

Princípios em Farmácia

Yvanna Carla de Souza Salgado
(Organizadora)

 **Atena**
Editora

Ano 2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

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)

P957 Princípios em farmácia [recurso eletrônico] / Organizadora Yvanna Carla de Souza Salgado. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia.

ISBN 978-85-7247-124-4

DOI 10.22533/at.ed.244191402

1. Farmácia. I. Salgado, Yvanna Carla de Souza.

CDD 615

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

Yvanna Carla de Souza Salgado
(Organizadora)

Princípios em Farmácia

Atena Editora
2019

APRESENTAÇÃO

O e-book *Princípios em Farmácia* traz um compilado de artigos de pesquisas realizadas em diferentes regiões. A temática inclui estudos variados relacionados a pesquisa de fármacos, potencial terapêutico, farmacocinética, toxicologia, formas farmacêuticas, entre outras.

O profissional farmacêutico participa das mais variadas funções que vão desde o desenvolvimento de um fármaco até a dispensação ao paciente e o acompanhamento farmacoterapêutico. A área da Farmácia é dinâmica e, como todos os ramos de atuação exigem a aplicação de conhecimentos técnicos; esse constante processo de renovação e produção científica exige a contínua busca pelo conhecimento por parte dos profissionais.

Neste e-book, buscamos ampliar o conhecimento de algumas áreas correlacionadas à farmácia, contribuindo assim para a propagação da pesquisa, atualização farmacêutica e divulgação dos estudos científicos realizados no país.

A obra é fruto do esforço e dedicação das pesquisas dos autores e colaboradores de cada capítulo e da Atena Editora em elaborar este projeto de disseminação de conhecimento e da pesquisa brasileira. Espero que este livro possa somar conhecimentos e permitir uma visão crítica e contextualizada; além de inspirar os leitores a contribuírem com pesquisas para a promoção de saúde e bem estar social.

Yvanna Carla de Souza Salgado

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
A QUÍMICA VERDE NA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO	
Jéssica de Castro Fonseca, Alejandro Pedro Ayala	
DOI 10.22533/at.ed.2441914021	
CAPÍTULO 2	5
ANÁLISES DE RÓTULOS E TEOR DE UMIDADE DE CHÁS MEDICINAIS DE ESPINHEIRA SANTA (<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex Reisseik) COMERCIALIZADOS NO RIO DE JANEIRO	
Priscilla Moriggi da Costa Bárbara Costa Antunes da Rocha	
DOI 10.22533/at.ed.2441914022	
CAPÍTULO 3	20
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO e FARMACOCINÉTICO <i>in silico</i> de ANADANTOFLAVONA	
Vinícius Duarte Pimentel Gabriel Felício Gomes Charllyton Luis Sena da Costa Wellington dos Santos Alves	
DOI 10.22533/at.ed.2441914023	
CAPÍTULO 4	26
DESENVOLVIMENTO <i>IN SILICO</i> E ESTUDO COMPARATIVO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS DE ANÁLOGOS DA MELATONINA.	
Ramires Feitosa de Freitas Vinícius Duarte Pimentel Gabriel Felício Gomes Jackson Henrique Alves Araújo Charllyton Luís Senna da Costa	
DOI 10.22533/at.ed.2441914024	
CAPÍTULO 5	32
EFICÁCIA DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>SYZYGIUM</i> <i>AROMATICUM</i> NO TRATAMENTO DE <i>TINEA PEDIS</i> - ESTUDO DE CASO	
Lelienne Ferreira Alves Pereira Calazans Isabela Lazarini Cantelmo Italo Adelfo Silva Souza	
DOI 10.22533/at.ed.2441914025	
CAPÍTULO 6	41
LEVANTAMENTO DE SUSPEITA DE REAÇÕES ADVERSAS EM CRIANÇAS NO SETOR DE ONCOLOGIA	
Suelen de Oliveira Gonzaga Maria de Lourdes Oshiro	
DOI 10.22533/at.ed.2441914026	

CAPÍTULO 7 51

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DEGRADÁVEIS PARA CARREAMENTO DE PROTEÍNAS: COM FOCO NA ENZIMA L-ASPARAGINASE

Caroline Dutra Lacerda

DOI 10.22533/at.ed.2441914027

CAPÍTULO 8 71

O PAPEL DO FARMACÊUTICO ALÉM DA LOGÍSTICA DE ACESSO AOS MEDICAMENTOS NO COMPONENTE ESPECIALIZADO DA ASSISTÊNCIAS FARMACÊUTICA

Jackson Henrique Alves Araújo

Gabriel Felício Gomes

Vinicius Duarte Pimentel

Ramires Feitosa de Freitas

Salomão Mascarenhas Cavalcante Júnior

Joseana Martins Soares de Rodrigues Leitão

DOI 10.22533/at.ed.2441914028

SOBRE A ORGANIZADORA..... 77

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DEGRADÁVEIS PARA CARREAMENTO DE PROTEÍNAS: COM FOCO NA ENZIMA L-ASPARAGINASE

Caroline Dutra Lacerda

Universidade de São Paulo, Instituto de Química,
São Paulo – SP

RESUMO: Bioativos, como as proteínas, têm sido estudados e empregados na terapia de diversas patologias humanas, muitas vezes, de forma limitada devido à vulnerabilidade desses compostos. A encapsulação em nanopartículas tem sido amplamente estudada, visando liberação controlada, redução da toxicidade e proteção do bioativo. Os biopolímeros quitosana e alginato têm sido muito empregados nessas formulações devido à biocompatibilidade e à baixa toxicidade. Dentre os métodos de obtenção de nanopartículas, a gelificação iônica é interessante por não utilizar solventes orgânicos e altas temperaturas. A enzima L-asparaginase é um bioativo muito importante no tratamento da leucemia linfoblástica aguda em crianças e necessita de alternativas para aumentar sua estabilidade plasmática e diminuir seus efeitos adversos, como indução de reação do sistema imune e produção de anticorpos antiasparaginase.

PALAVRAS-CHAVE: nanopartícula, L-asparaginase, quitosana, alginato.

ABSTRACT: Bioactive compounds, such as proteins, have been studied and employed

in the therapy of various human pathologies, although with limitation due to their structure vulnerability. The encapsulation in nanoparticles has been extensively studied, for controlled release, toxicity reduction, and bioactive protection. Biopolymers such as chitosan and alginate have been widely used in these formulations due to their biocompatibility and low toxicity. Among the methods of nanoparticle assembly, ionic gelation is interesting since it does not use organic solvents and high temperatures. The enzyme L-asparaginase is a very important bioactive to the treatment of acute lymphoblastic leukemia and different alternatives are needed to increase its plasma stability and to decrease its adverse effects, such as induction of immune system reaction and production of antiasparaginase antibodies.

KEY WORDS: nanoparticle, L-asparaginase, chitosan, alginate.

1 | NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA CARREAMENTO DE PROTEÍNAS

Sistemas de liberação de fármacos são estruturas micro ou nanométricas com capacidade de encapsular e promover o direcionamento específico do princípio ativo de maneira que aumente a sua segurança e/ou eficácia, além de promover maior

biodisponibilidade. Para tentar alcançar esses objetivos, de forma a possibilitar um tratamento mais seguro e eficiente, vários sistemas têm sido propostos como, lipossomas, micelas, nanopartículas poliméricas e dendrímeros. (Natarajan *et al.*, 2014)

Os nanocarreadores são planejados com o intuito de liberar determinada dose do princípio ativo em uma velocidade constante e assim diminuir a variação da concentração do mesmo no organismo durante um período específico, com o mínimo de efeitos colaterais. Em geral, o fármaco é incorporado a uma matriz que retém suas moléculas e as libera aos poucos, diminuindo a flutuação do nível plasmático desse ativo (Pundir, Badola e Sharma, 2013). Essa estratégia pode ser utilizada para melhorar a biodisponibilidade e biodistribuição de diferentes tipos de fármacos, sejam eles hidrofóbicos, hidrofílicos, sensíveis à variação de pH, de baixa estabilidade no meio fisiológico, com alta capacidade de ativar o sistema imunológico, desencadeando muitos efeitos adversos, entre outros, podendo ser moléculas pequenas ou grandes como as proteínas.

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 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.

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.

1.1 Nanotecnologia

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)

Diversos sistemas nano-estruturados vêm sendo desenvolvidos para carregamento de fármacos. Dentre eles, os lipossomas têm sido muito utilizados, apesar de apresentar aplicação limitada devido à baixa eficiência de encapsulação e da rápida liberação de moléculas hidrofílicas na presença dos componentes sanguíneos. Nesses casos, as nanopartículas poliméricas apresentam mais vantagens, por possibilitar aumento da estabilidade dos fármacos, como por exemplo, as proteínas, além de ser muito útil para produzir formulações de liberação controlada. (Soppimath *et al.*, 2001)

O tamanho das nanopartículas pode variar entre 10-1000 nm de diâmetro e têm atraído muita a atenção dos pesquisadores na área farmacêutica, com o objetivo de desenvolvimento de sistemas para entrega de princípio ativo, devido à versatilidade e possibilidade de direcionamento para tecidos específicos, acesso a alvos moleculares profundos e controle de liberação do ativo. Dentre os diversos materiais que podem ser utilizados para a produção de nanopartículas, os polímeros têm sido muito explorados devido à sua versatilidade e biocompatibilidade, podendo ser polímeros sintéticos, naturais ou semi-sintéticos, que são empregados a fim de encapsular princípios ativos. (Hans e Lowman, 2002)

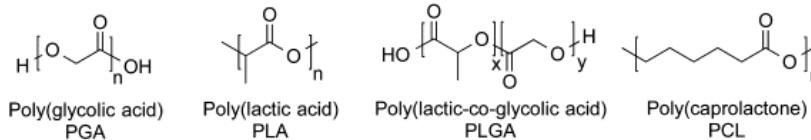
1.2 Nanopartículas poliméricas

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. Na Figura 1, estão representados os monômeros de alguns polímeros com essas características. (Kamaly *et al.*, 2016)

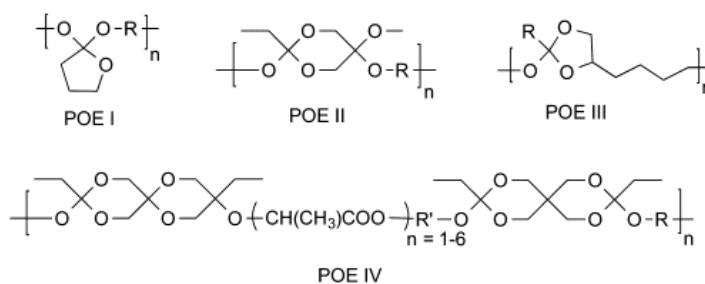
Apesar de o termo biodegradável ser muito utilizado para descrever polímeros que são degradados em meio biológico, sem formação de produtos tóxicos, nem sempre esse termo é aplicado da forma mais adequada, uma vez que em 2012, a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) definiu esse termo como referente à quebra de polímeros *in vivo*, mediada por ação celular. Muitos dos polímeros degradáveis utilizados são comumente referidos como biodegradáveis, embora o mecanismo

de degradação não seja biológico sendo, na maioria dos casos, impulsionada pela hidrólise. Sendo assim, a maioria dos polímeros utilizados na entrega de fármacos são degradáveis e não biodegradáveis uma vez que sua degradação *in vivo* é resultante unicamente da hidrólise pela água presente em tecidos e órgãos, e não por uma ação biológica em si. (Vert *et al.*, 2012)

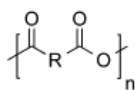
Poly(esters):



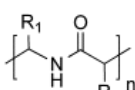
Poly(ortho esters) (POE):



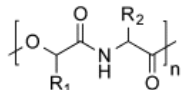
Poly(anhydrides):



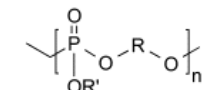
Poly(amides):



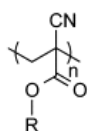
Poly(ester amides):



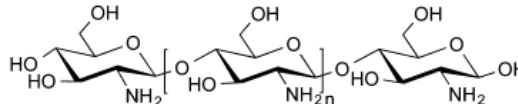
Poly(phosphoesters):



Poly(alkyl cyanoacrylates) (PACA):



Chitosan:



Hyaluronic acid (HA):

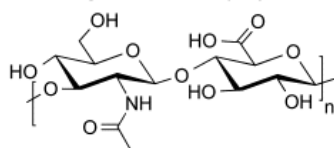


Figura 1. Polímeros para produção de sistemas de entrega de fármacos. Exemplos de polímeros degradáveis e biodegradáveis comumente utilizados. (Kamaly *et al.*, 2016)

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 β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. 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)

A citotoxicidade da quitosana foi avaliada em cultura de células A549. A IC_{50} , concentração na qual 50% do crescimento celular é inibido, não apresentou diferença significativa para a quitosana livre e na forma de nanopartículas. Variação de peso molecular entre 10 e 213 kDa também não altera a IC_{50} , com valor médio entre 1,1 e 1,2 mg.mL^{-1} . Entretanto, com a diminuição do grau de desacetilação, o valor de IC_{50} aumenta: quando diminui de 88 para 61%, o valor de IC_{50} aumenta de 1,2 para 2,0 mg.mL^{-1} , e com uma diminuição para 46%, a IC_{50} aumenta para 2,2 mg.mL^{-1} . (Huang, Khor e Lim, 2004)

Outro estudo também verificou a baixa citotoxicidade da quitosana em células CCRF-CEM e L132, sendo observado $\text{IC}_{50} > 1 \text{ mg.mL}^{-1}$. Nesse mesmo trabalho, foi constatada a baixa ação hemolítica, com menos de 15% de lise detectada após 5 horas de incubação. Além disso, após injeção intravenosa em ratos, foi observado que a quitosana pode ser administrada por essa via sem acúmulo significativo no fígado, além de uma rápida depuração sanguínea. O complexo de quitosana-DNA resultou ainda em diminuição significativa na degradação enzimática do DNA por DNase II, com degradação de aproximadamente 80% menor em 60 minutos. (Richardson, Kolbe e Duncan, 1999)

Outros biopolímeros também estão sendo muito utilizados nas ciências biomédicas, como, por exemplo, o alginato, que tem propriedades adequadas para produção de formulações para carregamento de fármacos, incluindo biocompatibilidade e facilidade

de gelificação. Os hidrogéis de alginato têm sido muito aplicados na cicatrização de feridas e engenharia de tecidos. Este biopolímero também é um excelente candidato à administração de drogas protéicas, já que as proteínas incorporadas em formulações à base de alginato podem estar menos susceptíveis à desnaturação e a matriz do hidrogel pode protegê-las da degradação até sua liberação. Diversas estratégias estão sendo investigadas para tal aplicação, porém, em geral, a taxa de liberação de proteínas do hidrogel de alginato é rápida, devido à sua natureza hidrofílica e porosidade inerente (Lee e Mooney, 2012). Assim, para utilização deste polímero em formulações de liberação lenta, é preciso avaliar modificações de síntese para aumentar o tempo de retenção do fármaco, como a utilização conjunta de outro polímero com característica de formar matriz menos porosa do que o alginato e, com isso, diminuir a velocidade de difusão das moléculas do fármaco.

Para a obtenção de nanopartículas poliméricas, dois métodos principais são aplicados: a dispersão de polímeros pré-formados ou a polimerização de monômeros. A dispersão de polímeros pode ser realizada por diferentes técnicas, como a evaporação de solvente, a emulsificação, a diferença de força iônica (*salting out*), o fluido supercrítico, a gelificação iônica e a coacervação. (Soppimath *et al.*, 2001)

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). A Figura 2 ilustra a formação de nanopartículas de quitosana utilizando TPP por gelificação iônica.

A formação de nanopartículas por gelificação iônica vêm sendo cuidadosamente estudada para que possa se obter partículas com tamanho nanométrico, com estreita distribuição de tamanho e forma esférica, que são características ideais para aplicações biomédicas (Bugnicourt e Ladavière, 2016). Variação nas características da quitosana, como peso molecular e grau de desacetilação, bem como a razão quitosana/TPP, permitem produzir partículas com diferentes propriedades, ou seja, diferentes tamanhos, valores de potencial zeta e polidispersão e estabilidade, além de, influenciar também na eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento de fármaco (Gan *et al.*, 2005; Xu e Du, 2003).

Nanopartículas de quitosana foram produzidas pelo método de gelificação iônica, contendo pravastatina, para serem utilizadas no tratamento de câncer de fígado. Foram obtidas partículas esféricas com tamanho médio entre $129,8 \pm 10,5$ e $270,4 \pm 23,3$ nm, com índice de polidispersão entre $0,238 \pm 0,03$ e $0,452 \pm 0,05$ e potencial zeta entre $25,1 \pm 2,6$ e $33,5 \pm 2,7$ mV. A eficiência de incorporação da pravastatina variou entre 49,05 e 72,04%. Foi observado, *in vitro*, rápida liberação inicial até 6 horas, seguida por uma liberação lenta variando de 52 a 92% após 48 horas, bem

como a maior eficiência da paravastatina incorporada na nanopartícula na inibição do crescimento das células HepG2, comparado com a forma livre, indicando que essa é uma formulação promissora para esse tipo de terapia. (Badran *et al.*, 2016)

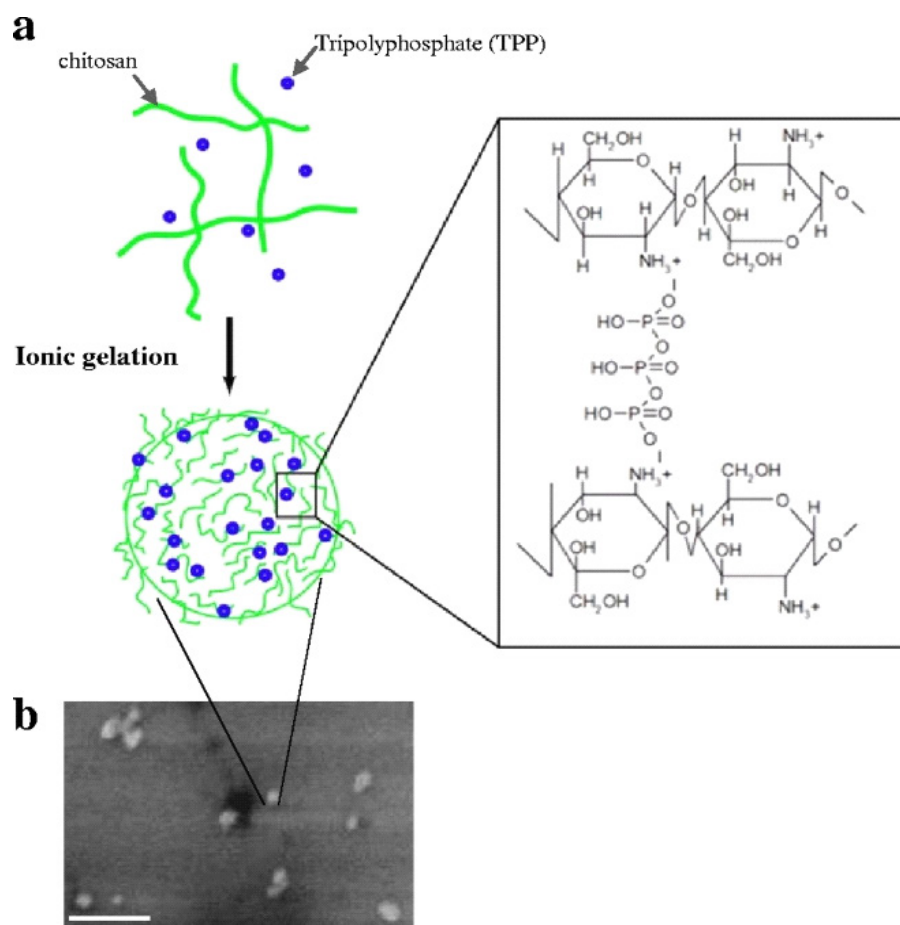


Figura 2. **Formação do complexo quitosana-TPP por gelificação iônica.** (a) Ilustração esquemática do complexo quitosana-TPP e (b) imagem de microscopia eletrônica de varredura, barra de escala 200 nm. (Paz *et al.*, 2011)

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)

A quitosana já foi utilizada para produção de nanopartículas para incorporação da insulina (diâmetro médio = 312,80 nm, índice de polidispersão = 0,481 e potencial

zeta = 23 mV), uma proteína utilizada no tratamento de diabetes. Estas nanopartículas apresentaram eficiência de encapsulação de 70%. Os resultados das caracterizações por espectroscopia no infravermelho (FTIR), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) corroboraram os dados sugerindo que a insulina foi encapsulada com sucesso. No entanto, a incorporação da proteína parece estar relacionada não apenas a interações eletrostáticas, mas também a processos físicos e/ou fenômenos de adsorção. (Azevedo *et al.*, 2011)

Características intrínsecas da proteína como peso molecular e ponto isoelétrico influenciam na eficiência de encapsulação e no perfil de liberação das nanopartículas de quitosana, como, por exemplo, proteínas com ponto isoelétrico menor do que o pH do meio são atraídas pelas cargas positivas da quitosana proporcionando maior eficiência de encapsulação. (Jarudilokkul, Tongthammachat e Boonamnuayvittaya, 2011)

O pH do meio influencia não só na eficiência de encapsulação, devido ao estado de ionização da proteína a ser incorporada, como também nas características das nanopartículas formadas. Em pH mais ácido é possível obter partículas menores; utilizando a solução do reticulante TPP em pH 5,5 são obtidas partículas mais compactas, enquanto que em pH 9,5 são obtidas partículas maiores. Entretanto, para a incorporação da proteína albumina bovina, em pH 9,5 apresentou maior eficiência de encapsulação e perfil de liberação mais lento (Mattu, Li e Ciardelli, 2013). Assim, para produzir uma formulação é preciso considerar as características do polímero utilizado e da molécula a ser incorporada, além das condições de síntese.

1.3 Caracterização de nanopartículas

Várias técnicas são empregadas para caracterizar um novo sistema contendo nanopartículas e tentar prever sua eficácia clínica. As principais características avaliadas são: o tamanho médio, a carga superficial, a capacidade de carregamento e a cinética de liberação do princípio ativo, a estabilidade física e química da formulação ao longo do tempo, bem como a citotoxicidade e atividade biológica.

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. Porém, devido à dificuldade de determinar diretamente a carga superficial de partículas pequenas em meio líquido, a prática mais comum é determinar o potencial elétrico em um ponto distante da superfície da partícula, a camada difusa. Esta localização está relacionada ao movimento das partículas em meio líquido, sendo chamada de plano de cisalhamento, sendo nele medido o potencial zeta. Esse potencial é comumente determinado por meio da avaliação da mobilidade eletroforética das partículas suspensas, medindo assim o potencial no limite da camada externa. 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 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)

Duas maneiras muito utilizadas para estudar a liberação do princípio ativo das nanopartículas é a amostragem e separação ou a difusão por membrana de diálise. Na técnica por amostragem e separação, o fármaco liberado é separado das nanopartículas por filtração, centrifugação ou filtração centrífuga e então quantificado, a suspensão de nanopartículas é complementada com o mesmo volume de meio de liberação retirado e incubado até a próxima amostragem. A difusão por membrana de diálise depende da difusão contínua através da membrana. As vantagens deste método são que as nanopartículas não estão sujeitas a processos de separação invasivos e a amostragem é rápida e simples, mas, por outro lado, a membrana pode atenuar a liberação do fármaco atuando como uma barreira de difusão ou uma superfície adsorvente. (Cho *et al.*, 2013; Mohanraj, Chen e Chen, 2006)

1.4 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

O câncer é uma patologia dos genes associada à disfunção do ciclo celular. Enquanto as células humanas saudáveis apresentam rigorosos mecanismos de controle sobre ciclo celular, nas células cancerosas estes são menos efetivos ou mesmo ausentes. Uma vez que ocorre uma mutação genética em uma célula normal, esta deixa de responder adequadamente aos controles normais de atividade celular passando a se multiplicar de forma descontrolada e agressiva, podendo migrar para tecidos vizinhos, formando focos disseminados, por um processo denominado de metástase. A célula perde sua função original passando a ser chamada de cancerígena, tumoral ou neoplásica. A incidência de neoplasia tem aumentado, bem como mortes em sua decorrência, e os tratamentos convencionais são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia. (Hartwell e Kastan, 1994; You e Jones, 2012)

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) é um tipo de neoplasia maligna que afeta a proliferação e a diferenciação das células linfóides progenitoras na medula óssea, sangue e locais extramedulares. Aproximadamente 80% de todos os casos ocorrem em crianças, mas é mais devastadora quando ocorre em adultos, quando apenas 30-40% alcançam remissão de longo prazo. As principais manifestações clínicas da LLA refletem o acúmulo de células linfóides malignas. A apresentação pode ser inespecífica, com uma combinação de sintomas constitucionais e sinais de insuficiência da medula óssea (anemia, trombocitopenia e leucopenia) e outros sintomas comuns como febre, perda de peso, suores noturnos, hemorragias, fadiga, dispneia e infecção. Quando afeta locais extramedulares, geralmente pode causar linfadenopatia, esplenomegalia ou hepatomegalia. (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017)

O tratamento quimioterápico da LLA consiste em fases de indução, consolidação e manutenção em longo prazo, além de medidas profiláticas de desordens do sistema nervoso central, em intervalos, ao longo da terapia. O objetivo da terapia de indução é conseguir uma remissão completa e restaurar a hematopoiese normal, utilizando, principalmente, os fármacos vincristina, corticosteróides e uma antraciclina. Um dos protocolos da fase de indução, com duração de quatro semanas, consiste no uso de ciclofosfamida no primeiro dia, três dias consecutivos de daunorubicina, vincristina semanal, L-asparaginase quinzenal e três semanas de prednisona. Este protocolo pode ser adaptado dependendo de caso, em especial para pacientes adultos e idosos. Apesar da L-asparaginase compor o protocolo padrão em pediatria, seu uso em adultos é um desafio, devido ao aumento da taxa de eventos adversos. Após a indução, os pacientes elegíveis podem tentar o transplante alogênico de células-tronco, enquanto os não elegíveis continuam na quimioterapia de consolidação e manutenção. A consolidação pode ser realizada por diferentes protocolos, mas geralmente é similar à indução e pode incluir quimioterapia intratecal e radiação craniana para profilaxia de desordens no sistema nervoso central. Já a terapia de manutenção consiste no uso de 6-MP, metotrexato, vincristina e de prednisona, sendo administrada por 2 a 3 anos

após a indução. (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017)

1.5 L-Asparaginase

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 L-asparaginase é uma enzima amplamente distribuída na natureza, de bactérias a mamíferos, e desempenha importante função no metabolismo e utilização de aminoácidos. Além disso, apresenta alto valor terapêutico devido ao seu emprego no tratamento de alguns tipos de câncer. A L-asparaginase de bactéria do tipo I é citosólica, expressa de forma constitutiva e utiliza L-asparagina e L-glutamina como substrato, enquanto a do tipo II está presente no periplasma de bactérias Gram-negativas, sendo sua produção induzida por anaerobiose. Essa também catalisa a hidrólise de L-asparagina, porém, com maior afinidade, além de catalisar a hidrólise da L-glutamina em menor proporção do que as do tipo I. Ambos os tipos de L-asparaginases são encontrados em muitas espécies bacterianas, no entanto, a do tipo II é a que possui atividade antitumoral sendo particularmente efetiva no tratamento da leucemia linfoblástica aguda em crianças (Muller e Boos, 1998), o tipo de câncer mais comum em crianças, responsável por 25% dos casos nessa faixa etária nos Estados Unidos da América (Howlader, Noone e Krapcho, 2013).

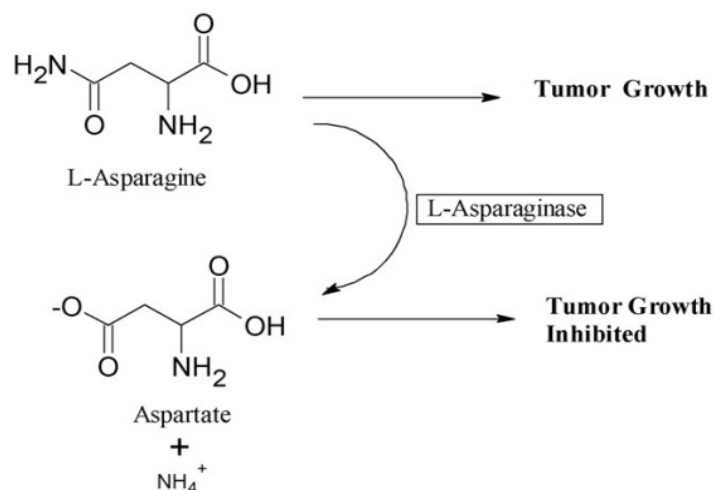


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação da L-asparaginase. Catálise

da clivagem de L-asparagina em aspartato e amônia, matando seletivamente as células neoplásicas deficientes em asparagina sintase (Narta, Kanwar e Azmi, 2007).

L-asparaginases com atividade antitumoral foram isoladas de diversas fontes bacterianas, mas, apenas a L-asparaginase tipo II isolada de *Escherichia coli* e a de *Erwinia chrysanthemi* são utilizadas no tratamento de alguns tipos de câncer e têm sido produzidas em escala industrial (Avramis e Panosyan, 2005; Muller e Boos, 1998).

A estrutura da L-asparaginase do tipo II de *Escherichia coli* foi determinada por cristalografia de raios-X com uma resolução de 2,3 Å. Estruturalmente, essa L-asparaginase é um homotetrâmero composto de subunidades de 34 kDa, denominadas A, B, C e D, com 326 aminoácidos cada. O tetrâmero é descrito como um dímero de dímeros devido às interações entre as subunidades A e C e entre B e D. (Swain *et al.*, 1993)

Entre os aminoácidos com papel catalítico, estão a tirosina 25, a treonina 12, a treonina 89 e a lisina 162, enquanto o aspartato 90, a serina 58, a asparagina 248 e a glutamina 283 são importantes para a ligação do substrato. (Wehner *et al.*, 1992)

Alguns fatores são limitantes para o uso da L-asparaginase como quimioterápico, uma vez que ela apresenta um perfil de toxicidade variado, desde hipersensibilidade aguda à hiperglicemia, disfunção hepatocelular e pancreatite. Os efeitos adversos da L-asparaginase se enquadram em duas categorias principais, os decorrentes da sensibilização imunológica (hipersensibilidade) e os relacionados à inibição da síntese proteica. As distintas preparações de asparaginase apresentam efeitos tóxicos similares, no entanto, a PEG-asparaginase apresenta menos reações alérgicas. Outro fator importante é a necessidade de doses diárias de injeções parenterais, por um período de tempo que pode durar até 21 dias. Além disso, podem ser observados outros efeitos colaterais graves provenientes da atividade glutaminásica da L-asparaginase, que corresponde a aproximadamente 2% da atividade sobre a L-asparagina. A falta de L-glutamina e L-asparagina no cérebro está associada com neurotoxicidade, depressão, letargia, fadiga, sonolência, confusão, irritabilidade, agitação e tontura. (Narta, Kanwar e Azmi, 2007; Ollenschlänger *et al.*, 1988)

As L-asparaginases de *Escherichia coli* e de *Erwinia chrysanthemi* apresentam mecanismos de ação idênticos, contudo, as propriedades farmacocinéticas são distintas, bem como a indução de hipersensibilidade. Assim, na maioria dos casos pacientes alérgicos a uma das preparações são frequentemente imunes à outra. (Billett *et al.*, 1992)

A imunogenicidade de proteínas exógenas, em geral, aumenta com o aumento do peso molecular e da complexidade da estrutura, sendo assim, mais um fator limitante do uso clínico da L-asparaginase, pois ela consiste em um homotetrâmero com cerca 140 kDa e resulta na formação de anticorpos específicos em muitos pacientes. Em decorrência disso, alguns pacientes podem apresentar anafilaxia sistêmica, eritema localizado e dor no local da injeção, além de uma alta taxa de inativação da enzima.

Em alguns casos a L-asparaginase é rapidamente inativada mesmo em pacientes sem sinais clínicos de hipersensibilidade na denominada “inativação silenciosa”. (Killander *et al.*, 1976; Panosyan *et al.*, 2004)

A L-asparaginase de *Erwinia chrysantemi* é menos imunogênica e causa menos problemas de coagulação. Apesar de essa enzima apresentar semelhanças com a L-asparaginase de *Escherichia coli*, tem um tempo de meia vida menor e eficiência clínica inferior. (Duval *et al.*, 2002)

As preparações de L-asparaginase utilizadas na clínica são as provenientes de *Escherichia coli*, na forma nativa ou na forma conjugada com polietilenoglicol (PEG-asparaginase), assim como a proveniente de *Erwinia chrysantemi*, a qual geralmente é utilizada como substituição no caso de os pacientes desenvolverem reações alérgicas à preparação derivada de *Escherichia coli*. (Shrivastava *et al.*, 2016)

Após administração intravenosa da forma PEG-asparaginase, na maioria dos pacientes que apresentam sintomas de alergia a essa forma, os mesmos são observados no início do tratamento, até 2 horas após a administração. Geralmente são de gravidade média e o risco de reações alérgicas subsequentes à enzima proveniente de *Erwinia chrysantemi* é baixo. (Browne *et al.*, 2018; Henriksen *et al.*, 2015)

Novas estratégias têm sido desenvolvidas com a finalidade de reduzir as reações imunogênicas e tóxicas, e ao mesmo tempo, manter a atividade biológica e a estabilidade proteica da L-asparaginase.

Algumas delas, buscando aumentar a eficiência de produção com menos etapas no processo de purificação, estão sendo avaliadas, com foco na obtenção da L-asparaginase de fontes diferentes das já utilizadas na prática clínica (Bhagat, Kaur e Chadha, 2016; Girão *et al.*, 2016). Além disso, é importante obter enzimas sem atividade na degradação do glutamato (Husain *et al.*, 2016; Mahajan *et al.*, 2014; Meena *et al.*, 2016) glutaminase free asparaginase is much needed for upgradation of therapeutic index of asparaginase therapy. In the present study, glutaminase free asparaginase produced from *Enterobacter cloacae* was purified to apparent homogeneity. The purified enzyme was found to be homodimer of approximately 106 kDa with monomeric size of approximately 52 kDa and pI 4.5. Purified enzyme showed optimum activity between pH 7-8 and temperature 35-40°C, which is close to the internal environment of human body. Monovalent cations such as Na⁺ and K⁺ enhanced asparaginase activity whereas divalent and trivalent cations, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, and Fe³⁺ inhibited the enzyme activity. Kinetic parameters Km, Vmax and Kcat of purified enzyme were found to be 1.58×10⁻³ M, 2.22 IU μg⁻¹ and 5.3 × 10⁴ S⁻¹, respectively. Purified enzyme showed prolonged in vitro serum (T1/2 = ~ 39 h, uma vez que essa atividade é responsável por alguns dos efeitos adversos.

Uma das possibilidades avaliadas para aumentar a segurança e eficiência no uso terapêutico da L-asparaginase é a produção de novas formulações farmacêuticas, como as nanopartículas, utilizando as L-asparaginases já empregadas na clínica.

Diversas formulações lipossomais foram estudadas para a encapsulação de

L-asparaginase, usando o sistema de desidratação-reidratação para produção de vesículas (sDRV), com posterior extrusão, para diminuir o tamanho e quantidade bicamadas das vesículas (VET). Com as condições otimizadas para a produção das sDRV, foi possível alcançar eficiência de encapsulamento de 100% com preservação de 99% da atividade específica da enzima encapsulada. Já para as VET, com diâmetro médio entre 85 e 250 nm, a eficiência de encapsulação (40%) e a preservação da atividade específica (74%) foram menores (Cruz *et al.*, 1993). Estudos de farmacocinética mostraram que o encapsulamento em lipossomos grandes (sDRV; diâmetro médio de 1.249 nm) diminuiu o tempo de circulação da enzima, enquanto que o encapsulamento em lipossomas pequenos (VET; diâmetro médio de 158-180 nm) prolongou-o por um fator de até 10 vezes. O encapsulamento em ambas as formas impede a indução de anticorpos anti-asparaginase e diminui a reação anafilática, além de aumentar em 2 vezes a atividade antitumoral em animais portadores de tumores P1534 (células de linfoma), em comparação com a enzima livre. (Gaspar, Perez-Soler e Cruz, 1996)

Foi produzida uma L-asparaginase modificada, conjugada com o lipídio palmitoil (palmitoil-L-ASNase), para que ela pudesse ser incorporada nos lipossomas. Em comparação com a palmitoil-L-ASNase livre (solubilizada em Tween-80, 0,5%), o encapsulamento lipossomal resultou em prolongamento do tempo de meia-vida no sangue (de 2,88 h para mais de 23,7 h), diminuição da toxicidade aguda e preservação da atividade antitumoral *in vivo*. (Jorge *et al.*, 1994)

Já foi relatada a incorporação de L-asparaginase em nanopartículas de ácido poli glicólico (PLG) produzidas utilizando a técnica de evaporação de solvente, partindo de uma emulsão do polímero e proteína em acetato de etila, obtida após sonicação. Nas condições avaliadas neste trabalho, obtiveram eficiência de encapsulação entre 15 e 40% e nanopartículas com tamanho médio de aproximadamente 200 nm. Apesar de ter sido observada atividade enzimática após o processo de produção das nanopartículas, não foi comparada a atividade da enzima antes da formulação (Gaspar *et al.*, 1998). É possível que tenha ocorrido perda, uma vez que a enzima foi exposta a condições que normalmente alteram conformação proteica (solvente orgânico, sonicação e exposição prolongada à alta temperatura). Além disso, mesmo após a evaporação, pode restar solvente residual na formulação, o qual pode ser tóxico.

Uma emulsão de solução aquosa de L-asparaginase e do polímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) em diclorometano foi desidratada por evaporação de solvente, para produção de nanocápsulas. Foi obtida uma eficiência de encapsulação de 28% e ocorreu um grande aumento na atividade enzimática, de 0,074 para 0,429 U/mg de nanocápsula. Não foram observados efeitos adversos e sintomas de anafilaxia após a injeção das nanocápsulas (na veia da cauda) em camundongos. (Baran, Özer e Hasirci, 2002)

Nanopartículas magnéticas de ferro foram revestidas, pela técnica camada por camada, com hidrogel polimérico (quitosana e ácido hialurônico) contendo L-asparaginase na solução. As nanopartículas magnéticas têm diâmetro médio de

25 nm, mas, depois do revestimento, dependendo da concentração de polímeros, o diâmetro médio variou entre 320 e 677 nm. Em teste de biocompatibilidade *in vitro*, em cultura de células Vero normais, com diferentes concentrações de nanopartículas (entre 2 e 12 ng/célula), não foi observada toxicidade. (Teodor *et al.*, 2009)

A L-asparaginase foi incorporada em eritrócitos intactos. Primeiramente, por meio de um processo complexo, a enzima foi conjugada com a protamina de baixo peso molecular, a qual tem capacidade de translocação de membrana. Posteriormente, os conjugados foram isolados da proteína livre por cromatografia de troca iônica, usando uma coluna de afinidade com heparina, apresentando 60% de atividade catalítica em comparação com a enzima original. Após incubação do conjugado com eritrócitos, foi detectada uma eficiência de encapsulação de 4%. Os autores sugerem o desenvolvimento de um dispositivo de autotransusão de sangue do tipo plasmaferese para permitir que as hemácias sejam separadas do sangue retirado de um paciente, processadas com o conjugado em um biorreator para encapsula-lo nas células e, então, finalmente, devolvê-las ao paciente, para que esse método possa ser aplicado de forma segura na clínica. (Kwon *et al.*, 2009)

Nanopartículas de 340 nm foram produzidas utilizando quitosana de baixo peso molecular, pela técnica de gelificação iônica para incorporação da L-asparaginase. Neste trabalho não foi avaliada a atividade em cultura de células ou *in vivo*. (Bahreini *et al.*, 2014)

Nanocápsulas de albumina sérica bovina (BSA) produzidas por ultrasonicação, sem e com polaxamer 407, foram utilizadas para encapsular a L-asparaginase e apresentaram alto índice de polidispersão, de 0,52 e 0,31, respectivamente, com tamanho médio de aproximadamente 200 nm. Houve um aumento na atividade catalítica da L-asparaginase após a imobilização para ambas as cápsulas testadas, sendo que para as contendo somente BSA-asparaginase o aumento foi de 29,73% em relação à asparaginase livre, e com a presença do polaxamer 407, o aumento foi menor. Estas nanocápsulas contendo L-asparaginase não causaram efeito citotóxico significativo na linhagem de macrófagos leucêmicos de camundongos RAW 264.7, as quais são positivas para a expressão de asparagina sintase. (Tinoco *et al.*, 2016)

A encapsulação de L-asparaginase em nanovesículas de quitosana modificada e lipídios levou ao aumento da atividade enzimática e ao aumento da estabilidade com variação de temperatura e pH, além de diminuir a taxa de proteólise. Além disso, após o encapsulamento, a enzima exibiu maior atividade anti-câncer de pulmão do que a enzima livre. Para obtenção dessa formulação, primeiramente, as nanovesículas lipídicas com L-asparaginase foram preparadas pelo método de evaporação de fase reversa modificada. Os lipídios foram previamente dissolvidos em clorofórmio e após a remoção do clorofórmio por evaporação rotativa, os filmes lipídicos foram obtidos e redissolvidos em éter dietílico. Em seguida, a L-asparaginase dissolvida em tampão Tris-HCl pH 7,3 foi adicionada. A mistura foi sonicada e, em seguida, o éter dietílico foi removido por um evaporador rotativo sob pressão reduzida para formar uma suspensão

aquosa (nanovesículas lipídicas-asparaginase). Posteriormente, estas nanovesículas foram revestidas com quitosana pelo método de deposição eletrostática. A taxa de inibição de crescimento de células de câncer de pulmão (H446) tratadas com 20 UI de asparaginase encapsulada (80%) foi maior do que quando tratadas com asparaginase livre (60%). (Wan *et al.*, 2016)

Embora a maioria dos estudos com L-asparaginase tenha foco no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, esta enzima também é muito útil na indústria de alimentos, no pré tratamento de alimentos ricos em amido (batata frita, batatas chips, pão, entre outros). Durante o aquecimento, a L-asparagina presente em alimentos ricos amido pode reagir com açúcares redutores e formar a acrilamida, por meio da reação de Maillard. A asparaginase é utilizada com o objetivo de diminuir a formação de acrilamida, um composto suspeito de ser carcinogênico em produtos alimentícios processados a quente. Dessa forma, a degradação da L-asparagina, devido à adição de L-asparaginase, decorre em menor formação de acrilamida. Contudo, essa aplicação é limitada, já que a enzima é irre recuperável após um único uso, além de ser altamente instável. Por isso, foi avaliada a sua imobilização covalente em pastilhas de óxido de alumínio, para superar esse problema e tornar a enzima reutilizável, estável e economicamente viável. O máximo rendimento de imobilização foi de 85%. A enzima livre e imobilizada apresentaram atividade ótima em 37 °C e pH 7,5. No entanto, o bioconjugado exibiu maior atividade e estabilidade em diferentes valores de pH e temperaturas. Apresentou maior afinidade (diminuiu o K_m) e foi mais estável na presença de alguns solventes (acetato de etila, acetona, acetonitrila), íons metálicos (Ag^+ e Zn^{2+}) e β -mercaptoetanol. O bioconjugado foi reutilizado em um reator de coluna de vidro para hidrólise de L-asparagina até nove ciclos sucessivos sem qualquer perda de atividade, além de ter sido eficaz na redução do nível de L-asparagina em batata chips, indicando, o seu potencial uso na atenuação da formação de acrilamida em alimentos ricos em amido. Esta preparação com boa relação custo-benefício tem prazo de validade de mais de 30 dias e pode ser efetivamente usada em indústrias alimentícias à base de amido. (Agrawal *et al.*, 2018)

Vários sistemas nanoestruturados já foram avaliados para incorporar a L-asparaginase, alguns deles foram úteis para manter a atividade enzimática, diminuir a ocorrência de efeitos adversos e a degradação proteolítica. Porém, muito ainda têm que ser estudado, quanto à melhor metodologia e qual os melhores excipientes para utilizar na produção de uma formulação que conserve a estrutura e atividade da enzima, mas que, principalmente, possa ser administrada de forma segura aos pacientes. Além disso, é interessante que seja um método de fácil escalonamento para produção industrial e menor produção de resíduos químicos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S. *et al.* Catalytic characteristics and application of L-asparaginase immobilized on aluminum oxide pellets. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 504–511, 2018.
- ANDRADE, F. *et al.* Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. **Current drug discovery technologies**, v. 8, n. 3, p. 157–72, 2011.
- AVRAMIS, V. I.; PANOSYAN, E. H. Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Relationships of Asparaginase Formulations The Past , the Present and Recommendations for the Future. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 4, p. 367–393, 2005.
- AZEVEDO, J. R. *et al.* Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 3, p. 685–689, 2011.
- BADRAN, M. M. *et al.* Pravastatin-loaded chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and cytotoxicity studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 1–9, 2016.
- BAHREINI, E. *et al.* Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 9, n. 1, p. 340, 2014.
- BARAN, E. T.; ÖZER, N.; HASIRCI, V. In vivo half life of nanoencapsulated L-asparaginase. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1113–1121, 2002.
- BHAGAT, J.; KAUR, A.; CHADHA, B. S. Single step purification of asparaginase from endophytic bacteria *Pseudomonas oryzae* exhibiting high potential to reduce acrylamide in processed potato chips. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 222–230, 2016.
- BILLET, A. L. *et al.* Allergic reactions to Erwinia asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to Escherichia coli asparaginase. **Cancer**, v. 70, n. 1, p. 201–206, 1992.
- BROWNE, E. K. *et al.* Clinical characteristics of intravenous PEG-Asparaginase hypersensitivity reactions in patients undergoing treatment for acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v. 35, n. 2, p. 103–109, 2018.
- BUGNICOURT, L.; LADAVIÈRE, C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 1–17, 2016.
- 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.
- CRUZ, M. E. M. *et al.* Liposomal L-asparaginase: in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 96, n. 1–3, p. 67–77, 1993.
- 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. **Clinical Observations, Interventions , and Therapeutic Trials**, v. 99, n. 8, p. 2734–2740, 2002.
- GAN, Q. *et al.* Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2–3, p. 65–73, 2005.

GASPAR, M. M. *et al.* Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. **Journal of Controlled Release**, v. 52, n. 1–2, p. 53–62, 1998.

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

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.

GIRÃO, L. F. D. C. *et al.* Saccharomyces cerevisiae asparaginase II, a potential antileukemic drug: Purification and characterization of the enzyme expressed in Pichia pastoris. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 118–125, 2016.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319–327, 2002.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 266, n. 5192, p. 1821–8, 1994.

HENRIKSEN, L. T. *et al.* PEG-Asparaginase allergy in children with acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL2008 protocol. **Pediatre Blood Cancer**, v. 62, p. 427–433, 2015.

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.

HOWLADER, N.; NOONE, A.; KRAPCHO, M. SEER cancer statistics review. **Bethesda, MD: National Cancer Institute**, 2013.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 344–353, 2004.

HUSAIN, I. *et al.* Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from enterobacter cloacae: In-vitro evaluation of cytotoxic potential against human myeloid leukemia HL-60 cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–27, 2016.

JARUDILOKKUL, S.; TONGTHAMMACHAT, A.; BOONAMNUAYVITTAYA, V. Preparation of chitosan nanoparticles for encapsulation and release of protein. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 5, p. 1247–1251, 2011.

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, 1994.

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.

KILLANDER, D. *et al.* Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. **Cancer**, p. 220–228, 1976.

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

KWON, Y. M. *et al.* L-Asparaginase encapsulated intact erythrocytes for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Journal of Controlled Release**, v. 139, n. 3, p. 182–189, 2009.

- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.
- MAHAJAN, R. V. *et al.* Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from bacillus licheniformis: In vitro evaluation of anti-cancerous properties. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.
- MATTU, C.; LI, R.; CIARDELLI, G. Chitosan nanoparticles as therapeutic protein nanocarriers: the effect of pH on particle formation and encapsulation efficiency. **Polymers and Polymer Composites**, v. 34, p. 1–8, 2013.
- MEENA, B. *et al.* Molecular expression of L-asparaginase gene from Nocardiosis alba NIOT-VKMA08 in Escherichia coli: A prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. **Gene**, v. 590, n. 2, p. 220–226, 2016.
- 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.
- MULLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, p. 97–113, 1998.
- 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.
- NATARAJAN, J. V *et al.* Sustained-release from nanocarriers: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 122–138, 2014.
- OLLENSCHLÄNGER, G. *et al.* Asparaginase - induced derangements of basis for some drug-related side-effects. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 18, p. 512–516, 1988.
- PANOSYAN, E. H. *et al.* Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 26, n. 4, p. 217–226, 2004.
- 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.
- PAZ, L. E. C. DE *et al.* Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on Streptococcus mutans biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3892–3895, 2011.
- PECORA, R. Dynamic light scattering measurements of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 123–131, 2000.
- PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in Drug Delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 447–451, 2001.
- PUNDIR, S.; BADOLA, A.; SHARMA, D. Sustained release matrix technology and recent advance in matrix drug delivery system: a review. **International Journal of Drug Research and Technology**, v. 3, n. 1, p. 12–20, 2013.
- RICHARDSON, S. C. W.; KOLBE, H. V. J.; DUNCAN, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system : biocompatibility , body distribution and ability to complex and protect DNA.

International Journal of Pharmaceutics, v. 178, p. 231–243, 1999.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

SHRIVASTAVA, A. *et al.* Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1–10, 2016.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SWAIN, A L. *et al.* Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 4, p. 1474–1478, 1993.

TEODOR, E. *et al.* Hydrogel-magnetic nanoparticles with immobilized l-asparaginase for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1307–1314, 2009.

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

TINOCO, A. *et al.* Albumin/asparaginase capsules prepared by ultrasound to retain ammonia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–10, 2016.

VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.

WAN, S. *et al.* Chitosan-modified lipid nanovesicles for efficient systemic delivery of L-asparaginase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 278–284, 2016.

WEHNER, A. *et al.* Site-specific mutagenesis of Escherichia coli asparaginase II. **European Journal of Biochemistry**, v. 480, n. 3992, p. 475–480, 1992.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 215–226, 2003.

YOU, J.; JONES, P. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? **Cancer cell**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2012.

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.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-124-4

