



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GLUTAMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS E**  
**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS NEUTRÓFILOS**

**LARISSA CHAVES COSTA**

**RECIFE, 2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GLUTAMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS E**  
**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS NEUTRÓFILOS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de mestre na área de concentração em Produção e Controle de Medicamentos.

**Mestranda: Larissa Chaves Costa**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariane Cajubá de Britto Lira**

**RECIFE, 2013**

Catálogo na Publicação  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C837g Costa, Larissa Chaves.

Glutamina encapsulada em lipossomas convencionais e avaliação da viabilidade dos neutrófilos / Larissa Chaves Costa. – Recife: O autor, 2013.  
65 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Glutamina. 2. Lipossomas. 3. Neutrófilos. 4. Viabilidade celular. I. Magalhães, Nereide Stela Santos (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-122)

**Larissa Chaves Costa**

**GLUTAMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS E  
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS NEUTRÓFILOS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de mestre na área de concentração em Produção e Controle de Medicamentos.

Aprovada em: 25/02/2013

**BANCA EXAMINADORA**

**PRESIDENTE:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães

**Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco**

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADOR EXTERNO:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Jacques Lagranha

**Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco**

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADOR EXTERNO:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Braga Dornelas

**Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Alagoas**

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico esta dissertação a minha família pelo amor e dedicação incondicionais, por me motivarem a continuar na luta diária, me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela capacidade que me foi concedida para realização deste trabalho

À minha querida e amada família (Ramalho, Salete e Arthur) pelo amor, carinho, compreensão, doação, força, união, ensinamentos e apoio em todos os momentos felizes e difíceis.

Ao meu namorado Ibysson, pelas incansáveis palavras de força, pela paciência, companheirismo, carinho e amor.

A todos os meus parentes pela torcida e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães, pela orientação e confiança no meu trabalho, pelo exemplo de professora e pesquisadora e por todos os ensinamentos acadêmicos. Obrigada por acreditar em mim e por proporcionar a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariane Cajubá de Britto Lira pela co-orientação. Obrigada por acompanhar passo-a-passo o desenvolvimento deste trabalho, por cada palavra de incentivo e cada idéia discutida. Agradeço pela paciência, por ter acreditado e confiado em mim e por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Lagranha por ter trazido a ideia do trabalho, pela colaboração fundamental em todos os experimentos *in vivo* e as longas análises no citômetro de fluxo.

Ao Prof. Dr. Pabyton Cadena pela colaboração com o planejamento fatorial e pelo auxílio estatístico.

A todos os colegas e amigos do Grupo de Pesquisa de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamento pela colaboração, união, amizade e convívio durante estes dois anos de mestrado.

Aos mestrandos Ana Lygia, Katyane, Larissa, Laércio e Sarah pela convivência, pelos “desabafos” e momentos de descontração. Obrigada pelo apoio e companheirismo em todos os momentos.

Aos doutorandos Camila, Catarine, Círia, Fábio, Milena, Rafaela, Rebecca, Taciana e Thiers pelos ensinamentos, apoio e colaboração.

A aluna de iniciação científica Bárbara Nayane pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), em especial aos do laboratório de Bioquímica pela convivência em laboratório.

A todos os funcionários do LIKA, pelo auxílio e atenção prestados.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami e Laboratório de Fisiologia da Nutrição (Departamento de Nutrição) pela disponibilidade da infraestrutura e suporte dado a este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o curso deste trabalho.

A todos, que de forma direta e indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A glutamina é um aminoácido que apresenta, dentre varias funções, uma importante influência nas células do sistema imunológico. Em determinadas situações, a sua síntese não supre a demanda exigida pelo organismo, repercutindo na imunodeficiência. Assim, a suplementação da glutamina vem sendo utilizada para ativar o sistema imune e melhorar a recuperação de pacientes. No entanto, a administração da mesma na sua forma livre pode promover nefropatias, principalmente em pacientes diabéticos. Deste modo, a utilização da glutamina encapsulada em nanosistemas, como os lipossomas convencionais, pode ser uma alternativa para reduzir os possíveis efeitos tóxicos, além de promover uma potencialização na eficácia terapêutica, uma vez que estes lipossomas são reconhecidos e capturados pelas células do sistema imune. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi nanoencapsular a glutamina em lipossomas convencionais, desenvolver um método analítico em CLAE para a quantificação da glutamina encapsulada e avaliar a viabilidade dos neutrófilos. As formulações foram preparadas utilizando a técnica de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação e caracterizadas segundo pH, tamanho das vesículas, potencial zeta e eficiência de encapsulação, além de avaliação da estabilidade ao armazenamento. Um planejamento fatorial foi realizado com a finalidade de estudar a influência da concentração dos constituintes lipídicos e da glutamina na formulação e assim escolher a preparação ideal. A viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo, a partir de neutrófilos provenientes de ratos wistar sadios, 2h após administração por via intraperitoneal de glutamina livre (Gln), nanoencapsulada em lipossomas (LG), lipossomas branco (LB) e solução salina como controle (C). A formulação escolhida apresentou tamanho médio de  $114,65 \pm 1,82$  nm com índice de polidispersão de  $0,300 \pm 0,00$  e pH 7,69. O potencial zeta foi positivo ( $36,30 \pm 1,38$  mV) e a eficiência de encapsulação foi de  $39,49 \pm 0,74$  %. O método cromatográfico desenvolvido foi eficiente para a quantificação da glutamina encapsulada, obtendo pico no tempo de retenção em torno de 3,8 minutos. Após tratamento, apesar dos neutrófilos permanecerem viáveis em todos os grupos testados, uma maior viabilidade foi observada no grupo tratado com glutamina encapsulada em relação ao grupo controle (20%). Assim, a glutamina encapsulada em lipossomas é capaz de manter os neutrófilos viáveis, tornando-se uma nova e promissora estratégia para aumentar a resposta em situações de imunodeficiência, com possível redução de sua toxicidade.

Palavras-chave: Glutamina. Lipossomas convencionais. Neutrófilos. Viabilidade celular.

## ABSTRACT

Glutamine is an amino acid that has, among several functions, an important influence on immune cells. In certain situations, their synthesis does not supply the demand required by the body, resulting in immunodeficiency. Thus, glutamine supplementation has been used to activate the immune system and improve the recovery of patients. However, the administration in its free form can promote kidney disease especially in diabetic patients. In that way, the use of glutamine encapsulated into nanosystems, such as conventional liposomes, may be an alternative to reducing possible toxic effects, and promote a potentiation in therapeutic efficacy, since these liposomes are recognized and captured by the immune system cells. In this context, the goal of this research work was nanoencapsulate glutamine into conventional liposomes, develop an analytical HPLC method for the quantification of encapsulated glutamine and evaluate the viability of neutrophils. Liposomes were prepared using the technique of thin-film hydration followed by sonication and characterized according to pH, size, zeta potential and encapsulation efficiency. The stability of liposomes was evaluated for at least 45 days. An experimental design was performed to study experimental conditions such as the concentration of lipids and glutamine, as well as choose the ideal preparation. Viability of neutrophils, from healthy wistar rats, was assessed, by using a flow cytometer, 2 hours after intraperitoneal administration of free glutamine (Gln), glutamine-loaded liposomes (GL), unloaded-liposome (UL) and saline solution as control (C). The chosen formulation presented a mean diameter of  $114.65 \pm 1.82$  nm with a polydispersion index of  $0.30 \pm 0.00$ , and pH 7.69 . The zeta potential was positive ( $36.30 \pm 1.38$  mV) and the encapsulation efficiency was  $39.49 \pm 0.74$  %. The chromatographic method developed was efficient for the quantification of encapsulated glutamine, obtaining a peak at retention time around 3.8 minutes. After treatment, although neutrophils remain viable in all groups, greater viability was observed in the group treated with glutamine encapsulated compared with control group (20%). Thus, glutamine encapsulated into liposomes is able to maintain viable neutrophils becoming a new and promising strategy to increase the response in immunodeficiency conditions, with a possible reduction of glutamine toxicity.

Keywords: Glutamine. Conventional liposomes. Neutrophils. Cell viability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

<b>Figura 1</b> - Estrutura química da glutamina. ....	18
<b>Figura 2</b> - Produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo..	20
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática das funções reguladoras da glutamina. ....	22
<b>Figura 4</b> - Farmacocinética comparativa de formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada.....	26
<b>Figura 5</b> - Esquema ilustrativo de um lipossoma, demonstrando compartimentos aquosos internos contendo fármacos hidrofílicos e fármacos lipofílicos retidos na bicamada lipídica.	28
<b>Figura 6</b> - Estrutura química e representação esquemática do fosfolipídio. ....	29
<b>Figura 7</b> - Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas. ....	30
<b>Figura 8</b> - Classificação dos lipossomas quanto à constituição.....	32

### ARTIGO

<b>Fig. 1.</b> Chromatographic separation and detection of glutamine. Glutamine in solvent mixture with retention time of 3.8 min (A). Comparison between glutamine loaded-liposomes (---) and unloaded-liposomes (—) (B). ....	46
<b>Fig. 2.</b> Scatter plot of the formulations produced using a 24-1 fractional experimental design and effects of response variables polydispersity index (PDI) and encapsulation efficiency (%). Formulation number indicated above, the mean size (nm) was also indicated. ....	50
<b>Fig. 3.</b> Pareto chart obtained from the two-level 2 <sup>2</sup> full experimental design with main effects and interactions of the formulation parameters (PC - phosphatidilcoline and CH - cholesterol) on the mean size (nm) of the liposomes. Dashed line: statistical significance (p<0.05).....	50
<b>Fig. 4.</b> Effect of glutamine on neutrophil membrane integrity. The percentage of neutrophils viable (A) and unviable (B) against different treatments by intraperitoneal route. The values are presented as means ± SD of three determinations from three animals in each group. Average with different letters differs statistically by Tukey test (p<0.05). Glutamine loaded-liposomes (GL), glutamine in solution (Gln), unloaded-liposomes (UL) and saline solution as control (C). ....	52

**Fig. 5.** Comparison between glutamine in solution administered by oral (Gln-GAV) and intraperitoneal route (Gln-IP). The values are presented as means  $\pm$  SD of three determinations from three animals in each group. Average with different letters differs statistically by Tukey test ( $p < 0.05$ ). ..... 52

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

<b>Table 1.</b> Experimental designs and physicochemical properties of glutamine-loaded liposomes.....	49
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ATP	Trifosfato de adenosina
CH	Colesterol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Gln	Glutamina
LUV	Large unilamellar vesicles (Vesículas unilamelares grandes)
MLV	Multilamellar large vesicles (Vesículas multilamelares grandes)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PDI	Índice de polidispersibilidade
PC	Fosfatidilcolina de soja
PM	Peso molecular
SUV	Small unilamellar vesicles (Vesículas unilamelares pequenas)
OCT	Octadecilamina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Glutamina</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Aspectos históricos</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Considerações bioquímicas e metabólicas</b>	<b>18</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Funções da glutamina</b>	<b>21</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Glutamina e o sistema imune</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Nanotecnologia e sistemas de liberação controlada</b>	<b>25</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Lipossomas</b>	<b>27</b>
<b>2.2.1.1</b>	<b>Classificação dos lipossomas</b>	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>Planejamento fatorial</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>60</b>

## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

A glutamina (Gln) é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, sendo também encontrada em concentrações relativamente elevadas em outros tecidos corporais (NEWSHOLME et al., 2003a). Sua síntese acontece primariamente nos músculos, assim como nos pulmões, fígado e cérebro. Por outro lado, seu consumo ocorre nos rins, nas células do sistema imunológico e do trato gastrointestinal. O fígado é o único órgão que tanto consome como sintetiza glutamina (LABOW; SOUBA, 2000). Apesar de ser classificada como não essencial, atualmente a glutamina tem sido considerada como condicionalmente essencial, uma vez que em determinadas situações críticas, como cirurgias, traumas e exercícios físicos exaustivos, sua síntese não supre a demanda exigida pelo organismo podendo repercutir na imunocompetência, levando ao aumento da incidência de infecções (ALBINO JUNIOR et al., 2004; GLEESON, 2008; CRUZAT; PETRY ; TIRAPEGUI, 2009).

A proliferação e o desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, são as principais funções que a glutamina esta envolvida (GLEESON, 2008). É utilizada em altas taxas pelos linfócitos como fonte de energia, fornecendo condições ideais para a biossíntese de nucleotídeos e, conseqüentemente, para a proliferação celular. Os leucócitos são essencialmente dependentes da síntese de glutamina no músculo esquelético e liberação no sangue para satisfazer suas necessidades metabólicas, visto que não possuem a enzima glutamina sintetase, responsável por catalisar a síntese de glutamina a partir da amônia e glutamato (ARDAWI; NEWSHOLME, 1983). Ademais, é importante como componente de proteínas, no transporte da amônia entre os tecidos, na doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, na regulação acidobásica, entre outros (CURI et al., 2005a; GLEESON, 2008; CRUZAT; PETRY ; TIRAPEGUI, 2009).

Eventos de estresse metabólico ou enfermidades, tais como: dengue, câncer, AIDS, queimaduras, cirurgias, exercícios físicos intensos e prolongados são algumas situações em que se observa que o consumo de glutamina excede a capacidade de síntese corporal (LACEY; WILMORE, 1990). Estudos têm demonstrado que a diminuição da concentração de glutamina no plasma ou no meio intracelular pode ser parcialmente responsável pela depressão da função imunológica e a administração de L-glutamina na forma parenteral é uma alternativa para atenuar esta redução (FURST, 2001; LAGRANHA et al., 2008a; FAN et al.,

2009), proporcionando uma melhoria na recuperação de pacientes com estas doenças (WILMORE, 2001; FLÄRING et al., 2003).

Apesar de apresentar benefícios em algumas situações, estudos mostram que a glutamina pode promover nefropatias e insuficiência renal, principalmente em pacientes diabéticos (CURI et al., 2005a; ALBA-LOUREIRO et al., 2010; GALERA et al., 2010). Apresenta solubilidade limitada e é instável em solução, podendo sofrer degradação dependo da temperatura, do pH e da concentração aniônica (D'SOUZA; POWELL-TUCK, 2004). Uma alternativa para reduzir estas limitações físico-químicas, reduzir os efeitos adversos e aumentar o efeito terapêutico é o desenvolvimento de uma forma farmacêutica capaz de diminuir os possíveis efeitos tóxicos, bem como direcionar o material bioativo para um sítio de ação específico, aumentando desta forma a eficácia terapêutica. Dentre as várias formas farmacêuticas que podem ser utilizadas, encontram-se os sistemas classificados como de liberação controlada incluindo, por exemplo, os lipossomas, que oferecem vantagens na tentativa de ultrapassar estas limitações.

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios, separadas por meio aquoso, que apresentam a capacidade de incorporar uma diversidade de compostos sejam eles hidrofílicos ou hidrofóbicos (BRANDL; GREGORIADIS, 1994). Os lipossomas classificados como convencionais, ou seja, aqueles que apresentam em sua composição fosfolipídio, colesterol e um lipídio com carga, caracterizam-se por serem rapidamente reconhecidos e capturados pelo sistema imunológico (TORCHILIN, 2005).

Neste contexto, a utilização de lipossomas convencionais contendo glutamina torna-se uma alternativa promissora ao direcionar este aminoácido aos neutrófilos, melhorando sua atividade, bem como minimizando a nefrotoxicidade causada pela glutamina livre.

***REVISÃO DE LITERATURA***

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Glutamina

#### 2.1.1 Aspectos históricos

As primeiras evidências da glutamina como molécula biologicamente importante foram descobertas por Hlasiwetz e Habermann em 1873. Este aminoácido foi isolado pela primeira vez por Schulze e Bosshard, em 1883, a partir de alguns tipos de plantas, mas apenas no ano de 1932, Damodaran e colaboradores conseguiram obter a glutamina e outros aminoácidos a partir de hidrolisados protéicos (LACEY; WILMORE, 1990).

Os primeiros estudos sobre a biossíntese de glutamina foram realizadas pelo Prof. Hans Krebs em 1935 usando cobaia e rins de rato, relatando o papel metabólico fundamental deste aminoácido para as funções celulares. A influência na sobrevivência e proliferação celular *in vitro* foi primeiramente relatado por Ehrensvarð e colaboradores em 1949. No entanto, apenas no ano de 1955, Eagle e colaboradores descreveram detalhadamente a ação da glutamina ao utilizar células HeLa e fibroblastos de camundogos isolados e cultivados em meio sem glutamina, demonstrando, assim, sua importância na sobrevivência e proliferação celular. Os pesquisadores observaram que ao adicionar glutamina em concentrações crescentes ocorre um aumento de resposta à dose na proliferação celular (EAGLE, 1955; HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

Posteriormente, Ardawi e Newsholme, em 1982, relataram o papel crítico da glutamina no fornecimento de energia e de precursores biossintéticos para a proliferação dos linfócitos e macrófagos. Trabalhos realizados por Pithon-Curi e colaboradores (1997) demonstraram a função deste aminoácido em neutrófilos de rato, comprovando que a taxa de utilização de glutamina nestas células é maior que a de glicose. Observaram ainda que a formação de amônia representa 27% da utilização de glutamina em neutrófilos e que a conversão de glutamina em glutamato, aspartato, alanina e lactato corresponde à 84% do total de aminoácidos utilizados por estas células.

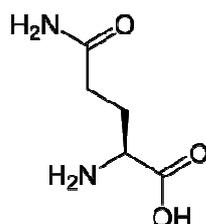
Outros trabalhos foram realizados com diferentes tipos de células (eritrócitos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células HeLa) demonstrando que o desenvolvimento celular pode ser aumentado e as estruturas e funções celulares mantidas em meios de cultura

contendo glutamina (CURI et al., 2005a). Além disso, um crescente interesse em novos trabalhos estão sendo desenvolvidos com a finalidade de verificar os efeitos agudos e crônicos da suplementação de glutamina em situações catabólicas como cirurgias, AIDS, dengue, câncer e exercícios físicos intensos e prolongados (D'SOUZA; POWELL-TUCK, 2004; ROGERO et al., 2006; GLEESON 2008).

### 2.1.2 Considerações bioquímicas e metabólicas

A glutamina é um L- $\alpha$ -aminoácido (ácido 2-amino-4-carbamoil-butanóico; C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; PM= 146,15 kDa) de cinco carbonos neutros, contendo dois grupos carboxílicos, sendo um ligado a um nitrogênio, formando um grupamento amida (Figura 1). De acordo com o grupamento R, quando em pH fisiológico, é classificada como um aminoácido neutro. Apresenta ponto de fusão em torno de 185 °C, caráter hidrofílico, sendo praticamente insolúvel em solventes orgânicos, como metanol, etanol, clorofórmio, acetona, benzeno e acetato de etila. Sua solubilidade em água é de 48 g/L H<sub>2</sub>O à 30 °C (pKa<sub>1</sub> = 2,17 e pKa<sub>2</sub> = 9,13) (O'NEIL, 2006; FÜRST, 2001; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003). A glutamina apresenta-se instável na forma livre, podendo sofrer degradação dependendo da temperatura, do pH e da concentração aniônica (D'SOUZA; POWELL-TUCK, 2004).

**Figura 1** - Estrutura química da glutamina.



Fonte: <http://totalhealth.hubpages.com>.

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, representando 30-35% dos aminoácidos nitrogenados (HALL; HEEL; McCAULEY, 1996). Sua concentração plasmática é de 0,5 a 0,9 mmol/L. Segundo Newsholme e colaboradores (2003b), a concentração intracelular da glutamina varia entre 2 e 20 mM (dependendo do tipo de célula). Indivíduos saudáveis pesando aproximadamente 70 kg apresentam cerca de 0,08

kg de glutamina distribuída por diversos tecidos corporais (D'SOUZA; POWELL-TUCK, 2004).

Por ser produzida naturalmente pelo organismo, a glutamina é classificada como um aminoácido não essencial ou dispensável. Entretanto, atualmente essa denominação tem sido questionada. Nas condições críticas em que a síntese da mesma não supre a demanda exigida pelo organismo, como em cirurgias, traumas, sepse, câncer, AIDS, queimaduras e exercícios físicos exaustivos, vários órgãos são afetados, principalmente os que estão envolvidos na síntese e liberação deste aminoácido (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009). Diante da sua importância metabólica, é fundamental que haja constante fornecimento de glutamina para os tecidos. Dessa forma, evidências recentes têm indicado a reclassificação da glutamina de um aminoácido dispensável para um aminoácido condicionalmente indispensável e essencial (GLEESON, 2008; CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

A homeostase da glutamina é controlada pelo equilíbrio entre sua produção e a utilização no interior das células e nos tecidos. O transporte da glutamina para dentro e para fora das células desempenha um papel importante nesse processo, assim como o equilíbrio entre a sua formação e catabolismo depende diretamente da atividade das enzimas glutamina sintetase e glutaminase (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001; CURI et al., 2007; NOVELLI et al., 2007).

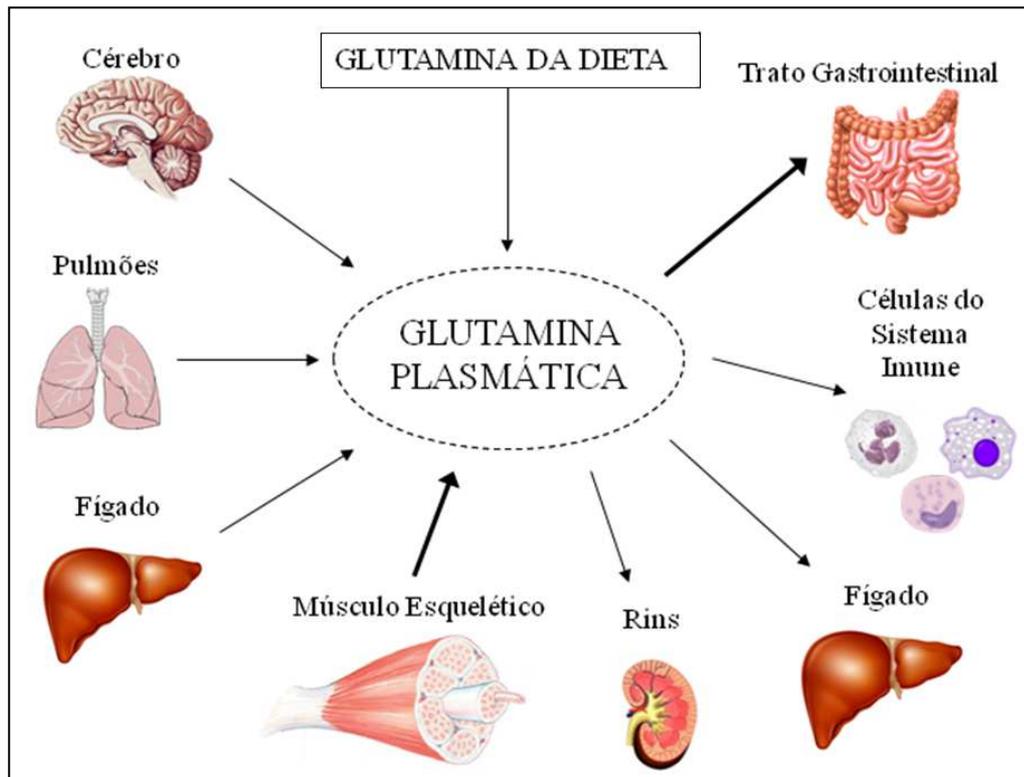
A glutamina sintetase é uma aminotransferase amplamente distribuída entre os organismos vivos, sendo sua atividade fundamental para a manutenção da vida de microrganismos e animais (HISCOCK ; PEDERSEN, 2002). Ela é responsável por catalisar a conversão de glutamato em glutamina, utilizando amônia como fonte de nitrogênio e trifosfato de adenosina (ATP) como fonte de energia (NOVELLI et al., 2007). A maior atividade desta enzima é encontrada principalmente dentro do citosol das células no músculo esquelético e nos pulmões, considerados como doadores de glutamina (HALL; HEEL; McCAULEY, 1996; LABOW; SOUBA 2000). Demais órgãos, como o fígado, cérebro e tecido adiposo, também estão envolvidos na síntese desse aminoácido (CRUZAT et al., 2007).

O tecido muscular esquelético é considerado o principal responsável pela síntese, estoque e liberação da glutamina. Sua taxa de síntese é de aproximadamente 50 mmol/h, sendo maior que qualquer aminoácido, e é responsável por armazenar 90% de toda a glutamina corporal (NEWSHOLME et al., 2003a ; GLEESON, 2008). Pesquisas demonstram

que a concentração plasmática de glutamina apresenta um decréscimo superior à 50% do nível normal nos casos de estresse metabólico (LACEY; WILMORE 1990; SMITH; WILMORE, 1990).

Por outro lado, a enzima responsável por catalisar a hidrólise do grupo  $\gamma$ -amido da glutamina convertendo-a em glutamato e íon amônio, é a glutaminase, presente no interior da membrana mitocondrial (COSTER; MCCAULEY; HALL, 2004). As células do túbulo renal, células da mucosa intestinal e do sistema imune apresentam elevada atividade dessa enzima, sendo assim considerados tecidos consumidores de glutamina (LABOW; SOUBA, 2000) (Figura 2). O fígado é considerado um tecido regulador visto que expressa atividade da enzima glutamina sintetase como também da glutaminase (HALL; HEEL; MCCAULEY, 1996). Esta regulação ocorre de acordo com a necessidade de utilização da glutamina, assim como pelo baixo nível de insulina e/ou altos níveis de glucagon (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001).

**Figura 2** - Produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo.



Legenda: Glutamina produzida/consumida (→); glutamina consumida/produzida em maior quantidade (⇨).

Fonte: Elaborado pela autora COSTA, L. C.

### 2.1.3 Funções da glutamina

A importância fisiológica da glutamina promovendo e mantendo a função celular é amplamente aceita. Seu papel na sobrevivência e proliferação celular é descrito desde 1935 por Krebs.

A glutamina é um aminoácido indispensável para o funcionamento de um grande número de órgãos, desempenhando funções primordiais no equilíbrio fisiopatológico do organismo (Figura 3). É conhecida como um importante transportador não tóxico de nitrogênio entre os tecidos e de amônia da periferia para os órgãos viscerais. Ao alcançar o órgão-alvo, a amônia pode ser regenerada para excreção ou ureogênese, promovendo, dessa forma, a detoxificação do organismo (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003).

Desempenha um papel importante como fonte de carbono e nitrogênio para a síntese de metabólitos intermediários e macromoléculas, podendo ainda ser utilizada na síntese de cofatores como glucosamina e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>); na síntese de ácidos nucléicos, participando da produção dos nucleotídeos purina e pirimidina; e na síntese protéica, servindo como precursor de outros aminoácidos (LABOW; SOUBA, 2000; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003).

Evidências sugerem que a glutamina desempenha uma função importante no controle redox das células através do fornecimento de constituintes para a síntese de glutathione (BRENNAN et al., 2003), contribuindo indiretamente para síntese da mesma por promover a troca transmembrana do glutamato intracelular (derivado da glutamina) por cisteína extracelular, ou outro componente da glutathione. Este tripeptídeo representa a maior fonte de redutores celulares, protegendo a célula contra lesões oxidativas. Essa ação é observada em pacientes cirúrgicos que podem apresentar estresse oxidativo elevado em alguns tecidos (LABOW; SOUBA, 2000; FLARING et al., 2003).

Alta proporção da glutamina da dieta é utilizada pelas células de divisão rápida da mucosa intestinal, melhorando a sua permeabilidade e integridade. Como também fornece energia aos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno (NEWSHOLME et al., 2003a; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003).

A elevada taxa de utilização de nitrogênio por linfócitos, macrófagos e neutrófilos e o aumento dessa demanda quando estas células são estimuladas, sugere que o fornecimento da glutamina pode ser importante para uma resposta imunológica eficiente (NEWSHOLME et



#### 2.1.4 Glutamina e o sistema imune

No contexto deste trabalho, a ação da glutamina frente às células do sistema imune é de grande interesse e apropriada para o foco do estudo e, por isso, deve ser detalhada.

O sistema de defesa celular do organismo é composto pelos leucócitos e fagócitos mononucleares, responsáveis pelas respostas imune e inflamatória. Os leucócitos são agrupados em duas categorias: os leucócitos mononucleares (linfócitos, plasmócitos e monócitos) e polimorfonucleares/granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Os fagócitos mononucleares são representados pelos macrófagos (ZAGO et al., 2004).

Os linfócitos são pequenas células arredondadas, com tamanho em torno de 6 a 15  $\mu\text{m}$ , núcleo grande e citoplasma escasso. Estas células recirculam através do sangue e/ou canais linfáticos em estado de repouso até serem estimulados à proliferação por antígenos ou microorganismos invasores (ZAGO et al., 2004). No entanto, para responder rapidamente ao desafio imunológico, os linfócitos necessitam de energia, sendo esta obtida através da utilização de alguns aminoácidos, glicose e ácidos graxos (NEWSHOLME et al., 1999).

Os macrófagos são formados a partir dos monócitos, precursores imaturos presentes na circulação sanguínea. Diferentemente dos linfócitos, os macrófagos são células terminais diferenciadas que perderam sua capacidade de proliferação. No entanto, permanecem células ativas, caracterizadas por alta capacidade fagocítica. Após estímulo inflamatório ou imunológico, os macrófagos recrutados acumulam-se em grande número no sítio específico de ação, liberando enzimas e radicais livres, além de fagocitar o organismo invasor (NEWSHOLME, 2001 ; ZAGO et al., 2004). Ao analisar a fonte de energia utilizada por estas células, foi comprovado que quando em cultura celular, os macrófagos ativados utilizam apenas a glutamina (6  $\mu\text{mol}$ ) e arginina (3  $\mu\text{mol}$ ) dentre os aminoácidos disponíveis (NEWSHOLME et al., 1999).

Os neutrófilos apresentam-se como uma célula multilobulada de cromatina purpúrea escura e densa, com 9 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Dos neutrófilos presentes no organismo, cerca de 90% estão localizados, como células recém diferenciadas, no interior da medula óssea; os demais, estão circulando no sangue ou ao longo do endotélio vascular (ZAGO et al., 2004). Os neutrófilos atuam como primeira linha de defesa celular no sangue e nos sítios de infecção, removendo e destruindo o material estranho através da fagocitose. Para isso, primeiramente recebem a informação da existência da infecção e então migram para o seu sítio. Uma vez no

local de ação, os neutrófilos podem tanto fagocitar, como liberar para o meio extracelular seus granulos ricos em enzimas (NEWSHOLME et al., 1999; ZAGO et al., 2004).

Diversas pesquisas têm demonstrado que a glutamina é utilizada em elevadas concentrações pelas células do sistema imune, especialmente linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Este aminoácido atua melhorando muitos parâmetros funcionais nestas células, como a proliferação de linfócitos T, a diferenciação dos linfócitos B, a fagocitose dos macrófagos, a apresentação de antígeno e a produção de citocinas, além da apoptose e produção de superóxido pelos neutrófilos (SPITTLER et al., 1995, 1997; PITHON-CURI et al., 1997 ; CALDER; YAQOOB, 1999).

Devido ao fato dos neutrófilos utilizarem altas concentrações de glutamina em comparação às demais células do sistema imune, pesquisadores tem analisado a influência deste aminoácido em parâmetros celulares de neutrófilos humanos e de ratos. Pithon-Curi e colaboradores (2003) avaliaram o efeito da glutamina na condensação da cromatina, na fragmentação do DNA, na externalização de fosfatidilserina e nas alterações do potencial de membrana mitocondrial, além da influência na fagocitose dos neutrófilos. Demonstraram que a glutamina apresenta um efeito protetor na integridade mitocondrial, além de reduzir apoptose espontânea em neutrófilos humanos e de ratos.

Por sua vez, Lagranha e colaboradores (2004, 2008a) analisaram o efeito protetor da glutamina frente a apoptose de neutrófilos de ratos submetidos a exercício físico intenso e comprovaram que a administração de 1 g/Kg de glutamina antes do exercício preveniu parcialmente a apoptose induzida por exercício, possivelmente devido ao efeito protetor sobre a função mitocondrial.

Nesse contexto, uma promissora alternativa para explorar as vantagens da glutamina e direcioná-la de uma forma mais eficiente aos neutrófilos, diminuindo a toxicidade e os efeitos adversos relacionados com a biodistribuição não específica, é a encapsulação em nanossistemas, mais especificamente em lipossomas convencionais, já que estes são rapidamente reconhecidos e capturados pelas células imunológicas.

A nanoencapsulação da glutamina vem despertando interesse, fato observado em trabalho recentemente publicado por Zhong e Shah (2013). Os autores desenvolveram micropartículas contendo L-glutamina para liberação entérica, utilizando um polímero como revestimento superficial, com o intuito de minimizar a degradação gástrica de compostos bioativos.

## 2.2 Nanotecnologia e sistemas de liberação controlada

O termo Nanotecnologia advém da palavra “nano” que significa “anão” em grego e representa a bilionésima parte do metro. Nanotecnologia pode ser definida como a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias com materiais a nível atômico, molecular ou macromolecular em escala nanométrica (0,1 a 100 nanômetros) (GRIMM; SCHEINBERG, 2011). O princípio dessa nova ciência é que os materiais na escala nanométrica podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores. Essas nanopartículas são projetadas na mesma escala de tamanho dos receptores, canais, ligantes, efetores e ácidos nucleicos e podem ser modificadas para alcançarem um determinado efeito fisiológico (MCNEIL, 2009).

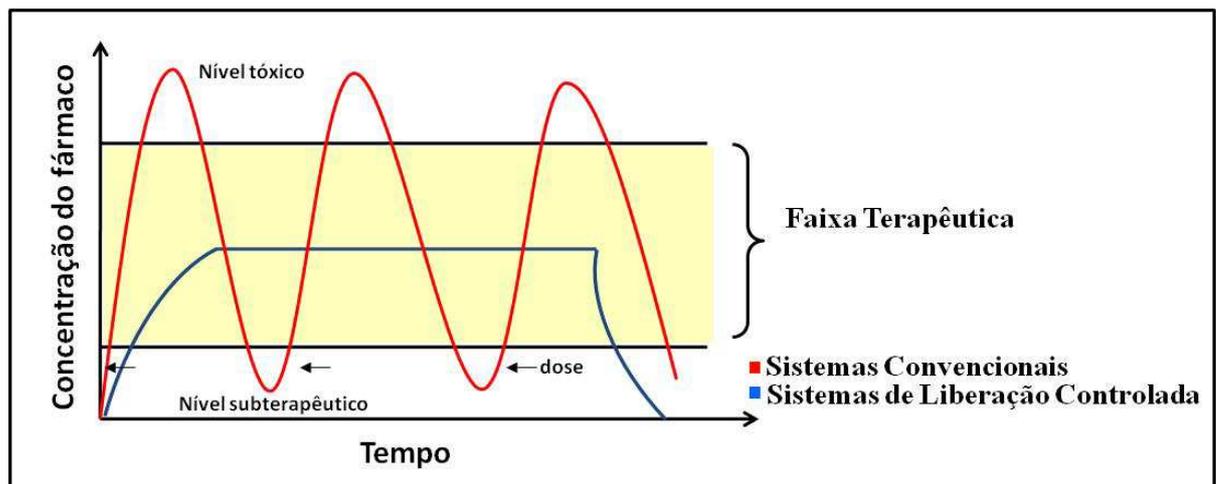
A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, desde setores de energia e eletrônica até a indústria farmacêutica (MU; SPRANDO, 2010; MOZAFARI et al., 2008).

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos visando melhorar sua eficácia terapêutica (SAKATA et al., 2007). Dentre os sistemas nanométricos, as nanopartículas poliméricas, os lipossomas, as micelas, os nanotubos de carbono e os dendrímeros, vêm sendo bastante estudados (FARAJI; WIPF, 2009).

A tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, ou de outras substâncias bioativas, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um incremento notório nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de liberação controlada. Formulações baseadas na escala nanométrica têm sido indicadas atualmente como a principal forma de aumentar o índice terapêutico via direcionamento do fármaco para o sítio de ação. Os nanosistemas possuem propriedades físicas (tamanho, carga e biocompatibilidade) que podem ser manipuladas para aumentar a meia vida de circulação do fármaco e o seu acúmulo no local de ação, principalmente quando estão associadas com moléculas sinalizadoras (FARRELL et al., 2011).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos caracterizam-se por serem capazes de liberar o princípio ativo de forma constante e controlada dentro de sua faixa terapêutica por um determinado período de tempo, eliminando as possíveis variações no decorrer do tratamento como os efeitos tóxicos e falta de efetividade da substância ativa (Figura 4). Tais sistemas oferecem numerosas vantagens quando comparados aos sistemas convencionais, ou seja, aqueles de liberação não-controlada, incluindo por exemplo: a) maior controle da liberação do princípio ativo, diminuindo o aparecimento de doses tóxicas e subterapêuticas; (b) utilização de menor quantidade do princípio ativo, resultando em menor custo; (c) maior intervalo de administração; (e) melhor aceitação do tratamento pelo paciente; (f) possibilidade de direcionamento do princípio ativo para seu alvo específico (TOCHILIN, 2005).

**Figura 4** - Farmacocinética comparativa de formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada.



Fonte: LIRA, 2007.

Os principais sistemas de liberação controlada são as micropartículas (microesferas e microcápsulas), nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas), dendrímeros, micelas, nanotubos e lipossomas (VERMA; GARG, 2001). Dentre estes, os lipossomas despertam grande interesse para pesquisa, aplicações analíticas e terapêuticas.

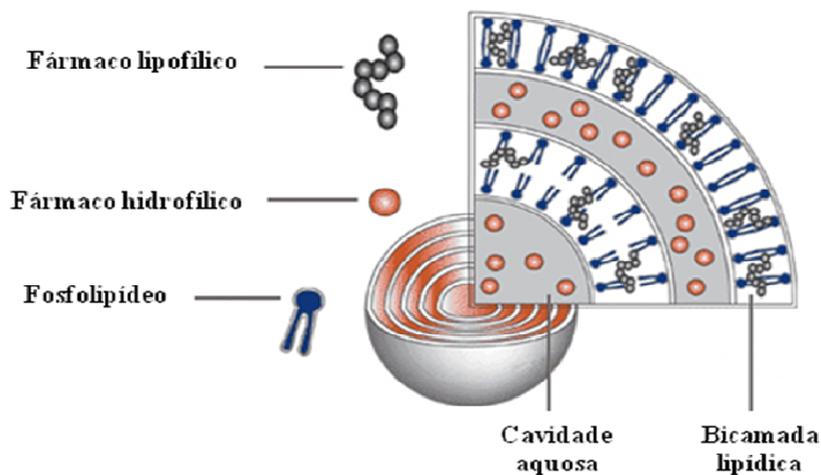
### **2.2.1 Lipossomas**

Alec Bangham, em meados de 1960, observou que fosfolipídios em soluções aquosas podem formar estruturas fechadas em bicamadas, os lipossomas. A partir de sua descoberta, estes nanossistemas passaram a ser aplicados em numerosos estudos clínicos (TORCHILIN, 2005). Imediatamente após o trabalho de Bangham, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas. O sucesso na incorporação de enzimas em lipossomas despertou também o interesse da comunidade científica para a sua aplicação médica e farmacológica (SANTOS; CASTANHO, 2002).

A utilização dos lipossomas como carreadores de fármacos foi proposta e demonstrada apenas na década de 70 por Gregory Gregoriadis. Ele começou a investigar a capacidade de encapsulação e posterior liberação de fármacos por vesículas lipossomais, propondo pela primeira vez, a utilização de lipossomas como sistema transportador de fármacos (GREGORIADIS, 1995). Desde então estas vesículas tem sido usadas para uma série de aplicações farmacêuticas (PAROOEI et al., 2011; YOSHIZAWA et al., 2011).

Os lipossomas caracterizam-se como vesículas esféricas, de tamanhos variados (em escalas de nm e  $\mu$ m), constituídas de uma ou mais bicamadas concêntricas de fosfolipídios, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (BRANDL; GREGORIADIS, 1994). Essa conformação permite incorporar uma variedade de compostos com características hidrofílicas e/ou lipofílicas (Figura 5). A incorporação dentro da vesícula lipídica promove uma proteção ao fármaco encapsulado contra possíveis processos de degradação seja, por exemplo, pela luz e ou por outros processos físico-químicos (TORCHILIN, 2005). Ademais, os lipossomas funcionam como um depósito a partir do qual o fármaco encapsulado é liberado lentamente ao longo do tempo, propriedade que permite manter o nível terapêutico por períodos prolongados (STORM ; CROMMELIN, 1998).

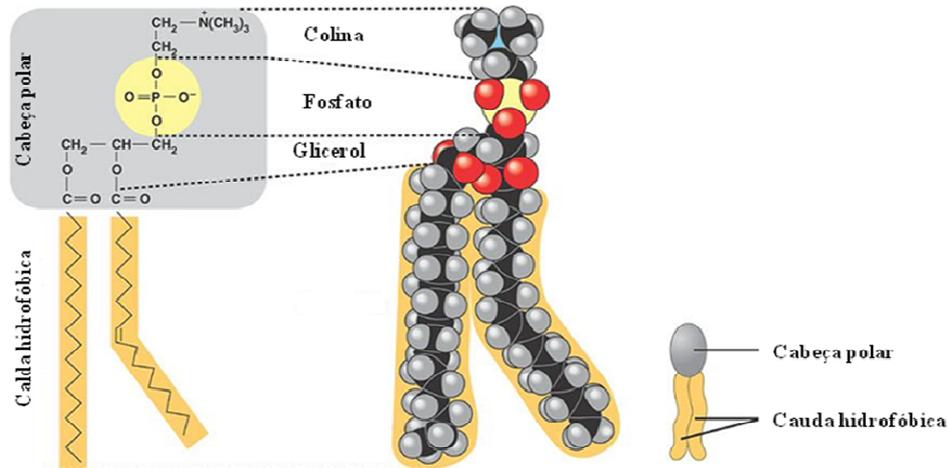
**Figura 5** - Esquema ilustrativo de um lipossoma, demonstrando compartimentos aquosos internos contendo fármacos hidrofílicos e fármacos lipofílicos retidos na bicamada lipídica.



Fonte: modificado de <http://nanogreenshawaii.com/supersorb/nanosorb.jpg>.

Os lipossomas são sistemas altamente versáteis, cuja superfície, tamanho, lamelaridade, volume e composição (lipídica e do compartimento aquoso interno) podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. Além disso, são biodegradáveis e biocompatíveis (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

As bicamadas lipídicas que compõem os lipossomas assemelham-se às membranas biológicas e podem ser preparadas a partir de lipídios naturais ou sintéticos (VEMURI; RHODES, 1995). Os lipídios estruturais mais comumente empregados na preparação de lipossomas são os fosfolipídios, moléculas anfipáticas, que possuem uma “cabeça” polar constituída pelo ácido fosfórico e uma “cauda” hidrofóbica composta por ácidos graxos de cadeia longa (Figura 6). O ácido fosfórico pode ser esterificado pela colina, serina, amina e glicerol, dando origem aos lipídios mais utilizados nas formulações lipossomais como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilamina e fosfatidilglicerol, respectivamente (VEMURI; RHODES, 1995; BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007). Estes alcoóis conferem diferentes propriedades aos lipossomas visto que originam cadeias de diferentes tamanhos e graus de saturação (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

**Figura 6** - Estrutura química e representação esquemática do fosfolípídio.

Fonte: modificado de avonapbio.pbworks.com.

Outro componente lipídico presente nas formulações lipossomais é o colesterol. Este é um componente relevante visto que influencia na fluidez e deformação da bicamada lipídica, diminuindo a permeabilidade e o extravasamento do fármaco encapsulado, permitindo, assim, a produção de lipossomas mais estáveis (SHARMA; SHARMA, 1997). Lipídios apresentando carga efetiva negativa ou positiva podem também ser incluídos na composição da membrana. A presença de cargas nos lipossomas pode influenciar a taxa de incorporação de substâncias, produzir repulsão eletrostática entre as vesículas lipídicas impedindo a agregação/fusão das mesmas e modular o seu destino no organismo, visto que a presença de uma carga eletrostática na superfície dos lipossomas promove a interação com biomoléculas e células, sendo então removidos mais rapidamente da circulação do que os lipossomas neutros (LAVERMAN et al., 1999; BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

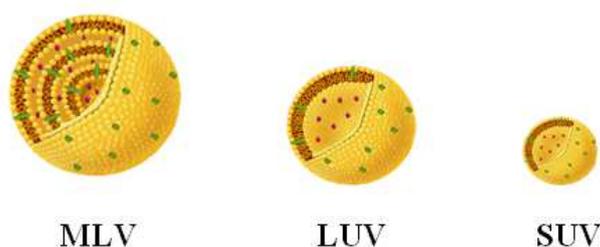
### 2.2.1.1 Classificação dos lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o tamanho das vesículas, o número de lamelas e quanto à composição química.

Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelar e multilamelar, respectivamente. As vesículas multilamelares grandes (MLV- Multilamellar Large Vesicles) possuem um tamanho em escala micrométrica (0,5-10  $\mu\text{m}$ ) e vários

compartimentos aquosos internos. Os lipossomas unilamelares apresentam um único compartimento aquoso interno e podem ser classificados como vesículas pequenas (SUV- Small Unilamellar Vesicles) apresentando tamanho em escala nanométrica (20 a 150 nm), ou como vesículas grandes (LUV- Large Unilamellar Vesicle) com tamanho variando de 500 a 1000 nm (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007) (Figura 7).

**Figura 7** - Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas.



Fonte: modificado de <http://www.encapsula.com/company.html>.

De acordo com a composição química, os lipossomas podem ser classificados em convencionais, furtivos (longa-circulação), sítio-específicos e catiônicos (Figura 8).

Os lipossomas convencionais foram os primeiros a serem desenvolvidos, sendo então conhecidos como lipossomas de primeira geração. São compostos basicamente por fosfolipídios e colesterol, podendo possuir um lipídio com carga (positiva ou negativa) com a finalidade de aumentar a estabilidade em suspensão. Estes lipossomas são caracterizados por apresentarem um curto tempo de circulação sanguínea. Quando administrados *in vivo*, geralmente através de administração intravenosa, tendem a se acumular rapidamente nas células fagocitárias do sistema mononuclear, sendo então removidas da circulação, principalmente pelo fígado e baço (STORM; CROMMELIN, 1998; TORCHILIN, 2005). Devido a essa elevada captura pelo sistema retículo-endotelial, os lipossomas convencionais são potentes candidatos a carrear fármacos que vão agir nos macrófagos. Da mesma forma, os neutrófilos se tornam células alvo, visto que constituem a primeira linha de defesa no plasma, sendo as primeiras células a identificar e fagocitar os organismos invasores (ANDREWS; GRIFFITHS, 2002).

Relatos na literatura descrevem aplicações bem sucedidas de lipossomas convencionais no direcionamento de agentes antimicrobianos aos macrófagos infectados,

assim como a utilização de imunomoduladores, aumentando a capacidade dos macrófagos em matar células neoplásicas e tornando-os resistentes contra microorganismos infecciosos. (BAKKER-WOUDENBERG et. al., 1993; BERGERS et al., 1995; PINTO-ALPHANDARY; ANDREMONT; COUVREUR, 2000). Por outro lado, a rápida eliminação dos lipossomas convencionais da circulação pelos macrófagos, compromete a aplicação desses lipossomas no tratamento de várias patologias, levando, então, ao desenvolvimento de lipossomas de longa duração na circulação sanguínea, conhecidos como furtivos (SANTOS; CASTANHO, 2002).

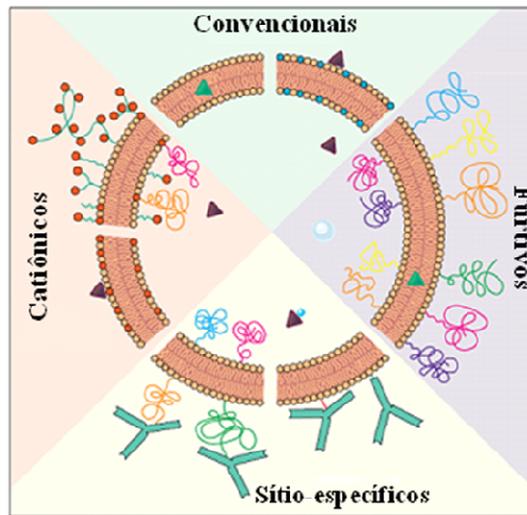
Os lipossomas furtivos ou de longa circulação, também conhecidos como *stealth liposomes*, são obtidos pelo revestimento da superfície lipossomal com componentes hidrofílicos naturais, como o monossialogangliosídeo GM1 e fosfatidilinositol, ou com polímeros hidrofílicos sintéticos inertes e biocompatíveis, especificamente os polietilenoglicóis. Este revestimento entérico previne a associação com as opsoninas no plasma, inibindo o processo de reconhecimento e captura pelo sistema fagocitário mononuclear, o que aumenta a sua biodisponibilidade na corrente sanguínea. Além disso, os lipossomas furtivos tem a capacidade de serem direcionados para tecidos e órgãos que possuem maior vascularização, como tumores, áreas de inflamação e infecção (TORCHILIN, 2005).

Na tentativa de aumentar o acúmulo de fármacos carregados por lipossomas nos tecidos e órgãos alvos, a pesquisa neste campo foi focada no desenvolvimento de lipossomas direcionados ou sítio-específicos (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007). Moléculas como anticorpos, proteínas, peptídeos, carboidratos e folato são ligadas covalentemente à superfície dos lipossomas, conferindo seletividade a tecidos e órgãos, direcionando o fármaco encapsulado ao sítio de ação desejado (EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Ainda assim, apesar da melhoria visando o aumento da eficácia, a maioria dos lipossomas sítio-específicos é acumulada no fígado como consequência do pouco tempo para interação entre a célula alvo e o vetor (TORCHILIN, 2005).

Desta forma, a combinação das propriedades de sítio especificidade e de longa circulação foram inseridas em um único sistema, obtendo assim, lipossomas com duas propriedades distintas. Esses nanocarreadores permitem que ocorra o acúmulo das vesículas em tecidos alvos mesmo quando há uma diminuição do fluxo sanguíneo no órgão ou mesmo quando a expressão do sítio de reconhecimento da molécula sinalizadora é baixa (TORCHILIN, 2005, 2006; IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006).

Por fim, os lipossomas catiônicos apresentam carga positiva na superfície e são utilizados para a terapia gênica. Embora os sistemas virais sejam, atualmente, os meios mais utilizados para este fim, sistemas não virais também têm sido desenvolvidos. Os lipossomas catiônicos são de fácil preparo, razoavelmente baratos e não imunogênicos. Os lipídios catiônicos interagem eletrostaticamente com o DNA, que possui carga negativa, neutralizando-o e condensando-o em uma estrutura mais compacta, com melhor ação quando comparado ao DNA encapsulado em lipossomas (STORM; CROMMELIN, 1998; TORCHILIN, 2006).

**Figura 8** - Classificação dos lipossomas quanto à constituição.



Fonte: modificado de STORM, G. & CROMMELIN, 1998.

Neste contexto, uma opção bastante eficaz para diminuir os efeitos tóxicos e otimizar a ação da glutamina, assim como direcioná-la para as células de defesa é a encapsulação deste aminoácido em lipossomas, mais especificamente nos convencionais, uma vez que estes são rapidamente reconhecidos e capturados pelas células imunológicas.

No desenvolvimento dos nanossistemas de liberação controlada, diversos fatores podem influenciar o sistema e pequena mudança em um fator pode alterar de forma significativa as características do sistema como um todo. Por essa razão, é importante que os parâmetros envolvidos nas preparações lipossomais sejam estudados. Uma eficiente forma de identificar as limitações e avaliar a influência dos constituintes nas características físico-químicas é a realização de um planejamento fatorial.

### **2.3 Planejamento fatorial**

O planejamento fatorial representa uma ferramenta estatística eficiente para se obter um modelo matemático multifatorial adequado para a otimização de formulações. Diferente dos experimentos tradicionais, em que a influência de um fator isolado é avaliada com a modificação somente do parâmetro em questão com os demais sendo mantidos constantes, com o planejamento fatorial é possível alterar mais de uma variável simultaneamente e ainda quantificar os efeitos causados pelas variáveis independentes e a interação entre elas (GOHEL; AMIN, 1998). Adicionalmente, permite avaliar os efeitos dos parâmetros da formulação lipossomal em variáveis respostas (como na eficiência de encapsulação, no tamanho de partícula, no índice de polidispersão, no potencial zeta, dentre outros) obtendo uma maior quantidade de informações com um menor número de experimentos e, conseqüentemente, redução no custo da produção. Dessa forma, é possível decidir quais os fatores mais importantes e otimizar o estudo para uma resposta desejada (GOHEL; AMIN, 1998; DILLEN et al., 2004; DAVIS et al., 2009).

Assim, no contexto deste trabalho, o desenvolvimento de lipossomas convencionais contendo glutamina pode tornar-se uma nova e promissora estratégia para aumentar a resposta em situações de imunodeficiência, com possível redução da toxicidade.

## ***OBJETIVOS***

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver formulações lipossomais contendo glutamina e avaliar a viabilidade dos neutrófilos frente aos nanossistemas desenvolvidos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver lipossomas convencionais contendo glutamina;
- Caracterizar os sistemas obtidos através de técnicas físico-químicas;
- Estudar o efeito das concentrações dos constituintes lipossomais nos parâmetros físico-químicos através de planejamento fatorial;
- Realizar estudos de estabilidade dos lipossomas desenvolvidos;
- Desenvolver um método analítico em HPLC para a quantificação da glutamina livre e encapsulada;
- Avaliar a viabilidade dos neutrófilos *in vivo* frente às formulações desenvolvidas.



#### 4 ARTIGO

##### **Novel glutamine-loaded liposomes: development, characterization and neutrophils viability evaluation**

Larissa Chaves Costa<sup>a,b</sup>, Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza<sup>b</sup>, Fábio Fidélis Almeida<sup>b</sup>, Cláudia Jacques Lagranha<sup>c</sup>, Pabyton Gonçalves Cadena<sup>b,d</sup>, Mariane Cajubá de Britto Lira<sup>b,c</sup>, Nereide Stela Santos-Magalhães<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>b</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup>Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife - PE, Brasil.

\*Corresponding author:

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Grupo de Sistema de Liberação Controlada de Medicamentos

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária.

50670-901, Recife-PE, Brasil.

Tel: +55-81-2126 8484

Fax:+55-81-2126 8485

E-mail: [nssm@ufpe.br](mailto:nssm@ufpe.br)

**Abstract**

The use of glutamine encapsulated into nanosystems, such as liposomes, may be an alternative to reducing possible toxic effects and promote a potentiation in therapeutic efficacy, since these liposomes are recognized and captured by the immune system cells. In this context, the goal of this research work was nanoencapsulate glutamine into conventional liposomes, develop an analytical HPLC method for the quantification of encapsulated glutamine and evaluate the viability of neutrophils. Liposomes were prepared using the technique of thin-film hydration followed by sonication and characterized according to pH, mean size, zeta potential and encapsulation efficiency. The stability of liposomes was evaluated for at least 45 days. An experimental design was performed to study experimental conditions such as the concentration of lipids and glutamine, as well as choose the ideal preparation. Viability of neutrophils, from healthy wistar rats, was assessed by using a flow cytometer, 2 hours after intraperitoneal administration of free glutamine (Gln), glutamine loaded-liposomes (GL), unloaded-liposome (UL) and saline solution as control (C). The chosen formulation had a mean size of  $114.65 \pm 1.82$  nm with a polydispersion index of  $0.30 \pm 0.00$ . The zeta potential was positive ( $36.30 \pm 1.38$  mV) and the encapsulation efficiency was  $39.49 \pm 0.74$  %. The chromatographic method developed was efficient for the quantification of encapsulated glutamine, obtaining a peak at retention time around 3.8 minutes. After treatment, although neutrophils remain viable in all groups, greater viability was observed in the group treated with glutamine encapsulated compared with the control group (20%). Thus, glutamine encapsulated into liposomes is able to maintain viable neutrophils becoming a new and promising strategy to increase the response in immunodeficiency conditions.

**Keywords:** Glutamine; conventional liposomes; neutrophils; cell viability.

## **1 Introduction**

Glutamine (Gln) is the most abundant free amino acid in plasma, muscle tissue, and also can be found at relatively high concentrations in other tissues (Newsholme et al., 2003). The synthesis of this amino acid occurs primarily in skeletal muscle, as well as lung, liver and brain. On the other hand, its consumption occurs primarily in kidney, immune system and gastrointestinal tract cells. The liver is the only organ that is able to consume as well as synthesize glutamine (Labow; Souba, 2000). Despite glutamine being classified as nonessential, nowadays has been considered conditionally essential, once, in certain critical situations such as surgery, trauma and exhaustive exercise, the synthesis of glutamine does not supply the demand required by the body, leading to immunocompetence and increasing incidence of infections (Albino Junior et al., 2004; Cruzat; Petry; Tirapegui 2009; Gleeson, 2008).

The proliferation and development of cells, particularly of immune system, is a major function which glutamine is involved (Gleeson, 2008). It is used at high rates by lymphocytes as a source of energy, providing an ideal conditions for the biosynthesis of nucleotides and hence, cell proliferation. Related to leukocytes, they are largely dependent on skeletal muscle glutamine synthesis and also it released into the blood to satisfy their metabolic requirements. This fact is due to the absence of glutamine synthetase which catalyses the synthesis of glutamine from ammonia and glutamate (Ardawi; Newsholme, 1983). Moreover, glutamine is important as a component of proteins, transport of ammonia between tissues, source of carbon skeleton for gluconeogenesis, in acid-base balance and participating in the synthesis of nucleotides and nucleic acids (Curi et al., 2005; Cruzet; Petry; Tirapegui, 2009), being therefore of great importance for maintenance and proper functioning of organism.

Events of metabolic stress or diseases such as dengue, cancer, AIDS, burns, surgeries, intense and prolonged exercise are some situations in which there is an excessive consumption of glutamine surpassing the body synthesis (Lacey; Wilmore, 1990). Studies have demonstrated that decrease in the intramuscular and plasma concentrations of glutamine may be partially responsible for the depression of immunological function and the administration of glutamine is an alternative to reduce this state (Furst, 2001; Lagranha et al., 2008a; Fan et al., 2009), thereby provide an improved recovery of patients with such diseases (Wilmore, 2001; Fläring et al., 2003).

Despite presenting significative benefits in some situations, the literature reports that glutamine supplementation could promote renal failure and kidney disease especially in diabetic patients (Curi et al., 2005; Alba-Loureiro et al., 2010; Galera et al., 2010). Moreover, it has a limited solubility and it is unstable in solution, which may undergo breakdown depending on temperature, pH and anion concentration (D'Souza; Powell-Tuck, 2004). An alternative to overcome these physicochemical limitations and reduce adverse effects while increase therapeutic effect, is the development of a pharmaceutical form, which is able to reduce the possible toxic effects, as well as direct the bioactive compound to a specific site of action, thereby increasing therapeutic efficacy. In this way, drug delivery systems, such as conventional liposomes, could offer advantages in attempt to overcome these limitations.

Liposomes are spherical vesicles consisting of one or more concentric bilayers of phospholipids that isolate one or more aqueous inner compartments of the external environment (Brandl; Gregoriadis, 1994). Liposomes classified as conventional, which present only lipids, are quickly recognized and captured by the immune system, being ideal to carry drugs to neutrophils (Torchilin, 2005). We believe that the use of glutamine-loaded conventional liposomes could be a promising alternative to direct this amino acid to neutrophils, enhancing their activity as well as minimize the nephrotoxicity caused by glutamine in its free form.

Within this framework, the goal of this research was firstly develop conventional liposomes containing glutamine and choose the best formulation after experimental design. Secondly, develop an analytical method to determine and quantify the nanoencapsulated glutamine into liposomes by high performance liquid chromatography (HPLC) and finally evaluate the neutrophils viability, *ex vivo*, after the administration of glutamine-loaded conventional liposomes.

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Reagents**

L-glutamine ( $\geq 99\%$ ), cholesterol (CH), octadecylamine (OCT) and glycogen from oyster type II were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Soya phosphatidylcholine (PC) (98% Epikuron<sup>®</sup> 200) was obtained from Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Germany). Solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

## **2.2 Methodology**

### **2.2.1 Preparation of glutamine-loaded conventional liposomes**

Glutamin-loaded liposomes were prepared using the thin lipid film method (Lira et al., 2009). Briefly, lipids consisting of soya phosphatidylcholine and cholesterol, with or without octadecylamine, a positive charged lipid, were dissolved in a mixture of  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (3:1 v/v) under magnetic stirring. The solvents were removed under pressure at  $37 \pm 1$  °C, 80 rpm for 60 min, forming a thin lipid film. This film was then hydrated with 10 ml of phosphate buffer solution at pH 7.4, containing glutamine (Gln) previously dissolved, resulting in the formation of multilamellar liposomes. Finally, liposomal suspension was sonicated (Vibra Cell, BRANSON, USA) at 200W and 40 Hz for 400 s under low temperature (4 °C) to form small unilamellar liposomes.

### **2.2.2 Extraction and determination of glutamine content into conventional liposomes**

The method for extraction of glutamine was developed following the idea of two-phase system previously described by Bligh and Dyer (1959). Briefly, for Gln extraction, 200  $\mu\text{l}$  of liposomes were diluted in 400  $\mu\text{l}$  of a mixture of  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1) and then, sonicated for 3 min. Next, 1 and 1.7 ml of chloroform and methanol, respectively, were added and sonicated for more 3 min. Aiming to the two-phase system formation, purified water was added to a final volume of 5 ml. After visual separation, the aqueous portion was filtered and injected into the HPLC to determine glutamine content.

The HPLC method for determine and quantify glutamine, previously extracted from conventional liposomes, was carried out on a Waters Alliance e2695-2998 (Waters, Milford, MA) coupled with a liquid chromatograph with photodiode array detector and operated by the software Empower<sup>TM</sup>. The chromatographic run was performed using a reverse phase Waters C18 XBridge<sup>®</sup> column (4.6  $\times$  250mm i.d. particle 3.5  $\mu\text{m}$ ) with 50  $\mu\text{l}$  of the sample injection volume at 37 °C. HPLC analysis of Gln was carried out using a mobile phase consisting of methanol and double dinized water (6:4 v/v) at a flow rate of 0.7 ml/min and detection at 204 nm. Standard curves were assayed using glutamine solution at concentrations ranging from 80 to 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Assays were performed in triplicate.

### 2.2.3 Physicochemical characterization of glutamine-loaded conventional liposomes

Liposomes formulations were characterized by the measurement of pH, mean hydrodynamic diameter, polydisperse index (PDI) and surface charge (zeta potential). The pH of liposome dispersions was measured with a glass electrode and a digital pHmeter (Micronal B474, São Paulo, BR) at 25 °C. The polydisperse index and diameter of liposomes was sized by photon correlation spectroscopy (Beckman Coulter Delsa™ Nano S Particle analyzer, USA), at 25 °C with a fixed angle of 90°. For that analysis, samples were adequately diluted using 300 µl of liposomes and 800 µl of purified water. The zeta potential ( $\zeta$  mV) was measured at 25 °C using the electrophoresis technique (Malvern Zetasizer Nano ZS90, USA). In this experiment liposome dispersions (50 µl) were diluted with 950 µl ml of purified water. Results corresponded to the average of three determinations.

Drug encapsulation efficiency (EE%) was determined through the ultrafiltration/ultracentrifugation technique using Ultrafree® units (Millipore, USA) (Lira et al., 2009). Samples of liposomes (400 µl) were inserted in filtration unit and submitted to centrifugation (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japan) at 8776 g for 1 h at 4 °C. The content of Gln in the supernatant was measured by the HPLC method described above.

### 2.2.4 Experimental designs

Fist, a two-level  $2^{4-1}$  fractional experimental design was carried out to study the influence of liposomal constituent concentrations. Four formulation factors, that mainly influenced the liposomes physicochemical characteristics, were evaluated at two levels and central point. The factors were defined as follows:

- Factor A (PC concentration) = 15.63, 31.27 and 46.91 mM;
- Factor B (CH concentration) = 4.42, 8.84 and 13.26 mM;
- Factor C (OCT concentration) = 0, 4.19 and 8.38 mM;
- Factor D (Gln concentration) = 27.37, 41.05 and 54.74 mM.

The pH, mean size, polydispersity index (PDI), zeta potential, ( $\zeta$  mV) and drug encapsulation efficiency (EE%) of liposomes were analyzed as described above and used as the response variables of the design study.

Next, a two-level  $2^2$  full experimental design was performed to study the main relevant parameters, found in the fractional factorial design study (PC and CH concentration) and their

second order interactions, to available the effect in the physicochemical characteristics. The design was performed by a matrix of 7 experiments with central point. The factors were defined as follows:

- Factor A (PC concentration) = 31.27, 39.09 and 46.91 mM;
- Factor B (CH concentration) = 8.84, 11.05 and 13.26 mM;

The same response variables of the fractional factorial design study (i.e. 2.2.4.1) was used for analyze the design study.

After the experimental design, the stability of the best liposomal formulations was evaluated during 45 days.

## **2.2.5 *In vivo* experiment**

### **2.2.5.1 Animals**

The *in vivo* study was carried out according to Lagranha et al. (2004). The study was in compliance of the responsible committee of Ethics Committee on Animal Experiments at Federal University of Pernambuco (CEUA-UFPE), and done after its acceptance (N<sup>o</sup>. 23076.013231/2012-47). Female Wistar rats (200 ± 20g) were maintained in collective cages until the day of the experiment, at temperature of 22 ± 2 °C, relative humidity 60% and under a cycle of 12 h light/12 h darkness with unrestricted access to water and food (commercial chow). The animals were randomly divided into the five following groups, containing three rats in each group: Gln-IP (glutamine in solution by intraperitoneal route), Gln-GAV (glutamine in solution by gavage), GL (Glutamine-loaded liposomes), UL (unloaded-liposome) and C (control/saline as placebo).

### **2.2.5.2 Recruitment of neutrophils**

With the purpose of causing an inflammatory stimulus and substantial migration of neutrophils to the intraperitoneal cavity, 12-15 ml of sterile oyster glycogen solution type II (1%) in PBS was administered intraperitoneally.

### **2.2.5.3 Treatment**

After two hours of neutrophils recruitment, free glutamine (Gln), glutamine-loaded liposomes (GL), unloaded liposomes (UL) and saline solution as control (C) were administered. Glutamine in its free form was administered by two different routes: orally (1

g/kg), following Lagranha and co-workers (2004, 2008b), and intraperitoneally (0.06 g/ kg). Glutamine loaded-liposomes (0.06 g/kg), unloaded-liposomes (the same volume as the glutamine loaded-liposomes) and saline solution (3 mL) were administered intraperitoneally.

#### **2.2.5.4 Collecting neutrophils**

Animals were anaesthetized with Urethane<sup>®</sup> (1.25 g/kg) and sacrificed by cervical dislocation 2 hours after the treatment. Neutrophils were obtained by intraperitoneal (i.p.) lavage with 40 ml sterile phosphate buffered saline. The cells were centrifuged (1000 g for 10 min), washed twice in PBS, and then counted in a Neubauer chamber in Trypan Blue solution (at 1% in PBS) using an optical microscope (Olimpus, USA).

#### **2.2.5.5 Neutrophils viability assay**

The viability of neutrophils was assessed by using a flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson Systems, San Jose, CA). The percentage of viable cells in each sample was determined using propidium iodide staining (solution at 0.05% in PBS) to identify dead cells. Data of 15.000 events were analyzed per sample. Fluorescence of the propidium iodide was detected in 630/622 nm wavelength.

#### **2.2.6 Statistical analysis**

The statistical software Statistica 8.0<sup>®</sup> (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) with experimental design capabilities was used to create the design, which means that the combinations were determined randomly and placed in random order. The statistical analyses of data were carried out using the same software. Statistically significant differences were determined using Turkey multiple comparisons test, with P-values less than 0.05 as a minimal level of significance.

### **3 Results and Discussion**

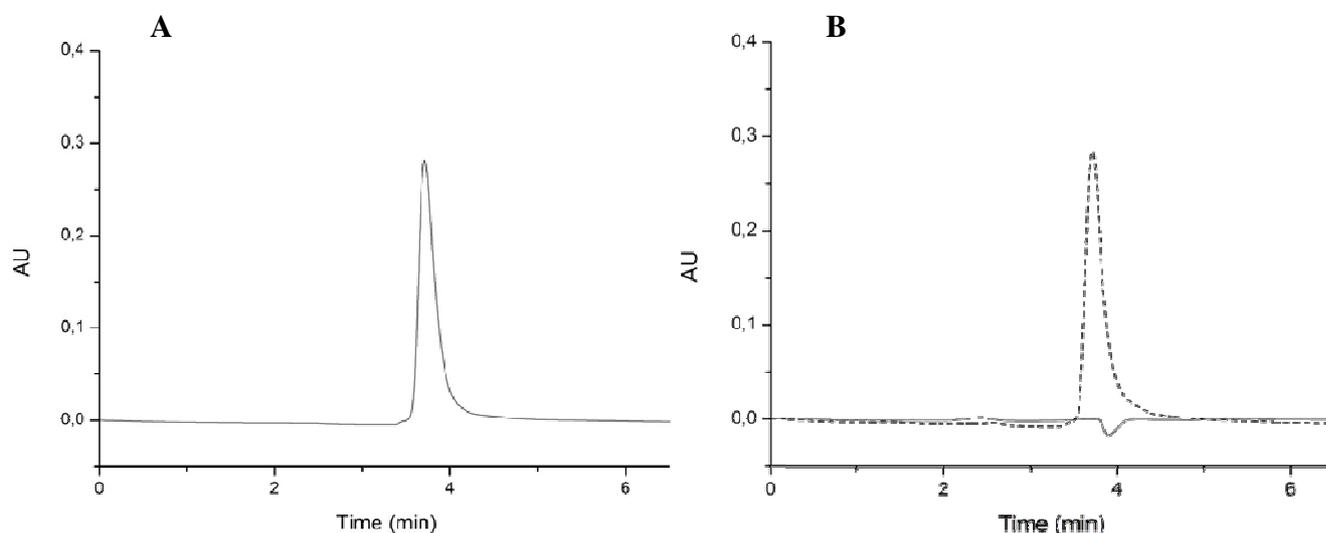
#### **3.1 Determination of glutamine content into liposomes**

The literature describes several methods aiming to quantify glutamine. Favre and co-workers in nineties (1990) described a HPLC method using an isocratic elution of a mobile phase constituted of 5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (pH 5.5) with glutamine retention time of 15 min. Some years later, Snowden et al. (2002) described another method obtaining a retention time of 2.5

min. They used a reversed-phase liquid chromatography method to quantify glutamine and also N-acetylglutamine in aqueous solution using isocratic elution of a mobile phase constituted of water adjusted to pH 2.2 with HCl. Recently, Chorilli et al. (2012) published a different method to analyze amino acids using an ion-exchange chromatography followed by post-column derivatization. The authors used this technique to validate a HPLC method for the determination of glutamine in food additives, with a mobile phase constituted of sodium eluent (pH 3.15) with 5% sulfolane, sodium eluant (pH 7.4) and sodium column regenerant, and obtained a retention time of 10 min. Each method described in the literature is efficient to quantify glutamine in its free form. However they are not adequate to quantify glutamine encapsulated into nanosystems, such as liposomes, due to the presence of lipids in liposomes formulation. An interesting method for that purpose is the one which not present any lipids interference, once liposomes are constituted of lipids. In that way, we developed and describe here a new method to identify and quantify glutamine encapsulated into liposomes.

Firstly, a two-phase liquid-liquid system was obtained to separate the aqueous and organic phase, which contains glutamine and lipids, respectively. Lately, the samples from aqueous phase were withdrawn and analyzed by HPLC following the parameters described previously. The chromatogram of glutamine, glutamine loaded-liposomes and unloaded-liposomes are shown in Figure 1 A and B. The standard curve of glutamine was plotted with nine concentrations allowing the derivation of the following regression linear equation:  $A = 16348.56 \times [\text{Gln}_{\mu\text{g/mL}}] - 19853.12$ ;  $r^2 = 99514$  (Insert a). As could be observed, glutamine presented a retention time around 3.80 min, and the same retention time was observed in glutamine loaded-liposomes chromatogram. Compared to the unloaded-liposomes, no peak is observed at this retention time, confirming that there was no glutamine in current formulation. In addition, no peak related to lipids was observed suggesting an adequate separation of glutamine, being possible the quantification of this aminoacid in liposomes formulations. The method developed is efficient and could be probably useful to quantify others hydrophilic compounds, encapsulated into liposomes, which presented the same lipids wavelength.

**Fig. 1.** Chromatographic separation and detection of glutamine. Glutamine in solvent mixture with retention time of 3.8 min (A). Comparison between glutamine loaded-liposomes (---) and unloaded-liposomes (—) (B).



### 3.2 Experimental designs of liposomal formulations

Several factors may influence the system and a small change in one factor may significantly change the characteristics of the whole system. Thereby, two experimental designs were developed in order to reduce the liposomal production costs, as well as studying the influence of four factors in the formulation, i.e. the concentration of phosphatidylcholine (PC), cholesterol (CH), octadecylamine (OCT) and the amount of glutamine (Gln). Thereby obtaining an optimized the formulations.

The experiments were randomly assayed in order to nullify the effect of inappropriate nuisance variables in both experimental designs. First, the nine runs of the two-level  $2^{4-1}$  fractional experimental design, and also their responses variables are show in the Table 1A. Each response variable was analyzed individually and it was observed that, lower level of OCT and higher level of PC reduce vesicles mean size (runs 2 and 4). On the other hand, higher level of OCT increases pH (runs 5 and 8) and higher level of OCT, PC and CH reduce the PDI values (run 8). It was also observed that higher level of OCT increases the zeta potential (runs 5 and 8) meanwhile the encapsulation efficiency (EE %) was not affected by the factors studied ( $p < 0.05$ ). The higher Gln level (54.74 mM), and the central point (41.05 mM) presented similar EE% of  $43.20 \pm 0.86$  and  $38.74 \pm 0.78\%$ , respectively, however run 8 presented a mean size of  $315.71 \pm 16.2$ , higher than the one found in central point  $177.7 \pm 7.8$ .

Thus, the 41.05 mM Gln concentration was used in the further experiments due to the lower size and also the possible reduction on liposomal costs.

The scatter plot (Figure 2) was used in order to identifying the best liposomal formulation obtained in the fractional experimental design study. It was observed that the central point (run 9) showed good liposomal characteristics as zeta potential ( $32.73 \pm 0.63$  mV) and EE% ( $38.74 \pm 0.78$ ). This formulation was stable at least for 45 days under low temperature ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) presenting particle size of  $162 \pm 6.21$  nm (PDI =  $0.25 \pm 0.01$ ). Finally, the run 9 was used as basis for the new experimental design.

The two-level  $2^2$  full experimental design was developed to study the influence of PC and CH and their interactions in liposomal characteristics, once only those lipids directly influence the physicochemical parameters studied above. The concentration of OCT (4.19 mM) was maintained firstly because this concentration did not showed significative difference between the higher level and the central point ( $p < 0.05$ ), and secondly because this amount of OCT promote a zeta potential value above 30 mV which, as reported in the literature, is an ideal value (even negative or positive) to avoid vesicles aggregation by electrostatic repulsion (Lapenda et al., 2012). The 41.05 mM of Gln was used due to reasons described above.

The Table 1B shows the results obtained in the design study. It was observed that only mean particle size were significantly modified by PC and CH concentrations ( $p < 0.05$ ) where the PC had the main statistically significant negative effect, the higher level of PC (46.91 mM) decrease the mean size. The second order interactions between the PC and CH concentration values had a positive effect, meaning that the main mean size was slightly enhanced by raising the levels of the two factors together. The results are show in the pareto chart (Figure 3).

Related to encapsulation efficiency (EE%), the literature reports high values only for lipophilic drugs. Generally, they are around 100%, as described by Lira et al. (2009), Cavalcanti et al. (2011) and Lapenda et al. (2012) who encapsulated Usnic acid (99%),  $\beta$ -lapachone (97%) and *Trans*-Dehydrocrotonin (95%), respectively. On the other hand, those high values are not found when hydrophilic drugs are nanoencapsulated into liposomes showing, for example, values of EE% around 14 to 23% as described by Wieber and co-workers (2012), when encapsulating a decapeptide with concentration varying from 0.25 to 0.75 mg/mL. Xu and co-workers (2012) also related low encapsulation efficiency for hydrophilic compounds, as the drug Tenofovir. The authors varied the lipids concentration

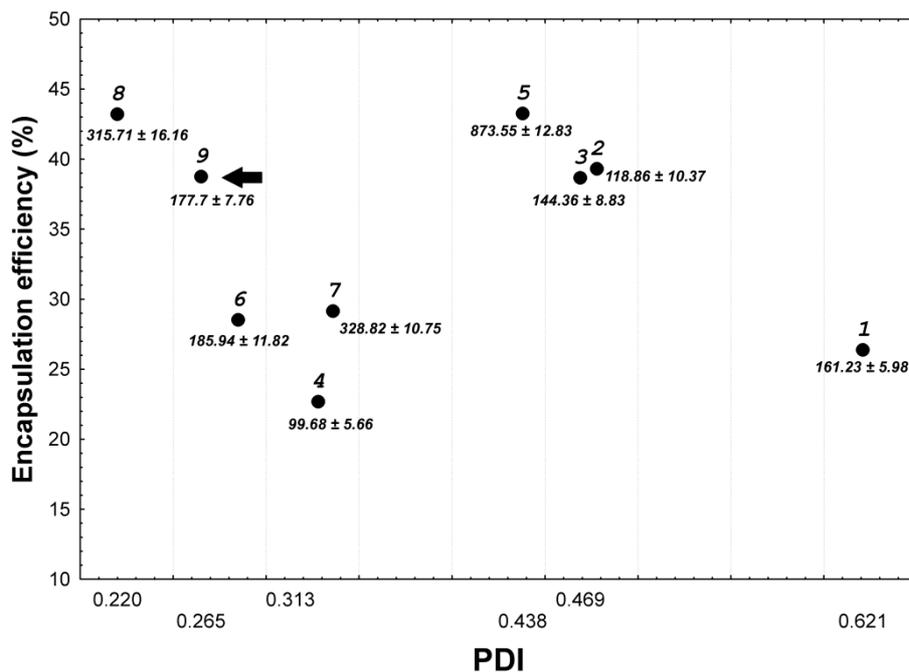
and observed that, lower amount promote low drug encapsulation, while very high lipids concentration (152.9 mM) showed an EE% of 9 to 45% using drug concentration of 0.5, 1, 2.5 and 6.9 mg/mL. It is noteworthy that high amount of some lipids in liposomes formulation could be toxic for cells (Mendonça et al., 2012). Our results are in accordance with the literature, once we also obtained low encapsulation efficiency. However, in contrast to other authors who used low drug concentration, as described above, we varied glutamine concentration from 4 to 8 mg/mL, obtaining a maximum encapsulation efficiency of 44%, a significative result.

Aiming to maintain the same rate of EE% found previously in other formulations in study design, the central point (Run 5 and EE% of  $39.49 \pm 0.74\%$ ) was chosen for *in vivo* experiments, once had the lowest size and an acceptable PDI. This formulation was stable for at least 45 days in suspension form under low temperature (4 °C) with particle sizes of  $180 \pm 4.90$  nm (PDI =  $0.30 \pm 0.01$ ), after the storage time.

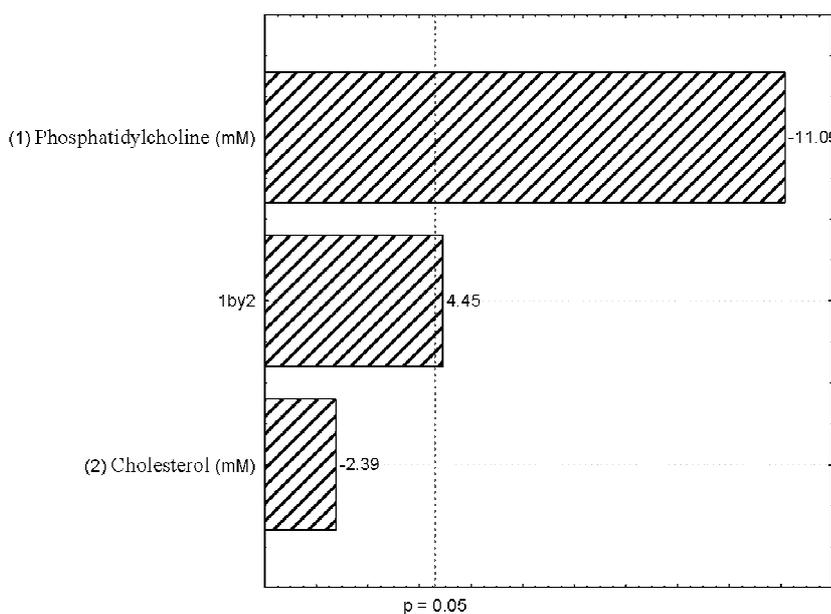
**Table 1.** Experimental designs and physicochemical properties of glutamine-loaded liposomes.

<i>Runs</i>	<i>PC (mM)</i>	<i>CH (mM)</i>	<i>OCT (mM)</i>	<i>Gln (mM)</i>	<i>pH</i>	<i>Size (nm)</i>	<i>PDI</i>	$\zeta$ (mV)	<i>EE (%)</i>
<b>A. Two-level <math>2^{4-1}</math> fractional experimental design</b>									
1	15.63	4.42	0	27.37	7.49	161.23 ± 5.98	0.621 ± 0.00	0.01 ± 0.07	26.37 ± 0.53
2	46.91	4.42	0	54.74	7.43	118.86 ± 10.37	0.478 ± 0.03	-14.73 ± 1.19	39.30 ± 0.79
3	15.63	13.26	0	54.74	7.49	144.36 ± 8.83	0.469 ± 0.04	1.94 ± 0.14	38.66 ± 0.77
4	46.91	13.26	0	27.37	7.54	99.68 ± 5.66	0.328 ± 0.01	5.73 ± 0.30	22.68 ± 0.45
5	15.63	4.42	8.38	54.74	7.58	873.55 ± 12.83	0.438 ± 0.01	31.96 ± 1.35	43.25 ± 0.87
6	46.91	4.42	8.38	27.37	7.62	185.94 ± 11.82	0.285 ± 0.02	33.73 ± 1.58	28.53 ± 0.57
7	15.63	13.26	8.38	27.37	7.65	328.82 ± 10.75	0.336 ± 0.01	31.40 ± 1.21	29.14 ± 0.58
8	46.91	13.26	8.38	54.74	7.68	315.71 ± 16.16	0.220 ± 0.01	33.20 ± 1.25	43.20 ± 0.86
9 (cp)	31.27	8.84	4.19	41.05	7.54	177.7 ± 7.76	0.265 ± 0.01	32.73 ± 0.63	38.74 ± 0.78
<b>B. Two-level <math>2^2</math> full experimental design</b>									
1	31.27	8.84	4.19	41.05	7.74	165.66 ± 3.09	0.297 ± 0.01	39.50 ± 1.91	44.67 ± 0.26
2	31.27	13.26	4.19	41.05	7.76	130.36 ± 3.42	0.307 ± 0.01	36.30 ± 0.10	32.91 ± 0.34
3	46.91	8.84	4.19	41.05	7.75	85.51 ± 2.80	0.294 ± 0.00	32.93 ± 1.01	7.35 ± 1.00
4	46.91	13.26	4.19	41.05	7.75	96.16 ± 1.23	0.274 ± 0.01	36.90 ± 1.50	28.29 ± 0.07
5 (cp)	39.09	11.05	4.19	41.05	7.69	114.65 ± 1.82	0.300 ± 0.00	36.30 ± 1.38	39.49 ± 0.74

**Fig. 2.** Scatter plot of the formulations produced using a 24-1 fractional experimental design and effects of response variables polydispersity index (PDI) and encapsulation efficiency (%). Formulation number indicated above, the mean size (nm) was also indicated.



**Fig. 3.** Pareto chart obtained from the two-level 2<sup>2</sup> full experimental design with main effects and interactions of the formulation parameters (PC - phosphatidilcoline and CH - cholesterol) on the mean size (nm) of the liposomes. Dashed line: statistical significance (p<0.05).

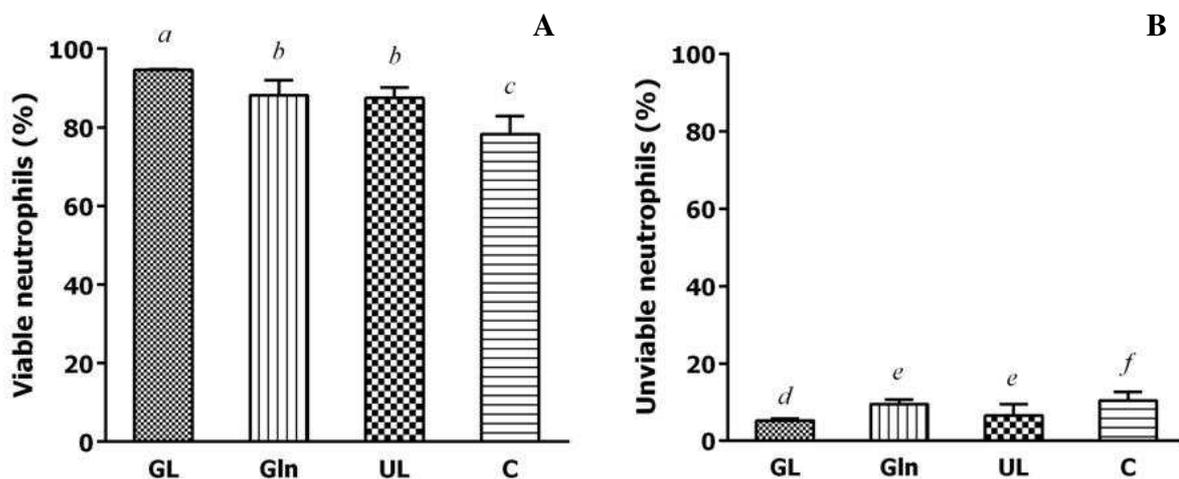


### 3.3 Neutrophils viability assay

Several studies have been conducted to demonstrate the effectiveness of glutamine, in raising the immunity of rats immunosuppressed by intense and prolonged exercise. In studies developed by Lagranha et al. (2005; 2008b), they demonstrated that a single bout of exercise induces apoptosis of rat neutrophils and oral glutamine supplementation (1 g/kg) prevented this effect, by promoting an increase in neutrophils phagocytosis and oxidative capacity from both exercised and rested rats. However, when glutamine is administered by oral route, 50-80% of this amino acid is absorbed by intestinal cells, promoting a reduction on bioavailability to other tissues. In that way, glutamine concentration in plasma is not sufficient to supply the physiological demand (D'Souza; Powell-Tuck, 2004; Gleeson, 2008).

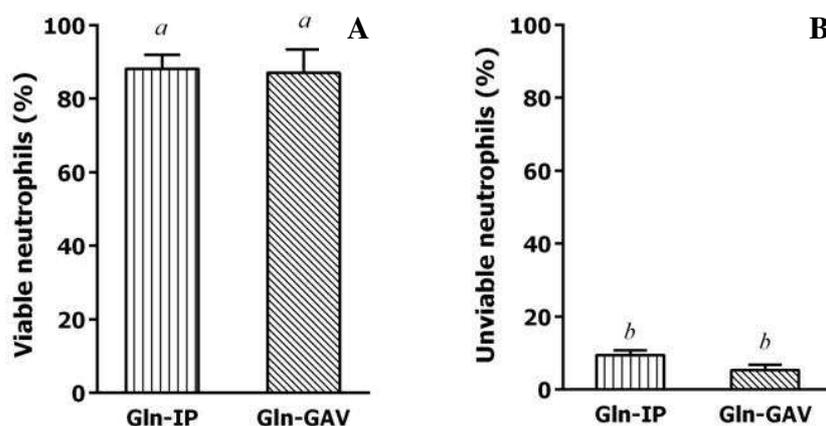
Despite the efficacy related to neutrophils activation, glutamine in high concentration can promote nephrotoxicity, especially in diabetic patients (Alba-Loureiro et al., 2010; Galera et al., 2010). Thus, the use of glutamine into nano delivery systems, as liposomes, could decrease the dose and also the toxicity, once conventional liposomes are able to target the encapsulated compound directly to neutrophil. This research describes for the first time the analysis of neutrophil viability after administration of glutamine-loaded conventional liposomes. Results showed that all groups investigated presented a high percentage of intact plasma membrane and a reduced number of unviable cells, as could be observed in Figure 4 A and B, once it was used healthy animals. The control group had a high cell viability (by  $78 \pm 4.5\%$ ), once the animals were not subjected to metabolic stress, as stated earlier. It is known that bacteria and virus promote an increased in immune response (Newsholme, 2001), as liposomes are formed by phospholipid bilayers, those vesicles mimic the shape and size of pathogenic microbes (Szebeni et al., 2011). In that way, unloaded-liposomes could be recognized as foreign body and stimulating the immune response, fact observed in our results by the high rate of viability ( $87 \pm 2.7\%$ ). The peritoneal administration of glutamine-loaded conventional liposomes (GL) caused an increase in neutrophil viability of 20% (by  $94 \pm 0.2\%$ ) in comparison with C group (Figure 4 A) and an unviable cells rate of  $5 \pm 0.5\%$  (Figure 4 B).

**Fig. 4.** Effect of glutamine on neutrophil membrane integrity. The percentage of neutrophils viable (A) and unviable (B) against different treatments by intraperitoneal route. The values are presented as means  $\pm$  SD of three determinations from three animals in each group. Average with different letters differs statistically by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Glutamine loaded-liposomes (GL), glutamine in solution (Gln), unloaded-liposomes (UL) and saline solution as control (C).



A comparison between free glutamine (Gln) administered by two different route, oral and intraperitoneal, was analyzed and no statistically difference was observed in the percentage of viable cells ( $87 \pm 6.4\%$  and  $88 \pm 3.8\%$ , respectively), and unviable cells ( $9 \pm 1.2\%$  and  $5 \pm 1.4\%$ , respectively) (Figure 5 A and B). Thus implying that a reduced dose of intraperitoneal glutamine may exhibit the same effect as a higher dosage by oral supplementation, thereby obtaining adequate plasma levels and reduced adverse effects caused by high oral supplementation.

**Fig. 5.** Comparison between glutamine in solution administered by oral (Gln-GAV) and intraperitoneal route (Gln-IP). The values are presented as means  $\pm$  SD of three determinations from three animals in each group. Average with different letters differs statistically by Tukey test ( $p < 0.05$ ).



#### 4 Conclusions

Novel glutamine-loaded liposomes were obtained presenting desirable physicochemical characteristics, such as pH, particle size, polydispersity index and zeta potential. The experimental designs performed were able to show good concentration of formulation constituents pointing out the ideal formulation.

This work also describes for the first time an adequate HPLC method for quantify glutamine encapsulated into liposomes. Glutamine loaded-liposomes were able to increase neutrophil viability with very low unviable cell. Based on these findings, this work encourages us to use the formulations developed in further studies using immunosuppressed animals, aiming to increase immunological function.

#### 5 Acknowledgments

CHAVES, L.C. is grateful for a Master scholarship from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

#### 6 References

- ALBA-LOUREIRO, T.C. et al. Effects of glutamine supplementation on kidney of diabetic rat. **Amino Acids**, v.38, p. 1021-1030, 2010.
- ALBINO JUNIOR, W. et al. Suplementação com glutamina melhora as reservas de glicogênio de músculos de ratos tratados com dexametazona. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n. 3, p. 283-291, 2004.
- ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, v. 212, p. 835-842, 1983.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BRANDL, M.; GREGORIADIS, G. Entrapment of hemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicles characterization and in vivo behavior. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes** v.1196, p. 65-75, 1994.
- CAVALCANTI, I.M.F. et al. The encapsulation of  $\beta$ -lapachone in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332-340, 2011.

CHORILLI, M. et al. Validation of a HPLC method for determination of glutamine in food additives using post-column derivatization. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 113-117, 2012.

CRUZAT, V.F.; PETRY, E.R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, 2009.

CURI, R. et al. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**, v. 204, p. 392-401, 2005.

D'SOUZA, R.; POWELL-TUCK, J. Glutamine supplements in the critically ill. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 97, p. 425-427, 2004.

FAN, Y. et al. Effects of glutamine supplementation on patients undergoing abdominal surgery. **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 24, n. 1, p. 55-59, 2009.

FAVRE, E.; PUGEAUD, P.; PERINGER, P. Automated HPLC monitoring of glucose, glutamine, lactate and alanine on suspended mammalian cell reactors. **Biotechnology Techniques**, v. 4, n. 5, p. 315-320, 1990.

FLÄRING, U.B. et al. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clinical Science**, v. 104, p. 275-282, 2003.

FURST, P. New developments in glutamine delivery. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2562S-2568S, 2001.

GALERA, S.C. et al. The safety of oral use of L-glutamine in middle-aged and elderly individuals. **Nutrition**, v. 26, p. 375-381, 2010.

GLEESON, M. Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 2045S-2049S, 2008.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W. Glutamine. **World Journal of Surgery**, v. 24, p. 1503-1513, 2000.

LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Reviews**, v. 48, n. 8, p. 297 – 309, 1990.

LAGRANHA, C.J. et al. Beneficial effect of glutamine on exercise- induced apoptosis of rat neutrophils. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 2, p. 210–217, 2004.

LAGRANHA, C.J. et al. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 23, p.101–107, 2005.

LAGRANHA, C.J. et al. The effect of glutamine supplementation and physical exercise on neutrophil function. **Amino Acids**, v. 34, p. 337-346, 2008a.

LAGRANHA, C.J. et al. Neutrophil fatty acid composition: effect of a single session of exercise and glutamine supplementation. **Amino Acids**, v.35, p. 243–245, 2008b.

LAPENDA, T.L.S. et al. Encapsulation of *trans*-dehydrocrotonin in liposomes: an enhancement of the antitumor activity. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, p. 1–12, 2012.

LIRA, M.C.B. et al. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v.19, p.49 - 58, 2009.

MENDONÇA, E.A.M et al. Enhanced antiproliferative activity of the new anticancer candidate LPSF/ AC04 in cyclodextrin inclusion complexes encapsulated into liposomes. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 13, n. 4, p. 1355-1366, 2012.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2515S–2522S, 2001.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , v. 36, p. 153-163, 2003.

SNOWDEN, M.K. et al. Stability of n-acetylglutamine and glutamine in aqueous solution and in a liquid nutritional product by an improved HPLC method. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 384- 389, 2002.

SZEBENI, J. et al. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 1020–1030, 2011.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Review Drug Discovevy**, v. 4, p. 145- 160, 2005.

XU, X.; KHAN, M.A.; BURGESS, D.J. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 410– 418, 2012.

WIEBER, A.; SELZER, T.; KREUTER, J. Physico-chemical characterisation of cationic DOTAP liposomes as drug delivery system for a hydrophilic decapeptide before and after freeze-drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 358–367, 2012.

WILMORE, D.W. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2543S-2549S, 2001.

## ***CONSIDERAÇÕES FINAIS***

---

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Lipossomas convencionais contendo glutamina foram obtidos apresentando características físico-químicas desejáveis, tais como pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta;
- O planejamento fatorial realizado mostrou uma boa concentração dos componentes lipossomais e permitiu avaliar o efeito dos constituintes nos parâmetros físico-químicos;
- O planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  demonstrou que a eficiência de encapsulação não foi afetada pelos fatores estudados;
- O planejamento fatorial completo  $2^2$  permitiu concluir que apenas o tamanho de partícula foi significativamente alterado pelas concentrações de fosfatidilcolina e colesterol;
- A formulação ideal, obtida a partir da análise fatorial, apresentou tamanho médio de  $114.65 \pm 1.82$  nm com índice de polidispersão de  $0.300 \pm 0.00$ . O potencial zeta foi positivo ( $36.30 \pm 1.38$  mV) e a eficiência de encapsulação foi de  $39.49 \pm 0.74$  %. Esta formulação permaneceu estável na forma de suspensão por pelo menos 45 dias a  $4^\circ\text{C}$ ;
- O método cromatográfico desenvolvido foi eficiente para a quantificação da glutamina livre e encapsulada, obtendo pico no tempo de retenção em torno de 3,8 minutos;
- A glutamina encapsulada em lipossomas foi capaz de aumentar a viabilidade dos neutrófilos apresentando baixa porcentagem de células inviáveis;
- O desenvolvimento de lipossomas convencionais contendo glutamina representa uma nova e promissora estratégia para direcionar este aminoácido aos neutrófilos, aumentando sua atividade, e conseqüentemente melhorando a imunidade.

### 5.1 Perspectivas

- Estudar a morfologia das formulações lipossomais produzidas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- Realizar o uptake *in vivo* com a finalidade de comprovar a captura dos lipossomas contendo glutamina pelos neutrófilos;

- Avaliar a cinética de captura celular *in vitro*;
- Realizar estudos *in vivo* em ratos imunossuprimidos para avaliar o efeito da glutamina encapsulada em lipossomas;
- Avaliar a nefrotoxicidade da glutamina livre e encapsulada em lipossomas.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## REFERÊNCIAS

- ALBA-LOUREIRO, T.C. et al. Effects of glutamine supplementation on kidney of diabetic rat. **Amino acids**, v.38, p. 1021-1030, 2010.
- ALBINO JUNIOR, W. et al. Suplementação com glutamina melhora as reservas de glicogênio de músculos de ratos tratados com dexametazona. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n. 3, p. 283-291, 2004.
- ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, v. 208, p. 743-748, 1982.
- ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, v. 212, p. 835-842, 1983.
- ANDREWS, F.J.; GRIFFITHS, R.D. Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. **British Journal of Nutrition**, v.87, p. S3-S8, 2002.
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p 167-179, 2007.
- BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. et al. Liposomes as Carriers of Antimicrobial Agents or Immunomodulatory Agents in the Treatment of Infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 12, p. 61-67, 1993.
- BERGERS, J.J. et al. Liposomes as delivery systems in the prevention and treatment of infectious diseases. **Pharmacy World Science**, v.17, p. 1 -11, 1995.
- BRANDL, M.; GREGORIADIS, G. Entrapment of hemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicles characterization and *in vivo* behavior. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes** v.1196, p. 65-75, 1994.
- BRENNAN, L. et al. <sup>13</sup>C NMR analysis reveals a link between L-glutamine metabolism, D-glucose metabolism and  $\gamma$ -glutamyl cycle activity in a clonal pancreatic beta-cell line. **Diabetologia**, v.46, p. 1512 – 1521, 2003.
- CALDER, P.C.; YAQOOB, P. Glutamine and the immune system. **Amino Acids**, v. 17, p. 227-241, 1999.
- COSTER, J.; MCCAULEY, R.; HALL, J. Glutamine:metabolism and application in nutrition support. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.13, n.1, p. 25-31, 2004.
- CRUZAT, V.F. et al. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 5, 2007.

CRUZAT, V.F.; PETRY, E.R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, 2009.

CURI, R. et al. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**, v. 204, p. 392-401, 2005a.

CURI, R. et al. Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity. **Cell Biochemistry & Function**, v. 23, p. 77-84, 2005b.

CURI, R. et al. Glutamine, gene expression, and cell function. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 344-357, 2007.

DAVIES, G. L.; BARRAY, A.; GUN'KO, Y.K. Preparation and size optimization of silica nanoparticles using statistical analyses. **Chem. Phys. Lett.**, v. 468, p. 239-244, 2009.

DILLEN, K. et al. Factorial design, physicochemical characterization and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 275, p. 171-187, 2004.

D'SOUZA, R.; POWELL-TUCK, J. Glutamine supplements in the critically ill. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 97, p. 425-427, 2004.

EAGLE, H. et al. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 218, p. 607 -616, 1956.

EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p.1432-1441, 2006.

EHRENSVARD, G.; FISCHER, A.; STJERNHOLM, R. Protein metabolism of tissue cells in vitro. The chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 18, p. 218-230, 1949.

FAN, Y. et al. Effects of glutamine supplementation on patients undergoing abdominal surgery. **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 24, n. 1, p. 55-59, 2009.

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

FARRELL, D. et al. Nanotechnology-based cancer therapeutics-promise and challenge-lessons learned through the NCI alliance for nanotechnology in cancer. **AAPS Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 273-278, 2011.

FLÄRING, U.B. et al. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clinical Science**, v. 104, p. 275-282, 2003.

FURST, P. New developments in glutamine delivery. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2562S-2568S, 2001.

GALERA, S.C. et al. The safety of oral use of L-glutamine in middle-aged and elderly individuals. **Nutrition**, v. 26, p. 375-381, 2010.

GLEESON, M. Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 2045S-2049S, 2008.

GOHEL, M.C.; AMIN, A.F. Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design. **J. Control Release**, v. 51, p. 115-122, 1998.

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. **Trends in Biotechnology**, v. 13, p. 527-37, 1995.

GRIMM, J.; SCHEINBERG, D.A. Will nanotechnology influence targeted cancer therapy? **Seminars in Radiation Oncology**, v. 21, p.80-87, 2011.

HALL, J.C.; HEEL, K.; McCAULEY, R. Glutamine. **British Journal of Surgery**, v.83, p. 305-312, 1996.

HISCOCK, N.; PEDERSEN, B.K. Exercise-induced immunodepression—plasma glutamine is not the link. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, p. 813–822, 2002.

IMMORDINO, M.L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v.1, p. 297–315, 2006.

KREBS, H.A. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochemical Journal**, v. 2, p. 1951-1969, 1935.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W. Glutamine. **World Journal of Surgery**, v. 24, p. 1503-1513, 2000.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W.; ABCOUWER, S.F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism—glutaminase and glutamine synthetase. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2467S–2474S, 2001.

LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Reviews**, v. 48, n. 8, p. 297 – 309, 1990.

LAGRANHA, C.J. et al. Beneficial effect of glutamine on exercise- induced apoptosis of rat neutrophils. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 2, p. 210–217, 2004.

LAGRANHA, C.J. et al. The effect of glutamine supplementation and physical exercise on neutrophil function. **Amino Acids**, v. 34, p. 337-346, 2008a.

LAGRANHA, C.J. et al. Neutrophil fatty acid composition: effect of a single session of exercise and glutamine supplementation. **Amino Acids**, v.35, p. 243–245, 2008b.

LAVERMAN, P. et al. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 37, p. 225–235, 1999.

MCNEIL, S.E. Nanoparticle therapeutics: a personal perspective. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, p. 264-271, 2009.

MOZAFARI, M.R. et al. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 4, p. 309-327, 2008.

MU, L.; SPRANDO, R.L. Application of nanotechnology in cosmetics. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 8, p. 1746-1749, 2010.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299 p.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: Its importance in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 316–324, 1999.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2515S–2522S, 2001.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 153-163, 2003a.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate-their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochemistry & Function**, v. 21, p. 1-9, 2003b.

NOVELLI, M. et al. Suplementação de glutamina aplicada à atividade física. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.15, n.1, p. 109-117, 2007.

O'NEIL, M.J. et al. **The merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 14. ed. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co, 2006.

PAROOEI, M. et al. Preparation and physicochemical characterization of immunoliposome nanoparticles as a vaccine delivery system: Leishmaniasis as a model. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. S216-S216, 2011.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 155-168, 2000.

PITHON-CURI, T.C. et al. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 273, p. C1124–C1129, 1997.

PITHON-CURI, C.P. et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 284, p. C1355- C1361, 2003.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos nutricionais sobre glutamina e atividade física. **Nutrire**, v. 25, p. 87-112, 2003.

ROGERO, M.M. et al. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**, v. 22, p. 564-571, 2006.

SAKATA, S. et al. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 733-737, 2007.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SHARMA, A.; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123-140, 1997.

SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Glutamine nutrition and requirements. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, p. 94S-99S, 1990.

SPITTLER, A. et al. Influence of Glutamine on the Phenotype and Function of Human Monocytes. **Blood**, v. 86, n. 4, p. 1564.-1569, 1995.

SPITTLER, A. et al. A glutamine deficiency impairs the function of cultured human monocytes. **Clinical Nutrition**, v.16, p. 97-99, 1997.

STORM, G. ; CROMMELIN, D.J.A. Liposomes: quo vadis?. **PSTT**, v. 1, n. 1, p.19-31, 1998.

TORCHILIN, V.P. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. **Nature Review Drug Discovery**, v. 4, p. 145- 160, 2005.

TORCHILIN, V.P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1532- 1555, 2006.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetica**, v. 70, p. 95-111, 1995.

VERMA, R.K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. **Pharmaceutical Technology On-line**, v. 25, p. 1-14, 2001.

WILMORE, D.W. The Effect of Glutamine Supplementation in Patients Following Elective Surgery and Accidental Injury. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2543S-2549S, 2001.

YOSHIZAWA, Y. et al. PEG liposomalization of paclitaxel improved its *in vivo* disposition and anti-tumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, p. 132-141, 2011.

ZAGO, M.A.; FLACÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. 1043 p.

ZHONG, Q; SHAH, B. Surface coating of L-glutamine solid microparticles for enteric delivery. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 538–544, 2013.