



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

CAMILA DE OLIVEIRA MELO

**ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
PARA VEICULAÇÃO DA L-ASPARAGINASE**

CAMPINA GRANDE – PB

2016

CAMILA DE OLIVEIRA MELO

**ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
PARA VEICULAÇÃO DA L-ASPARAGINASE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de farmácia com formação generalista da Universidade Estadual da Paraíba em exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. JOSE ALEXSANDRO DA SILVA

CAMPINA GRANDE – PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

M528e Melo, Camila de Oliveira.
Estudo de pré-formulação de nanopartículas poliméricas para veiculação de L-Asparaginase [manuscrito] / Camila de Oliveira Melo. - 2016.
46 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.
"Orientação: Prof. Dr. Jose Alexsandro da Silva, Departamento de Farmácia".

1. Nanopartículas poliméricas. 2. PLGA. 3. L-Asparaginase. I. Título.

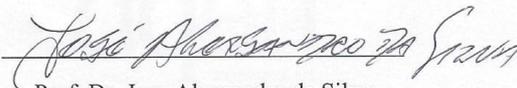
21. ed. CDD 615

CAMILA DE OLIVEIRA MELO

**ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS
PARA VEICULAÇÃO DA L-ASPARAGINASE**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao curso de graduação de farmácia com formação generalista da Universidade Estadual da Paraíba em exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em : 05/04/2016



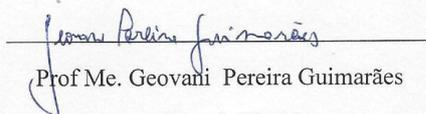
Prof. Dr. Jose Aleksandro da Silva

Orientador



Prof Me. Leonardo Ferreira Soares

Examinador



Prof Me. Geovani Pereira Guimarães

Examinador

“Aos meus pais Mônica Sueli de Melo e José Soares de Melo, por todo o esforço e dedicação para que eu chegasse aqui. Além de pais foram amigos e fiéis companheiros, mesmo quando nossos ideais pareciam distantes e inatingíveis. Essa conquista é nossa, amo vocês.”

AGRADECIMENTOS

*Á deus em primeiro lugar, por todas as bênçãos, pela força e por todas as graças alcançadas
“Tudo posso naquele que me fortalece”.*

Aos meus pais, Jose e Mônica por acreditarem que eu conseguiria chegar até aqui, me deram o que podia e até mesmo o que não podia e pelos valores que me foram passados. Essa conquista é de vocês...

As minhas irmãs, Jaiza Melo e Vivian Suene, por todo o apoio e carinho e paciência, mesmo com minha constante ausência vocês se mostraram sempre presente, vocês são uma parte de mim.

A Mauricio Santos, por toda paciência, carinho e incentivo, pelos momentos difíceis que estive ao meu lado, foi meu companheiro, amigo confiante e por nunca ter deixado de acreditar em mim, meu eterno obrigado.

Aos meus amigos de faculdade, Vanessa Nascimento, Vandiarra Martins, Hervesson Pereira e Moises Guilhermino que eu tenho certeza que a nossa amizade vai além da graduação.

A Alexandra Apolinário, não só por este trabalho, mas por todos os outros que pude ter a honra de desenvolver junto a ela, meu exemplo de pesquisadora e de pessoa.

A Ana Emanuelle Medeiros, que com toda sua paciência e suavidade me ajudou nos momentos mais difíceis, não teria concluído sem a sua bondade e empenho, o meu muito obrigado.

Ao meu orientador Jose Alexandro, por quatros anos de trabalho em iniciação científica e todos os frutos colhidos desses anos trabalhos, o meu muito obrigado.

Ao professor Bolívar Damasceno, por todos os ensinamentos, brincadeiras e “puxões de orelha” também, guardarei todos com carinho e admiração.

As minha amiga de iniciação científica, Salete Rodrigues, por todo o companheirismo e amizade, sei que você vai longe e vou ficar torcendo para vê-la conquistando todas suas metas.

Aos meus eternos amigos do LDCPF, Natan, Yuri, Malu, Bruna, João Paulo, Jamilly, Juliana, Geovani e todos os outros que compõem essa equipe, levarei para sempre no meu coração.

A USP, em especial ao professor Adalberto, pela oportunidade de ir duas vezes desenvolver essa e outras pesquisas em seu laboratório, o meu eterno obrigado.

E a todos que indiretamente me ajudaram a chegar ate aqui, o meu muito obrigado.

De alguma forma, eu não posso acreditar que existam alturas que não podem ser escaladas por um homem que conhece os segredos de fazer sonhos se tornarem realidade. Este segredo especial parece-me, pode ser resumido em quatro “c”s. Eles são curiosidade, confiança, coragem e constância, e o maior de todos é a confiança. Quando você acredita em uma coisa, acredita nela por todo o caminho, implícita e inquestionavelmente.

(Walt Disney)

RESUMO

Um dos principais interesses da indústria farmacêutica nos dias atuais consiste no desenvolvimento de agentes terapêuticos seletivos para alvos específicos do organismo, ocasionando assim, uma potencialização dos efeitos terapêuticos e diminuição dos efeitos adversos sistêmicos. Para alcançar essa entrega dirigida de drogas a nanotecnologia pode ser empregada por permitir o desenvolvimento de sistemas carreadores de biomoléculas, como as nanopartículas poliméricas, estes são sistemas que apresentam partículas na escala nanométrica, o que favorece a melhoria da biodisponibilidade e o carreamento de ativos hidrofílicos e hidrofóbicos. Nanopartículas de poli (ácido-co-glicólico) PLGA apresentam como principal vantagem sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. A enzima L-Asparaginase (L-Asp) é amplamente usada no tratamento do câncer, com ênfase no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA), esta enzima é oriunda principalmente do citoplasma de cepas de *Escherichia coli*, apresenta como desvantagem o reduzido tempo de meia vida e sua fácil captação pelo sistema fagocitário, tal problema pode ser melhorado com sua encapsulação o qual protege a enzima do ataque proteolítico e do sistema imunológico. Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo realizar um estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA pelo método da dupla emulsificação e evaporação do solvente para veiculação da L-Asparaginase. A enzima foi analisada em eletroforese SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) para verificação da pureza e avaliação de agregação em soluções de glicerol. O estudo de pré-formulação nos permitiu escolher o sistema com menor massa molar do polímero por apresentar um tamanho ideal para veiculação intravenosa. A enzima purificada sem a presença de agregados apresentou-se apta para encapsulação. Desta forma, podemos concluir que o estudo permitiu o desenvolvimento e escolha do melhor sistema para a encapsulação da enzima e posterior administração intravenosa.

Palavras-chaves: Nanopartículas, PLGA, L-Asparaginase

ABSTRACT

One of the main interests of the pharmaceutical industry nowadays is the development of selective therapeutic agents to specific targets in the body, thus causing a potentiation of therapeutic effects and decrease in systemic adverse effects. To achieve this targeted delivery of drugs nanotechnology can be employed to allow the development of carriers for biomolecules systems such as polymeric nanoparticles, which are systems with particles in the nanometer range, which facilitates improving the bioavailability and the entrainment of hydrophilic active and hydrophobic. PLGA nanoparticles have as main advantage their biodegradability and biocompatibility. L-asparaginase enzyme (L-Asp) is widely used in cancer treatment, with emphasis on the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), arising mainly from the cytoplasm of *Escherichia coli*, the enzyme has the disadvantage reduced half time life and easy uptake by the phagocytic system, such a problem can be improved with their encapsulation which protects the enzyme from proteolytic attack and the immune system. Therefore, this study aimed to develop a pre-formulation study for the development of nanoparticles of PLGA by the method of double emulsification and solvent evaporation to serve the L-asparaginase. The enzyme was analyzed on SDS-PAGE to check purity and evaluation of aggregation in glycerol solutions. The pre-formulation study allowed us to choose the system with lower molecular weight of the polymer to present an ideal size for intravenous placement. The purified enzyme without the presence of aggregates is presented suitable for encapsulation. Thus, we can conclude that the study allowed the development and choosing the best system for encapsulating the enzyme and subsequent intravenous administration.

Keywords: Nanoparticles, PLGA, L-asparaginase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hidrolise de PLGA em ácido láctico e ácido glicólico.....	17
Figura 2: Representação de nanocápsulas e nanoesferas.....	18
Figura 3: Reação catalisada pela L-Asparaginase.....	20
Figura 4: Eletroforese SDS-PAGE da L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 5: Espalhamento de luz para enzima em água (a) e em solução de glicerol 5% (v/v) (b).....	30
Figura 6: Espalhamento de luz para enzima em solução de glicerol 20% (v/v)(a) e enzima em solução de glicerol 40% (v/v)(b).....	31
Figura 7: Suspensão de nanopartículas de PLGA 50:50 (30,000-60,000) (a) e PLGA 50:50 (24,000-38) (b).....	32
Figura 8: Análise de espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) 1:10	33
Figura 9: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) 1:100.....	33
Figura 10: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) 1:1000.....	34
Figura 11: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) liofilizada.....	35
Figura 12: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) filtrada.....	36
Figura 13: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (24,000-38,000) 1:10	36
Figura 14: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (24,000-38,000) 1:100.....	37
Figura 15: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (24,000-38,000) 1:100.....	37
Figura 16: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (24,000-38,000) filtrada.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A/O- água-em-óleo

FDA- *Food and Drugs Administration*

L-ASpase- L-Asparaginase

L-Asp- L-Asparagina

O/A- óleo-em-água

O/A/O- óleo-em-água-em-óleo

PCL- Poli (caprolactona)

PGA- Poli (ácido-glicólico)

PLA- Poli (ácido láctico)

PLGA- Poli (ácido-co-glicólico)

POE- poli (orto-ésteres)

PVA – Álcool poli vinílico

T_g– Transição vítrea

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Poli ácido-co-glicólico (PLGA)	17
2.2 Nanopartículas Poliméricas	18
2.3 L-Asparaginase: Estudos e aplicações farmacêuticas	19
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 MATERIAIS	25
4.1.1 Substâncias e reagentes	25
4.1.2 Equipamentos	25
4.2 MÉTODOS.....	26
4.2.1 Obtenção de nanopartículas de PLGA pelo método da dupla emulsificação	26
4.2.2 Caracterização físico-química.....	26
4.2.2.1 Raio hidrodinâmico das partículas e índice de polidispersidade	26
4.2.2.2 Eletroforese SDS- PAGE.....	26
4.2.2.3 Estudo de agregação em meio glicerol/água	27
5. RESULTADOS	29
5.1 Eletroforese SDS-PAGE da L-asparaginase	29
5.2 Estudo de agregação em meio glicerol	30
5.3 Obtenção de nanopartículas de PLGA pelo método da dupla emulsificação/ evaporação do solvente.....	31
5.4 Caracterização dos sistemas por espalhamento de luz dinâmica (DLS)	32
5 CONCLUSÃO	41
6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a nanotecnologia vem sendo abordada como uma alternativa para direcionamento de drogas em órgãos específicos, redução dos efeitos fora do alvo e para evitar a toxicidade. A Nanoencapsulação propicia o direcionamento da droga para o sítio de ação, além de promover um sistema de liberação controlada. (VERMA et al., 2015; KHALIL et al., 2013).

Nanopartículas formuladas com poli (ácido láctico-co-glicólico- PLGA) são um sistema promissor para entrega de drogas por ser biodegradável e não mostrar efeitos tóxicos, em consequência dos seus produtos de degradação que são o ácido láctico e glicólico (PANYAM et al., 2002; KIM et al., 2006), diversos medicamentos são encapsulados com êxito utilizando PLGA para controlar a liberação do fármaco e a melhorar sua biodisponibilidade (KUMARI et al., 2010). Uma das maiores vantagens do emprego de polímeros biodegradáveis, como o PLGA, é que a liberação da droga depende, principalmente, da cinética de degradação do polímero e no caso em particular do PLGA esta pode ser controlada alterando a proporção de ácido láctico e ácido glicólico e o peso molecular do polímero (YE et al., 2010). A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) é a mais disseminada no campo científico para medição do tamanho e distribuição do tamanho de partículas sólida em suspensão. É uma técnica não invasiva que nos fornece a intensidade de espalhamento de luz das partículas que estão em movimento browniano em uma suspensão coloidal (GOLBURG, 1999).

Estudos prévios mostraram que ao alterar parâmetros de síntese, a liberação do composto retido nas nanopartículas é afetada diretamente, dentre os quais podemos citar a composição do polímero, método de síntese, o tamanho de partícula e emulsificante utilizado (PANYAM et al., 2003).

A L-asparaginase (L-ASPase) é um agente antineoplásico amplamente usado no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA), considerado o tipo mais comum de câncer infantil que, no entanto, possui bom prognóstico, com 95% de remissão completa em casos tratados com quimioterapia (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; PEDROSA; LINS, 2002). É uma proteína tetramérica com peso molecular de 140 kDa que catalisa de forma irreversível a hidrólise de L-Asparagina em ácido aspártico e amônia (LUBKOWSKI et al., 1996; PRAKASHAM et al., 2007).

Apesar de o encapsulamento proteger a L-Asparaginase do ataque proteolítico e prolongar a liberação, ainda há instabilidade da proteína devido ao microambiente desfavorável nas nanopartículas, podendo perder a sua integridade. Em casos mais brandos a atividade biológica é perdida, no pior dos casos produtos de degradação tóxicos ou imunogênicos são formados. Desse modo, a estabilização de drogas e proteínas é uma questão importante para o sucesso da terapia (WOLF et al, 2003). Desta forma, esse trabalho tem como objetivo realizar um estudo de pré-formulação para escolha de um sistema nanoparticulado de Poli (ácido-co-glicólico) (PLGA) visando a encapsulação da enzima L-Asparaginase.

Referencial Teórico

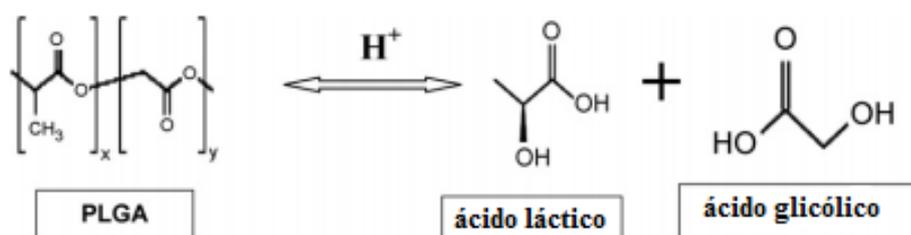
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Poli ácido-co-glicólico (PLGA)

Polímeros vêm sendo utilizados abrangentemente em sistemas farmacêuticos como agentes adjuvantes de suspensão e de emulsificação, agentes flocculantes, adesivos, materiais de embalagem e encapsulantes. São usados com maior frequência como componentes de sistemas de liberação controlada em sítios específicos de drogas (FLORENCE & ATTWOOD., 2003).

Os polímeros utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos devem ser quimicamente inertes, não carcinogênicos, hipoalergênicos e não causar resposta inflamatória no local de aplicação (ATHANASIOU et al., 1996). O PLGA é um dos copolímeros sintéticos mais utilizados em nanosistemas sendo composto por monômeros de ácido láctico e ácido glicólico (KUMARI et al., 2010). Apresenta cadeia linear saturada, com comportamento termoplástico, cuja principal característica estrutural é a ligação éster presente entre os monômeros, resultando em um poliéster de cadeia alifática, hidrofóbico. Sua degradabilidade está relacionada a sua hidrólise no organismo em metabólitos não tóxicos e toleráveis aos tecidos (Figura 1) que são facilmente absorvidos pelo organismo (MERKLI et al., 1998; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Figura 1: Hidrólise de PLGA em ácido láctico e ácido glicólico



(Adaptado de KUMARI; YADAV; YADAV, 2010)

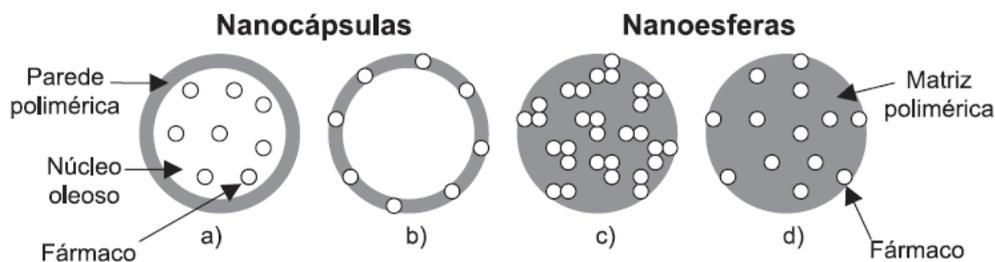
A cristalinidade do PLGA é influenciada pelos isômeros moleculares e pela razão molar dos componentes envolvidos em sua obtenção. Polímeros de PLGA na razão molar 50:50 de ácido láctico e glicólico, apresentam caráter amorfo e, conseqüentemente, são hidrolisados mais rapidamente em relação ao padrão cristalino. Por apresentar metabólitos

facilmente absorvidos pelo organismo e apresentar riscos mínimos a saúde humana, o PLGA é regularizado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) e Agência Europeia de Medicina (DANHIER et al., 2012), além disso, a temperatura de transição vítrea (T_g) do PLGA está entre 45 e 50°C, acima da temperatura corporal (37°C), o que o mantém na sua forma vítrea, apresentando sua cadeia polimérica relativamente rígida. Desse modo, o material apresenta resistência mecânica significativa, permitindo seu uso em sistemas de liberação de fármacos (JAIN, 2000; BARBANTI et al., 2005). Sendo assim, podemos informar que devido a essas características peculiares já difundidas na literatura é que esse polímero foi escolhido para esta pesquisa.

2.2 Nanopartículas Poliméricas

Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais, classificados em dois tipos, as nanocápsulas e as nanoesferas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As nanoesferas são compostas por uma matriz polimérica cujas moléculas podem ficar adsorvidas na superfície ou retidas dentro da partícula. Já as nanocápsulas são sistemas veiculadores, que se comportam como reservatórios são compostos por um invólucro polimérico com um núcleo líquido (oleoso ou aquoso) cujo fármaco pode estar aderido as paredes da esfera ou disperso no núcleo exemplificado pela Figura 2 (VAUTHIER; COUVREUR., 2000; COUVREUR; DUBERNET; PUISIEUX., 1995).

Figura 2: Representação de nanocápsulas e nanoesferas



a) fármaco dissolvido no núcleo (oleoso ou aquoso) das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido na parede polimérica da nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco adsorvido na parede polimérica da nanoesfera. (Fonte: SCHAFFAZICK; GUTERRES., 2003)

O tipo de nanopartícula e o local em que o ativo ficará (adsorvido na superfície ou não) dependerão do método de obtenção e da característica do ativo. Os métodos de preparo de nanopartículas poliméricas podem ser classificados em dois grandes grupos: técnicas que realizam a dispersão de polímeros pré-formados e técnicas de polimerização de monômeros. Entretanto, os métodos mais comumente aplicados são os que fazem uso dos polímeros pré- formados. Neste grupo há diversas técnicas, mas as que se destacam são as que utilizam polímeros sintéticos, tais como emulsificação- evaporação do solvente, emulsificação-difusão do solvente, *salting-out* e nanoprecipitação (REIS et al., 2006).

As nanopartículas apresentam uma enorme versatilidade para o emprego como carreadores de fármaco por apresentar diversas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, tais como: na solubilidade, melhoram essa propriedade quando compara aos fármacos que tem baixa solubilidade em formas convencionais e o fato das nanopartículas funcionarem como reservatório do fármaco (RAO e GECKELER, 2011), confere ao fármaco proteção frente às alterações fisiológicas do meio, independente da rota de administração. Uma liberação controlada, em virtude da biodegradabilidade e biocompatibilidade do polímero constituinte, evitando a ocorrência de doses tóxicas ou abaixo da dose terapêutica (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010).

Nanopartículas poliméricas são usadas frequentemente como sistemas carreadores de drogas por serem biocompatíveis e biodegradáveis, são adequados para o aprisionamento e entrega de uma variedade de agentes terapêuticos. Por apresentar diâmetro reduzido, as nanopartículas propiciam inúmeras vantagens farmacocinéticas, tais como maior capacidade de atravessar as barreiras biológicas, como o endotélio que necessita de sistemas em escala nanométrica (FARAJI; WIPF.,2009; ALEXIS, et al., 2008).

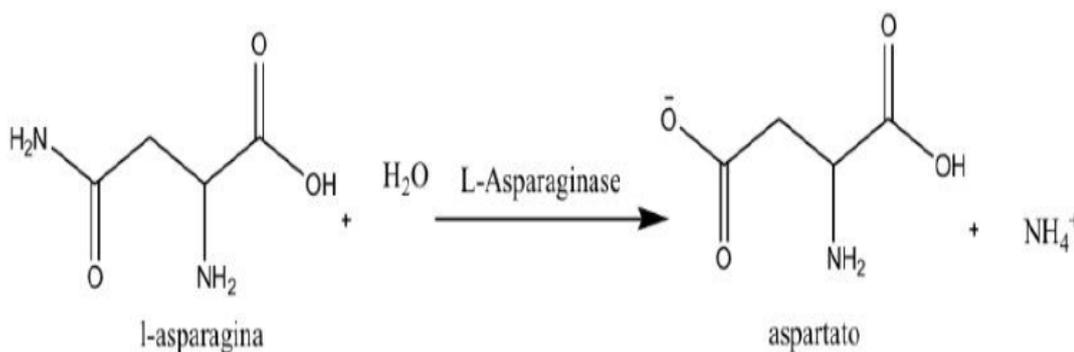
2.3 L-Asparaginase: Estudos e aplicações farmacêuticas

Das diversas aplicações dos sistemas nanocarreadores a que mais tem despertado a atenção é sua utilização como substrato para aprisionamento de biomoléculas para uso biomédico. Em virtude de sua grande área de superfície e seu tamanho reduzido, torna-se apropriado para veiculação desses materiais (TIAN et al., 2012). Desde muitos anos, há relatos do uso de enzimas como agente terapêutico, porém, apenas nas ultimas décadas esse emprego tem chamado atenção em virtude dos avanços tecnológicos na área de processos biotecnológicos (SOARES et al., 2002).

A L-Aspase é um agente quimioterapêutico amplamente usado na leucemia linfóide aguda e em outras doenças hematopoiéticas (SHRIVASTAVA et al., 2015). A enzima L-Aspase pode ser isolada de diversas fontes naturais como bactérias, fungos, plantas dentre outras. Porém, apenas as enzimas oriundas de bactérias do gênero *Escherichia coli* e *Erwiniachrysanthemii* estão atualmente disponíveis para uso médico (CHEN et al., 2014). A atividade antitumoral da L-Asparaginase em células leucêmicas foi inicialmente identificada e caracterizada em ensaios clínicos humano no ano de 1970 (ALI et al., 2016). Desde então, a enzima tornou-se essencial para o tratamento da leucemia.

A enzima L-Asparaginase hidrolisa a L-asparagina do meio extracelular em L-aspartato e amônia (figura 3). Com a redução desse aminoácido há uma inibição da síntese de proteínas constitutivas e regulatórias funcionais, como as do ciclo celular e proteínas anti-apoptóticas por parte das células cancerígenas, ocasionando a sua lise celular (AVRAMIS et al., 2012). As células cancerígenas necessitam de L-Asparagina do meio extracelular para sua síntese proteica pois, possuem baixa expressão ou ausência da enzima asparaginase sintetase (NAGGAR et al., 2014).

Figura 3: Reação catalisada pela L-Asparaginase



(Adaptado de: NARTA et.al. 2007).

Na clínica, a enzima L-Asparaginase de *E.coli* é ativa na sua forma tetramérica com subunidades idênticas com peso de 35,6 kDa para cada subunidade (SWAIN et al., 1993). Porém, quando esta proteína é oriunda do citoplasma de microrganismos é denominada de L-Aspase I e apresenta alta afinidade com L-Asparagina e glutamina e quando produzida no espaço periplasmático é chamado de L-Aspase II e tem menor afinidade por estes aminoácidos (CAPPELETTI et al., 2008).

Quando a terapia com L-Asparaginase é seguida adequadamente, com doses e horários regulados há uma melhoria do quadro clínico (RIZZARI et al., 2013). Entretanto, mesmo com o avanço no desenvolvimento de formulações para veiculação de L-Asparaginase, estas ainda possuem limitações, tais como reações imunológicas à proteína (SHRIVASTAVA et al., 2015). O rápido *clearance* sanguíneo da enzima reduz sua eficácia terapêutica e por outro lado a necessidade da administração repetida provoca hipersensibilidade resultando desde reações alérgicas leves até anafilaxia (NARAZAKI et al., 2012). O surgimento de anticorpos anti-asparaginase além de reduzir a eficácia terapêutica ocasiona a resistência medicamentosa a enzima (AVRAMIS et al., 2012).

Essas condições atentam para a necessidade de preparações alternativas que sejam capazes de diminuir ou erradicar as reações imunológicas relacionadas a L-Asparaginase (WENNER et al., 2005), como sua veiculação em novos sistemas transportadores de fármacos, como as nanopartículas, que além de vetorizar a ação, libera o ativo de maneira controlada.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Realizar estudo de pré-formulação de nanopartículas poliméricas de PLGA pelo método da dupla emulsificação e evaporação do solvente para veiculação L-Asparaginase.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter as nanopartículas poliméricas pelo método da dupla emulsificação e evaporação do solvente realizando pequenas adaptações inerentes ao caso;
- Caracterizar o sistema quanto ao tamanho de partícula e índice de polidispersão;
- Realizar ensaios de eletroforese da enzima para fins de verificação de pureza;
- Realizar estudo de agregação em meio glicerol;

Materiais e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias e reagentes

- Poli (ácido d- glicólico) PLGA;
- Acetato de etila;
- Clorofórmio;
- Álcool polivinílico (PVA);
- Tampão PBS (fosfato-salino)
- Gel SDS – PAGE

4.1.2 Equipamentos

- Zetasizer Nano- ZS , (Malvern Instruments Ltd, UK).
- Mini-protean (Biorad)
- Sonicador de Ponteira/Desruptor de Célula Ultrassônico - Modelo: DES500, UNIQUE®
- Agitador magnético Op-95®
- Centrifuga
- Balança semianalítica Bel engineering®

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção de nanopartículas de PLGA pelo método da dupla emulsificação

As nanopartículas de PLGA foram obtidas pelo método da dupla emulsificação e evaporação de solvente. Para o polímero com maior massa molecular, inicialmente 50 mg do polímero foram dissolvido em 2,5 mL de solvente orgânico, clorofórmio, juntamente com 250 µL de água destilada, sonicando-se em três ciclos de 60 segundos com potência de 50%. Desse modo, foi obtida a primeira emulsão (A/O), e essa então vertida em 10 mL da solução de PVA 1% (p/v) e sonicada em três ciclos de 60 segundos, obtendo assim a emulsão múltipla (A/O/A). Todo o processo em sonificador foi mantido em banho de gelo para evitar desestabilização do sistema por conta do calor gerado pelo aparelho.

Depois de formada a emulsão, esse sistema foi levado para evaporação do solvente em agitador magnético (4000 rpm) por 24 horas. Após esse período a suspensão de nanopartículas foi centrifugada á 2500 rpm por 15 minutos e lavada em 2,5 mL de água duas vezes e ressuspensa em 5 mL de água e armazenada em geladeira para posterior caracterização.

Esse protocolo foi seguido para produção de nanopartículas de PLGA 50:50 com menor massa molecular, mudando o solvente orgânico para acetato de etila e concentração de estabilizante PVA 0,5 % (p/v), com as mesmas quantidades descritas.

Após a preparação das nanopartículas, essas foram diluídas nas proporções de 1:10, 1:100 e 1:1000 em água deionizada para serem analisadas por dispersão de luz dinâmica.

4.2.2 Caracterização físico-química

4.2.2.1 Raio hidrodinâmico das partículas e índice de polidispersidade

A análise do raio hidrodinâmico das partículas e índice de polidispersão foram realizadas em aparelho Zeta size pela técnica DLS (*Dynamic light scattering*) em temperatura ambiente e utilizado como meio dispersante água.

4.3.2.2 Eletroforese SDS- PAGE

Foram realizadas análises da enzima L-Asparaginase através da técnica de eletroforese em gel SDS – PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Foram utilizados géis de 20% de acrilamida (Biorad) e equipamento

Mini-protean (Biorad) ajustado para 160 V. Após a corrida os géis foram corados com *Coomassie Blue R-250* (Biorad®). Foram adquiridos 1000 U da enzima e esta foi diluída em 20 ml de tampão PBS, adquirindo assim uma concentração de 50 U.mL^{-1} , esta solução foi alicotada em tampão PBS (200 μl), em seguida aplicada no gel juntamente com o padrão e a enzima advinda de alimentos, ambas cedidas pelo laboratório de tecnologia bioquímico-farmacêutico da Universidade de São Paulo.

4.3.2.3 Estudo de agregação em meio glicerol/água

O estudo foi realizado pesando-se 50 mg da enzima liofilizada e diluída em 50 mL de água, obtendo assim uma concentração de 1mg/mL, logo após essa suspensão foi adicionada a soluções de glicerol de 5,20 e 40 % de glicerol/água e analisada realizado em aparelho Zeta size pela técnica DLS (*Dynamic light scattering*).

Resultados

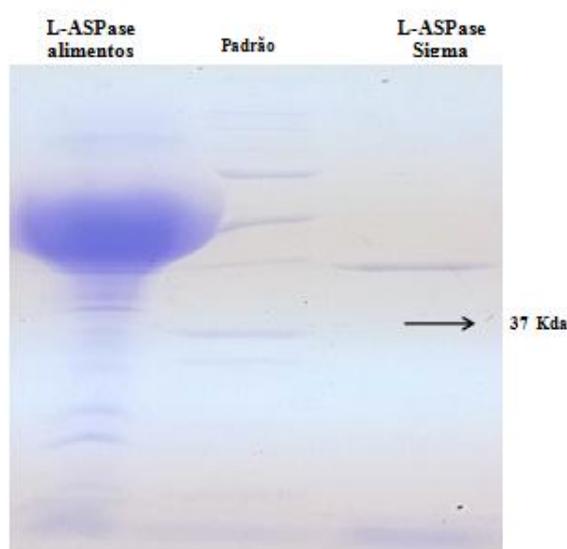
5. RESULTADOS

5.1 Eletroforese SDS-PAGE da L-asparaginase

O conhecimento de um analito ou de uma família de analitos num fluido biológico é uma necessidade diária em medicina humana, em particular para avaliar a fisiopatologia de um estado de doença. Ao analisar macromoléculas tais como proteínas e ácidos nucleicos, a separação de fases é um passo chave. Vários métodos atualmente compartilham essa capacidade com diferentes graus de sensibilidade, especificidade e praticidade. Eles são baseados em diferenças de tamanho, carga ou propriedades específicas (biológicas ou químicas). A eletroforese é uma técnica físico-química, que separa os componentes ionizados num campo eléctrico. Durante vinte anos, o desenvolvimento de novos meios de comunicação (géis de poliacrilamidas, agarose e, finalmente, capilares de sílica) como eletroforese em campo migração deu um novo impulso (TRIVIN e BRICON., 2003).

A figura 4 apresenta o resultado da análise da enzima padrão, a enzima oriunda de alimentos e a enzima em estudo com padrão sigma, podemos analisar que a enzima da sigma está pura apresentando-se como uma banda única com peso molecular na sub-unidade de 33 kDa, o que segundo a literatura é esperado, a banda do padrão é de 37 kDa. A enzima advinda de alimentos está nitidamente contaminada com bandas saindo do gel, o que pode ter ocorrido por motivos de falha na extração da proteína desses alimentos.

Figura 4: Eletroforese SDS-PAGE da L-asparaginase de *Escherichia coli*.



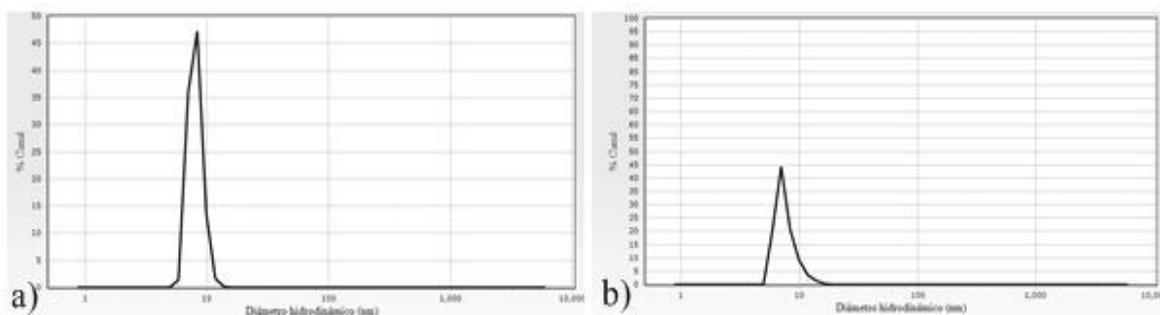
Do ponto de vista bioquímico a enzima é composta por quatro subunidades, sendo homotetramérica com um sítio ativo em cada uma destas. A massa molar varia entre 133-144 kDA e é formada por 300-350 resíduos de aminoácidos (CAPPELLETTI et al., 2008).

5.2 Estudo de agregação em meio glicerol

A agregação de proteínas pode ser classificada de maneira geral em dois tipos, agregação química e agregação física. A agregação física ocorre de maneira simples por associação física de uma proteína a outra, sem alterações na estrutura primária, já a agregação química ocorre por formação de novas ligações covalentes entre as moléculas (FINKE et al., 200).

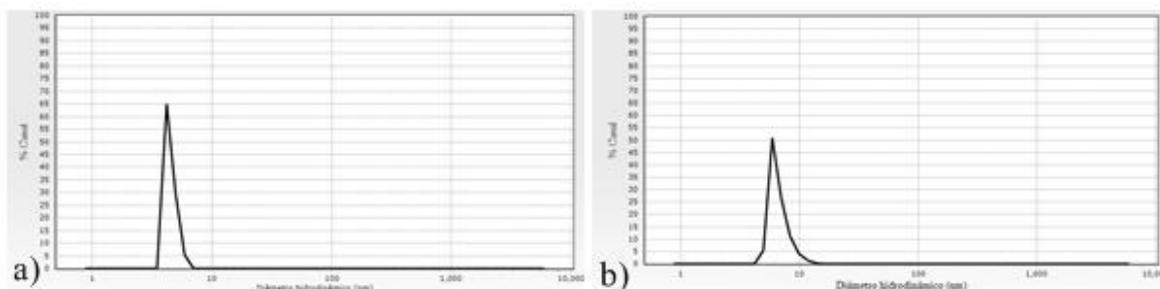
Nas figuras abaixo estão demonstrados os raios hidrodinâmico para a enzima nas diferentes concentrações d glicerol. Na figura 5 (a), podemos analisar o pico para a enzima diluída em água, o qual apresentou um único pico e na figura 5 (b) a enzima em meio glicerol 5% (v/v) apresentando-se também com apenas um pico, sugestivo de ausência de agregação.

Figura 5: Espalhamento de luz para enzima em água (a) e em solução de glicerol 5% (v/v) (b)



Em seguida, pode-se analisar na figura 6 (a) o pico gerado para enzima em meio glicerol 20% (v/v) e na figura 6 (b) o pico para enzima em meio glicerol 40% (v/v), ambas apresentaram apenas um pico em análise de DLS, sugestivo de ausência de agregação,

Figura 6: Espalhamento de luz para enzima em solução de glicerol 20% (v/v)(a) e enzima em solução de glicerol 40% (v/v)(b)



A uma tendência própria das proteínas de formarem agregados, o que ocasiona um grave problema para a tecnologia farmacêutica e biotecnologia, pois necessitam sintetizar, processar e armazenar proteínas em concentrações elevadas e durante longos períodos. A proteína agregada, geralmente, não apresenta a mesma atividade biológica que as proteínas no seu estado nativo, além do que, muitas vezes pode ser imunogênico e apresentar feitos tóxicos agudos *in vivo*, desta forma é essencial o planejamento de estratégias para prevenção de agregação nestas aplicações (BRIAN.,2004).

A ausência de mais de um pico na análise em DLS nos leva a concluir que a enzima liofilizada encontra-se com ausência de agregação, estando apta para posteriores estudos de encapsulação.

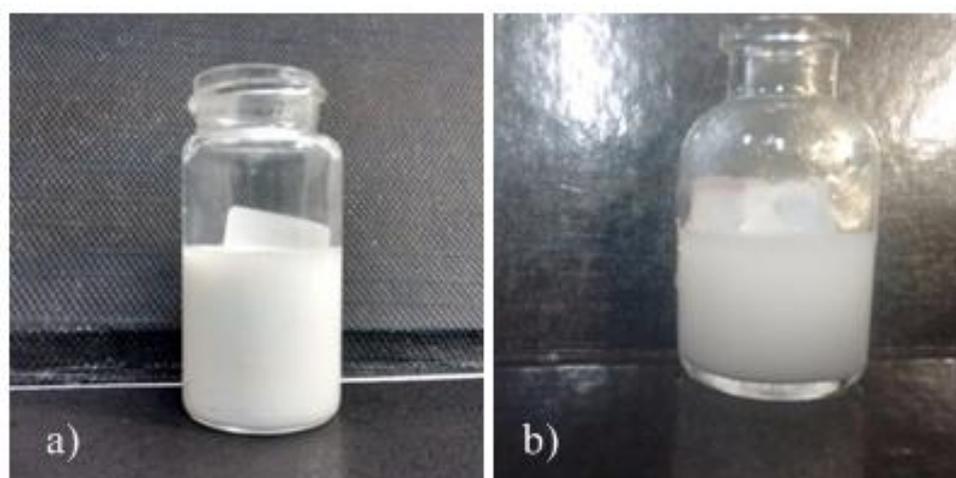
5.3 Obtenção de nanopartículas de PLGA pelo método da dupla emulsificação/evaporação do solvente

Na técnica da emulsificação/evaporação do solvente, a encapsulação de fármacos hidrofílicos é feita pelo preparo de uma emulsão do tipo simples (A/O), em que primeiramente o polímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente orgânico imiscível em água, como clorofórmio ou acetato de etila, e essa fase é emulsificada em uma fase aquosa, geralmente contendo um estabilizador de emulsão (SAWALHA et al., 2011). A formação da emulsão é o passo mais importante da preparação de nanopartículas, pois o tamanho das gotas da emulsão está diretamente relacionado com o tamanho final das nanopartículas.

As nanopartículas foram obtidas com êxito pelo método da dupla emulsificação e evaporação do solvente. Do ponto de vista macroscópico as emulsões formadas mostraram-se satisfatória com ausência de separação de fases (figura 7). O estudo de pré-

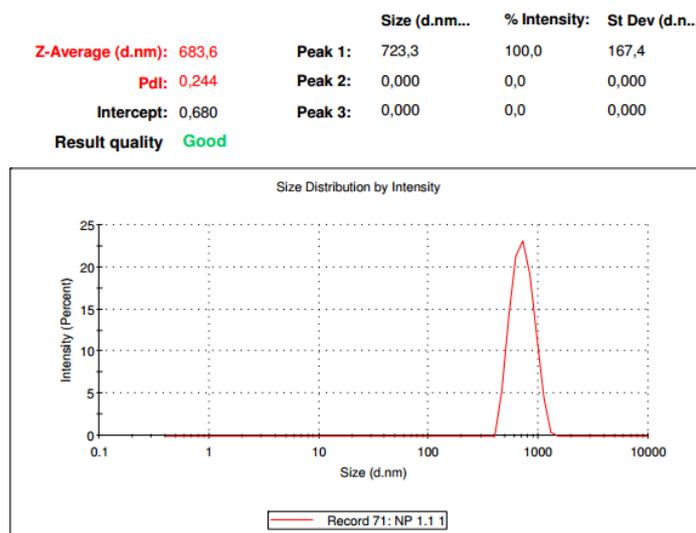
formulação teve por influência outros estudos como o de RAO e GECKELER (2011), que asseguram que a concentração do polímero e o solvente utilizado na formulação influenciam diretamente as características finais das nanopartículas preparadas a partir do método de evaporação do solvente. Este método é largamente utilizado na produção de nanopartículas poliméricas para veiculação de fármacos, pela sua possível encapsulação de ativos hidrofóbicos e hidrofílicos (RAO e GECKELER, 2011).

Figura 7: Suspensão de nanopartículas de PLGA 50:50 (30,000-60,000) (a) e PLGA 50:50 (24,000-38) (b).

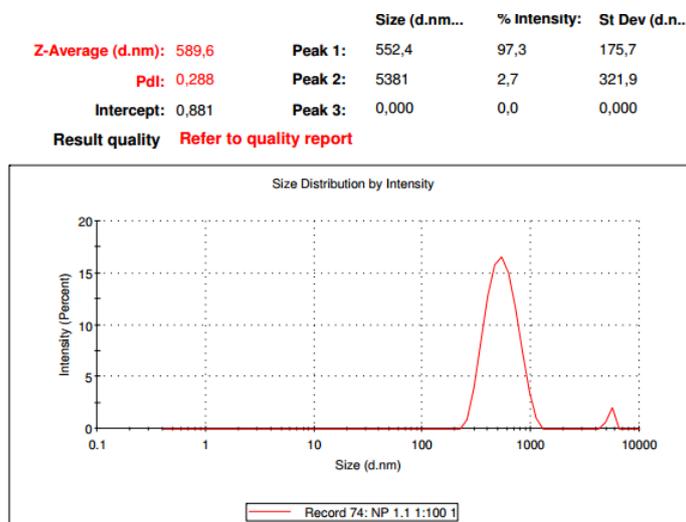


5.4 Caracterização dos sistemas por espalhamento de luz dinâmica (DLS)

Examinou-se o efeito dos solventes orgânicos na fase oleosa e a variação de massa molar do polímero sobre a distribuição do tamanho da partícula, o qual foi indicado pelo diâmetro do raio hidrodinâmico medido por dispersão de luz dinâmica (DLS) no equipamento Zetasizer Nano- ZS , (Malvern Instruments Ltd, UK). Na Figura 8 pode-se observar o resultado da análise de espalhamento de luz para o sistema com maior massa molar do polímero, solvente orgânico clorofórmio e fase externa PVA 1% (p/v), diluída na proporção de 1:10 em água deionizada, que apontam para nanopartículas com tamanho de 683,6 nm e índice de polidispersão (PDI) de 0,244.

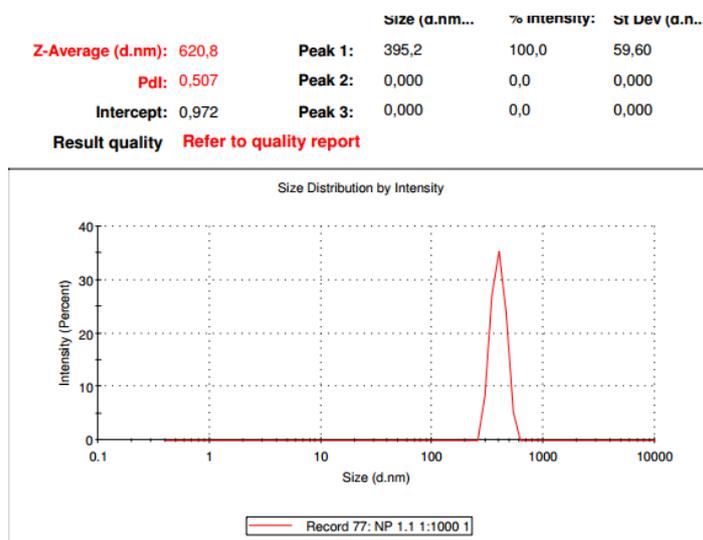
Figura 8: Análise de espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) 1:10

Na Figura 9 pode-se observar a análise de espalhamento de luz para o mesmo sistema diluída na proporção de 1:100 em água deionizada que aponta para nanopartículas com tamanho de 589,6 nm e PDI de 0,288. Na escala entre 1000 e 10000 nm podemos observar o pico de uma possível agregação do sistema ou de alguma contaminação. A agregação é um fenômeno que pode advir em várias etapas da produção, sendo evidente na evaporação do solvente. O uso de estabilizantes nos sistemas cria um revestimento na superfície das nanopartículas prevenindo a agregação (CHENG et al., 2012).

Figura 9: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) 1:100

Na figura 10 está ilustrado o pico para o sistema diluído na proporção de 1:1000, podemos observar que para o sistema com maior massa molar a variação de tamanho ficou entre 500-600 nm. O diâmetro de partícula é um parâmetro importante a ser considerado na otimização de uma formulação, pois esta tem influência direta sobre as características biofarmacêuticas e o perfil de liberação do ativo a partir da nanoestrutura (HERMANS et al., 2012).

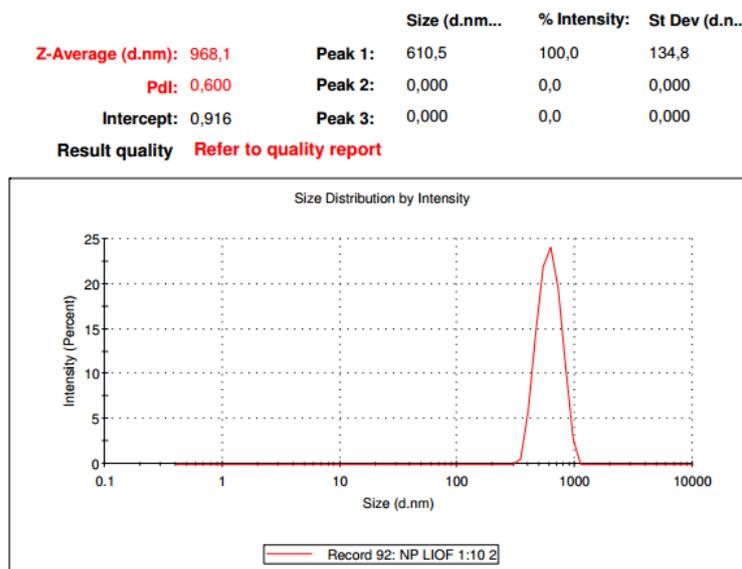
Figura 10: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) 1:1000



Na figura 11 pode-se analisar o espalhamento de luz para o sistema liofilizado o qual aponta para nanopartículas com tamanho de 968,1 nm, esse aumento no tamanho da partícula pode ser justificado pela adsorção de PVA na superfície das partículas por meio da parte hidrofóbica do acetato de vinila, o qual serve de abrigo deste polímero na interface aquosa/orgânica formada durante a emulsificação (RILEY et al., 1999). No trabalho de Silva (2007) foi concluído que mesmo realizando varias lavagens na suspensão de nanopartículas para eliminar o excesso de PVA do sistema sempre haverá uma porcentagem residual sobre as partículas. O autor também explica que após uma lavagem a camada de PVA que envolve a nanopartícula liofilizada permite uma redispersão imediata das partículas em água, no entanto, por conta da solvatação das cadeias de PVA por moléculas de água através de ligações de oxigênio, há uma alteração da conformação do polímero, as quais desenrolam, levando a um aumento no volume das partículas e, conseqüentemente, o seu raio hidrodinâmico. O aumento do número de lavagens favorece a diminuição do álcool polivinílico residual sobre as partículas, o que é desejável para

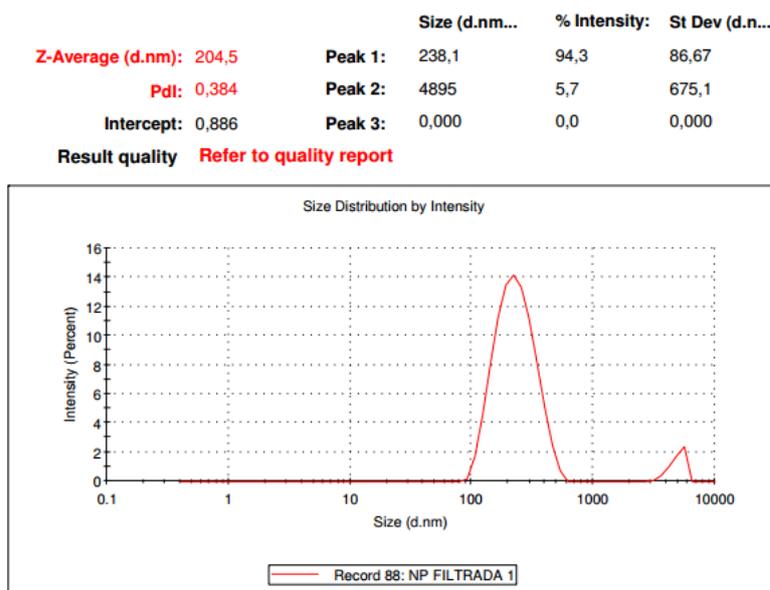
administração intravenosa, em virtude do PVA não ser biodegradável (ZAMBAUX et al., 1998).

Figura 11: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) liofilizada



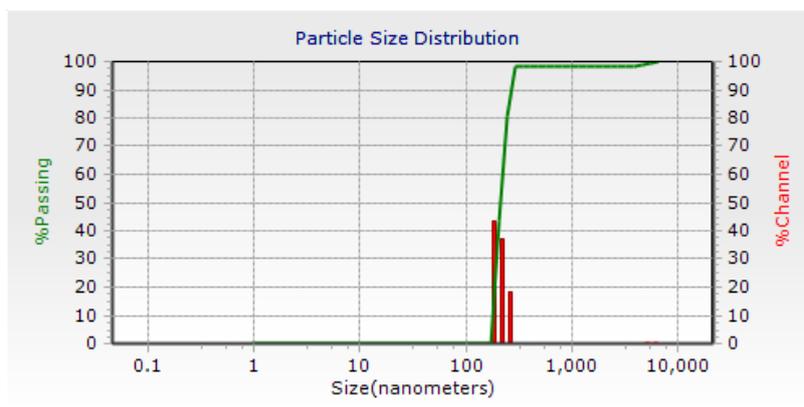
Para a administração intravenosa de nanopartículas um diâmetro médio de partícula <200 nm e uma distribuição de tamanhos estreita são desejáveis para evitar o risco de embolia e para isso pode-se proceder à filtração estéril (BOOTZ et al., 2004). Na figura 12 podemos analisar um diâmetro de partículas de 204,5 nm e PDI de 0,384 para o sistema filtrado em filtro de 0,22 μm , com isso obteve-se assim, um tamanho de partícula ideal para veiculação intravenosa.

Figura 12: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (30,000-60,000) filtrada



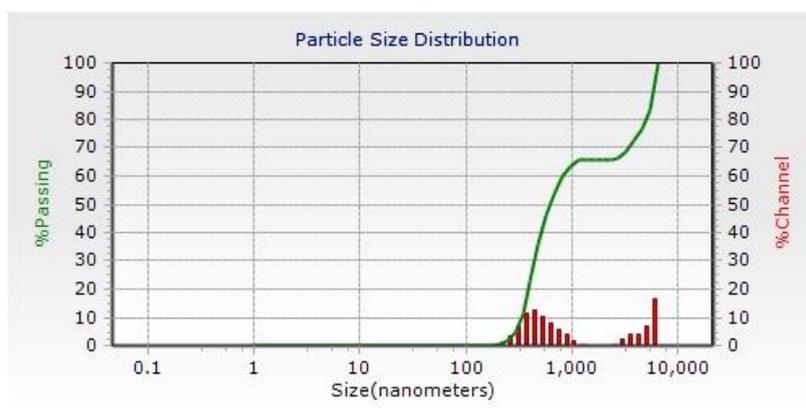
Os resultados do tamanho hidrodinâmico para o sistema com menor massa molar, solvente orgânico acetato de etila e fase externa PVA 0,5% (p/v) estão ilustrados nas figuras abaixo. Na figura 13 observa-se um espalhamento de luz do sistema diluído em água deionizada na proporção de 1:10 apontando para partículas com tamanho de 564,7 nm e PDI 0,544.

Figura 13: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (24,000-38,000) 1:10



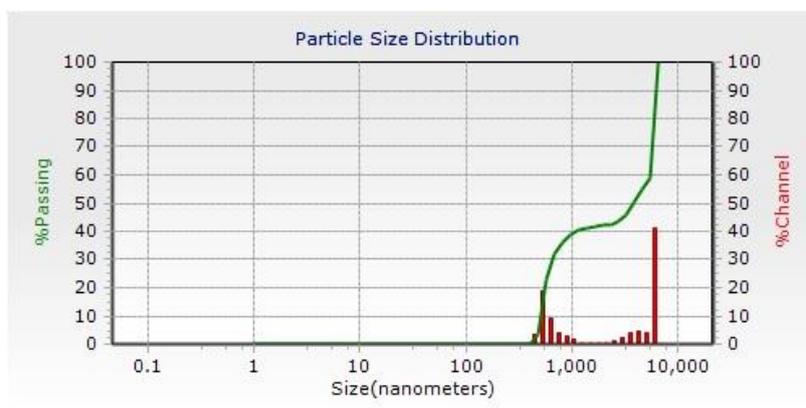
Na figura 14 pode-se analisar o espalhamento de luz dinâmico para o mesmo sistema diluído na proporção de 1:100 em água deionizada apontando para partículas com tamanho de 780 nm, porém é possível observar um outro pico entre 1,000 e 10,000 nm sugestivo de agregação ou de partículas com tamanho maior presente no sistema, o qual não foram evidenciadas quando diluídas numa proporção menor.

Figura 14: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (24,000-38,000) 1:100



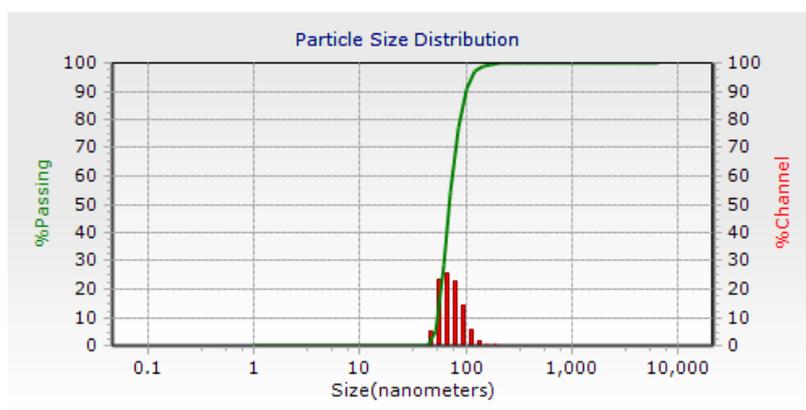
Já na figura 15 podemos analisar um tamanho de 883,9 nm e PDI 0,987, o que nos sugere que, a medida que se aumenta a proporção da diluição elevou-se o raio hidrodinâmico médio das partículas, assim como a população de partículas entre a escala de 1,000-10,000 nm prevaleceu, demonstrando uma possível agregação do sistema.

Figura 15: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (24,000-38,000) 1:100



Na figura 16 podemos observar o sistema filtrado em filtro de 0,22 μm com espalhamento de luz apontando para nanopartículas com espalhamento de luz de 87,7 nm e PDI de 0,537. Esse resultado foi satisfatório, pois, o sistema formou partículas com menor raio hidrodinâmico quando comparado com o sistema com maior massa molecular, o que segundo a literatura é esperado pois, o tamanho das nanopartículas de PLGA diminuem a medida que a polaridade do solvente orgânico aumenta (LIN et al., 2015).

Figura 16: Análise do espalhamento de luz nanopartículas PLGA (24,000-38,000) filtrada



A relativa simplicidade de reprodução do método de dupla emulsificação, a produção de nanopartículas a partir de polímeros biodegradáveis, assim como, a possibilidade de controlar alguns parâmetros de preparação (volume do solvente orgânico, proporção de fase externa, tempo de sonicação) fizeram desse método ideal para o desenvolvimento desse trabalho.

No trabalho de Carraro (2013) foi analisado a influência dos dois solventes orgânicos, clorofórmio e acetato de etila, sob o tamanho de partícula, as partículas obtidas com clorofórmio apresentam tamanho médio maior quando comparadas as partículas obtidas com acetato de etila. Os resultados obtidos nesse presente estudo estão de acordo com dados da literatura, pois, obtivemos tamanhos de partículas menores quando formuladas com acetato de etila.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que ao diminuir o tamanho da massa molar total do polímero obteve-se um raio hidrodinâmico menor para as partículas formuladas. A escolha de outro polímero com menor peso molecular resultou em nanopartículas com menor tamanho o que será importante, uma vez que o objetivo é que o sistema seja administrado por via intravenosa. Estudos apontam que o tamanho da nanopartículas de PLGA aumenta proporcionalmente com o aumento do peso molecular deste polímero (MITTAL et al., 2007). Para diminuição do raio hidrodinâmico das nanopartículas pode ser aumentado o tempo de sonicação na preparação da segunda emulsão (A/O/A), pois, esta é de maior influência no tamanho final das nanopartículas (BILATI et al., 2003).

A análise de potencial zeta não foi realizado devido à estabilização estérica ocasionado pelo PVA que justifica a não realização dessa análise nestas amostras. Este mecanismo de estabilização estérica através estabilizadores não-iônicos anfifílicos ocorre

por efeito solvatação, os quais mostram que estas substâncias estão fortemente ancoradas com as nanopartículas dispersas.

Conclusão

5 CONCLUSÃO

O método da dupla emulsificação e evaporação do solvente para produção de nanopartículas mostrou-se satisfatório, o que proporcionou e possibilitou a obtenção das formulações com tamanho de partículas em escala manométrica, usando o polímero de PLGA com diferentes massas molares.

O estudo de pré-formulação foi útil para a escolha do melhor sistema para a encapsulação da enzima L-Asparaginase. Concluindo-se, portanto, que o polímero com maior massa molecular não é o ideal para a demanda, tendo em vista seu alto raio hidrodinâmico o que sugere partículas com tamanho inadequado para administração intravenosa, logo, o mesmo, foi descartado.

Já o polímero com menor massa molar foi o escolhido, não só por ter obtido partículas com raio hidrodinâmico menores, mas, também, por permitir a formulação com solvente orgânico acetato de etila que é menos tóxico quando comparado ao clorofórmio, além do sistema apresentar uma concentração menor de estabilizante PVA, o qual não é degradável pelas vias metabólicas do organismo.

Quanto ao estudo com a enzima, podemos concluir ela mostrou-se pura através do ensaio de eletroforese e com ausência de agregação por meio do estudo em meio glicérol.

Por fim, podemos inferir que o estudo permitiu o desenvolvimento e escolha do melhor sistema para a encapsulação da enzima e posterior administração intravenosa, os quais serão as próximas etapas desta pesquisa.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, p. 505-515, 2008.

ATHANASIOU, K.A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M.; Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copo-lymers. **Biomaterials**, v. 17, p. 93-102, 1996.

AVRAMIS VI, et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**. V.99, n.6, p.1986-1894, 2012.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R.; Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BASCOMB, B.; BANKS, G.T.; SKARSTEDT, H.T.; FLEMING, A.; BETTLEHEIN, K.A.; CONNORS, T.A. The properties and large-scale production of L/Asparaginase from *Citrobacter*. **Journal of General Microbiology**, v.91, p. 1-16, 1975.

BILATI, P.; ALLÉMANN, B.; DOELKER, E. Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method. **Pharmaceutical development naTecnology**. v.8.n.1.p.1-9, 2003.

BOOTZ, A. et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 369–375, 2004.

CAPPELLETTI, D. et al. *Helicobacter pylori*-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 377, n. 4, p. 1222–6, 26 dez. 2008.

CHEN, Y et al. Polymersomes conjugated with des-octanoyl ghrelin and folate as a BBB-penetrating cancer cell-targeting delivery system. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 4066–81, 2014.

COUVREUR P, DUBERNET C, PUISIEUX F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.4. n. 1.p.2–13,1995.

COUVREUR P. Poly alkyl cyano acrylates as colloidal drug carriers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**.v.1988.n.5. p. 1-20, 1988.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v.161, p. 505-522, 2012.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 96–106, 2010.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**., v.17, p. 2950-2962, 2009.

FLORENCE A. T; ATTWOOD D. Princípios Físico Químicos em Farmácia, **Editora da USP**, São Paulo, p. 345-375; 413-455, 2003.

GOLDBURG, W. I. Dynamic light scattering. **American Journal of Physics**, v. 67, p. 1152-1160, 1999.

HERMANS, C.; PLAS, D. V.; EVERAERT, A.; WEYENBERG, W.; LUDWIG, A. Full factorial design, physicochemical characterisation and biological assessment of cyclosporine A loaded cationic nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, p. 27-35, 2012.

JAIN, R. A.; The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**. v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JONER, P.E. Purification and Properties of L-Asparaginase B from *Acinetobacter colcoacetivus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.438, p. 287-295, 1976.

KHALIL, N.M.; NASCIMENTO, T.C.F.D.; CASA, D.M.; DALMOLIN, L.F.; MATTOS, A.C.D.; HOSS, I.; ROMANO, M.A.; MAINARDES, R.M.; Pharmacokinetics of

curcumin loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.101,p. 353-350, 2013.

KIM,S.S.; PARK,M.S.; JEON, O.; CHOI, L.Y.; KIM, B.S.; Poly (lactido-co-glicolido)/hydroxyapatite composite substrates for tissue engineeringosseus. **Biomaterials**, v. 27, p. 1399-1409, 2006.

KOERHOLZ, D.; BRUECK, M.; NUENBERGER, W.; JUERGENS, H.; GOEBEL, V.; WAHN, V. Chemical and immunological characteristics of four different L-asparaginase preparations. **European Journal of Haematology** , v.42, p. 417-424,1989.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LIN, TS-TING.; GAO, DONG-YO.; LIU, YA-CHI.; SUNG, YUN-CHIEN.; WAN, DEHUI.; LIU, JIA-YU.; CHIANG, TSAYU.;WANG, LIYVING.; CHEN, YUNCHING. Development and characterization of sorafenib-loaded PLGA nanoparticles for the systemic treatment of liver fibrosis. **Journal of controlled release**.v.221, p.62-70, 2015.

LUBKOWSKI J, PALM GJ, GILLILAND GL, DERST C, ROEHM KH AND WLODAWER A. Crystal structure and amino acid sequence of Wolinella succinogenes L-asparaginase. **European Journal Biochemical**. V.241.n.1,p.201-207, 1996.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. ;Biodegradable polymers for thecontrolled release of ocular drugs. **Progress of Polymers Science**, v.23, p. 563-580, 1998.

MITTAL, A.; CHITKARA, D.; KUMAR, N.; PAWAR, R.; DOMB, A.; CORN, B.; Polymeric Carriers for Regional Drug Therapy. In: GALAEV, I.; MATTIASSOM, B.; SMART POLYMERS: **Applications in Biotechnology and Biomedicine**. P-492, 2008.

MITTAL, G. et al. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 77–85, 2007.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

NAGGAR EL, NOURA EL-AHMADY, SARA M EL-EWASY, AND NANCY M ELSHWEIHY. Microbial L-asparaginase As a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. **International Journal of Pharmacology**. v.4,n.10,p-182-199,2014.

NARAZAKI, H. KIYOHICO KAIZU, CHIHARU MIYATAKE, SHINYA KOIZUMI, T. A. AND O. F. Delayed-type Hypersensitivity in Response to L-asparaginase in a Case of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Nippon Medical School**, v. 79, n. 6, p. 489–493, 2012.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 3, p. 208–21, mar. 2007.

PANYAM, J.; DALI, M.M.; SAHOO, S.K.; MA, W.; CHAKRAVARTHI, S.S.; AMIDON, G.L.; polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly (D,L-lactide-co-glycolide) nano and microparticles. **Journal of controlled release**. v. 92, p. 173-187, 2003.

PANYAM, J.; ZHOW, W.Z.; PRABHA, S.; SAHOO.S.K.; LABHASE TWAR, V.; Endofugalypossomal rapid poly (D-L-lactidicoglycolide) nanoparticles: implications for drug delivery and gene. **FASEB J**. v.16, p. 1217-1226, 2002.

PEDROSA, F. Leucemia linfoide aguda : uma doença curável. Acute lymphoblasti cleukemia : a curabledisease. **Revista Brasileira de saúde materno infantil**. v. 2, n. 1, p. 63–68, 2002.

PRAKASHAM RS, RAO CS, RAO RS, LAKSHMI GS AND SARMA PN. L-asparaginase production by isolated Staphylococcus sp- 6A: Design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. **Journal Applied Microbiology** . v.102.n.5, p-1382-1391, 2007.

REIS, C.P., NEUFELD, R.J., RIBEIRO, A.J., et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine: **Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

RAO, J.P., GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control Parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RILEY, T.; T. GOVENDER, S. STOLNIK, C.D. XIONG, M.C. GARNETT, L. ILLUM, S.S. DAVIS Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles. **Colloid and Surface B-Biointerfaces**.v. 16, p.147-159,1999.

RIZZARI C, CONTER V, et al. Optimizing Asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Oncology** .v. 25,n.1,p- 9, 2013.

SCHANFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**. V.26, n.5, p- 726-737, 2003.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, p. 1–12, 2015.

SOARES, A. L., GUIMARÃES, G. M., POLAKIEWICZ, B., PITOMBO, R. N. M., ABRAHÃO-NETO, J., “Effects of Polyethylene Glycol Attachment on Physicochemical and Biological Stability of E. coli L-Asparaginase”, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, pp. 163-170, 2002.

SILVA JUNIOR, A. A. Micropartículas de ácido poli lático-co-glicólico obtidas por “spray drying” para liberação prolongada intra-ocular de fármacos. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SWAIN AL, et al. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academioc Science**. V.90,n.4,p.1474-1478, 1993.

TIAN, H. et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, funcionalization and biomedical application. **Pogress in polymer Science**.v.37, p.237-280, 2012.

TRIVIN, F., BRICON, T LEE. New electrophoresis tecniques applied to protein and DNA analysis. **Imunno-analyse & Biologie specialise**.v.18.,p.11-22, 2003.

USMAN, ALI. Seeking efficacy in L-asparaginase to combat acute lymphoblastic leukemia (ALL): A review. **African Journal of pharmacy and pharmacology**.v.9.n.3, p.739-855, 2015.

VAUTHIER C, COUVREUR P. Development of nanoparticles made of polysaccharides as novel drug carrier systems. In: Wise DL, editor. **Handbook of pharmaceutical controlled release technology**. p. 13–429,2000.

VERMA, R.K.; YU, W.; SINGH, S.P.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R.K.; Encapsulated anthothecol PLGA nanoparticles inhibit cancer cell growth rad pancreas via the sonic hedgehog modulation circuit. **Nanomaedice: nanotechnology and medicine**. V. 11.p- 2061-2070, 2015.

WOLF, M. et al. Stabilisation and determination of the biological activity of l-asparaginase in poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, n. 1-2, p. 141–152, 2003.

YE, MINGLI; KIM, SUNGWON; PARK, KINAM. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. **Journal of Controlled Release**.v.146.p.241-260, 2010.

WENNER KA, et al. Asparagine concentration in plasma after 2,500 IU/m² PEG-asparaginase i.v. in children with acute lymphoblastic leukemia. **Klinische Padiatre**. V.217.n.6, p.321-326, 2005.

M.F. ZAMBAUX, F. BONNEAUX, R. GREF, P. MAINCENT, E. DELLACHERIE, M.J. ALONSO, P. LABRUDE, C. VIGNERON. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlle. Release** .v. 50,p.31-40,1998.