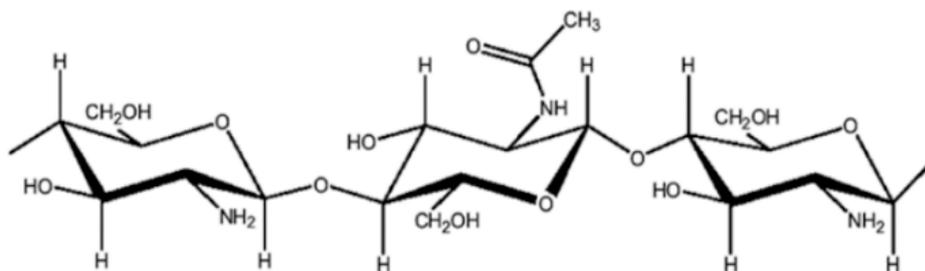


Figura 1. Estrutura da molécula de quitosana

Dentre as técnicas mais utilizadas para a obtenção de nanopartículas, a gelificação iônica se destaca devido a não utilização de solventes orgânicos e alta temperatura, o que é uma vantagem para encapsulação de bioativos. Esta técnica consiste, basicamente, na reticulação de compostos com cargas opostas, como ocorre com os grupos amino da quitosana que apresentam característica catiônica, com os grupos fosfato das moléculas aniônicas do tripolifosfato de sódio (TPP) ou alginato de sódio (Nagpal, Singh e Mishra, 2010).

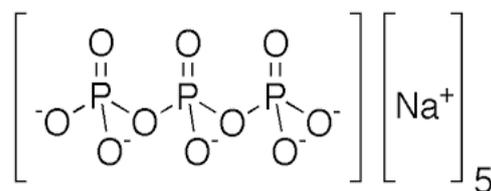


Figura 2. Estrutura da molécula de tripolifosfato de sódio

Além de ter se mostrado útil para a encapsulação de fármacos de molécula pequena, o biopolímero quitosana, devido às suas propriedades já citadas anteriormente, é um candidato promissor também para a produção de formulações contendo proteínas com aplicação terapêutica. As proteínas representam uma parte significativa dos novos produtos farmacêuticos em uso e ainda sendo estudados. Apesar do seu mecanismo de ação muito eficiente, a sua aplicação ainda apresenta uma grande desvantagem, uma vez que, devido às suas propriedades físico-químicas, muitas delas apresentam baixa estabilidade, permeabilidade e biodistribuição, após administração no paciente. O sucesso desse tipo de formulação depende não apenas da estabilidade do sistema de entrega, mas, também, da sua capacidade de manter a estrutura nativa e a atividade da proteína, durante a preparação, período de armazenamento e da entrega ao local de ação do fármaco. Os sistemas à base de quitosana estão sendo propostos como estratégias válidas para atender tais condições. (Andrade *et al.*, 2011)

### L-asparaginase

A L-asparaginase II é muito utilizada em protocolos clínicos para tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente a leucemia linfoblástica aguda em crianças, mas apresenta limitações de uso inerente de qualquer proteína exógena, além de

efeitos secundários indesejados que podem resultar desde a inativação da enzima após a administração até graves reações alérgicas e neurotóxicas (Hill *et al.*, 1967; Narta, Kanwar e Azmi, 2007). Neste contexto, é um desafio desenvolver formulações que superem essas limitações e possibilitem o uso do potencial terapêutico desse bioativo com mais segurança para o paciente.

O uso de L-asparaginase no tratamento de neoplasmas malignos é o primeiro exemplo claro de uma terapia baseada em uma diferença nutricional específica entre certas células normais e malignas. A ação terapêutica da L-asparaginase consiste na depleção da L-asparagina circulante no soro (Figura 3). A L-asparagina é um aminoácido não essencial sintetizado pela enzima asparagina sintase, através da transaminação do ácido aspártico, e é fundamental para o crescimento celular. As células leucêmicas e outras células tumorais são deficientes ou apresentam baixa expressão de asparagina sintase, sendo dependentes de fonte externa de L-asparagina para síntese proteica e sobrevivência. Após administração da L-asparaginase, a L-asparagina circulante é clivada em aspartato e amônia, o que mata seletivamente as células leucêmicas e impede sua proliferação. (Hill *et al.*, 1967)

A incorporação da L-asparaginase em nanopartículas de polímeros biocompatíveis é uma alternativa promissora para aumentar a estabilidade dessa enzima no plasma e permitir a liberação sustentada da enzima e, com isso, aumentar o intervalo entre as administrações, além de diminuir os efeitos adversos.



Figura 3 Estrutura na enzima L-asparaginase, PDB: 3ECA

Neste trabalho o objetivo foi obter nanopartículas de quitosana de alto peso molecular sem e com  $\text{ZnCl}_2$ , além da incorporação de L-asparaginase como proteína modelo, por gelificação ionotrópica com razão CS/tripolifosfato de 3. As partículas obtidas foram caracterizadas utilizando-se espalhamento dinâmico de luz para determinar o tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta e a capacidade de carregamento das nanopartículas, além da atividade enzimática.

## Caracterização de nanopartículas

### *Espalhamento de luz dinâmico (DLS)*

Duas características das nanopartículas comumente estudadas são a distribuição do tamanho e a carga superficial das partículas. Quando iluminadas com um laser, as partículas em suspensão espalham a radiação, sendo que a intensidade do espalhamento é proporcional ao tamanho das partículas. A variação da intensidade de espalhamento é devida ao movimento Browniano das partículas, relacionado ao tamanho e a forma das partículas, podendo ser avaliada pela relação de Stokes-Einstein. A velocidade do movimento Browniano é definida pelo coeficiente de difusão translacional ( $D$ ) e é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula (quanto maior o diâmetro da partícula, menor o movimento), podendo ser influenciada também pela temperatura e viscosidade do meio. Esse coeficiente ( $D$ ) é medido pela curva de correlação da intensidade. (Xu, 2008)

A biodistribuição das partículas depende das suas propriedades físico-químicas, especialmente o tamanho. Uma das principais técnicas utilizadas para determinar o tamanho de partículas em suspensão é o espalhamento dinâmico de luz (DLS), que avalia o movimento browniano das partículas e relaciona com a velocidade, ou seja, o coeficiente de difusão translacional, sendo, assim, possível determinar o tamanho das partículas de acordo com a equação de Stokes-Einstein (Pecora, 2000). O tamanho de partícula é definido como o tamanho de uma esfera hipotética rígida que difunde da mesma forma que as partículas que estão sendo avaliadas. O resultado é relatado como um tamanho médio e a homogeneidade da distribuição de tamanho é expressa como índice de polidispersidade (PDI), um parâmetro adimensional da função de autocorrelação; valores entre 0,1 a 0,25 indicam uma estreita distribuição de tamanho. O DLS fornece uma estimativa simples e rápida do tamanho das partículas, mas apresenta limitações, principalmente em amostras com distribuição de tamanho multimodal. Uma alternativa é a microscopia que fornece uma avaliação precisa do tamanho e da forma das partículas. No entanto, muitas vezes requer etapas complicadas de preparação de amostra, específicas para cada tipo de microscopia que pode alterar a amostra e criar artefatos. (Cho et al., 2013; Gaumet et al., 2008; Xu, 2008)

A carga superficial é um importante parâmetro para o estudo da estabilidade de coloides ou nanopartículas em suspensão. Não existe uma tecnologia satisfatória para determinar a carga superficial de partículas pequenas em líquido. Assim, a prática mais comum é determinar o potencial elétrico da partícula em um local afastado da sua superfície, ou seja, na camada difusa. Este local que se relaciona ao movimento das partículas no líquido é chamado de plano de deslizamento ou cisalhamento. O potencial medido neste plano é chamado de potencial zeta, sendo esse um parâmetro muito importante para a suspensão de nanopartículas, uma vez que está intimamente relacionado à sua estabilidade. A carga líquida na superfície da partícula afeta

a distribuição de íons ao seu redor, aumentando a concentração de contraíons na superfície, sendo formada uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Na camada mais interna estão localizados os íons fortemente ligados à superfície e na camada externa, a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e o movimento térmico. Assim, o potencial nesse local diminui com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionado como potencial zero. A microeletroforese é utilizada para determinar esse potencial, pois, em um campo elétrico, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade. O potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é denominado de potencial zeta. Como este potencial é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface e da natureza e composição do meio que a circunda, ele reflete a carga efetiva nas partículas, se correlacionando com a repulsão eletrostática e com a estabilidade da suspensão. (Xu, 2008)

Em geral, partículas com potencial zeta mais positivo do que +30 mV ou mais negativo do que -30 mV têm estabilidade coloidal mantida devido à repulsão eletrostática. Uma limitação desse tipo de determinação é que em amostras multimodais o valor do potencial zeta de partículas maiores domina em relação a partículas menores. (Cho et al., 2013; Xu, 2008)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para determinar o diâmetro médio e o índice de polidispersão das nanopartículas. As aquisições foram realizadas a 25 °C, sendo 100 aquisições de cada amostra. O equipamento utilizado foi o Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) acoplado a um sistema de aquisição de dados e o software DTS (Malvern Instruments) foi empregado para coleta e análise dos dados. O mesmo equipamento e software também foram utilizados para determinar o potencial zeta das partículas por meio da avaliação da mobilidade eletroforética das partículas em suspensão.

### *Capacidade de carregamento*

A capacidade de carregamento do princípio ativo, ou seja, a quantidade de fármaco que é possível veicular em uma determinada quantidade do sistema nanoparticulado, é importante, pois, quanto mais alta, menos matriz deverá ser administrada. O carregamento pode ocorrer pela incorporação no interior da matriz polimérica ou pela absorção na superfície das nanopartículas. Outro fator importante nesses sistemas é a liberação do fármaco que, em geral, depende da solubilidade do mesmo, da dessorção da superfície, da difusão através da matriz, da erosão/degradação da matriz, bem como da combinação desses fatores. (Cho et al., 2013; Mohanraj, Chen e Chen, 2006)

A fim de determinar a quantidade de L-asparaginase incorporada nas nanopartículas, estas foram centrifugadas a 27000 × g durante 30 minutos e a

concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) de acordo com Smith et al. (1985).

### *Atividade enzimática por Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)*

As técnicas calorimétricas têm contribuído muito para a compreensão dos mecanismos de interação a nível molecular. O calorímetro de titulação isotérmica (ITC) possibilita medidas energéticas de fenômenos de ligação, interação e reação entre componentes em temperatura constante. O calor associado com a reação ou interação é medido diretamente, permitindo obter os parâmetros termodinâmicos, como a entalpia, além de determinar a extensão da reação. (Freire, Mayorga e Straume, 1990)

Um instrumento de ITC consiste em duas células idênticas compostas de um material condutor térmico altamente eficiente (Hasteloy ou ouro) rodeado por uma câmara adiabática. Os circuitos de termopar detectam diferenças de temperatura entre as duas células e entre as células e a câmara. O sistema trabalha para manter idênticas as temperaturas entre todos os componentes. Em um experimento de ITC, a solução de macromolécula é colocada na célula de amostra e a célula de referência contém tampão ou água. Antes da injeção do titulante, uma potência constante é aplicada à célula de referência. Este sinal direciona o circuito de feedback para ativar o aquecedor localizado na célula de amostra. Isso representa o sinal de linha de base. O sinal medido em um ITC é a energia necessária para manter a temperatura igual em ambas as células, de amostra e de referência. Durante a injeção do titulante na célula de amostra, o calor é absorvido ou liberado, dependendo se a reação é endotérmica ou exotérmica, respectivamente. Para uma reação exotérmica, a temperatura na célula de amostra aumenta, então o sistema de aquecimento é desativado para manter as temperaturas iguais entre as duas células e um pico negativo é observado. Para reações endotérmicas, o inverso ocorrerá, ou seja, o sistema irá aumentar a potência para a célula de amostra para manter a temperatura e um será observado um pico positivo. (Pierce, Raman e Nall, 1999)

A maioria dos substratos e/ou produtos de reações enzimáticas não possuem as propriedades necessárias para quantificação direta por técnicas espectrofotométricas. Assim, frequentemente, para estudar essas reações são utilizados substratos modificados ou uma reação acoplada, que reage com o produto de interesse formando um segundo produto quantificável. Porém, essas estratégias podem introduzir muitos erros experimentais, principalmente, na determinação  $K_m$  e  $k_{cat}$ . Uma vez que durante as reações químicas ocorre liberação ou absorção de calor, as técnicas calorimétricas são úteis para estudar essas reações. Assim a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma ferramenta muito interessante para estudo de reações enzimáticas, pois permite a determinação direta da velocidade de reação, sem modificação de substrato e sem necessidade de utilizar uma reação acoplada. Além disso, esse equipamento

tem um controle muito preciso de temperatura, além de permitir a determinação direta do calor de reação utilizando uma concentração muito baixa de proteína, de modo que possibilita a determinação dos parâmetros cinéticos da reação. (Bianconi, 2007)

Comumente, a atividade enzimática da L-asparaginase é caracterizada pela reação de Nessler. Para isso, é preparada uma solução de enzima em tampão e a reação é iniciada com a adição de asparagina nessa solução. Após 30 minutos a reação é interrompida com a adição de ácido tricloroacético. Após centrifugação, a amostra é diluída em água e, então, adicionado o reagente de Nessler (tetraiodomercurato(II) de potássio), o qual reage com nitrogênio amoniacal, formando um precipitado amarelo-castanho e após 15 minutos a quantidade amônia produzida é determinada a partir da absorvância em 500 nm. Para isso, é necessário fazer uma curva padrão de sulfato de amônio (Whelan e Wriston, 1969). Porém, essa reação é de baixa sensibilidade. Por ser uma reação acoplada e ocorrer a formação de precipitado, pode apresentar incerteza quantitativa.

A calorimetria de titulação isotérmica foi utilizada para caracterizar a atividade enzimática da L-asparaginase livre e da solução de nanopartículas carregadas com L-asparaginase em um VP-ITC, MicroCal (Malvern, USA). As taxas de reação enzimática foram determinadas medindo-se a alteração de calor na cela de amostra, contendo substrato, após a injeção da enzima. Todas as aquisições foram feitas a 37 °C e sob agitação de 300 rpm. Para alcançar o estado estacionário da reação, foram injetados 20 µL de L-asparaginase livre ou nanopartículas carregadas com L-asparaginase (8,5 µg.mL<sup>-1</sup> de proteína) na cela de amostra (1,45 mL) contendo 10 mM de L-asparagina em tampão PBS pH 7,4. As constantes das taxas enzimáticas foram determinadas de acordo com Morin e Freire, (1991).

## RESULTADOS

O cloreto de zinco (ZnCl<sub>2</sub>) foi utilizado para estabilizar nanopartículas de quitosana reticulada com ácido hialurônico em condições fisiológicas (Wu e Delair, 2015). Dessa forma, então foi avaliado o efeitos da adição de ZnCl<sub>2</sub>, quando a reticulação é realizada utilizando o tripolifosfato (TPP). Os valores de tamanho médio e polidispersão das partículas obtidas podem ser observados na Tabela 1.

ZnCl <sub>2</sub> (mM)	Dm (nm)	PDI
0	133,7 ± 0,7	0,2 ± 0,01
1,0	103,5 ± 3,19	0,41 ± 0,11
1,5	87,92 ± 0,45	0,45 ± 0,01
2	73,26 ± 0,50	0,46 ± 0,01

Tabela 1. Diâmetro médio (Dm) e índice de polidispersão (PDI) de nanopartículas obtidas a partir de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> de quitosana e TPP/QT 0,3 com adição de cloreto de zinco

A alta concentração de quitosana permite maior incorporação de fármaco, mas aumenta o tamanho da partícula, o que não é interessante para a liberação intravenosa de fármaco. A adição de ZnCl<sub>2</sub> na formulação leva ao decréscimo de tamanho com o aumento da capacidade de carga. Utilizando 0,25 mg/mL de CS, foram obtidas nanopartículas de 133,7 nm de diâmetro e com ZnCl<sub>2</sub> 2 mM, o tamanho diminuiu para 73,26 nm, enquanto as nanopartículas de 169,8 nm obtidas com 0,5 mg/mL CS diminuíram para 102,5 nm com ZnCl<sub>2</sub>.

Obter partículas menores é muito interessante, uma vez que o aumento da concentração de polímero utilizado resulta em aumento do tamanho da partícula obtida, assim, na presença de ZnCl<sub>2</sub>, foi possível aumentar a concentração de quitosana com a vantagem de aumentar a capacidade carregamento de proteína e ainda ter partículas com tamanho adequado para a aplicação.

Todas as formulações apresentaram alto valor do potencial zeta (faixa de 25 a 30 mV), indicando boa estabilidade físico-química.

Na presença de ZnCl<sub>2</sub>, a capacidade de carregamento da L-asparaginase aumentou de 14 µg de proteína/mg de quitosana para 32 µg de proteína/mg de quitosana. A incorporação de L-asparaginase não alterou significativamente o tamanho das nanopartículas.

Como pode ser observado na Figura 4, a enzima L-asparaginase apresentou maior taxa de hidrólise da asparagina quando no interior das nanopartículas ( -4,45 µcal/s), em comparação com sua forma livre ( -2,74 µcal/s), o que representa uma aumento de 60% na velocidade de catálise. Além disso, a adição de ZnCl<sub>2</sub> não alterou a taxa de hidrólise da asparagina pela L-asparaginase.

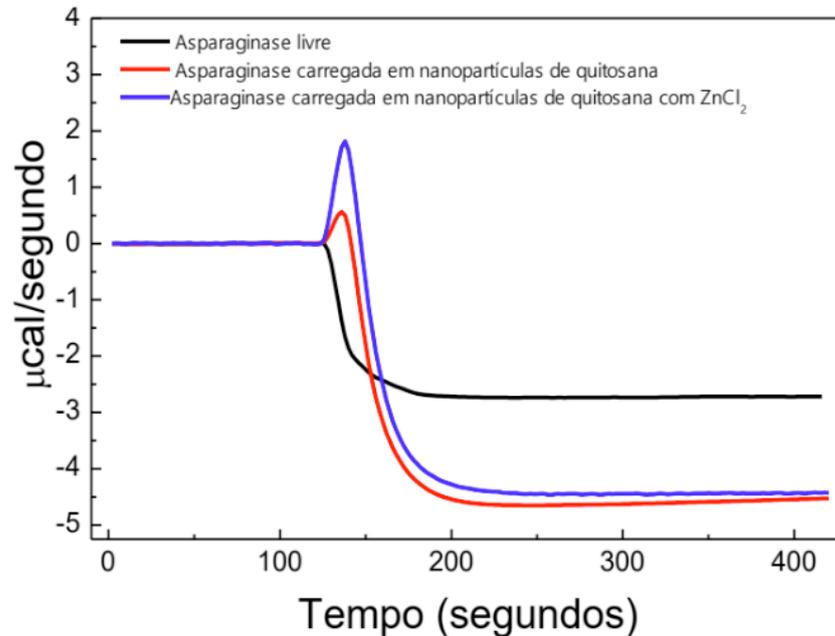


Figura 4. Medida da velocidade de catálise enzimática, em estado estacionário, da enzima L-asparaginase em 37 °C, pH 7,4, na presença de 10 mM de asparagina.

O uso de  $ZnCl_2$  na formulação foi interessante para permitir o uso de alta concentração de quitosana, o que conseqüentemente possibilita aumento da quantidade de proteína que pode ser carregada nas nanopartículas, além da diminuição do tamanho médio dessas partículas.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, F. *et al.* Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. **Current drug discovery technologies**, v. 8, n. 3, p. 157–72, 2011.

BIANCONI, M. L. Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. **Biophysical chemistry**, v. 126, n. 1–3, p. 59–64, mar. 2007.

CHO, E. J. *et al.* Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093–2110, 2013.

FREIRE, E.; MAYORGA, O. L.; STRAUME, M. Isothermal Titration. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 950A–959A, 1990.

GAUMET, M. *et al.* Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.

HILL, J. M. *et al.* L-Asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. **Journal of the American Medical Association**, v. 202, n. 9, p. 882–888, 1967.

KAMALY, N. *et al.* Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.

KUMAR, M. N. . R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

- MOHANRAJ, V.; CHEN, Y.; CHEN, M. &. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research Trop J Pharm Res**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006.
- MORIN, P. E.; FREIRE, E. Direct calorimetric analysis of the enzymatic activity of yeast cytochrome c oxidase. **Biochemistry**, v. 30, p. 8494–8500, 1991.
- NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423–1430, 2010.
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 61, p. 208–221, 2007.
- PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147–166, 2012.
- PECORA, R. Dynamic light scattering measurements of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 123–131, 2000.
- PIERCE, M. M.; RAMAN, C. S.; NALL, B. T. Isothermal Titration Calorimetry of Protein–Protein Interactions. **Methods**, v. 19, n. 2, p. 213–221, 1999.
- PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in Drug Delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 447–451, 2001.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 85, p. 76–85, 1985.
- WHELAN, H. A.; WRISTON, J. C. Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 8, p. 2386–2393, 1969.
- WU, D.; DELAIR, T. Stabilization of chitosan/hyaluronan colloidal polyelectrolyte complexes in physiological conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 149–158, 2015.
- XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.
- YU, M. *et al.* Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 24–37, 2016.
- ZHANG, L. *et al.* Nanoparticles in Medicine: Therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology e Therapeutics**, v. 83, p. 761–769, 2008.

## **SOBRE A ORGANIZADORA**

**Sabrina Passoni Maravieski** - Possui graduação em Licenciatura em Física e Mestrado em Ciências/ Física, ambos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atualmente é doutoranda na área de Ensino de Ciências nas Engenharias e Tecnologias pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. É também professora adjunta do Centro de Ensino Superior de Campos Gerais na cidade de Ponta Grossa. Ministra as disciplinas de: Mecânica dos Fluidos, Fenômenos de Transporte, Mecânica Aplicada, Eletricidade e Magnetismo, Física Atômica e Nuclear, Física da Ressonância Magnética Nuclear, Física das Radiações Ionizantes e Não Ionizantes e Física e Instrumentação Aplicada a Engenharia Biomédica; nos cursos de Engenharia Elétrica, Engenharia Civil, Tecnologia em Radiologia, Pós -Graduação em Segurança do Trabalho e Imagenologia. Já atuou como professora de Ensino Médio em escolas pública e particular ministrando aulas de Física e Robótica.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-189-3

