

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EDSON DE SOUZA MOURA

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA BOTULISMO TIPO D  
UTILIZANDO COMO ADJUVANTES MICROPARTÍCULAS E  
HIDROGEL DE QUITOSANA**

Belo Horizonte - MG

2011

EDSON DE SOUZA MOURA

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA BOTULISMO TIPO D  
UTILIZANDO COMO ADJUVANTES MICROPARTÍCULAS E  
HIDROGEL DE QUITOSANA**

Tese, como requisito parcial, para obter o grau de doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Dr. Armando da S. Cunha Júnior  
Co-orientador: Dr. Luiz Guilherme D. Heneine

Belo Horizonte - MG

2011

M929d Moura, Edson de Souza.  
Desenvolvimento de vacina contra botulismo tipo D utilizando como adjuvantes micropartículas e hidrogel de quitosana [recurso eletrônico] / Edson de Souza Moura. – 2011.  
1 recurso eletrônico (217 f. : il.) : pdf

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.  
Coorientador: Luiz Guilherme Dias Heneine.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Botulismo – Teses. 2. Vacinas – Teses. 3. Quitosana – Teses. 4. Micropartículas derivadas de células – Teses. 5. Adjuvantes de vacinas – Teses. 6. Tecnologia de liberação controlada – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.372

Elaborado por Luciene Aparecida Costa – CRB-6/2811

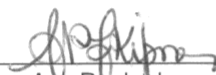
## FOLHA DE APROVAÇÃO

### EDSON DE SOUZA MOURA

#### "DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA BOTULISMO TIPO D UTILIZANDO COMO ADJUVANTES MICROPARTÍCULAS E HIDROGEL DE QUITOSANA"

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

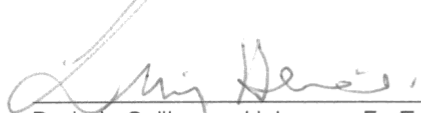
#### COMISSÃO EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis - UFG

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Eliana Martins Lima - UFG

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Otto Domenici Mozzer - Vallée S.A.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato - UFG

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luiz Guilherme Heinene – F. Ezequiel Dias

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Armando da Silva C. Junior - UFG

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por esta experiência de persistência e ampliação de conhecimento.

À VALLÉE S.A. e a UFMG que viabilizaram a execução deste trabalho.

Aos Diretores Américo Craveiro e Otto Mozzer por priorizar a excelência profissional de sua equipe.

Aos orientadores Armando da Silva Cunha e Luiz Guilherme Heneine, pelo apoio e incentivo que nos possibilitaram a conclusão desta tese.

A Eliane Macedo Sobrinho e Renato Vieira pelo valioso trabalho em experimentos com animais.

A Dra. Heloisa Tunes, da Biomm, pelo incentivo e valiosa discussão técnica para desenvolvimento dos processos cromatográficos.

À Professora de Bioestatística Marise Fagundes e Dr. Celso Maruta que prestaram consultoria estatística para este trabalho.

Aos colaboradores Dra. Maria Irene Yoshida do Departamento de Química, Sílvia Ligório, Jamile Barbosa e Guilherme Augusto da FUNED e Luiz Alves da Unimontes.

Aos estagiários Mônica Pacheco, Rafaela Martins, Denise Cordeiro, Sávio Miranda, Antônio Carlos Lopes, Samuel Góes e Mariana Moran pela incansável ajuda na realização dos ensaios.

Aos companheiros do LTF, Cecília e Elbi Bernardes, e colegas Alessandra, Larissa, Aparecida, Igor, Adair e Diogo pelo apoio na realização dos ensaios.

À minha família e amigos que sempre depositaram confiança em mim.

À Luciana, Celina e Thales, em todo momento, pelo carinho e paciência, fortalecendo-me na concretização desta etapa.

## RESUMO

O botulismo é uma intoxicação geralmente fatal causada pela neurotoxina botulínica. No Brasil é uma das principais causas de mortalidade bovina nos sistemas de produção de corte e leite. A doença é causada pelas toxinas botulínicas tipo C e D produzidas por *Clostridium botulinum* presentes em matéria orgânica vegetal ou animal decompostas. A ocorrência da doença está associada à osteofagia, devido à carência nutricional, e ingestão de água contaminada ou alimentos mal conservados. O diagnóstico é clínico e o tratamento é inviável devido a não disponibilidade de soro. A recomendação é a prevenção através da vacinação, remoção de carcaças de animais do campo e melhor conservação de água e alimentos. A vacinação é anual, sendo que animais primovacinados devem receber dose de reforço em até quatro semanas. O esquema de vacinação aumenta o manejo resultando em prejuízo econômico, pela perda de peso dos animais, e menor adesão ao esquema de vacinação. Visando a obter uma vacina de dose única por meio de um sistema de liberação prolongada do antígeno, neste trabalho foram desenvolvidas duas vacinas baseadas em micropartículas e hidrogel de quitosana. Para se obter um perfil de resposta imunológica desejável, a quitosana foi previamente caracterizada e selecionada e a toxina foi purificada parcialmente e destoxificada. O processo de obtenção de micropartículas contendo toxóide botulínico tipo D foi padronizado por meio de estudo dos parâmetros críticos do processo. As vacinas formuladas foram avaliadas, em comparação com a vacina convencional a base hidróxido de alumínio, por intermédio do teste de eficácia em cobaias e medida de título de anticorpos antitoxina botulínica tipo D por soroneutralização em camundongos. Os dados obtidos demonstram que as formulações a base de quitosana possibilitam a produção de vacinas viáveis, capazes de estimular uma resposta imunológica protetora por mais tempo e mais intensa a partir de uma única dose. Os perfis de formação de anticorpos específicos no soro sugerem que as formulações a base de quitosana se comportam como sistemas de liberação prolongada do antígeno.

Palavras chave: quitosana, micropartículas, liberação prolongada de antígeno, toxina botulínica tipo D, purificação de proteína, adjuvante, *Clostridium botulinum*, *single shot*.

## ABSTRACT

Botulism is often a fatal poisoning caused by botulinum neurotoxin. In Brazil it is one of the main causes of mortality in production systems of beef and milk. The disease is caused by botulinum toxin type C and D produced by *Clostridium botulinum* present in decomposed organic matter from plant or animal. The occurrence of the disease is associated with bone chewing due to nutritional deficiency, and with ingestion of contaminated or poorly maintained food. The diagnosis is clinical, and the treatment is impractical due to unavailability of serum. Prevention through vaccination, removal of animal carcasses from the pasture field and better conservation of water and food are recommended. The vaccination is annual, and primed animals should receive a booster dose within four weeks. This vaccination program requires a better management, what results in economic damage due to weight loss, and a decreased adherence to vaccination. In a search for a single dose vaccine through a system of sustained release of antigen, this study has developed two vaccines based on microparticles and hydrogels of chitosan. In order to obtain a desirable profile of immune response, chitosan has been previously characterized and selected, and the toxin was partially purified and detoxified. The process of obtaining microparticles containing type D botulinum toxin was standardized through the study of critical process parameters. The formulated vaccines were evaluated in comparison with the conventional vaccine containing aluminum hydroxide through testing efficacy in guinea pigs, and measurement of antibody titer by type D botulinum antitoxin through neutralization in mice. The results have showed that the chitosan-based formulations enable the production of viable vaccines which are capable of stimulating a more intense and protective immune response for a longer period after a single dose. The profiles of specific antibody formation in serum suggest that chitosan-based formulations behave as systems for prolonged release of antigens.

Keywords: chitosan, microparticles, hydrogel, sustained release of antigen, botulinum toxin type D, purification of protein, *Clostridium botulinum*, adjuvant, single shot.

## LISTA DE FIGURAS

1 - Mecanismo de ação da toxina botulínica.....	25
2 - Estrutura da quitosana .....	34
3 - Fluxograma do processo e controle da produção e purificação da toxina do <i>C. botulinum</i> tipo D.....	57
4 - Biorreator B. Braun® utilizado para produção da toxina botulínica de <i>C. botulinum</i> tipo D.	58
5 - Sistema <i>Hollow Fiber</i> , de filtração tangencial, montado com cartucho <i>Hollow Fiber</i> UFP-30-E-5A e bomba de lóbulos Teknoflow Unibloc PD.....	61
6 - Coluna cromatográfica XK-50 contendo resina <i>Q-Sepharose High Performance (HP)</i> utilizada para purificação da toxina botulínica tipo D sob condições de eluição isocráticas.....	64
7 - Colônias de <i>C. botulinum</i> tipo D cultivadas em placas contendo meio PGYA observadas em estereomicroscópio. Aumento de 15X.....	106
8 - Células típicas de <i>C. botulinum</i> tipo D em fase exponencial, coradas pela técnica de Gram, observadas ao microscópio óptico. Aumento de 1000X.....	107
9 - Concentração de células (D.O.), concentração de glicose e volume de solução de NaOH 10N adicionado ao meio do cultivo de <i>C. botulinum</i> tipo D a 37°C, em meio de cultura PYG, pH controlado em 6,5, durante 107h.....	110
10 - Concentração de células (D.O.), concentração de glicose e volume solução de NaOH 10N adicionado ao meio de cultivo do <i>C. botulinum</i> tipo D a 37°C, em meio de cultura PYG, pH controlado em 6,5, durante as primeiras 12h.....	111
11 - Cromatogramas das amostras de meio de cultivo do <i>C. botulinum</i> tipo D nos tempos zero (A), 9h (B) e 24h (C) obtidos por CLAE. Verifica-se a redução da concentração de glicose e o surgimento de picos resultantes do metabolismo do microorganismo. Condições cromatográficas: coluna Aminex HPX-87H, solução de ácido sulfúrico 5mM como fase móvel, fluxo 0,6mL.min <sup>-1</sup> , volume de injeção 10µL, temperatura 43°C e tempo de corrida 15min.....	112
12 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) da amostra da toxina de <i>C. botulinum</i> tipo D, após concentração em <i>Hollow Fiber</i> de corte molecular de 30kDa: (1); marcador de massa molar (MM). Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas.....	114
13 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) do ensaio de precipitação com sulfato de amônio com 60 e 85% de saturação: marcador de massa molar (MM); precipitado a 60% de saturação 2x diluído (1); precipitado a 60% de saturação 5x diluído (2); precipitado a 60% de saturação 10x diluído (3); precipitado a 85% de saturação 2x diluído (4); precipitado a 85% de saturação 5x diluído (5); precipitado a 85% de saturação 10x diluído (6); amostra do cultivo microfiltrada (7). Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas.....	116
14 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) da amostra do meio do cultivo de <i>C. botulinum</i> tipo D, concentrado 3,8x e diafiltrado em tampão acetato de amônio 50mM, pH 8,0, utilizando membrana <i>Hollow Fiber</i> (corte molecular de 30kDa): A1 e A2 (amostra diluída 1x); marcador de massa molar (MM). Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas.....	117

15 - Primeira cromatografia de troca iônica: perfil cromatográfico da amostra do meio de cultura de <i>C. botulinum</i> tipo D previamente diafiltrada em <i>Hollow Fiber</i> de corte molecular de 30kDa, aplicada em coluna <i>Q-Sepharose Hi Trap</i> e eluída por gradiente utilizando solução de acetato de amônio 50mM (pH8,0) e solução de acetato de amônio 1M (pH 8,0). As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo volume em mL do pico a 280nm: fração 1 (8,58), fração 2 (34,90), fração 3 (48,50), fração 4 (63,80), fração 5 (87,80), fração 6 (100,60), fração 7 (117,10) e fração 8 (129,90).....	119
16 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 8 eluídas em coluna <i>Q-Sepharose Hi-Trap</i> referente a primeira cromatografia de troca iônica: AA, amostra aplicada na coluna; MM marcador de massa molar. Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 15.....	119
17 - Segunda cromatografia de troca iônica: perfil cromatográfico da amostra da fração 6 obtida na primeira cromatografia de troca iônica, aplicada em coluna <i>Q-Sepharose Hi Trap</i> e eluída por gradiente utilizando solução de acetato de amônio 50mM (pH8,0) e solução de acetato de amônio 1M (pH 8,0). As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo volume em mL do pico a 280nm: fração 1 (8,91), fração 2 (55,30) e fração 3 (62,98) .....	120
18 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) 1, 2 e 3 eluídas da segunda cromatografia de troca iônica utilizando coluna <i>Q-Sepharose Hi-Trap</i> , gradiente tampão acetato de amônio 50mM pH 6,0 e tampão acetato de amônio 1M pH 6,0. Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 17.....	121
19 - Perfil cromatográfico da fração 5 e 6 reunidas da primeira cromatografia de troca iônica, aplicada em coluna Source 15Q e eluída por gradiente utilizando solução de acetato de amônio 50mM (pH 8,0) e solução de acetato de amônio 1M (pH 8,0). As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo volume em mL do pico a 280nm: fração 1 (14,25), fração 2 (31,50), fração 3 (39,02), fração 4 (46,68), fração 5 (54,63), fração 6 (64,29), fração 7 (73,23), fração 8 (95,43), fração 9 (122,84) e fração 10 (122,84). As frações 3 e 4, 9 e 10, bem como, 5, 6, 7 e 8 foram misturadas.....	122
20 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 2 a 11 eluídas na cromatografia de troca iônica a temperatura de 25°C, utilizando coluna Source 15Q e gradiente de tampão acetato de amônio pH 8,0. Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 19.....	123
21 - Perfil cromatográfico da amostra do meio de cultura do <i>C. botulinum</i> tipo D previamente diafiltrada em <i>Hollow Fiber</i> 30kDa, aplicada em coluna <i>Q-Sepharose Hi Trap</i> e eluída por etapas utilizando solução de acetato de amônio 50mM (pH 8,0) e solução de acetato de amônio 1M (pH 8,0). As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo volume em mL do pico a 280nm: fração 1 (10,09), fração 2 (22,21), fração 3 (36,70), fração 4 (47,20), fração 5 (67,96) e fração 6 (87,08).....	125
22 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 6 eluídas em etapas em coluna <i>Q-Sepharose Hi-Trap</i> . Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 21.....	126
23 - Perfil cromatográfico da amostra de meio de cultura de <i>C. botulinum</i> tipo D previamente diafiltrada em <i>Hollow Fiber</i> 30kDa, aplicada em coluna <i>Q-Sepharose HP XK-50</i> e eluída por etapas utilizando solução de acetato de amônio pH 8,0 (sequência A): 50mM, 240mM, 335mM, 380mM e 1M. As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo pico a 280nm: fração 1, fração 2, fração 3, fração 4, fração 4a, fração 5, fração 5a e fração 6. Leitura a 280nm e velocidade do papel de 1mm.min <sup>-1</sup> .....	127

24 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 6 eluídas da coluna Q-Sepharose HP conforme sequência A. Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 23. Observa-se banda referente à toxina botulínica tipo D em todas as frações.....	128
25 - Perfil cromatográfico da amostra de toxina de <i>C. botulinum</i> tipo D previamente diafiltrada em <i>Hollow Fiber</i> 10kDa, aplicada em coluna Q-Sepharose HP XK-50 e eluída por etapas utilizando solução de acetato de amônio pH 8,0 (sequência B): 50mM, 180mM, 200mM, 240mM, 335mM, 380mM e 1M. As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo pico a 280nm: fração 1, fração 2, fração 3, fração 4, fração 5, fração 6, fração 6a, fração 7 e fração 8. Leitura a 280nm e velocidade do papel de 1mm.min <sup>-1</sup> .....	130
26 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 8 eluídas da coluna Q-Sepharose HP conforme sequência B. Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 25. Observa-se banda referente a toxina botulínica D nas frações 6, 6a, 7 e 8.....	131
27 - Perfil cromatográfico da amostra de toxina de <i>C. botulinum</i> tipo D a 280nm previamente diafiltrada em <i>Hollow Fiber</i> 30kDa, aplicada em coluna Q-Sepharose HP XK-50 e eluída por etapas utilizando solução de acetato de amônio pH 8,0 (sequência C): 50mM, 250mM, 350mM, 400mM e 1M. As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelas setas ao final de cada fração: fração 1, fração 2, fração 2a, fração 3, fração 4 e fração 5. Velocidade do papel de 1mm.min <sup>-1</sup> .....	133
28 - SDS Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 5 eluídas da coluna Q-Sepharose HP conforme sequência C. Gel corado por <i>comassie blue</i> para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 27: fração 2, fração 2a, fração 3, fração 4, fração 5. Observa-se banda de 150kDa atribuída à toxina botulínica tipo D nas frações 3 e 4.....	134
29 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) do processo de purificação por precipitação ácida, corado por <i>comassie blue</i> : MM – marcador de massa molar; 1 - amostra microfiltrada; 2 - toxina precipitada em meio ácido; 3 - toxina diafiltrada; 4 - resíduo final após centrifugação. Imagem ajustada utilizando o programa Microsoft® Office Picture Manager.....	140
30 - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações do processo de purificação por precipitação ácida, corado por <i>comassie blue</i> : 1 – marcador de massa molar; 2 – toxina precipitada em meio ácido; 3 – sobrenadante da precipitação ácida; 4 – sobrenadante da precipitação ácida (amostra concentrada por liofilização). Imagem ajustada utilizando o programa Microsoft® Office Picture Manager.....	140
31 - Curva de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para amostras de quitosana fornecidas pela Sigma-Aldrich (A), Hydagen® (B), Polymar (C) e Chitopharm® (D).....	145
32 - Espectro na região do infravermelho da quitosana Chitopharm® .....	149
33 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H obtido para a amostra de quitosana Sigma-Aldrich (500MHz, D <sub>2</sub> O + DCI, 70°C).....	151
34 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da quitosana Sigma-Aldrich em temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 50°C (500MHz, D <sub>2</sub> O + DCI).....	152
35 - Perfil térmico obtido por DSC da amostra de quitosana fornecida pela Sigma-Aldrich, sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> .....	153

36 - Perfil térmico obtido por DSC da amostra de quitosana Hydagen <sup>®</sup> , sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> .....	154
37 - Perfil térmico obtido por DSC da amostra de quitosana fornecida pela Polymar, sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> .....	154
38 - Perfil térmico obtido por DSC da amostra de quitosana Chitopharm <sup>®</sup> , sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> .....	155
39 - Curva termogravimétrica da amostra de quitosana fornecida pela Sigma-Aldrich, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	157
40 - Curva termogravimétrica da amostra de quitosana Hydagen <sup>®</sup> , sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	157
41 - Curva termogravimétrica da amostra de quitosana fornecida pela Polymar, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	158
42 - Curva termogravimétrica da amostra de quitosana Hydagen <sup>®</sup> , sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	158
43 – Curva turbidimétrica da precipitação de quitosana em pH 3,0 e 5,0 em função do volume adicionado de solução de sulfato de sódio 20%p/V.....	164
44 – Resultados dos ensaios do esquema experimental I (n=3).....	167
45 - Distribuição granulométrica acumulada D <sub>10</sub> , D <sub>50</sub> e D <sub>90</sub> correspondentes aos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 (esquemas experimentais II e III).....	171
46 – Valores médios de absorvância a 500nm das preparações de micropartículas carregadas com BSA correspondentes aos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 (esquemas experimentais II e III).....	172
47 - Fotomicrografias das micropartículas de quitosana carregadas com toxóide botulínico tipo D (vacina Q3) aumentos de 3000 (A), 5000 (B) e 10000 (C e D) vezes (15 kV).....	180
48 – Título de anticorpos do <i>pool</i> de soros de cobaias (n=6) contra toxina botulínica tipo D (BoNT D) em função do tempo após administração de dose de 5mL por via subcutânea no dia zero contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente a 50.000 DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> (H2a e Q2) e 75.000DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> (H3a e Q3). Os animais dos grupos H2a e H3a receberam dose reforço de mesmo volume no dia 21. Os animais dos grupos Q2 e Q3 foram imunizados com dose única. As análises foram realizadas em duplicata.....	182
49 – Título de anticorpos do <i>pool</i> de soros de cobaias contra toxina botulínica tipo D (BoNT D) em função do tempo após administração de dose de 5mL por via subcutânea contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente 75.000DL <sub>50</sub> .mL <sup>-1</sup> . Os animais do grupo Ha' foram imunizados nos dias 0 e 21. Os animais dos grupos Q, G e M foram imunizados com dose única no dia 0. Foi analisado <i>pool</i> de soro de 12 animais no dia 42 e de no mínimo 6 animais nos dias 63, 84, 105, 126, 147 e 168. As análises foram realizadas em duplicata.....	184
50 – Título de anticorpos dos soros individuais de cobaias contra toxina botulínica tipo D (BoNT D) em função do tempo após administração de dose de 5mL por via subcutânea contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente 75.000DL <sub>50</sub> .mL <sup>-1</sup> . Os animais do grupo Ha' foram imunizados nos dias 0 e 21. Os animais dos grupos Q, G e M foram imunizados com dose única no dia 0. Foram analisadas amostras de soro de 12 animais no dia 42 e de no mínimo 5 animais nos dias 63, 84, 105, 126, 147 e 168.....	186

## LISTA DE TABELAS

1 - Características dos grupos de <i>C. botulinum</i> classificados pelo comportamento fisiológico.....	23
2 - Determinação da DL <sub>50</sub> através de diluição seriada da toxina botulínica, utilizando-se o fator 10, a partir da amostra pura até a diluição 10 <sup>-7</sup> , com uso de salina 0,85%(p/V), em banho de gelo..	73
3 - Leitura hipotética do resultado da técnica DL <sub>50</sub> .....	74
4 - Primeira etapa da determinação da L+, através de diluição seriada da toxina botulínica, utilizando-se o fator 10, até diluição 10 <sup>-6</sup> , com uso de salina 0,85%(p/V), em banho de gelo.....	76
5 - Primeira etapa da determinação da L+ através da mistura da toxina diluída conforme Tabela 7 com antitoxina padrão (1UI.mL <sup>-1</sup> ) .....	76
6 - Leitura do resultado do teste L+. Primeira etapa do teste L+, com fator de diluição 10.....	77
7 - Segunda etapa do teste L+, com diluições do intervalo a partir da diluição em que todos os animais morreram até a diluição 1:176.890.....	78
8 - Diluição seriada do toxóide botulínico tipo D para determinação do TCP, utilizando-se o fator 1:10, com uso de salina 0,85%(p/V), em banho de gelo.....	79
9 - Determinação do TCP, através da reação do toxóide botulínico tipo D com antitoxina padrão (2UI.mL <sup>-1</sup> ) e toxina padrão (10L+/10 mL <sup>-1</sup> ), diluído conforme Tabela 8.....	80
10 - Diluições do soro teste e antitoxina padrão utilizados na prova de soroneutralização.....	81
11 - Obtenção de micropartículas brancas, micropartículas brancas com Lutrol F 127 e micropartículas carregadas com toxóide e contendo Lutrol F 127 em função do volume adicionado de solução de sulfato de sódio 20%(p/V) .....	94
12 - Estudo da influência da velocidade de agitação, fluxo de adição de solução de sulfato de sódio 20%(p/V) e da marca comercial de quitosana em presença ou não de Lutrol F 127 nas características das micropartículas carregadas com BSA.....	96
13 - Primeiro esquema de imunização via subcutânea e sangria de cobaias para avaliação da formação de anticorpos contra toxina botulínica tipo D de vacinas adjuvantadas com hidróxido de alumínio (H1a, H2a, H3a, H1b, H2b e H3b) ou micropartículas de quitosana em gel (Q1, Q2 e Q3). Os grupos H1a, H2a e H3a com adjuvante hidróxido de alumínio receberam duas doses (dias 0 e 21) e os demais grupos apenas uma dose no dia inicial. As vacinas continham quantidade de toxóide botulínico tipo D (lote 01) equivalente a 10.000 (H1a, H1b, Q1), 50.000 (H2a, H2b, Q2) e 75.000 DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> (H3a, H3b e Q3) .....	103
14 - Esquema de imunização e sangria de cobaias para experimento de comparação da cinética de formação de anticorpos contra toxina botulínica tipo D em resposta a tratamentos com e sem dose de reforço, utilizando quantidade de toxóide lote 02 equivalente a 75.000DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> , variando-se formulações de vacinas utilizando adjuvante hidróxido de alumínio (Ha'), micropartículas de quitosana em gel (Q), gel de quitosana (G) e micropartículas de quitosana (M).....	104

15 - Sequência A da cromatografia da amostra contendo toxina botulínica tipo D a partir da diafiltração em <i>Hollow Fiber</i> 30kDa.....	126
16 - Sequência B da cromatografia da amostra contendo toxina botulínica tipo D a partir da diafiltração em <i>Hollow Fiber</i> 30kDa.....	129
17 - Sequência C da cromatografia da amostra contendo toxina botulínica tipo D a partir da diafiltração em <i>Hollow Fiber</i> 30kDa.....	131
18 – Resultados de rendimento e fator de purificação das etapas de clarificação e purificação de baixa resolução da amostra de cultivo de <i>C. botulinum</i> tipo D.....	135
19 - Resultados de rendimento e fator de purificação da primeira cromatografia de troca iônica (sequência C) da etapa de purificação de alta resolução da amostra de toxina botulínica tipo D.....	136
20 - Resultados de rendimento e fator de purificação da segunda cromatografia de troca iônica da etapa de purificação de alta resolução da amostra de toxina botulínica tipo D.....	137
21 - Resultados de rendimento e fator de purificação após etapas de microfiltração, precipitação ácida e diafiltração a partir de meio de cultivo de <i>C. botulinum</i> tipo D.....	139
22 - Resultados de L+/10 do estudo de estabilidade da toxina botulínica após etapas de centrifugação, microfiltração e diafiltração pH 7,0 e 8,0 do processo de purificação.....	141
23 - Grau de desacetilação (GD) determinado por titulação potenciométrica das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen®, Polymar e Chitopharm® (n=3).....	144
24 - Resultados de cinzas sulfatadas, proteína total, acidez/alcalinidade e metais pesados das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen®, Polymar e Chitopharm® (n=3).....	146
25 - Relação de bandas de absorção da quitosana no infravermelho.....	148
26 - Grau de desacetilação (GD) determinado por análise no infravermelho das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen®, Polymar e Chitopharm®.....	150
27 - Distribuição de massas molares médias $M_n$ , $M_w$ e $M_z$ e dos valores de Q e Q' de quitosanas de diferentes marcas comerciais utilizando a técnica de GPC realizada em um TDA 302 – <i>Triple Detector Array</i> (detectores de índice de refração, viscosímetro e <i>ligh scattering</i> ) calculadas pelo <i>software</i> Viscotek OmniSEC V.4.1.0.224 (n=2).....	161
28 - Esquema experimental II e III: estudo da obtenção de micropartículas carregadas com toxóide botulínico tipo D sob variação da velocidade de agitação e do fluxo de adição de sulfato de sódio 20%(p/V), em presença (G2 e G4) ou não (G1 e G3) de Lutrol F 127; alteração da marca comercial de quitosana com adição (G6) ou não de Lutrol F127 (G5) .....	171
29 - Valores médios de $D_{50}$ e desvio padrão, obtidos no preparo de micropartículas dos grupos G1, G2, G3 e G4.....	174
30 - Valores médios de absorvância e desvio padrão das leituras das preparações de micropartículas dos grupos G1, G2, G3 e G4.....	175
31 - Valores médios de $D_{50}$ e de absorvância a 500nm e seus respectivos desvios padrão das preparações de micropartículas dos grupos G5 e G6.....	176
32 - Comparação entre os valores médios de $D_{50}$ , desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 .....	177

33 - Comparação entre os valores médios de absorvância, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6.....	177
34 – Resultados do teste de inativação e do teste TCP das amostras de toxóide lote 01 e 02 recém preparadas e após 4 meses sob refrigeração .....	179
35 – Resumo das formulações de vacinas preparadas para testes biológicos.....	179
36 – Média e desvio padrão dos títulos de anticorpos dos indivíduos dos grupos Q2 e Q3 obtidos nos dias 42, 63, 84, 105 e 126 após imunização.....	183
37 – Medianas dos títulos de anticorpos dos indivíduos dos tratamentos com vacinas M, Q, Ha' e G obtidos nos dias 42, 63, 84, 105, 126, 147 e 168 após imunização.....	187
38 – Título de anticorpos contra toxina botulínica tipo D do <i>pool</i> de soro de cobaias (n=12) no dia 42 após administração subcutânea de dose única das vacinas adjuvantadas com micropartículas de quitosana em gel (Q e Q') e com gel de quitosana (G, G') contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente 75.000DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> .....	188
39 - Sobrevivência de cobaias a dose de desafio com toxina botulínica tipo D devido ao efeito da vacinação com as formulações Q' e G'.....	189

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
BSA	Albumina de soro bovino
BoNT	Toxina botulínica
CFR	<i>Code Federal Regulation</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CSL	<i>Commonwealth Serum Laboratories</i>
DMM	Dose mortal mínima, que corresponde a menor dose capaz de matar 100% dos animais inoculados em determinado período de tempo.
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
D.O.	Densidade ótica
DL <sub>50</sub>	Dose capaz de matar 50% de uma população em determinado período de tempo
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
Fr	Fração
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
IgG	Imunoglobulina G
ISCOMs	Complexos imunoestimulatórios formado por mistura de colesterol, fosfolípides e saponina
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
kDa	Quilo daltons
L+/10	Limite de morte: menor quantidade de toxina que frente a 0,1 UI mata pelo menos 80% dos camundongos inoculados
L0/10	Limite de vida: maior quantidade de toxina que frente a 0,1 UI não causa morte ou doença nos animais inoculados
LCST	<i>Lower critical solution temperature</i>
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
LTV	Laboratório de Tecnologia de Vacinas
NALP3	Complexo inflamossomo

NAPs	Neurotoxinas não tóxicas associadas a proteínas
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
Ln	Logarítmo neperiano
PA	Padrão analítico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLGA	Ácido polilático-co-glicólico
rBoNT Hc	Cadeia pesada C-terminal da toxina botulínica recombinante
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de próton
S	Desvio padrão
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório -
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Dodecyl sulphate sodium - polyacrylamide gel eletrophoresis.</i>
SNARE	Fator solúvel N-etilmaleimida-sensitivo anexado ao complexo protéico receptor
TCP	<i>Total Combining Power</i> - Menor quantidade de toxóide capaz de neutralizar 1UI de antitoxina específica.
TEMED	N,N, N', N'-tetra-metil-etilenodiamino
TG	Termogravimetria
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TMP	Pressão transmembrana
TNF	Fator de necrose tumoral
TPP	Tripolifosfato
u.a.	Unidades de absorvância
VAMP	sinaptobrevina

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	20
1.1 Botulismo .....	20
1.1.1 Prevenção .....	25
1.2 Sistemas de liberação de proteínas .....	28
1.2.1 Imunologia dos sistemas particulados .....	31
1.3 Quitosana .....	33
1.4 Preparo de microesferas de quitosana .....	36
1.4.1 Coacervação simples .....	38
1.4.2 Emulsificação com evaporação do solvente .....	38
1.4.3 <i>Spray Drying</i> .....	39
1.5 Sistemas de gelificação <i>in situ</i> .....	39
1.5.1 Baixa temperatura crítica de transição .....	40
1.6 Purificação da toxina botulínica .....	42
1.7 Métodos de quantificação da toxina botulínica .....	45
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>47</b>
2. JUSTIFICATIVA .....	48
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>51</b>
3. OBJETIVOS .....	52
3.1 Objetivo geral .....	52
3.2 Objetivos específicos .....	52
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>53</b>
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	54
4.1 Materiais .....	54
4.2 Locais de realização do trabalho e condições experimentais do uso de animais .....	54
4.3 Obtenção da toxina botulínica tipo D .....	55
4.3.1 Microorganismo .....	56
4.3.2 Meios de cultura .....	56
4.3.3 Condições de cultivo .....	57
4.3.4 Purificação via cromatografia .....	59
4.3.5 Processo de purificação via precipitação ácida .....	65
4.4 Estudos de estabilidade da toxina botulínica .....	67
4.5 Métodos de controle de qualidade no desenvolvimento de vacinas .....	67
4.5.1 Tipificação da bactéria <i>Clostridium botulinum</i> tipo D .....	67
4.5.2 Determinação da concentração celular .....	68
4.5.3 Quantificação de glicose e identificação de metabólitos .....	68
4.5.4 Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	69
4.5.5 Quantificação de proteína .....	70
4.5.6 Ensaio <i>in vivo</i> .....	72
4.5.7 Purificação da toxina botulínica .....	81
4.6 Caracterização da quitosana .....	82
4.6.1 Titulação potenciométrica .....	82
4.6.2 Espectrometria UV .....	83
4.6.3 Espectroscopia de Infravermelho (IV) .....	84
4.6.4 Ressonância magnética nuclear de prótons - RMN <sup>1</sup> H .....	85
4.6.5 Calorimetria exploratória diferencial – DSC .....	86
4.6.6 Termogravimetria – TG .....	86

4.6.7 Perda por dessecação .....	87
4.6.8 Acidez ou alcalinidade .....	87
4.6.9 Determinação de proteína .....	88
4.6.10 Metais pesados .....	88
4.6.11 Cinzas sulfatadas .....	89
4.6.12 Cromatografia em Permeação em Gel avançado (GPC avançado) .....	90
4.7 Preparo de micropartículas de quitosana .....	92
4.7.1 Curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio .....	92
4.7.2 Preparo das micropartículas carregadas .....	92
4.7.3 Estudo do processo de preparação de micropartículas .....	93
4.7.4 Caracterização das micropartículas de quitosana .....	97
4.8 Obtenção de vacinas .....	99
4.8.1 Destoxificação da toxina botulínica .....	99
4.8.2 Estudo de estabilidade do toxóide botulínico tipo D .....	99
4.8.3 Produção de vacinas contra botulismo tipo D .....	100
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>105</b>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	105
5.1 Tipificação e cultivo da bactéria <i>Clostridium botulinum</i> tipo D .....	105
5.2 Purificação da toxina botulínica a partir de cultivo em biorreator do <i>C. botulinum</i> tipo D .....	113
5.2.1 Clarificação .....	113
5.2.2 Purificação de baixa resolução .....	115
5.2.3 Cromatografia de Troca Iônica – eluição gradiente .....	117
5.2.4 Cromatografia de Troca Iônica – eluição isocrática .....	123
5.2.5 Desempenho das etapas de purificação .....	132
5.2.6 Purificação da toxina botulínica pelo processo de precipitação ácida .....	138
5.2.7 Estudo de estabilidade da toxina botulínica tipo D nas etapas intermediárias do processo de purificação .....	141
5.3 Caracterização da quitosana .....	142
5.3.1 Titulação potenciométrica .....	143
5.3.2 Espectrofotometria na região ultra-violeta (UV) .....	146
5.3.3 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV) .....	147
5.3.4 Análise de quitosana por RMN <sup>1</sup> H .....	150
5.3.5 Análise calorimétrica .....	152
5.3.6 Cromatografia em Permeação em Gel avançado (GPC avançado) .....	159
5.3.7 Avaliação geral dos resultados de caracterização .....	162
5.4 Obtenção de micropartículas de quitosana por precipitação com sulfato de sódio .....	163
5.4.1 Avaliação do pH na formação de micropartículas .....	163
5.4.2 Taxa de encapsulamento das micropartículas de quitosana .....	165
5.4.3 Estudo do processo de preparo das micropartículas .....	165
5.5 Obtenção de vacinas para experimentação <i>in vivo</i> .....	177
5.6 Estudo de eficácia das vacinas utilizando quitosana como adjuvante .....	180
5.7 Perspectivas futuras .....	190
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>192</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>192</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>193</b>
<b>ANEXO A – CERTIFICADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) .....</b>	<b>216</b>

## CAPÍTULO 1



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Botulismo

As toxinas botulínicas (BoNTs) são as substâncias mais letais conhecidas. Doses em nível de  $1\text{ng.kg}^{-1}$  de peso são suficientes para causar paralisia fatal dos músculos respiratórios (BYRNE; SMITH, 2000; DEPAZ; HENDERSON; ADVANT, 2005). O botulismo é uma intoxicação não febril, geralmente fatal, caracterizada por peresia e paralisia flácida, envolvendo a musculatura da locomoção, mastigação e deglutição. Após a absorção, a neurotoxina distribui-se pela circulação linfática e sanguínea. Age sobre os receptores das terminações nervosas periféricas, bloqueando a liberação de acetilcolina, resultando na paralisia flácida progressiva dos músculos estriados e a morte ocorre por parada respiratória (BARROS *et al.*, 2006; ORTOLANI *et al.*, 1997; QUEIROZ, 2001; SONGER, 1997).

O botulismo bovino é considerado uma doença endêmica na América do Sul, América do Norte, Oceania e África, e está associada ao hábito de osteofagia, geralmente nas áreas deficientes em fósforo (QUEIROZ, 2001; SONGER, 1997). Os agentes causadores de botulismo são *Clostridium botulinum*, *Clostridium barati* e *Clostridium butyricum* (SHIAVO, MONTECUCCO, 1997). Entretanto, amostras toxigênicas de *C. butyricum* e *C. barati* são muito raras (HATHEWAY; JOHNSON, 1998).

O *C. botulinum* pode ser encontrado no solo, poeira, frutas e vegetais frescos, carnes e peixes, água e tubo digestivo de espécies animais e do homem. Os cadáveres em decomposição têm papel importante como fonte de contaminação. Em seu estado vegetativo, esta bactéria pode ser inativada por compostos clorados após cerca de 20min de contato, pela luz solar após 1 a 3 horas ou por aquecimento por 5min a  $85^{\circ}\text{C}$ . Mas, os esporos são resistentes ao calor, luz, desidratação e radiação. São inativados por calor a  $121^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 20min e em contato com cloro, formaldeído, ácidos fortes, bases fortes, óxido de etileno e de propileno. São resistentes a luz ultravioleta, alcoóis, compostos fenólicos e compostos orgânicos mercuriais (ARNON *et al.*, 2009; FERRARI; WEISSE, 1995; VU, 2006).

As neurotoxinas produzidas por *C. botulinum* são classificadas em sete tipos sorologicamente distintos (A-G) que são neutralizadas somente pelas antitoxinas homólogas, porém apresentam ação farmacológica similar. *C. botulinum* tipos A, B e G são encontrados em solo, enquanto os tipos C, D, E e F estão mais frequentes em ambientes úmidos. Os tipos C e D, de maior importância epidemiológica em bovinos, produzem os componentes C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e D, em diferentes quantidades. As toxinas C<sub>1</sub> e D são responsáveis pelos sinais neurológicos da doença e a toxina binária C<sub>2</sub> causa necrose da mucosa intestinal, hipotensão e hemorragia. Ainda não está claro o papel do componente C<sub>3</sub> como fator virulento (BARROS *et al.*, 2006; BÖHNEL; GESSLER, 2005; QUEIROZ, 2001; RAWAT; AHMED; SWAMINATHAN, 2008; SONGER, 1997). Os genes que codificam a produção de BoNTs tipo C e D estão associados ao fago, enquanto para BoNT tipo G os genes aparecem associados ao plasmídeo. Os demais tipos de toxina apresentam genes associados ao cromossoma, embora existam evidências de fago transferência para BoNT tipo E em *C. butyricum* toxigênico (HATHEWAY; JOHNSON, 1998; JOHNSON; BRADSHAW, 2001).

Botulismo em humanos é resultante dos sorotipos A, B, E e F; em equinos, é causado mais comumente pelos tipos A, B e C; animais de pêlo, como furão, são mais notoriamente sensíveis ao botulismo tipo C e, em menor grau, aos tipos A e B; pássaros são sensíveis ao tipo A, muito sensíveis aos tipos C e E, mas podem manter *C. botulinum* tipo D em seu intestino sem apresentar sintomas; os peixes são especialmente vulneráveis ao tipo E (DEPREZ, 2006). No Brasil, o botulismo em bovinos é causado pela ingestão de neurotoxinas C ou D de *C. botulinum* presentes em matéria orgânica vegetal ou animal decompostas (BARROS *et al.*, 2006; SAKAGUCHI, 1983). Mas, nos Estados Unidos e em outras regiões está associado aos tipos A e B (DEPREZ, 2006; MYLLYKOSKI *et al.*, 2006; SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1990; WHITLOCK; WILLIAMS, 1999).

O botulismo é uma das principais causas de mortalidade bovina nos sistemas de produção de corte e leite nas regiões sudeste e centro-oeste brasileiras. Ovinos, caprinos, equinos, aves e, esporadicamente, os suínos também podem ser acometidos (BARROS *et al.*, 2006). As ocorrências de intoxicação em gado de modo geral estão associadas à osteofagia (TOKARNIA *et al.*, 1970). Outras causas menos

comuns envolvem a ingestão de água contaminada (DUTRA *et al.*, 2001; LANGENEGGER; DÖBEREINER, 1988) e de alimentos contaminados e conservados inadequadamente, como a cama de frango, silagem e milho (DUTRA *et al.*, 2001; DUTRA; DÖBEREINER; SOUZA, 2005). A maior incidência da doença ocorre em fêmeas adultas prenhes ou lactantes e com maior frequência sazonal registrada na época das chuvas, provavelmente devido à maior exigência nutricional nesta categoria de animal e pela dificuldade de suplementação mineral nessa época (DUTRA *et al.*, 2001; LISBOA *et al.*, 1996).

A Tabela 1 apresenta as diferenças em cultivo que permitem classificar o *C. botulinum* em quatro grupos, conforme proposto por Smith e Sugiyama (1977 *apud* FERREIRA, 2002). Contudo, Oguma *et al.* (1986) estudaram cepas toxigênicas e não toxigênicas de *C. botulinum* tipos C e D e observaram que embora todas as culturas fossem capazes de fermentar glicose e ribose, apresentavam propriedades bioquímicas variadas, comportamentos diferentes para fermentação de açúcares e produção de lectinase, indol e sulfeto de hidrogênio.

Estes clostrídios produzem as toxinas progenitoras como complexos de 300, 500 ou 900kDa com componentes não tóxicos (NAPs – *non-toxic neurotoxin associated proteins*), alguns com atividade hemaglutinante. Esses complexos são também conhecidos como toxinas M, L e LL de tamanho molecular 12S, 16S ou 19S, respectivamente. As NAPs variam entre os diversos sorotipos e formam complexos de 900 e 500kDa com BoNT A, B, D e G enquanto BoNT E e F formam somente complexos de 500 e 300kDa. A formação da toxina de 300kDa de *C. botulinum* tipo D resulta da clivagem da toxina de 500kDa em sua única ligação peptídica entre tirosina e serina. Embora NAPs não desempenhem nenhum papel na sinapse nervosa, apresentam especial função na estabilidade, captura e transcitose da BoNT no trato gastrointestinal. A dissociação da BoNT e NAP ocorre em condições alcalinas (ATASSI; OSHIMA, 1999; CHENG *et al.*, 2008; OGUMA *et al.*, 1981). A toxina complexada apresenta toxicidade de 10 a 100 vezes maior que a toxina não complexada através da via oral. A liberação da toxina a partir dos complexos foi investigada utilizando modelos de digestão *in vitro* e mostraram relação direta entre o tamanho molecular e a resistência a degradação por pepsina ou sucos gástricos (CHENG *et al.*, 2008).

**Tabela 1 - Características dos grupos de *C. botulinum* classificados pelo comportamento fisiológico.**

<b>Característica</b>	<b>Grupo I</b>	<b>Grupo II</b>	<b>Grupo III</b>	<b>Grupo IV</b>
Tipo de toxina	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Digestão de proteínas	+	-	-	-
Fermentação de glicose	+	+	+	+
Hidrólise de gelatina	+	+	+	+
Formação de lípases	+	+	+	+
Produção de indol	-	-	-	-
Produtos de fermentação	AA, AP, AIB, AB,AIV	AA, AB	AA, AP,AB	AA, AP, AIB, AB,AIV

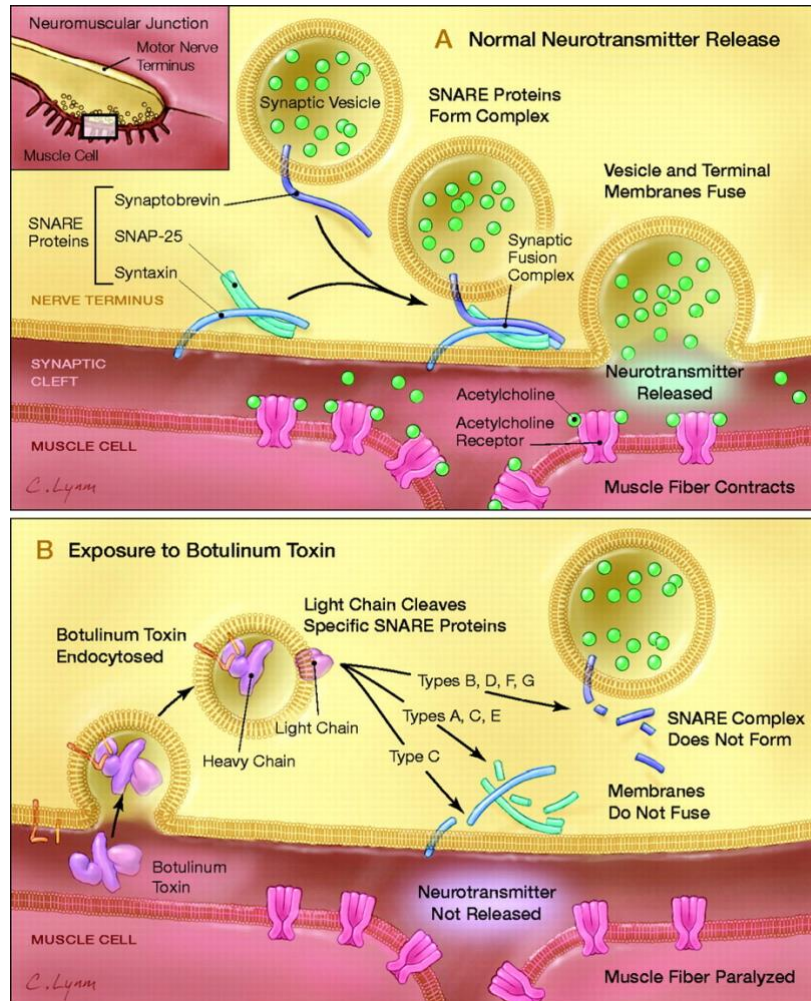
**AA = ácido acético; AP = ácido propiônico; AIB = ácido isobutírico; AB = ácido butírico; AIV = ácido isovalérico**

As BoNTs são produzidas como uma cadeia polipeptídica única de 150kDa. Após a ativação por clivagem proteolítica são geradas as duas cadeias ligadas por ligação dissulfeto, L (50kDa) e H (100kDa), que estão organizadas em três domínios específicos de 50kDa conectadas por ligações sensíveis a proteases. O domínio amino-terminal (H<sub>N</sub>) da cadeia pesada (H) tem o papel de translocação enquanto a parte carboxi-terminal (H<sub>C</sub>) é responsável pela ligação neuroespecífica. Por sua vez, a cadeia leve (L), uma zinco-endopeptidase, é responsável pela atividade catalítica intracelular (BYRNE; SMITH, 2000; OGUMA *et al.*, 1981; QUEIROZ, 2001; SHIAVO; MONTECUCCO, 1997).

As cadeias leves das neurotoxinas são zinco-endopeptidases, que clivam várias proteínas envolvidas nas etapas de ancoragem e fusão da vesícula sináptica e, portanto, bloqueiam a liberação da acetilcolina. As cadeias pesadas da toxina têm papel acessório, se ligam ao receptor pré-sináptico da célula nervosa e promovem a

translocação da cadeia leve para o citoplasma celular (CAI; SINGH; SHARMA, 2007). Estudos eletrofisiológicos mostraram que a toxina age reduzindo o conjunto de vesículas sinápticas capazes de fusão, mas não altera o conteúdo das vesículas sinápticas ou interfere no processo de síntese e armazenagem do neurotransmissor, propagação do sinal elétrico nervoso e entrada e disponibilidade de cálcio (SHIAVO, MONTECUCCO, 1997).

As sinapses são compostas por um terminal pré-sináptico preenchido com vesículas sinápticas contendo neurotransmissores, uma fenda sináptica e um aparato de recepção pós-sináptico (Figura 1). A acetilcolina é liberada, na fenda sináptica, quando o terminal do axônio é despolarizado pelo potencial de ação do motoneurônio. O transporte vesicular, reconhecimento do alvo, ancoragem e fusão envolvem recrutamento ordenado e sequencial de complexos protéicos a partir do citoplasma. A liberação do neurotransmissor é executada por uma cadeia de proteína de transporte, o fator solúvel N-etilmaleimida-sensitivo anexado ao complexo protéico receptor (SNARE) que está envolvido no ancoramento e fusão das vesículas sinápticas na membrana pré-sináptica. Em presença da BoNT, a cadeia pesada da neurotoxina botulínica liga-se às estruturas da glicoproteína encontradas especificamente em terminais nervosos colinérgicos, provavelmente a sinaptotagmina. No caso da toxina tipo A, a proteína SV2 da vesícula sináptica pode ser outro receptor. Após a endocitose, acredita-se que ocorre em meio ácido uma alteração conformacional da cadeia leve da toxina que permite a formação de poro no endossoma e facilite a passagem do domínio catalítico, pelo menos, através da membrana para o citosol. A cadeia leve age com elevada especificidade para o complexo protéico SNARE. O alvo das proteínas varia de acordo com os sorotipos das BoNTs. As toxinas tipo A, C e E quebram as proteínas sinaptossomais associadas de 25kDa (SNAP-25). As toxinas tipo B, D, F e G atuam sobre a sinaptobrevina (VAMP). A BoNT tipo C também pode atuar sobre a syntaxina. A quebra proteolítica da cadeia peptídica do complexo protéico SNARE impede a ligação da vesícula da acetilcolina na superfície interna da membrana celular e resulta na obstrução da fusão vesicular e, portanto, na progressiva paralisia flácida (ARNON *et al.*, 2009; CAI; SINGH; SHARMA, 2007; RAWAT; AHMED; SWAMINATHAN, 2008).



**Figura 1 - Mecanismo de ação da toxina botulínica. Fonte: ARNON *et al.*, 2009.**

**A.** A liberação de acetilcolina na junção neuromuscular envolve a junção de proteínas intrínsecas das membranas plasmáticas, vesicular e pré-sináptica, mediante proteínas específicas de ancoragem e fusão na zona ativa (SNARE). O complexo de fusão sináptica é um conjunto de proteínas SNARE, que inclui sinaptobrevina, SNAP-25 e sintaxina. Após fusão na membrana, a acetilcolina é liberada na fenda sináptica e então ligada a receptores da célula muscular.

**B.** A toxina botulínica liga-se a membrana da célula neuronal na terminação nervosa e entra no neurônio por endocitose. A cadeia leve da toxina cliva sítios específicos das proteína SNARE, impedindo a formação do complexo de fusão sináptica e, conseqüentemente, bloqueando a liberação da acetilcolina. As toxinas tipo B, D, F e G clivam a sinaptobrevina; os tipos A, C e E clivam SNAP-25; o tipo C cliva a sintaxina. Sem a liberação da acetilcolina, o músculo não é capaz de contrair. SNARE, fator solúvel N-etilmaleimida-sensitivo anexado ao complexo protéico receptor; NSF, o fator solúvel N-etilmaleimida-sensitivo e SNAP-25, proteínas sinaptossomais associadas de 25kDa.

### **1.1.1 Prevenção**

A utilização de alimentos e água de boa qualidade, eliminação de cadáveres das pastagens e suplementação mineral de fósforo constituem as medidas para profilaxia e controle da doença. Ressalta-se, entretanto, que a vacinação é o mais importante fator para redução da mortalidade (BARROS *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 1999). Todos os bovinos com idade acima de quatro meses devem ser vacinados anualmente (BARROS *et al.*, 2006). Em áreas de risco de surtos, a melhor alternativa de prevenção é a vacinação do rebanho com toxóide C e D. Os anticorpos contra toxóides C e D agem bloqueando a ligação das toxinas ao receptor, ou seja, agem como neutralizadores da toxina (QUEIROZ, 2001). Experimentos demonstraram que anticorpos podem atuar extracelularmente por interferir na ligação da BoNT com a superfície da célula, bem como intracelularmente pela inativação de qualquer BoNT que tenha escapado da primeira linha de defesa (ATASSI; OSHIMA, 1999). De acordo com a Instrução Normativa nº23, de 18/03/2002, do Ministério da Agricultura (SECRETARIA..., 2002), foi estabelecido que as vacinas contra botulismo devem obter títulos mínimos de 5UI.mL<sup>-1</sup> para a antitoxina C e 2UI.mL<sup>-1</sup> para a antitoxina D, conforme ensaio de soroneutralização descrito no documento.

O trabalho feito por Steinman *et al.* (2006) avaliou a eficácia de uma vacina comercial bivalente em surtos entre os anos de 2002 e 2005 em Israel e concluiu que naquelas condições havia probabilidade de 96% de animais não vacinados entre 6 a 24 meses serem acometidos pela doença. Já os animais entre 2 a 6 meses de idade, não vacinados apresentaram probabilidade de apenas 24% de serem acometidos, muito provavelmente devido à imunidade passiva.

Não há informações sobre o grau de imunidade necessário para proteger animais expostos ao material tóxico, já que não é conhecida a quantidade de toxina ingerida pelos animais a campo (CURCI, 2008). Portanto, é desejável que as vacinas comerciais contenham uma quantidade de toxóide suficiente para desencadear o mais alto grau de imunidade possível (JANSEN; KNOETZE; VISSER, 1976; LOBATO *et al.*, 1999).

Steinman *et al.* (2007) realizaram estudo sobre os níveis de anticorpos antitoxina D em bovinos em Israel após surto ocorrido ao sul do país envolvendo 28 diferentes propriedades e que resultou na morte de 600 bovinos. O esquema de vacinação oficial

era o mesmo adotado no Brasil (SECRETARIA..., 2002), em que a revacinação dos primovacinados deve ocorrer quatro semanas após a primeira e, em seguida, a vacinação é anual. Verificou-se que os animais foram expostos a altos níveis de BoNT D na ocasião do surto e que, portanto, seria necessário altos níveis de anticorpos neutralizantes no soro. Contudo, o nível de anticorpos neutralizantes contra BoNT reduz significativamente ao longo do tempo tanto em humanos quanto em animais. Deste modo, os autores propuseram uma mudança no esquema de vacinação antitoxina D para cada seis meses após a primeira vacinação.

Brown *et al.* (1999) avaliaram o desempenho de duas vacinas bivalentes, contendo toxóides botulínicos tipo C e D, após administração única em bovinos. A vacina da Websters Singvac era uma emulsão oleosa e da CSL uma vacina convencional de hidróxido de alumínio. O estudo evidenciou que ambas apresentaram títulos similares para anticorpos tipo D enquanto a vacina Singvac induziu uma maior resposta imunogênica para tipo C em comparação com a vacina convencional. Também verificaram alta concentração de anticorpos para botulismo C e D em bezerros antes da vacinação e associaram o resultado à imunidade passiva, uma vez que as mães já haviam sido vacinadas várias vezes.

As respostas humorais de cobaias e bovinos induzidas por vacinas bivalentes tipo C e D, utilizando vacinas comerciais, foram avaliadas por Fonseca (2001). Foram observadas diferenças significativas de resposta entre as vacinas avaliadas, em especial para anticorpos contra o tipo C. Também se observou que a resposta imune em cobaias e bovinos vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D revelou que o padrão de resposta imune nas duas espécies é compatível, existindo uma tendência dos cobaias apresentarem uma magnitude de resposta maior que os bovinos. Curci (2008) avaliou a resposta humoral de bovinos contra as toxinas botulínicas tipos C e D pelo teste de *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) indireto e também observou diferenças significativas entre as respostas das vacinas avaliadas, principalmente aos 30 dias após o reforço. Os toxóides C e D de vacinas bivalentes tiveram resposta superior quando comparadas aos toxóides C e D de vacinas polivalentes, principalmente contra o tipo D.

## 1.2 Sistemas de liberação de proteínas

Na área veterinária, o sucesso da terapia pela administração de vacina depende tanto do método de liberação quanto da preparação do antígeno. A facilidade de administração é especialmente importante para grandes animais. Como vacinar um rebanho, no período adequado, sem prejudicar a produtividade? Muitas vacinas requerem duas ou três doses e representam grande transtorno devido à dificuldade de manejo. Vacinas que apresentem ação prolongada, pulsátil, de liberação programada ou que possam ser administradas com o menor manejo possível, são muito desejadas (BOWERSOCK; MARTIN, 2000; BRAMWEELL; EYLES; ALPAR, 2005). A vacina ideal deve apresentar alta imunogenicidade e antigenicidade específica, ausência de efeitos colaterais, ser de baixo custo, estável, adaptável à vacinação em massa e, teoricamente, deve estimular uma resposta imune distinguível da devida a uma infecção natural de forma que a imunização e a erradicação possam prosseguir simultaneamente (BOWERSOCK; MARTIN, 2000; TIZARD, 1998).

Desde algumas décadas atrás, houve considerável aumento do interesse em desenvolver sistemas de liberação de proteínas efetivos a fim de atender à grande variedade de proteínas recombinantes que foram obtidas para aplicação terapêutica. A chave para o sucesso é a obtenção de um eficiente sistema que permita a proteína alcançar os órgãos linfóides secundários no tempo e duração adequados. Quatro fatores principais devem ser considerados: rota de administração, perfil de liberação, método de liberação e modo de fabricação da formulação. O desenvolvimento de um sistema de liberação para proteína depende de características como tamanho molecular, meia vida biológica, imunogenicidade, estabilidade conformacional, dose, local e taxa de liberação, farmacocinética e farmacodinâmica. Além do grande desafio em estabelecer um padrão de liberação adequado e reprodutível, deve-se atentar para a manutenção da integridade da estrutura tridimensional durante todas as etapas de preparação e mesmo durante a liberação. Em muitas situações, devido à fragilidade da natureza protéica, ocorre redução de sua atividade biológica e imunogênica. Essas modificações podem ser por desnaturação ou por degradação química envolvendo oxidação, deaminação, hidrólise, entre outras (SENEL; MCCLURE, 2004; SINHA; TREHAN, 2003).

A perspectiva de estabilização de antígenos e a administração de dose primária e secundária em uma administração única, *single-shot*, pela preparação de vacinas em microesferas poliméricas é um avanço tecnológico que pode revolucionar a terapia em países em desenvolvimento e do terceiro mundo (BRAMWEELL; EYLES; ALPAR, 2005). Outra forte motivação para encapsular antígeno no interior das micropartículas é a possibilidade de induzir uma melhor resposta imune em comparação com antígenos não encapsulados ou, em muitos casos, superior resposta imune comparado àquela obtida com o uso de alume ou adjuvante de Freund (BOWERSOCK; MARTIN, 2000).

O processo de produção de micropartículas pode ser otimizado para obtenção de tamanhos apropriados. Isto permite a produção de partículas de tamanho entre 1-10 $\mu$ m, o que é ótimo para fagocitose por células processadoras de antígenos. Também é possível a produção de partículas de tamanho até 125 $\mu$ m em diâmetro que são lentamente degradadas *in vivo*, reduzindo o tamanho até que possam ser fagocitadas. Isto é importante para se conseguir uma liberação sustentada de antígenos e prolongar a imunoestimulação possibilitando a obtenção de uma vacina do tipo *single shot*. Uma segunda estratégia para prolongar a liberação ou obter uma liberação pulsátil é a utilização de diferentes polímeros ou blends ou diferentes massas molares como comumente estudado com polímeros poliláticos, poliglicólicos ou a combinação desses ésteres (BOWERSOCK; MARTIN, 2000).

Ainda não está definido se seria mais desejável uma liberação pulsátil ou uma liberação contínua do antígeno ao longo do período de indução de resposta imune. De forma geral, assume-se que a liberação pulsátil de antígeno seria a mais desejável por mimetizar uma infecção natural e evitar indução de tolerância imune pela contínua administração de antígeno em baixo nível. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que a liberação contínua de antígeno resulta em altos títulos de anticorpos, aparentemente evitando a indução de tolerância (BOWERSOCK; MARTIN, 2000). Um mecanismo possível para explicar uma melhor eficiência está em função da mais prolongada exposição do antígeno ao sistema imune (BRAMWEELL; EYLES; ALPAR, 2005).

Amplamente estudado nos últimos anos, sistema de liberação utilizando microesferas de quitosana tem sido utilizado para veicular antibióticos, antihipertensivos, agentes anticâncer, proteínas, peptídeos e vacinas (DANG; LEONG, 2006; ILLUM *et al.*, 2001; JAMEELA; MISRA; JAYAKRISHNAN, 1994; MI *et al.* 1999; SINHA *et al.*, 2004). Em revisão feita por Issa, Köping-Höggård e Artursson (2005) foram apontadas as áreas de engenharia de tecidos biológicos e vacinas como principais aplicações da quitosana como material biomédico.

Propriedades tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade estimularam a utilização da quitosana em formulações farmacêuticas e bioprodutos (ALPAR; GROVES, 2006; ILLUM *et al.*, 2001; JIANG; ABDEL-FATTAH; LAURENCIN, 2006; SENEL; MCCLURE, 2004). As primeiras publicações nas áreas farmacêuticas e médica ocorreram a partir da década de 1980 propondo obtenção de preparações para liberação sustentada (SAWAYANAGI; NAMBU; NAGAI, 1982), liberação sítio-específica (GALLO; HASSAN, 1988) e mucoadesivas (ILLUM; FARRAJ; DAVIS, 1994; LEHR *et al.*, 1992).

Quanto à atividade imunoadjuvante, a utilização de quitosana em vacinas em formulações de uma grande variedade de antígenos tem demonstrado promover a concentração e ativação de macrófagos, células polimorfonucleares e células natural *killer* (NK), indução de interleucinas (IL-2, IL-10, IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferon-gama (INF- $\gamma$ ), aumento da resposta de anticorpos, de hipersensibilidade tipo tardia e resposta de linfócitos T citotóxicos (ARCA; GÜNBEYAZ; SENEL, 2009; NISHIMURA *et al.*, 1984). Kosaka *et al.* (1996) demonstraram que implantes subcutâneos de quitosana em cães aumentaram o número de células sanguíneas brancas, particularmente neutrófilos e ativou tanto células polimorfonucleares quanto macrófagos.

Testes clínicos utilizando quitosana não têm reportado nenhum efeito tóxico ou reação alérgica após a implantação, injeção, administração tópica e oral em seres humanos. Sua biodegradação por lisozimas resulta na liberação de amino-açúcares, que são incorporados às vias metabólicas da glicosaminoglicana e glicoproteína, ou excretada (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001).

Na área de vacinas, estudos realizados com micropartículas de quitosana apresentaram significativa resposta imune contra influenza, pertussis e difteria administradas por via nasal com similar nível de IgG e superior nível de IgA quando comparado a administração parenteral. O mecanismo de ação principal envolveu uma melhor promoção da absorção do material (ILLUM *et al.*, 2001). Arca, Günbeyaz e Senel (2009) listaram a utilização de quitosana e derivados em vacinas com antígeno antrax recombinante, dermonecrotóxina da *Bordetella bronchiseptica*, toxóide da difteria, toxina da cólera, partícula viral da aftosa, vírus influenza inativado, toxóide tetânico, toxina botulínica A, B e E e *Streptococci equi* entre outros.

Conforme a literatura tem mostrado, a quitosana tem um grande potencial para complexação com DNA, negativamente carregado, devido às suas características catiônicas. Do mesmo modo, devido a sua propriedade mucoadesiva, tem sido utilizada com sucesso em sistemas de liberação de genes pela via nasal e oral (DANG; LEONG, 2006).

Jaganathan *et al.* (2005) prepararam microesferas carregadas com toxóide tetânico em matrizes de quitosana e PLGA (ácido polilático-co-glicólico) e observou que em presença de estabilizante ambas apresentaram resultados satisfatórios devido a um bom nível de antitoxina, com aumento do *booster* em comparação com vacinas formuladas com hidróxido de alumínio. Os resultados demonstraram que microesferas de toxóide tetânico têm potencial aplicação para modular a liberação, ressaltando que em comparação ao PLGA, a quitosana torna o custo final do produto mais viável.

### **1.2.1 Imunologia dos sistemas particulados**

Desde 1924, quando foi verificado que era possível aumentar a resposta imunológica contra toxina tetânica e difteria em mistura dos antígenos com ágar, amido, óleo, lecitina ou saponina, o desenvolvimento de adjuvantes microparticulados baseados em emulsões lipídicas, nano e micropartículas biodegradáveis, complexos

imunoestimulatórios (ISCOMs) e virossomos tornaram-se foco de interesse das pesquisas (GUY, 2007; XIANG *et al.*, 2006).

Micro e nanopartículas sólidas podem ser obtidas de materiais inertes, biodegradáveis ou não. Nanopartículas são atribuídas a partículas de tamanho entre 10 a 1000nm e as micropartículas são maiores, em torno de 1 a 200 $\mu$ m (ROTHEN-WEINHOLD; GURNY; DAHN, 2000; SPICKLER ; ROTH, 2008).

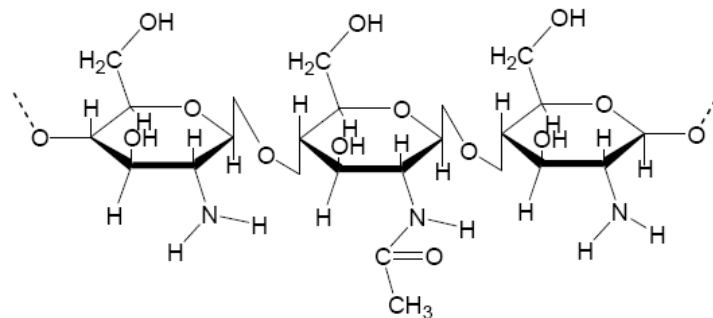
As micropartículas provaram atuar como sistemas adjuvantes e são mais eficientes em veicular o antígeno às células apresentadoras de antígenos (APCs) que o antígeno solúvel (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005). Os resultados em literatura sugerem que os antígenos microencapsulados são capazes de ser transferidos em sua forma nativa aos locais de indução (ALPAR; GROVES, 2006; BRAMWELL; EYLES; ALPAR, 2005) e estimular a resposta imune inata (ILYINSKII, 2009). A fagocitose das micropartículas por células APCs é um mecanismo importante para ação da micropartícula como adjuvante. Kanke, Sniecinski e De Luca (1983) descreveu a fagocitose das micropartículas de tamanho de 1-3 $\mu$ m por macrófagos e mostrou que partículas de 12 $\mu$ m não foram fagocitadas. Posteriormente, Tabata e Ikada (1990) mostraram que a fagocitose ocorre mais facilmente para partículas <2 $\mu$ m e que a hidrofobicidade dos materiais tem influência no processo. Utilizando partículas de poliestireno, Xiang *et al.* (2006) demonstraram que o tamanho das partículas é fator crítico para a imunogenicidade, sendo que partículas menores (<0.5 $\mu$ m), em particular entre 40 a 50nm, são significativamente melhores para promover resposta imune de linfócitos T<sub>H1</sub> que as partículas maiores (>0.5 $\mu$ m). Estas ao serem fagocitadas por células APCs induzem satisfatoriamente resposta tipo 2 e a formação de anticorpos. Ou seja, micropartículas possuem tamanho similar aos patógenos, sendo assim partículas menores induzem resposta tipo viral enquanto partículas maiores induzem resposta similar à bactérias. Winzeburg *et al.* (2004) acrescentam que partículas maiores que 10 $\mu$ m devem primeiramente ser degradadas *in vivo* antes de serem fagocitadas e, portanto, podem atuar como *depot*. Ainda não está claro na literatura se sistemas particulados de tamanho entre 5 a 10 $\mu$ m melhoram a resposta imunológica ou se nanopartículas são capazes de promover fagocitose diferenciada pelas APCs (ARCA; GÜNBEYAZ; SENEL, 2009).

As micropartículas são avidamente absorvidas pelas APCs, tais como células dendríticas e macrófagos. Ao mesmo tempo, os antígenos estimulam as reações de imunidade inata ligando-se aos receptores Toll-like (TLRs) nas células dendríticas e macrófagos residentes nos tecidos. Isso resulta na produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-1 (IL-1). Subsequentemente, as células maturam, passam a expressar receptores na superfície para as citocinas produzidas nas zonas de células T dos linfonodos e seguem para o linfonodo. As células APCs ativam as células T (CD4+) e definem a resposta adaptativa. Antígenos associados a partículas também podem ser fagocitados pelas células APCs e apresentar os antígenos para que sejam reconhecidos pelos linfócitos T CD8+ que se diferenciarão em linfócitos T citolíticos (CTLs). Também é possível que outras células, tais como células musculares, possam expressar antígenos na sua superfície e estimular os linfócitos T ativados. Senão, após a morte celular as partículas serão liberadas e fagocitadas pelas APCs (BRAMWELL; EYLES; ALPAR, 2005; ILYINSKII, 2009; MOREIN; HU; ABUSUGRA, 2004).

Sharp *et al.* (2009) demonstraram que a fagocitose das micropartículas pelas células dendríticas ativa a NALP3 inflamossomo que contribui para promover a resposta inata e antígeno específica. Outro importante mecanismo consiste na ativação dos linfócitos B que endocitam os antígenos protéicos, apresentam às células T auxiliares (CD4+) e desenvolvem a resposta humoral cuja intensidade depende da duração da apresentação antigênica (STORNI *et al.*, 2003). Neste sentido, as micropartículas poliméricas têm papel importante na proteção dos antígenos, peptídeos e DNA da degradação imediata, possibilitando prolongar e controlar a liberação do antígeno ao longo do tempo *in vivo* (HANES; CLELAND; LANGER, 1997; WANG *et al.*, 2004; XIANG *et al.*, 2006). Considerando que as micropartículas podem proteger as proteínas do ambiente, os sistemas particulados são capazes de promover a captura e retenção de antígenos nos linfonodos (O'HAGAN; SINGH; ULMER, 2006).

### 1.3 Quitosana

Quitosana é um aminopolissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, que é o segundo polissacarídeo mais abundante no planeta, e obtido de exoesqueletos de crustáceos e outros animais marinhos (ALPAR; GROVES, 2006). É formada pelos copolímeros  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino 2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida 2-desoxi-D-glicose. Cada unidade de seis carbonos possui um grupo amino primário e duas hidroxilas livres (KAS, 1997; TORRES *et al.*, 2005; WU; SU; MA, 2006) (**Figura 2**).



**Figura 2 - Estrutura da quitosana.**

Fonte: Torres *et al.* (2006).

A quitosana e seus derivados são classificados como polímeros heterogêneos, porque possuem na cadeia polimérica tanto monômeros acetilados quanto desacetilados. A proporção relativa dessas unidades nas cadeias macromoleculares de quitosana tem efeito marcante na sua solubilidade. Devido ao grupo amino comportar-se como base fraca, com pKa de 6,2 a 7,0, a quitosana é insolúvel em água e em solventes orgânicos. A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade desses grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água. A solubilidade depende da natureza do ânion envolvido; dissolve-se em soluções aquosas de ácidos orgânicos (pH < 6,5), como acético, fórmico e cítrico, além de ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico diluído, resultando em soluções viscosas. É pouco solúvel em solução diluída de ácido fosfórico e é insolúvel em solução diluída de ácido sulfúrico. Em condições alcalinas ou em soluções contendo poliânions ocorre precipitação da quitosana (ALPAR; GROVES, 2006; SENEL; MCCLURE, 2004; SINHA *et al.*, 2004). Devido à presença de amina primária, a quitosana sofre reações típicas das aminas, como a formação de base de Schiff. À temperatura ambiente, a quitosana forma aldíminas (reações com aldeídos) e cetíminas (reação com cetonas).

A N-alquilquitosana formada da reação com aldeídos intumesce em presença de água e facilmente forma filmes (KUMAR, 2000).

Comercialmente, a quitosana está disponível na forma de flocos secos, solução e pó fino. Possui massa molar entre 3.800 e 2.000.000Da e grau de desacetilação entre 66 a 95% (ALPAR; GROVES, 2006). É um material semi-cristalino, apresentando grau de cristalinidade em função do grau de desacetilação. A cristalinidade é máxima quando o polímero apresenta grau de desacetilação em nível extremo, ou seja, 0% ou 100% de desacetilação (SENEL; MCCLURE, 2004). Tamanho de partículas, densidade, viscosidade, grau de desacetilação e massa molar são importantes características da quitosana que influenciam nas propriedades das preparações farmacêuticas (SINHA *et al.*, 2004).

Conforme descrito no Quadro 1, a caracterização de quitosanas envolve, principalmente, a determinação do grau médio de acetilação, da massa molar, da solubilidade, do teor de cinzas e do grau de umidade (CAMPANA F<sup>o</sup>; SIGNINI, 2001; GUPTA; JABRAIL, 2006; SANTOS *et al.*, 2003; SIGNINI; CAMPANA F<sup>o</sup>, 2001; SINHA *et al.*, 2004).

O grau de acetilação é importante parâmetro estrutural que influencia propriedades físico-químicas como a massa molar, estiramento até fratura e resistência à tensão em filmes e membranas que diminuem com a redução do grau de acetilação.

**Quadro 1 - Caracterização físico-química da quitosana.**

<b>Parâmetros</b>	<b>Caracterização</b>	<b>Referências</b>
Identificação	Espectroscopia na região do infravermelho	SANTOS <i>et al.</i> , 2003; TORRES <i>et al.</i> , 2005
Grau médio de acetilação ou grau de desacetilação	Espectroscopia de infravermelho	GUPTA; JABRAIL, 2006; TORRES <i>et al.</i> , 2005
	Espectroscopia de ultravioleta	EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5 <sup>a</sup> ed

	Espectroscopia de RMN de $^1\text{H}$	CAMPANA F <sup>o</sup> ; SIGNINI, 2001; SIGNINI; CAMPANA F <sup>o</sup> , 2001; SANTOS <i>et al.</i> , 2003
	Titulação condutimétrica	SANTOS <i>et al.</i> , 2003
	Titulação potenciométrica	BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; GUPTA; JABRAIL, 2006.
Massa molar	Cromatografia de permeação em gel	(CANELLA; GARCIA, 2001);
	Viscosimetria	CAMPANA F <sup>o</sup> ; SIGNINI, 2001; SANTOS <i>et al.</i> , 2003.
Grau de umidade	Termogravimetria	SIGNINI; CAMPANA F <sup>o</sup> , 2001; SANTOS <i>et al.</i> 2003; EUROPEAN ..., 2004.
Teor de cinzas	Termogravimetria	SIGNINI; CAMPANA F <sup>o</sup> , 2001; SANTOS <i>et al.</i> , 2003; EUROPEAN ..., 2004.
Cristalinidade	Difração de raios X	CAMPANA F <sup>o</sup> ; SIGNINI, 2001; SIGNINI; CAMPANA F <sup>o</sup> , 2001.

Também se verificou que o processo de biodegradação por lisozima depende do grau médio de acetilação e diminui com a redução do mesmo (TOMIHATA; IKADA, 1997). Inversamente, a adesão celular *in vitro* de algumas células cutâneas, como fibroblastos e queratinócitos, reduz com o aumento do grau de acetilação, devido à interação eletrostática envolvendo os grupos aminos protonados da quitosana com cargas da superfície da membrana celular (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001). Por sua vez, a atividade estimulatória sobre macrófagos é principalmente atribuída às unidades de N-acetil-D-glicosamina do que aos resíduos de glicosamina (PELUSO *et al.*, 1994).

#### 1.4 Preparo de microesferas de quitosana

O método de preparo tem muita influência nas propriedades das microesferas e devem ser considerados fatores como taxa de encapsulamento, estabilidade da proteína encapsulada, uniformidade e reprodutibilidade do lote, flexibilidade para ajustar o perfil de liberação, baixo efeito *burst*, fluidez das microesferas e estreita distribuição de tamanho de partículas. Ressalta-se a necessidade de adjuvanticidade do sistema e sua seringabilidade através das agulhas. O processo não deve expor a proteína a solventes desnaturantes e ser simples, reprodutível e escalonável. Assim como todo produto de uso parenteral, as microesferas devem estar estéreis para sua utilização (SINHA; TREHAN, 2003; WANG *et al.*, 2006).

O processamento da quitosana para obtenção de microesferas carregadas com proteínas tem sido extensamente pesquisado há três décadas. As técnicas mais comumente utilizadas são: (a) gelificação ionotrópica com um polieletrólito de carga oposta, tais como o tripolifosfato (TPP) ou alginato (GRENHA; SEIJO; RMUÑÁN-LÓPEZ, 2005; KANG *et al.*, 2006; MI *et al.* 1999); (b) emulsificação com evaporação de solvente (XUE *et al.*, 2006); (c) secagem por atomização (OLIVEIRA, 2004); (d) atomização e coagulação (TORRES *et al.*, 2005); (e) método de emulsificação/reticulação (JAGANATHAN *et al.*, 2005; XUE *et al.*, 2006); (f) emulsificação através de membrana (WANG *et al.*, 2006); (g) precipitação/coacervação (VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001). Uma variação da técnica é possível pela imobilização do ativo após preparo de microesfera porosa (ALEXAKIS *et al.*, 1995; MI *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005). A etapa final dos diversos processos envolve a lavagem, separação e secagem das microesferas (SINHA *et al.*, 2004).

A estabilidade de partículas de quitosana em ambiente aquoso pode ser questionável e alguns autores propõem a reticulação do polímero. As microesferas reticuladas são menos solúveis em água e são mais estáveis (ALPAR; GROVES, 2006). A reticulação pode ocorrer simultaneamente ao processo de obtenção das microesferas ou a partir de microesferas pré-formadas por diferentes técnicas. Berger *et al* (2004a) dividiram a reticulação de quitosanas em duas classes: reticulação química e reticulação física. A primeira é formada por ligações covalentes irreversíveis, sendo que o intumescimento e a liberação do ativo não são considerados sensíveis ao pH. Entre os agentes de reticulação pode-se citar: glutaraldeído (DINI; ALEXANDRIDOU;

KIPARISSIDES, 2003); formaldeído (HE; DAVIS; ILLUM, 1999); D,L-gliceraldeído (OLIVEIRA, 2004); glioxal (GUPTA; JABRAIL, 2006); tripolifosfato (ANAL; STEVENS; REMUÑÁN-LOPEZ, 2006). A reticulação física, por sua vez, é formada por várias ligações reversíveis, como as interações iônicas, complexos de polieletrólitos; sendo que o intumescimento e a liberação são considerados dependentes do pH.

Para a maior parte das aplicações em sistemas de liberação controlada, devido às propriedades hidrofílicas da quitosana, a reticulação se torna uma estratégia para controlar propriedades desses sistemas como capacidade de adsorção de água, carga superficial, dentre outras que afetam diretamente a sua cinética de liberação (ANAL; ESTEVENS; REMUÑÁN-LÓPEZ, 2006; BERGER *et al.*, 2004b; GUPTA; JABRAIL, 2006)

#### **1.4.1 Coacervação simples**

O processo de coacervação usa o fenômeno de desolvatação parcial dos polímeros e sua agregação em resposta a trocas químicas ou físicas no meio (PORTE; COUARRAZE, 1994). Consiste em solubilizar a quitosana em meio ácido e adicionar ânion sulfato, resultando na formação de complexo pouco solúvel e, conseqüentemente, na precipitação de partículas. Utiliza-se um tensoativo, como o polissorbato 80, e banho de ultra-som para evitar formação de aglomerados. (BERTHOLD; CREMER; KREUTER, 1996).

#### **1.4.2 Emulsificação com evaporação do solvente**

Uma emulsão simples é obtida entre a solução polimérica orgânica e uma fase contínua imiscível, formando uma emulsão do tipo O/A se a fase aquosa formar a emulsão ou A/O se a fase oleosa formar a emulsão. A emulsão formada é mantida sob agitação até que a maior parte do solvente seja evaporada, resultando na solidificação das microesferas (SINHA *et al.*, 2004).

Emulsões múltiplas também podem ser obtidas utilizando um processo de emulsificação em três etapas. A solução aquosa contendo o ativo e a fase oleosa contendo estabilizantes da emulsão são combinadas para formar uma emulsão do tipo A/O (etapa 1). Em seguida, a emulsão A/O é dispersa na solução polimérica levando a formação de uma emulsão dupla A/O/A (etapa 2). E finalmente ocorre a evaporação do solvente (etapa 3) (SINHA *et al.*, 2004; SINHA; TREHAN, 2003).

### **1.4.3 Spray Drying**

A utilização de *spray dryer* para preparo de micropartículas com finalidade de obter sistemas de liberação controlada é bastante difundida pela sua reprodutibilidade, facilidade de escalonamento e baixo custo (MOURA, 2005; MURILLO *et al.*, 2002; RÉ, 1998; REGE; GARMISE; BLOCK, 2003; VEHRING, 2008). O princípio do *spray drying* consiste na atomização de uma solução, suspensão ou emulsão em pequeníssimas gotículas, seguida de evaporação quase instantânea do líquido e resultando num pó seco, de baixa umidade. A natureza do pó é função de diversas variáveis incluindo a concentração inicial de soluto, a distribuição do tamanho das gotículas e a taxa de remoção do solvente (REMINGTON, 2000). De acordo com a natureza da molécula a ser encapsulada e do polímero, microesferas ou microcápsulas podem ser obtidas. *Spray drying* permite processamento em uma única etapa, embora o processamento sob condições assépticas possa apresentar dificuldades tecnológicas (FATALL *et al.*, 1999).

### **1.5 Sistemas de gelificação *in situ***

Como alternativa aos sistemas que utilizam *pellets* ou micropartículas, as pesquisas na área de tecnologia farmacêutica têm se direcionado para utilização de uma grande variedade de substâncias que podem ser utilizadas para obtenção dos sistemas de gelificação *in situ*, ou seja, que após a administração se transformam em sistema de

depósito (*Depot*). Estes sistemas apresentam atributos como baixa viscosidade antes da injeção e capacidade de rapidamente modificarem sua forma física após a administração. Além disso, são oportunos para liberação local e muitos desses materiais, após a injeção, assumem estado amorfo e podem fluir e preencher espaços vazios, apresentando alto potencial para aplicação como material em engenharia de tecidos (BAJPAI *et al.*, 2008; PACKHAEUSER, *et al.*, 2004; TIPTON; DUNN, 2000).

Uma formulação administrada via subcutânea ou intra-muscular pode encontrar diferentes ambientes: pH, osmolaridade, temperatura e concentração de água. Em adição, pode-se também conduzir reações *in situ* tais como *cross-linking* de acrilatos. Todos esses métodos têm sido explorados e alguns desses sistemas conhecidos como *smart gels* já estão em estágio de estudos clínicos e outros disponíveis para comercialização. Os desafios dessa tecnologia para os formuladores é trabalhar dentro de uma estreita janela entre segurança e toxicidade e desenvolver sistemas que sejam funcionais dentro das condições biológicas (TIPTON; DUNN, 2000). Sistemas de liberação responsivos utilizam várias propriedades dos polímeros, tais como: transição térmica reversível, intumescimento, transição vítrea e fusão cristalina (BAJPAI *et al.*, 2008).

### **1.5.1 Baixa temperatura crítica de transição**

É conhecido como sistema LCST ou *lower critical solution temperature* e representa uma das tecnologias mais bem estudadas para gelificação após injeção. A maioria dos LCSTs consiste em sistemas aquosos de polímeros que ao aumento da temperatura respondem com a modificação de fase. Pelo controle das propriedades do polímero e do solvente, pode-se conduzir essa modificação pela mudança de uma condição ambiente para temperatura corporal. De uma forma geral, a uma baixa temperatura as ligações de hidrogênio do polímero são mantidas e com o aumento de temperatura, o número de ligações de hidrogênio diminui e obtém-se uma solução. Na maioria dos sistemas químicos a entropia é o fator de maior importância quando ocorre aumento de temperatura, conduzindo a alta solubilidade. Porém, em sistemas LCSTs o fator entropia é relativamente menos importante (uma característica associada com a alta massa molar dos materiais) e o efeito da entalpia domina à

medida que a temperatura aumenta. Na maioria dos sistemas de liberação, o efeito da entalpia ocorre devido a redução das ligações de hidrogênio com a água e consequente aumento das interações hidrofóbicas e redução da hidrossolubilidade. Dentro de uma estreita faixa de parâmetros físicos e químicos ocorre essa transição, como por exemplo, com o aumento da temperatura ambiente para temperatura do corpo físico (BAJPAI *et al.*, 2008; TIPTON; DUNN, 2000).

Os poloxamers, copolímeros em bloco de óxido de etileno e de óxido de propileno (PEO-PPO-PEO), também conhecidos como Pluronic® F127 e F68, têm sido amplamente utilizados em uma variedade de formulações farmacêuticas pela sua ação como tensoativo e estabilizante de proteínas. Tobío *et al.* (1999) obtiveram melhor resposta imunológica de vacinas de microesferas de blendas ácido poli-láctico glicólico e Pluronic® F127 quando comparada a utilização de fosfato de alumínio como adjuvante. Também verificaram maior estabilidade do toxóide em microesferas contendo Pluronic® F127 quando comparada a microsferas de PLGA. Westerink *et al.* (2002) avaliaram a utilização de quitosana e Pluronic® F127 em vacina nasal antitetânica em camundongos e verificaram que esta combinação resultou em resposta imunológica significativamente maior quando comparada a utilização de toxóide tetânico e quitosana, toxóide tetânico e Pluronic® F127 ou toxóide tetânico e solução salina fosfato. A combinação dos dois componentes resultou em efeito tanto aditivo quanto sinérgico na resposta imune. A hipótese sugerida pelo autores considerou que a quitosana tanto aumentou a permeabilidade, portanto aumentou a apresentação do antígeno, quanto exerceu efeito adjuvante por recrutar macrófagos e aumentar liberação de citocinas. Enquanto o Pluronic® F127, pela ação gelificante, aumentou a estabilidade do antígeno e atuou como reservatório. Porém, a utilização de poloxamers em altas concentrações, acima de 15%p/p, pode levar a citotoxicidade. Também é relatado aumento dos níveis de colesterol e triglicerol em ratos após a administração intraperitoneal (PACKHAEUSER *et al.*, 2004). Coeshott *et al.* (2004) demonstraram que a combinação de quitosana e Pluronic® F127 com antígenos (toxóides tetânico e diftérico e recombinante antrax) resultou em resposta imunológica superior a vacina utilizando sais de alumínio para imunização parenteral em camundongos. Os autores sugeriram que o F127 atua produzindo liberação sustentada e estabilizando antígeno e adjuvante no interior da matriz. Além disso, o Pluronic® F127 parece ser capaz de atuar positivamente no estabelecimento da

memória imunológica. Chenite *et al.* (2000) obtiveram uma solução termossensível baseada na combinação de quitosana e poliois capaz de gelificar *in situ* após administração subcutânea em camundongos. O sistema foi utilizado com sucesso na liberação de fator de crescimento e encapsulamento de condrócitos para aplicação em engenharia de tecidos. Kang *et al.* (2006; 2007) estudaram a liberação de antígenos da *Bordetella bronchiseptica* encapsulados em microesferas de quitosana preparadas com Pluronic® F127. Os experimentos *in vitro* já haviam demonstrado que as microesferas apresentavam elevada atividade imunoestimulante para macrófagos alveolares de camundongos. Em ensaio *in vivo* em camundongos, a administração nasal da vacina resultou em resposta específica de IgA e proteção satisfatória contra a doença tanto em mucosa quanto em nível sistêmico.

## 1.6 Purificação da toxina botulínica

Os avanços de técnicas e métodos para separação e purificação de proteínas é importante requisito para o desenvolvimento da biotecnologia. O impulso no desenvolvimento de pesquisas na área de biosseparação é restrito devido a complexidade dos processos aplicados a produtos farmacêuticos e biológicos. Calcula-se que cerca de 60 a 70% do custo de produção para um produto biotecnológico reside na estratégia de purificação. Por isso, a escolha da técnica deve considerar a possibilidade de escalonamento e eficiência de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula (DYR; SUTTNAR, 1997).

As etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processo de purificação geral. Entre as características dos meios de cultura, pode-se citar a elevada proporção de água, a presença de moléculas orgânicas e inorgânicas, metabólitos extracelulares e intracelulares originados de células mortas e fragmentos celulares (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005).

Deve-se delinear cuidadosamente as etapas de purificação porque estas estão relacionadas ao tipo de aplicação e impactam no custo do produto. Além disso, a

definição do processo de purificação deve considerar, principalmente, o rendimento da operação, bem como a possibilidade de causar degradação do ativo (SHADLE, 1997). O Quadro 2 apresenta exemplos de operações unitárias empregadas nas etapas de purificação de processos biotecnológicos (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005; SHADLE, 1997).

Os métodos de purificação de proteínas e peptídeos podem ser divididos em dois grupos: cromatográficos e não cromatográficos. Os métodos cromatográficos são de primeira escolha para proteínas recombinantes devido a sua escalonabilidade, alto poder de separação e eficiência. Entretanto, esses são métodos de alto custo e requerem muito treinamento e habilidade. Por sua vez, os métodos não cromatográficos são similares aos conhecidos na área química e envolve clarificação, redução de volume e troca de tampão em purificação de proteína recombinante.

Kurazono *et al.* (1985) propuseram seis etapas para purificação da toxina botulínica C1: (a) precipitação em meio ácido pH 3,9 utilizando solução de ácido sulfúrico; (b) extração/centrifugação utilizando tampão pH 7,5; (c) diálise (segunda precipitação) em pH 4,0 utilizando tampão acetato; (d) ultrafiltração através de Amicon PM-30; (e) cromatografia em SP-Sephadex C-50 e (f) filtração em gel SP-Sephadex G-200 e concentração através de membrana Amicon PM-30. Por meio desse processo simples obteve-se alto rendimento e purificação.

Miyazaki, Iwasaki e Sakaguchi (1977) purificaram a toxina tipo D por meio de uma sequência de etapas a partir do meio de cultura: (a) precipitação com RNA a pH 3,5 ajustado com solução de ácido sulfúrico; (b) extração com tampão acetato pH 6,5 em presença de cloreto de sódio; (c) precipitação utilizando solução saturada de sulfato de amônio; (d) extração com tampão acetato pH 4,5 em presença de cloreto de sódio; (e) tratamento com protamina em tampão citrato-acetato pH 4,5; (f) cromatografia através de SP-Sephadex (C-50) em pH 4,0 e (g) cromatografia através de SP-Sephadex (G-200) pH 6,0. Este mesmo procedimento foi repetido com sucesso por Jongh, Schwartzkoff e Howden (1989).

Syuto e Kubo (1977) isolaram e purificaram a toxina botulínica tipo C utilizando coluna Sephadex G-75, seguida de coluna de cromatografia de dietilaminoetilcelulose e Sephadex A-50 QAE (aminoetil quarternário) equilibradas com tampão borax-fosfato de sódio pH 8,0 e força iônica de 0,12 $\mu$ . As amostras eluídas foram coletadas e as proteínas monitoradas a 280nm por intermédio de espectrômetro UV. Esta mesma sequência foi utilizada por Terajima *et al.* (1985) para purificação de toxinas botulínicas tipo C (C-6813 e C-ST) e tipo D (D-1873).

A purificação da toxina botulínica C e D proposta por Gessler e Böhnelt (1999) é uma combinação de ultrafiltração seguida de cromatografia de interação hidrofóbica, troca iônica e de exclusão molecular. Durante as corridas cromatográficas, todas as frações coletadas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e confirmada a presença da toxina por bioensaio em camundongo.

De acordo com a patente US 5,902,565 (CSL, 1999) a purificação da vacina botulínica foi realizada por diálise, seguida de centrifugação antes da adição de formaldeído. Também é proposta a concentração por filtração, seguida de parcial purificação por ultrafiltração (massa molecular de corte de 50 kDa).

**Quadro 2 - Operações unitárias empregadas durante a etapa de purificação de proteínas.**

Etapa do processo	Operações unitárias	Princípio/Características
Clarificação	Filtração convencional	Tamanho de partícula
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas

Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca-iônica	- Tipo e densidade de carga na superfície das biomoléculas; - Aniônica: liga-se a ácidos nucleicos - Catiônica: não se liga a DNA, endotoxinas; pode requerer modificação de pH em que a proteína não é estável.
	Cromatografia de interação hidrofóbica	- Hidrofobicidade; - Alta seletividade; moderada capacidade; produtos e contaminantes podem se precipitar por <i>salting-out</i> .

### 1.7 Métodos de quantificação da toxina botulínica

O ensaio em camundongos é atualmente o único método aceito para confirmação do botulismo (OFFICIAL... 2005) e é o método de detecção de neurotoxinas mais comumente utilizado por apresentar alta sensibilidade (0,03ng) (ARNON *et al.*, 2009; CAI; SINGH; SHARMA, 2007; GESSLER; BÖHNEL, 1999; VU, 2006). No Brasil, a avaliação da proteção da vacina contra botulismo também é realizada *in vivo*, utilizando cobaias e camundongos, conforme recomendado pelo Ministério da Agricultura para teste de soroneutralização (SECRETARIA..., 2002).

Métodos imunobiológicos tais como ELISA e outras técnicas têm sido utilizadas para detecção de toxinas e identificação de colônias de *C. botulinum*. Contudo, a aplicação de ELISA tem limitações. Muitos ELISAs requerem aplicações complexas e de alto custo. Alguns podem reagir com toxinas inativas ou sofrer interferência de reação cruzada de toxinas de outro clostrídio. ELISAs comerciais são limitados a neurotoxinas patogênicas de humanos tais como A, B e E. Além disso, a técnica avalia apenas epítopos e não a atividade biológica como um todo (BÖHNEL; WAGNER; GESSLER, 2008; GESSLER *et al.*, 2006; VU, 2006). Contudo, devido às restrições éticas da utilização de animais e o longo tempo para análise (4 dias), o desenvolvimento de técnicas alternativas como cromatografia de afinidade e ensaio em partículas imunomagnéticas para toxinas botulínicas C e D (GESSLER *et al.*, 2006; GESSLER;

HAMPE; BÖHNEL, 2005; KLEWITZ *et al.*, 2006), eletroquimiluminescência para os tipos A, B, E e F (RIVERA *et al.*, 2006) foram apresentados recentemente. *Polymerase chain reaction* (PCR) para genes de toxinas botulínicas A, B, C, E e F (MYLLYKOSKI *et al.*, 2006; 2009) são possíveis. Para os tipos A, B, E e F, espectroscopia de massa e espectroscopia de massa combinada com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também foram empregadas. A soroneutralização em cultura de células foi padronizada para *C. septicum* (Salvarani 2007) e *C. perfringens* tipo D (Souza Júnior *et al.*, 2010) e é um método potencial para outras clostridioses. De forma geral, qualquer método de diagnóstico *in vitro* deve ser validado em relação ao ensaio em camundongo, apresentar sensibilidade equivalente ou superior ao bioensaio (20pg.mL<sup>-1</sup>) e apresentar capacidade de avaliar diferentes sorotipos de toxina botulínica. Outro obstáculo a ser superado é a padronização de reagentes, uma vez que a potência da toxina e os reagentes variam muito entre os laboratórios. Tais fatores são extremamente críticos para aprovação de qualquer ensaio clínico para botulismo. Também é preciso considerar que para avaliação de sobrenadantes de cultura de fermentação não há toxina pura e sim complexos incluindo proteínas hemoaglutinantes e não hemoaglutinantes (CAI; SINGH; SHARMA, 2007; GESSLER; HAMPE; BÖHNEL, 2005).

## CAPÍTULO 2



## 2. JUSTIFICATIVA

As clostridioses incluem várias espécies de bactérias do gênero *Clostridium* que acometem diversas espécies animais de produção e selvagens. Nos animais de interesse pecuário, os clostrídios são extremamente importante, pois atuam como agentes primários. As infecções e intoxicações causadas por essas bactérias causam perdas consideráveis nos rebanhos, uma vez que o tratamento em grande maioria dos casos é impraticável, sendo o prognóstico desfavorável (RADOSTITS *et al.*, 2007).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2009 (IBGE, 2010), o efetivo nacional de bovinos atingiu a marca de 205,3 milhões de cabeças o que mostra a efetiva importância econômica do setor. Infelizmente, não existem dados oficiais sobre a prevalência das clostridioses em bovinos, caprinos, ovinos e suínos, incluindo o botulismo no país. O botulismo é uma doença que prejudica o crescimento do rebanho e a principal medida profilática é por meio da imunização dos animais, especialmente no Brasil em que o sistema de criação é extensivo (BARROS *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 1999).

Conforme dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal – SINDAN e empresa Sinpase (SINDAN, 2010), o mercado brasileiro para vacinas botulínicas (botulismo tipo C e D) foi de 2,8 bilhões em 2009 (5,2 milhões de doses). Enquanto este mercado vem sofrendo reduções nos últimos anos, as vacinas contra clostridioses chegaram a um patamar de 49,1 bilhões no mesmo ano (104,7 milhões de doses). Isto significa que parte do rebanho nacional não recebe imunização contra botulismo, ou outras clostridioses, e que há forte tendência na utilização de vacinas associadas contra clostridioses (*C. Botulinum*, *C. tetani*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordelli*, *C. perfringens*, *C. haemolyticum*) em preferência à vacina contra botulismo. Contudo, isto corresponde a um desafio tecnológico de associar diferentes antígenos. Deste modo, a utilização de um sistema que garanta imunização com baixa quantidade de antígeno se torna muito importante para viabilização técnica e econômica destas vacinas. Outro fato importante é que as vacinas contra clostridioses requerem dose de reforço para animais primovacinados e, conseqüentemente, isto acarreta aumento do manejo de animais e custo do tratamento.

Apesar dos avanços da área de biotecnologia e síntese bioquímica, o uso de peptídeos e proteínas em medicina é limitado devido a baixa biodisponibilidade resultante da pouca estabilidade a degradação proteolítica e hidrolítica, baixa permeabilidade para atravessar barreiras biológicas e curta meia-vida no sistema circulatório (GROVES, 2006). A busca por alternativas para administração de vacinas levou Preis & Langer (1979) a aplicarem a tecnologia da liberação controlada de fármacos no campo da imunização. Nos últimos anos, um dos mais importantes avanços na área de sistemas de liberação controlada é o emprego de sistemas particulados (nanopartículas, nanocápsulas e micropartículas) e de sistemas de gelificação *in situ* para liberação de peptídeos e proteínas, visto que são capazes de modificar a liberação do ativo (HORA; RADHAKRISHNAN, 2000; ISSA; KÖPING-HÖGGÅRD; ARTURSSON, 2005; TIPTON; DUNN, 2000). Em comparação com outras formas farmacêuticas, a microencapsulação polimérica e a gelificação *in situ* com o uso de polímeros biodegradáveis são rotas muito promissoras para obtenção de vacinas de administração única, *single shot*, que podem ser administradas de maneira simples, sem a necessidade de técnicas cirúrgicas, contando apenas com o auxílio de seringa (JAGANATHAN *et al.*, 2005; LEE; PUTNAM, 2000).

Entre os polímeros utilizados para obtenção de micropartículas, a quitosana, um poliaminossacarídeo natural, tem atraído atenção considerável para uso na área de saúde como polímero com baixa toxicidade apresentando características favoráveis tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade e propriedade adjuvante (KANG *et al.*, 2006; NISHIMURA *et al.*, 1984). A quitosana é utilizada em diferentes aplicações tanto para engenharia de tecidos biológicos como em sistemas de liberação controlada de vacinas por diferentes vias de administração incluindo as vias oral, nasal e outras mucosas, porque é capaz de aumentar o transporte de biomacromoléculas tais como peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e plasmídeos através da superfície biológica.

Na área de sistemas de gelificação *in situ*, há uma grande variedade de substâncias capazes de se transformarem em sistema de depósito (*Depot*). Entre os polímeros de baixa temperatura crítica de transição, o Pluronic® é um dos mais pesquisados e se tornou clássico como potencial de aplicação (TIPTON; DUNN, 2000).

A proposta deste trabalho é a obtenção de formulações de vacinas contra botulismo tipo D utilizando hidrogel e micropartículas de quitosana preparadas com poloxamer 407 visando o tratamento de bovinos, caprinos e ovinos através de uma dose única. As principais vantagens são a redução do manejo do rebanho e o aumento da adesão à prevenção da doença, devido à eliminação da dose de reforço para animais primovacinados. A purificação parcial da toxina botulínica e a utilização de sistemas de micropartículas colaboram com futuras pesquisas para desenvolvimento de vacinas associadas.

## CAPÍTULO 3

---



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de vacina contra botulismo tipo D utilizando como adjuvantes micropartículas e hidrogel de quitosana para fins de vacinação em dose única.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Produzir, purificar e caracterizar a toxina botulínica de *C. botulinum* tipo D a partir do meio de cultivo;
- Obter um antígeno atóxico a partir da destoxificação da toxina botulínica tipo D parcialmente purificada;
- Caracterizar a quitosana por meio de métodos físico-químicos;
- Obter micropartículas de quitosana e poloxamer carregadas com toxóide botulínico tipo D por método de coacervação utilizando como precipitante o sulfato de sódio;
- Preparar vacinas contendo toxóide botulínico tipo D purificado;
- Avaliar por soroneutralização a resposta imunológica, em cobaias, induzida pela administração das vacinas obtidas a partir de sistemas a base de micropartículas e hidrogel de quitosana.

## CAPÍTULO 4

---



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados os materiais, bem como os procedimentos utilizados nos experimentos.

### 4.1 Materiais

- Cepa de *Clostridium botulinum* tipo D GPV078/02 fornecida pela VALLÉE S.A. (Brasil);
- Antitoxina tipo D fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-MG, Brasil) e *National Institute for Biological Standards and Control* – NIBSC (*Potters Bar*, Reino Unido) lote 61/001;
- Quitosanas fornecidas pela Sigma-Aldrich (lote 6720AE), Cognis (Hydagen® lote 1268895 e Chitopharm® lote UPBH5266PR) e Polymar (lote HP20051015);
- Ácido acético PA Sigma-Aldrich (lote 06822HH), albumina de soro bovino (BSA) Sigma-Aldrich (lote 056K1554), Lutrol F127 BASF (lote WPDD542B), sulfato de sódio anidro PA Synth (lote 98445);
- Coluna cromatográfica *Q-Sepharose Hi-Trap* de 5mL (GE Healthcare, Estados Unidos);
- Resinas *Q-Sepharose High Performance* e *Sepharose 15Q* (GE Healthcare, Estados Unidos).

Os reagentes utilizados foram adquiridos de diferentes fabricantes, todos com grau analítico.

Salvo quando especificado, a água utilizada em todos os experimentos foi a ultra pura obtida por sistema Milli-Q® (Millipore, Estados Unidos).

### 4.2 Locais de realização do trabalho e condições experimentais do uso de animais

A primeira parte deste trabalho consistiu na tipificação e cultivo do *C. botulinum* tipo D e foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Vacinas da Vallée S.A., situado em Montes Claros – MG. As etapas de purificação da toxina foram realizadas no Laboratório de Imunologia da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, e na Biommm S.A., em Montes Claros. A etapa de formulação da vacina foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Vallée S.A. e no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os testes clínicos foram realizados no biotério de pesquisa da Vallée S.A. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura, umidade, luminosidade e receberam água e ração ad libitum conforme recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL (COBEA..., 2007).

As gaiolas onde foram alojados os animais são de material plástico com tampa em aço inoxidável na forma de grade com rebaixamento para o interior da gaiola, servindo de comedouro. Diariamente foram realizadas trocas das gaiolas para limpeza, substituindo as gaiolas sujas por outras limpas e forradas com maravalha especial de pinus.

Aos animais foi fornecida água filtrada em frascos de plástico com rolhas de borracha, usadas como tampa, e bico em aço inox. Foi fornecida ração peletizada, sendo esta ração colocada no rebaixamento da tampa das gaiolas. Tanto a ração quanto a água eram trocadas nas segundas, quartas, sextas e sábados.

Os experimentos foram aprovados previamente quanto aos princípios éticos de experimentação animal pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais conforme protocolos 107/08 e 017/10.

#### **4.3 Obtenção da toxina botulínica tipo D**

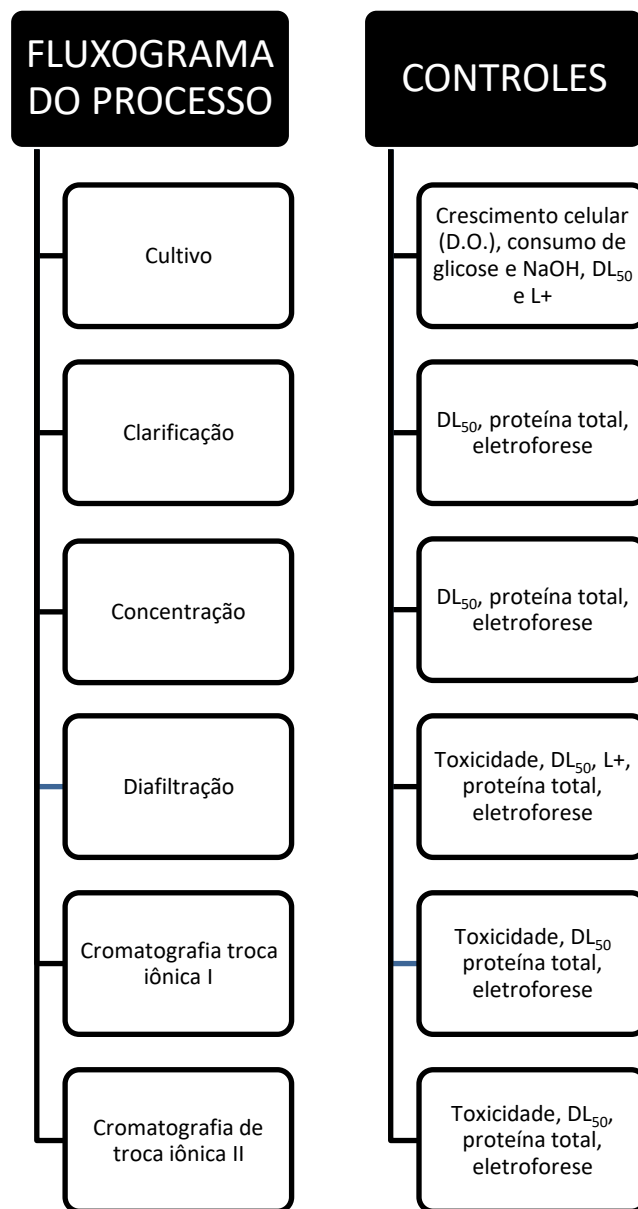
O fluxograma apresentado na Figura 3 sintetiza as principais atividades durante o processo de obtenção da toxina botulínica de *C. botulinum* tipo D utilizada na fabricação da vacina.

#### **4.3.1 Microorganismo**

Utilizou-se cepa de *C. botulinum* tipo D GPV078/02 do banco de células do LTV da Vallée S.A.. Esta linhagem foi isolada de um foco de botulismo do estado do Piauí no ano de 1988, caracterizada e mantida na forma liofilizada.

#### **4.3.2 Meios de cultura**

Na etapa de reativação do liofilizado foi utilizado meio Tarozzi conforme descrito por Bier (1955). Para isolamento foi utilizado o meio PYGA (*Peptone Yeast Extract Glucose Agar*) adicionado de 10%(V/V) de sangue de carneiro desfibrinado. E nas etapas de cultivo e biorreator foram utilizados o meio PYG (*Peptone Yeast Extract Glucose*) enriquecido e pH ajustado para 6,5 (ATLAS, 2004; MOZZER, 2004). O meio PYG foi composto de peptona bacteriológica 20,0g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5,0g.L<sup>-1</sup>, glicose 20,0g.L<sup>-1</sup>, sulfato de magnésio heptahidratado 1,5g.L<sup>-1</sup>, fosfato de potássio dibásico 5,0g.L<sup>-1</sup>, cloridrato de cisteína 0,75g.L<sup>-1</sup> e mistura Vallée/LTV de proteínas. Para obtenção do meio PYGA, acrescentou-se 1,5%(p/V) de ágar.



**Figura 3 - Fluxograma do processo e controle da produção e purificação da toxina do *C. botulinum* tipo D.**

### **4.3.3 Condições de cultivo**

A reativação do liofilizado foi realizada em meio Tarozzi, utilizando tubo vedado com parafina na superfície do meio, e incubação em estufa a 37°C por cerca de 12h. Uma

amostra do cultivo foi tomada para avaliação de colônia em meio PYGA adicionado de 10%(V/V) de sangue de carneiro desfibrinado. O crescimento foi identificado com a ascensão da parafina dentro do tubo. A cultura foi submetida a três cultivos consecutivos, sendo o primeiro pela transferência de 9mL de inóculo para frasco de 100mL contendo 81mL de meio de cultura PYG, previamente borbulhado com nitrogênio para retirada do oxigênio. Após incubação a 37°C por 8h em estufa, foi transferido todo volume para outro frasco de 1L contendo 810mL do mesmo meio de cultura. Incubou-se a cultura a 37°C por 6h em estufa. Transferiu-se os 900mL do inóculo para dorna de 10L do fermentador B. BRAUN® (Biostat MD, Alemanha) (**Figura 4**), contendo 8,1L de meio PYG em estado de anaerobiose com borbulhamento de nitrogênio (MOZZER, 2004; SIEGEL, METZGER, 1980).



**Figura 4 - Biorreator B. Braun® utilizado para produção da toxina botulínica de *C. botulinum* tipo D.**

O biorreator era dotado de controles de agitação, pH e temperatura. O cultivo foi realizado em pH 6,5, com adição automática de NaOH 10N, temperatura de 37°C e agitação de 150 RPM, por 96h. O fermentador possuía filtro Millex FG 0,22 $\mu$ m (Millipore, Brasil) para saída de gases. Previamente à inoculação, borbulhou-se nitrogênio filtrado em Millex FG de 0,22 $\mu$ m ao meio sob agitação por 5min, para garantir a anaerobiose. Ao término do cultivo a suspensão com células e toxinas foi resfriada a 4°C.

Para melhor caracterização do cultivo, acompanhou-se o consumo de NaOH ao longo do tempo de 96h e foram feitas amostragens de 30mL para acompanhamento das fases de crescimento do *C. botulinum* por meio da análise de densidade ótica a 600nm. Após centrifugação em equipamento Beckman® modelo JA-21 (Estados Unidos) a 12.100g por 15min a 5°C, avaliou-se o consumo glicose através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e produção de toxina pelas técnicas de DL<sub>50</sub> e L+. Todo material utilizado nos ensaios com toxina ou contendo resíduos foram autoclavados a 121°C por 40min ou sanitizados com solução de hipoclorito de sódio antes de serem descartados ou reutilizados.

#### **4.3.4 Purificação via cromatografia**

##### **4.3.4.1 Clarificação do meio com toxina**

Com a finalidade de separar células do meio fermentado, foram avaliadas duas técnicas clássicas: centrifugação e microfiltração convencional. A centrifugação foi realizada utilizando centrífuga Beckman modelo JA-21, 12.100g, por 15 minutos, a 4°C. Foram utilizados tubos de centrífuga previamente autoclavados. Quanto a microfiltração asséptica, esta foi realizada através de membranas de diâmetro 293mm de microfibras de vidro AP 15 (Millipore, Brasil) e de éster de celulose 0,22µm (Millipore, Brasil), previamente autoclavadas. O processo foi realizado em fluxo laminar, sob pressão positiva. Os recipientes de armazenamento e coleta do filtrado estéril foram mantidos em banho de gelo.

##### **4.3.4.2 Concentração**

Para concentração de proteínas foram testadas duas alternativas: *salting out* e ultrafiltração em *Hollow Fiber*. Na técnica de *salting out*, foi pesada quantidade de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (JT Baker, lote B07340) suficiente para obtenção de saturação de 10, 25, 40, 60 e 85% e acrescentadas consecutivamente durante o processo. A adição do sal foi feita de forma lenta e sob agitação à temperatura de 4°C. Após precipitação, manteve-se o sistema sob agitação por mais 30min. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000g por 10min em centrífuga Beckman modelo JA-21. Em caso de formação de *pellet*, separou-se o sobrenadante para continuidade do processo e o *pellet* formado foi ressuspensionado em tampão de fosfato de sódio 10mM, pH 6,0, contendo azida sódica 0,5%(p/V). Em seguida, adicionou-se mais  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em quantidade suficiente para obtenção da saturação em teste. Este procedimento foi finalizado quando a saturação da solução chegou a 85%. Os *pellets* ressuspensionados foram dialisados em tubos de celulose de corte molecular de 12kDa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) lavando-se por 5 vezes, em volume 10 vezes maior, utilizando como eluente tampão fosfato de sódio 10mM, pH 6,0, a temperatura de 5 a 8°C. Em seguida, as soluções foram liofilizadas e avaliadas por eletroforese. A segunda técnica testada para concentração foi a filtração tangencial. Foi utilizado cartucho *Hollow Fiber* UFP-30-E-5A (corte 30kDa, área 1200cm<sup>2</sup>, lote 4-469) e bomba de lóbulos Teknoflow Unibloc PD (Estados Unidos) mantendo-se a pressão transmembrana máxima de 10PSI (**Figura 5**). Os recipientes de armazenamento e coleta do retentato foram mantidos em banho de gelo. O meio contendo toxina foi concentrado em aproximadamente 4 vezes. A limpeza do cartucho foi realizada antes e após as operações de filtração tangencial, utilizando solução de NaOH 0,5M sob recirculação por 2h, seguida de enxágue com água purificada e sanitização com solução de hipoclorito de sódio com 100ppm de cloro ativo e solução de NaOH 0,01M.



**Figura 5** - Sistema *Hollow Fiber*, de filtração tangencial, montado com cartucho *Hollow Fiber* UFP-30-E-5A e bomba de lóbulos Teknoflow Unibloc PD.

A partir do meio concentrado, foi realizada a diafiltração, em etapas, através de diluições sucessivas do retentado por 6 vezes, em volume 4 vezes maior, eluindo com tampão acetato de amônio 50mM, pH 8,0. A temperatura foi mantida na faixa de 4 a 8°C em banho de gelo.

Em caso de preparo de amostras de pequeno volume e, com finalidade de eliminação de sal e concentração da amostra após cromatografia, utilizou-se sistema Amicon modelo 8200 (Estados Unidos). Este processo foi realizado utilizando membranas de celulose regenerada de corte molecular de 10kDa YM10 de diâmetro de 63,5mm (Millipore, Brasil). A ultrafiltração ocorreu sob pressão positiva de nitrogênio e refrigeração entre 4 a 8°C em refrigerador Reubly VEVM15 (Brasil).

A ultrafiltração em sistema Amicon também foi aplicada para diafiltração em tampão PBS 150mM pH 7,0 da fração da amostra após concentração em *Hollow Fiber*. Esta amostra semipurificada foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose 0,22 $\mu$ m (Millipore, Brasil), mantida sob refrigeração e rotulada como lote 01.

#### **4.3.4.3 Cromatografia de troca iônica**

O meio contendo toxina, retido após a filtração tangencial, foi submetido a purificação cromatográfica em um equipamento Äkta Purifier System fabricado pela Amersham Pharmacia (Suécia). O equipamento era composto de detector UV-900, bomba quaternária P-900, fracionador automático Frac-900 e *software* Unicorn.

##### 4.3.4.3.1 Eluição por gradiente

Na primeira cromatografia, amostras de 5mL foram eluídas através de um sistema gradiente de acetato de amônio 50mM pH 8,0 e acetato de amônio 1M pH 8,0, a temperatura 25°C, utilizando coluna cromatográfica *Q-Sepharose Hi-Trap* de 5mL (GE Healthcare, Estados Unidos). O processo cromatográfico gradiente ocorreu em quatro etapas consecutivas: 2 volumes de coluna de acetato de amônio 50mM; 20 volumes de coluna para o gradiente 0 a 50% de acetato de amônio 1M; 2 volumes de coluna entre 50 a 100% de acetato de amônio 1M e 5 volumes de coluna com acetato de amônio 1M. O fluxo foi de 2mL.min<sup>-1</sup> e leitura a 280nm.

Na segunda cromatografia, as frações que continham toxina foram reunidas, aplicadas novamente em coluna de troca iônica e eluídas em gradiente de acetato de amônio 50mM e acetato de amônio 1M, a temperatura de 25°C. Foram realizadas corridas cromatográficas em pH 8,0 e 6,0. Para comparação, foram utilizadas colunas

cromatográficas *Q-Sepharose Hi-Trap* de 5mL e *Sepharose 15Q* de 5mL (GE Healthcare, Estados Unidos). O fluxo foi de  $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e leitura a 280nm. O processo cromatográfico gradiente ocorreu em quatro etapas consecutivas: dois volumes de coluna de acetato de amônio 50mM; 20 volumes de coluna para o gradiente 0 a 50% de acetato de amônio 1M; 2 volumes de coluna entre 50 a 100% de acetato de amônio 1M e 5 volumes de coluna com acetato de amônio 1M.

#### 4.3.4.3.2 Eluição isocrática e aumento de escala

Partindo dos resultados obtidos na eluição gradiente e mantendo a mesma coluna cromatográfica, *Q-Sepharose Hi-Trap* de 5mL, e equipamento Äkta Purifier System, foram testadas condições isocráticas de eluição utilizando acetato de amônio 50mM, pH 8,0 e acetato de amônio 1M pH 8,0, a temperatura de 25°C, sob monitoramento pela leitura a 280nm. O resultado foi satisfatório através da seguinte sequência da mistura de acetato de amônio 50mM (A) / acetato de amônio 1M (B): 2 volumes de coluna A(100%):B(0%); 5 volumes de coluna A(80%):B(20%); 3 volumes de coluna A(70%):B(30%); 3 volumes de coluna A(75%):B(35%); 3 volumes de coluna A(0%):B(100%).

Uma vez definida a condição isocrática no equipamento Äkta Purifier System, foi feito escalonamento do processo para uma coluna de *Q-Sepharose High Performance (HP)* com diâmetro e altura de 5cm (**Figura 6**).



**Figura 6 - Coluna cromatográfica XK-50 contendo resina *Q-Sepharose High Performance (HP)* utilizada para purificação da toxina botulínica tipo D sob condições de eluição isocráticas.**

Alíquota de 100mL da solução de toxina botulínica, previamente concentrada e equilibrada por diafiltração, foi administrada à coluna cromatográfica associada a um sistema composto de Optical Unit com detector UV com filtro de 280nm (Amersham Pharmacia Biotech, Estados Unidos) ajustado para 0,05 de sensibilidade, registrador Pharmacia LKB-REC-102 a  $1\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ , bomba Watson Marlow 101V/R ajustada para fluxo de  $10\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente em cinco etapas (sequência A): 5 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 50mM, pH 8,0; 4 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 240mM, pH 8,0; 3 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 335mM, pH 8,0; 3 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 380mM, pH 8,0; 5 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 1000mM, pH 8,0. Foram realizadas medidas de condutividade de todos os eluentes como controle de qualidade.

A partir da avaliação da primeira cromatografia, foi realizado o ajuste das condições de processo e a eluição foi estabelecida nas seguintes etapas (sequência B): 2,5 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 50mM, pH 8,0; 3 volumes de coluna: tampão

acetato de amônio 150mM, pH 8,0; 3 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 200mM, pH 8,0; 2,5 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 240mM, pH 8,0; 3 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 335mM, pH 8,0; 2 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 383mM, pH 8,0; 2 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 1000mM, pH 8,0.

A fim de reduzir número de etapas e tempo de eluição cromatográfica, foi proposta a sequência C: 2 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 50mM, pH 8,0; 4 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 250mM, pH 8,0; 3 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 350mM, pH 8,0; 2 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 400mM, pH 8,0; 2,5 volumes de coluna: tampão acetato de amônio 1000mM, pH 8,0.

Após as corridas cromatográficas, as frações coletadas foram concentradas e equilibradas utilizando sistema Amicon, composto de membrana de celulose regenerada de corte molecular de 10kDa 63,5mm (YM10, Millipore), e tampão acetato de amônio 50mM pH 6,0 ou tampão bis-tris 50mM, pH 6,0, a temperatura de 4 a 8°C em refrigerador Reubly Modelo VEVM15 (Brasil). Em seguida, foram feitas análises por SDS-PAGE e teste de toxicidade em camundongo. Como alternativa para equilíbrio da amostra, em situações de trabalho com um grande número de frações, utilizou-se procedimento de diálise em tubo de celulose (limite de exclusão 12kDa, Sigma Aldrich). A diálise foi realizada contra cerca de 30 a 50 volumes de tampão, em cinco trocas durante 2 dias, sob temperatura de 4 a 8°C em refrigerador Reubly Modelo VEVM15 (Brasil). Para manutenção microbiológica das amostras, foi realizada filtração esterilizante em membrana de poli(fluoreto de vinilideno) 0,22 $\mu$ m (PVDF, Millex GV, Millipore, Brasil) sob fluxo laminar em capela de segurança biológica e envase em frascos de vidro estéreis.

#### **4.3.5 Processo de purificação via precipitação ácida**

##### **4.3.5.1 Clarificação**

A remoção de células foi realizada por processo de microfiltração asséptica, esta foi realizada através de membranas de diâmetro 293mm de microfibras de vidro AP 15 e de éster de celulose 0,22 $\mu$ m, previamente autoclavadas. O processo foi realizado em capela de segurança biológica, sob pressão positiva. Os recipientes de armazenamento e coleta do filtrado estéril foram mantidos em banho de gelo.

#### **4.3.5.2 Concentração**

Sob agitação, em um béquer contendo a toxina clarificada adicionou-se quantidade suficiente de ácido sulfúrico 3N para obter pH 3,4. Em seguida, deixou-se em repouso a 4°C por cerca de 48h. Retirou-se o sobrenadante por sifonamento e coletou-se o precipitado através de centrifugação a 12.000g. A proteína precipitada foi lavada com água Milli-Q e o *pellet* foi separado novamente por centrifugação. Os *pellets* reunidos foram ressuspensos em tampão fosfato 0,2M pH 6,5 contendo NaCl 0,5M. Após aproximadamente 2h, centrifugou-se e o sobrenadante foi coletado. O precipitado foi lavado por 3 vezes com o mesmo tampão. Os sobrenadantes foram reunidos e armazenados sob refrigeração.

#### **4.3.5.3 Diafiltração**

A amostra foi diafiltrada em etapas, através de diluições sucessivas do retentado por 3 vezes, em volume 10 vezes maior de tampão PBS 150mM pH 7,0 utilizando cartucho *Hollow Fiber* UFP-30-E-5A e bomba de lóbulos Teknoflow Unibloc PD mantendo-se a pressão transmembrana máxima de 10PSI. Em seguida, a amostra diafiltrada foi esterilizada por filtração em membrana PVDF 0,22 $\mu$ m, aliqüotada e rotulada como lote

02. A limpeza do cartucho foi realizada antes e após as operações de filtração tangencial, utilizando solução de NaOH 0,5M sob recirculação por 2h, seguida de enxágue com água purificada e sanitização com solução de hipoclorito de sódio com 100ppm de cloro ativo e solução de NaOH 0,01M.

#### **4.4 Estudos de estabilidade da toxina botulínica**

Foi realizado estudo de estabilidade das amostras de toxina botulínica tipo D após as etapas de purificação: centrifugação, microfiltração, diafiltração em PBS pH 7,0, em acetato de amônio 50mM pH 8,0 e em solução ácida pH 3,0. As amostras foram filtradas através de membrana de PVDF 0,22 $\mu$ m, alíquotadas, mantidas sob refrigeração e analisadas nos pontos inicial, 1 mês e 2 meses pela padronização ao nível de L+ (item 4.5.6.3).

#### **4.5 Métodos de controle de qualidade no desenvolvimento de vacinas**

##### **4.5.1 Tipificação da bactéria *Clostridium botulinum* tipo D**

A tipificação do *C. botulinum* tipo D foi efetuada por meio de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Para tanto, foram realizadas: coloração de Gram, plaqueamento, microscopia óptica, determinação da DL<sub>50</sub> e padronização ao nível L+.

A coloração de Gram foi realizada conforme descrito por Bier (1955) e as lâminas foram visualizadas utilizando microscópio óptico Olympus BX40 (Estados Unidos) composto com videocâmara JVC Digital TK-C720v (Tailândia).

Após a ativação do liofilizado em meio Tarozzi, foi realizado plaqueamento da amostra do inóculo em placas de PYGA adicionado de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram transferidas para a jarra de anaerobiose de 3L junto com um envelope gerador de anaerobiose BBL GasPak Plus (Becton Dickinson, Estados Unidos). Após realização de vácuo na jarra, a mesma foi mantida a 37°C por 48h em câmara de incubação Fanem 347 (Brasil). O acompanhamento da condição de anaerobiose foi feito por meio de fita indicadora BBL GasPak (Becton Dickinson, Estados Unidos) que assume coloração branca em anaerobiose. As placas foram avaliadas em estereoscópio LABMED CZM4 (Brasil) composto de videocâmera JVC Digital TK-C720v (Tailândia).

Foi determinado o valor de  $DL_{50}$  e o nível L+ durante a etapa de cultivo e purificação e o procedimento está descrito nos itens 4.5.6.2 e 4.5.6.3, respectivamente.

#### **4.5.2 Determinação da concentração celular**

Foi determinada a concentração celular através da medida da densidade ótica (DO) a 600nm utilizando espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Tailândia) . As amostras foram coletadas e lidas diretamente no equipamento até valores em torno de 0,7. Acima deste valor de absorvância, foram feitas diluições em meio de cultura estéril antes de repetir a leitura. O valor lido após diluição foi multiplicado pelo fator de diluição para obtenção da concentração celular (MOZZER, 2004).

#### **4.5.3 Quantificação de glicose e identificação de metabólitos**

A análise de glicose durante o cultivo foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando equipamento Waters HPLC System Alliance modelo 2695 (Estados Unidos) incluindo uma bomba quaternária, auto-injetor, forno para coluna e detector para Índice de Refração modelo 2414. As áreas dos picos foram integradas pelo

programa Empower 2 Software Build 2154. Para a análise, as condições cromatográficas foram padronizadas utilizando coluna Aminex HPX-87H (BIO-RAD, Estados Unidos) e solução de ácido sulfúrico 5mM como fase móvel, fluxo 0,6mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 10μL, tempo de corrida de 15min, temperatura de 43°C.

A curva padrão de glicose foi obtida utilizando padrão de Dextrose USP (lote J2E294, Estados Unidos). A partir da solução padrão da dextrose de 10mg.mL<sup>-1</sup>, obteve-se amostras diluídas nas concentrações de 0,025, 0,05, 0,10, 0,20, 0,50, 0,85, 1,0 e 1,25mg.mL<sup>-1</sup> utilizando-se solução de ácido sulfúrico 5mM como diluente. Substâncias de referência foram empregadas para identificação de picos cromatográficos: ácido acético glacial (lote 37698, Fmaia, Brasil), ácido láctico (lote 75K1457, Sigma, Estados Unidos), ácido propiônico (lote 11318JA, Sigma, Estados Unidos), ácido butírico (lote 109H2607, Sigma, Estados Unidos) e etanol (lote E14C59, J.T Baker, México).

Para análise da amostra, após centrifugação, foi pipetado 1,0mL do sobrenadante e transferido para um balão volumétrico de 20mL. Os volumes foram completados utilizando solução de ácido sulfúrico 5mM.

#### **4.5.4 Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Analisou-se o perfil eletroforético de amostras durante as etapas de purificação de toxina de *C. botulinum* tipo D utilizando-se a técnica SDS-PAGE. As amostras contendo aproximadamente 300mg de proteína foram previamente acrescidas de diluente contendo azul de bromofenol, fervidas e submetidas à eletroforese utilizando uma diferença de potencial de 90 Volts em equipamento Pharmacia Biotech EPS 300 (Suécia). O gel de poliacrilamida 0,75mm foi preparado na concentração de 7% para corrida e 5% para o gel de empilhamento, conforme Laemmili (1970) e Protein electrophoresis - applications Guide (1994).

Foram utilizados os seguintes marcadores: (i) SDS-PAGE Standards (Bio-Rad) contendo: miosina (197,2kDa), galactosidase (125,3kDa), albumina de soro bovina (83,4kDa), anidrase carbônica (37,1kDa), inibidor de tripsina de soja (31,2kDa), lisozima (17,2kDa) e aprotinina (7,0kDa); (ii) Amersham full-range rainbow molecular weight markers (GE Healthcare): azul (225kDa), vermelho (150kDa), verde (102kDa), amarelo (76kDa), púrpura (52kDa), azul (38kDa), alaranjado (31kDa), verde (24kDa), azul (17kDa), vermelho (12kDa); (iii) Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad): miosina (196,1kDa),  $\beta$ -galactosidase (131,1kDa), albumina de soro bovina (90,6kDa), anidrase carbônica (42,1kDa), inibidor de tripsina de soja (32,0kDa), lisozima (17,2 kDa) e aprotinina (6,9kDa); (iv) Trial Mix™ Protein Markers (Novagen®): composto de proteínas recombinantes de 10,15, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 225kDa. Adicionou-se em cada canaleta do gel, 15 $\mu$ L da amostra e 10 $\mu$ L de proteínas padrão. A corrida das amostras no gel foi realizada sob refrigeração em banho de gelo a aproximadamente 4 a 8°C, 90V. Em seguida, o gel foi corado com solução de *Coomassie Blue* (*Coomassie Brilliant Blue* 0,25%(p/V) em 25%(V/V) de isopropanol e 7%(V/V) de ácido acético), por 12 horas. O gel foi corado com *Comassie blue* para revelação das proteínas e descorado com solução contendo ácido acético 7%(V/V) e metanol 33%(V/V).

O registro dos géis foi realizado por fotografia e as imagens foram ajustadas utilizando o programa Microsoft® Office Picture Manager.

#### **4.5.5 Quantificação de proteína**

##### **4.5.5.1 Método de Bradford**

Para medida da concentração do teor de proteínas totais durante as etapas de purificação, a quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford.

A curva padrão foi construída com BSA, albumina de soro bovino, fornecida pela Pierce (lote II115178A, Estados Unidos), com 6 pontos variando entre 75 a 750 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . As diluições foram obtidas em tampão tris 0,1M pH 8,0.

A determinação de proteína total foi realizada em triplicata com adição de 1mL do reagente *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* (Pierce, Estados Unidos) a 25 $\mu\text{L}$  da solução de BSA ou amostras diluídas em tris 0,1M pH 8,0. A absorvância da mistura foi lida em comprimento de onda de 595nm utilizando espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Tailândia), após 5 a 20min de reação utilizando cubetas descartáveis.

#### **4.5.5.2 Método micrométrico de Lowry**

Devido à maior sensibilidade da técnica em relação ao método de Bradford, a determinação quantitativa de proteínas na etapa de formulação foi realizada pelo método micrométrico de Lowry utilizando *Total Protein kit Micro-Lowry* fornecido pela Sigma (lote 058k6068). A curva padrão foi obtida com BSA nas concentrações de 10 a 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  utilizando água Milli-Q como diluente. Em seguida, as soluções padrão e a(s) amostra(s) foram transferidas para um tubo centrífuga e, se necessário, diluídas para 1,0mL. Um tubo contendo 1,0mL de água foi utilizado como branco. Foram acrescentadas 3 gotas de NaCl 0,1M a cada tubo. Adicionou-se 0,1mL de solução de desoxicolato 0,15%(p/V) (DOC), homogeneizou-se e manteve-se sob repouso por 10 min. Em seguida, adicionou-se 0,1mL de solução de ácido tricloroacético 72%(p/V) (TCA) e homogeneizou-se. Centrifugou-se por 15 min em centrífuga Eppendorf 5415D (Alemanha) a 13200RPM. O sobrenadante foi desprezado e o sedimentado solubilizado e transferido

quantitativamente para um tubo de ensaio utilizando volume de 1,0mL de água Milli-Q. Após 20min de repouso, adicionou-se 0,5mL de solução de reagente fenólico (*Folin & Ciocalteau's Phenol reagent*) e 1,0mL de água em cada tubo. Após 30min de repouso, as amostras foram lidas em comprimento de onda de 750nm utilizando espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Tailândia).

#### **4.5.6 Ensaio *in vivo***

A avaliação qualitativa e quantitativa da toxina foi realizada por meio do teste de toxicidade em camundongo, DL<sub>50</sub>, L+, TCP e soroneutralização (BRANDI, 2007; SECRETARIA..., 2002; UNITED..., 2009; WISDOM; MIDURA, 1982). Foram utilizados camundongos da raça Swiss albina, de linhagem Webster, com peso corporal variando entre 18 a 22g.

##### **4.5.6.1 Ensaio de toxicidade em camundongo para detecção de toxina botulínica**

O ensaio de toxicidade foi utilizado para confirmar a presença da toxina botulínica nas frações obtidas durante o processo de purificação. Após esterilização por filtração em membrana Millex GV 0,22µm, foram inoculados 0,2mL da amostra por via intravenosa em dois camundongos. Os animais foram mantidos sob observação para os sinais de botulismo por quatro dias. Como controle, dois camundongos foram inoculados com igual volume de tampão (DUTRA; DÖBEREINER; SOUZA, 2005; KONDO *et al.*, 1984; WISDOM; MIDURA, 1982).

##### **4.5.6.2 Quantificação da toxina botulínica por DL<sub>50</sub>**

Para quantificação da  $DL_{50} \text{ mL}^{-1}$  da amostra, sete grupos de seis camundongos receberam 0,2mL de toxina diluída a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  por via endovenosa conforme Tabela 2. Sob fluxo laminar, em capela de segurança biológica, as diluições da toxina foram realizadas em solução salina 0,85%(p/V) pH 7,2. Os animais foram observados por quatro dias e o valor da  $DL_{50} \text{ mL}^{-1}$  foi calculado pelo método de Reed e Muench (REED; MUENCH, 1938).

**Tabela 2 - Determinação da  $DL_{50}$  através de diluição seriada da toxina botulínica, utilizando-se o fator 10, a partir da amostra pura até a diluição  $10^{-7}$ , com uso de salina 0,85%(p/V), em banho de gelo.**

Diluição da toxina	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
Salina 0,85% (mL)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Amostra (mL)	0,5	0,5( $10^{-1}$ )	0,5 ( $10^{-2}$ )	0,5 ( $10^{-3}$ )	0,5 ( $10^{-4}$ )	0,5 ( $10^{-5}$ )	0,5 ( $10^{-6}$ )
Volume total (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

A primeira linha indica os fatores de diluição da toxina a partir da amostra pura até a diluição  $10^{-7}$ . Para diluição da amostra, iniciou-se pela amostra não diluída seguindo para diluição 10 vezes pela adição de 4,5mL de salina e 0,5mL de amostra pura. Agitou-se em vórtice e fez-se diluição seriada até a diluição final. A quarta linha indica o volume final de cada tubo.

#### 4.5.6.2.1 Exemplo de aplicação

A interpretação do resultado da Tabela 3 baseia-se no postulado segundo o qual os animais sobreviventes a certa dose necessariamente sobreviveriam a doses menores e inversamente, os animais que sucumbem a certa dose sucumbiriam se tivessem sido injetados com doses maiores. Daí resulta a possibilidade de se fazer uma acumulação

dos mortos e dos sobreviventes e de calcular sobre estes resultados acumulados a dose correspondente a 50% de mortalidade (REED; MUENCH, 1938). Ou seja, a  $DL_{50}$  está compreendida entre as diluições imediatamente acima e abaixo do ponto onde ocorreu pelo menos 50% de mortalidade. Neste exemplo  $10^{-5}$  com 100% mortos e  $10^{-6}$  com 0% de morte.

**Tabela 3 - Leitura hipotética do resultado da técnica  $DL_{50}$ .**

Diluições	Leitura
$10^{-1}$	+ + + + +
$10^{-2}$	+ + + + +
$10^{-3}$	+ + + + +
$10^{-4}$	+ + + + +
$10^{-5}$	+ + + + +
$10^{-6}$	V V V V V
$10^{-7}$	V V V V V

+ = morte  
V = vivo

O título é determinado através da interpolação matemática da seguinte forma:

$$DL_{50} = \frac{(\text{diluição acima de } 50\% - 50\%)}{(\text{diluição acima de } 50\%) - (\text{diluição abaixo de } 50\%)} = \frac{(100 - 50)}{(100 - 0)} = 0,5$$

(Equação 1)

Multiplica-se o valor 0,5 pelo log do fator de diluição, que neste caso é  $\text{Log}(10) = 1,0$ . Logo,  $0,5 \times 1,0 = 0,5$ . Para se obter a  $DL_{50}$ , o valor 0,5 é somado ao expoente da maior dose, que neste caso é  $10^{-5}$  ( $\text{log } 10^{-5} = -5$ ); portanto,  $DL_{50}$  será  $10^{5,5}$ . Finalmente, convertendo esse valor para 1mL, obtém-se:  $1\text{mL} / 0,2\text{mL}$  (volume injetado) = 5. Sendo o log de 5 igual a 0,7, o resultado final será  $\text{log } DL_{50} \text{ mL}^{-1}$  é igual a 6,2.

### **4.5.6.3 Quantificação da toxina botulínica por L+**

O ensaio L+ foi utilizado para padronização da toxina além de ser utilizada para quantificação da toxina botulínica nas amostras de cultivo e ao longo da purificação. A quantificação da atividade da toxina botulínica do *C. botulinum* tipo D, frente a uma antitoxina específica, foi realizada pelo nível de teste L+/10 utilizando cinco camundongos por diluição. A antitoxina padrão utilizada ( $1\text{UI.mL}^{-1}$ ) foi fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LANAGRO – MG). L+/10 é a menor quantidade de toxina que quando misturada com 0,1UI de antitoxina padrão causa morte em pelo menos 80% dos camundongos inoculados. L0/10 é a maior quantidade de toxina a qual quando misturada com 0,1UI de antitoxina padrão não causa morte nos camundongos inoculados (SECRETARIA..., 2002; UNITED..., 2009). A metodologia para a obtenção de L+/10 foi realizada em duas etapas.

#### 4.5.6.3.1 Primeira etapa

Previamente, realizaram-se diluições seriadas da amostra com fator 10 utilizando salina 0,85%(p/V), conforme Tabela 4.

**Tabela 4 - Primeira etapa da determinação da L+, através de diluição seriada da toxina botulínica, utilizando-se o fator 10, até diluição  $10^{-6}$ , com uso de salina 0,85%(p/V), em banho de gelo.**

Diluição da toxina	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
Salina 0,85%(mL)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Amostra (mL)	0,5	0,5 ( $10^{-1}$ )	0,5 ( $10^{-2}$ )	0,5 ( $10^{-3}$ )	0,5 ( $10^{-4}$ )	0,5 ( $10^{-5}$ )
Volume total (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Em seguida, 1,0mL de cada uma das diluições obtidas foi acrescido de 1,0mL de antitoxina padrão específica, conforme Tabela 5.

**Tabela 5 - Primeira etapa da determinação de L+ através da mistura da toxina diluída conforme Tabela 4 com antitoxina padrão (1UI.mL<sup>-1</sup>).**

Diluição da toxina	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Toxina diluída (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Antitoxina padrão – 1UI.mL <sup>-1</sup> (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume total (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

As amostras diluídas acrescidas de 1,0mL de antitoxina padrão 1UI.mL<sup>-1</sup>, foram incubadas em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após esse tempo, inoculou-se 0,2mL de cada diluição, via endovenosa, em cinco camundongos. Os animais foram observados por um período de quatro dias.

#### 4.5.6.3.2 Segunda etapa

Ao término deste período o L+/10 e o L0/10 foram determinados e seguiu-se para a 2ª etapa. Nesta foram realizadas diluições a partir da diluição que matou todos os camundongos (L+/10) até a diluição em que todos os camundongos sobreviveram (L0/10). O intervalo das diluições foi de 33%, utilizando 3,76mL de toxina diluída e 1,24mL de salina 0,85%(p/V). Em seguida, a cada 1,0mL da solução diluída de toxina foi adicionado 1,0mL de antitoxina padrão específica. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37°C por 1 hora. Ao final da reação, inoculou-se 0,2mL, via endovenosa, em cinco camundongos por diluição. Os animais foram observados por

um período de quatro dias. O resultado da metodologia L+/10 foi obtido multiplicando o resultado da 1ª etapa pela 2ª etapa.

Para comprovar a morte devido à toxina botulínica tipo D, na análise das amostras coletadas ao final dos cultivos do microorganismo foi realizado um segundo tratamento. A partir da maior diluição que causou morte em 80% dos animais foi adicionado excesso de antitoxina a fim de neutralizar a toxicidade da amostra e, em seguida, foram injetados 0,2mL em dois camundongos por via endovenosa.

#### 4.5.6.3.3 Exemplo da aplicação

A Tabela 6 apresenta a interpretação da leitura do resultado do teste L+ após a primeira etapa.

**Tabela 6 - Leitura do resultado do teste L+. Primeira etapa do teste L+, com fator de diluição 10.**

<b>Diluições</b>	<b>Leitura</b>
10 <sup>-1</sup>	+ + + + +
10 <sup>-2</sup>	+ + + + +
10 <sup>-3</sup>	+ + + + +
10 <sup>-4</sup>	+ + + + +
10 <sup>-5</sup>	+ + + + +
10 <sup>-6</sup>	V V V V V

**+ = morte**

**V = vivo**

Na primeira etapa da L+ é determinado o intervalo da dose da toxina capaz de matar pelo menos 80% dos camundongos inoculados quando misturada com 0,1UI de antitoxina homóloga, ou seja, neste exemplo, o valor da toxina será de 10<sup>-5</sup>L+/10 em 0,1mL da toxina injetada no camundongo, uma vez que na diluição 10<sup>-5</sup> todos os camundongos morreram e na diluição seguinte todos os camundongos sobreviveram.

Na segunda etapa foram feitas diluições a partir da diluição  $10^{-5}$  que correspondia à diluição em que todos os animais morreram (**Tabela 7**). O intervalo entre as diluições foi de 33%.

**Tabela 7 - Segunda etapa do teste L+, com diluições do intervalo a partir da diluição em que todos os animais morreram até a diluição 1:176.890.**

Diluições	Leitura
1:133.000	+ + + + +
1:176.890	+ + + + +
1:235.264	V V V V V
1:312.901	V V V V V
1:416.158	V V V V V
1:553.490	V V V V V
1:736.142	V V V V V
1:979.142	V V V V V

+ = morte  
V = vivo

Nesta etapa o valor de L+ é determinado entre a diluição que matou 80% dos camundongos e a que não matou os camundongos inoculados, ou seja, neste exemplo, o valor da toxina será de 176890L+/10 em 0,1mL de toxina injetada no camundongo, uma vez que na diluição 1:176890 todos os camundongos morreram e na diluição seguinte todos os camundongos sobreviveram.

#### **4.5.6.4 TCP – Total Combining Power**

A qualidade antigênica do toxóide foi avaliada por TCP através da afinidade do antígeno pela antitoxina botulínica tipo D padrão (ELLIS *et al.* 1999; BRANDI, 2007). O teste envolve neutralização parcial de uma dose fixa da antitoxina com uma série de doses variantes do toxóide que está sendo testado. A antitoxina que não reage com o toxóide é então misturada com uma dose fixa de toxina equivalente à metade da dose de



O resultado do TCP será dado pela recíproca da maior diluição onde ocorreu morte de 100% dos camundongos inoculados multiplicado por 10.

#### **4.5.6.5 Imunização de cobaias e soroneutralização**

As cobaias da espécie *Cavia porcellus* albina pesando entre 350 a 450g foram imunizadas por via subcutânea com uma dose de 5,0mL no dia 0 e quando indicado no delineamento experimental, com uma dose de reforço aplicada após 21 dias da primovacinação. Foi mantido um grupo controle com 2 animais nas mesmas condições. Após a colheita por punção cardíaca, o sangue foi centrifugado e o soro coletado foi mantido congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente ser titulado pelo teste de soroneutralização em camundongos.

O ensaio de soroneutralização foi realizado utilizando toxina e antitoxina padrão fornecida pelo LANAGRO-MG. A toxina foi padronizada em nível de  $10\text{L}+/10\text{ mL}^{-1}$  e a antitoxina padrão em  $5\text{UI.mL}^{-1}$ . Foram realizadas as diluições do soro teste conforme detalhado na Tabela 10 (SECRETARIA..., 2002).

**Tabela 10 - Diluições do soro teste e antitoxina padrão utilizados na prova de soroneutralização.**

U.I. $\text{mL}^{-1}$	20	10	5	2	1
Antitoxina Padrão $5\text{UI.mL}^{-1}$ (mL)	0,5 (1/10)	1,0 (1/10)	0,2	0,5	1,0
Salina 0,85% (mL)	0,5	-	0,8	0,5	-
Toxina ( $10\text{ L}+/10\text{ mL}^{-1}$ ) (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

A primeira linha da Tabela 10 indica os valores de U.I. relativos a potência da toxina diluída. A segunda linha representa as quantidades de antitoxina padrão tomadas, a terceira linha apresenta os volumes de salina utilizada para diluições e na última encontram-se os volumes de toxina padrão utilizadas. As amostras foram colocadas a 37°C por 60min, em banho-maria, antes da inoculação. As amostras de soro teste foram tituladas em paralelo a prova de controle utilizando soro padrão diluído para obter os mesmos valores indicados na primeira linha da Tabela 10. Para cada mistura variando de 1UI.mL<sup>-1</sup> a 20UI.mL<sup>-1</sup>, foram inoculados 0,2mL via subcutânea em dois camundongos. Os animais foram observados por quatro dias. Considerou-se como título da prova a diluição onde ocorreu morte dos dois camundongos, desde que houvesse sobrevivência dos outros dois na diluição imediatamente menor. Quando ocorreu morte de um camundongo em uma diluição e sobrevivência dos dois camundongos na diluição imediatamente menor, o ensaio foi repetido. Nos casos em que o título da amostra foi maior que 20UI.mL<sup>-1</sup> foi preparada nova diluição entre 20 a 80UI.mL<sup>-1</sup> e procedeu-se a titulação conforme anteriormente descrito.

#### **4.5.7 Purificação da toxina botulínica**

Através do cálculo de rendimento e fator de purificação foi realizado o acompanhamento do processo de purificação nas etapas de clarificação, concentração, diafiltração e cromatografia. O cálculo do rendimento foi realizado pela equação 2 que representa a relação percentual entre toxicidade total da amostra de toxina na etapa em análise [toxicidade total atual (DL<sub>50</sub>)] pela toxicidade total obtida na etapa anterior do processo [toxicidade total anterior (DL<sub>50</sub>)]. Enquanto o fator de purificação (Equação 3) foi calculado pela relação entre a toxicidade da amostra de toxina na etapa em análise [toxicidade atual (DL<sub>50</sub>.mg<sup>-1</sup>)] pela toxicidade obtida na etapa anterior do processo [toxicidade anterior (DL<sub>50</sub>.mg<sup>-1</sup>)].

$$\text{Rendimento (\%)} = \left( \frac{\text{Toxicidade total atual (DL}_{50})}{\text{Toxicidade total anterior (DL}_{50})} \right) \times 100$$

(Equação 2)

$$\text{Fator de purificação} = \left( \frac{\text{Toxicidade atual (DL}_{50} \cdot \text{mg}^{-1})}{\text{Toxicidade anterior (DL}_{50} \cdot \text{mg}^{-1})} \right)$$

(Equação 3)

#### 4.6 Caracterização da quitosana

Com a finalidade de caracterizar e selecionar o material a ser utilizado no preparo das microesferas de quitosana, amostras fornecidas pela Sigma-Aldrich, Cognis (Hydagen® e Chitopharm®) e Polymar foram analisadas por métodos físico-químicos.

##### 4.6.1 Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica foi realizada para quitosana usando um peagômetro Mettler Toledo MP220 (Suíça) de acordo com o descrito na literatura (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; GUPTA; JABRAIL, 2006; RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993). O método baseia-se na dissolução da amostra de quitosana exatamente pesada em 60mL de solução de HCl 0,05M em um béquer de 100mL encamisado, mantido sob circulação de água a 25±1°C e agitação por no mínimo 12h. Sob temperatura de 25±1°C e utilizando eletrodo prata/cloreto de prata, registrou-se o pH em função do incremento do volume da solução titulante de NaOH 0,17M. As análises foram realizadas em triplicatas.

Os pontos de inflexão foram determinados graficamente pela segunda derivada, ( $\Delta^2E/\Delta V^2$ ) e o grau de desacetilação calculado conforme equação 4 proposta por Raymond; Morin; Marchessault (1993).

$$GD = \frac{161 \times M_{NaOH} \times Fc \times (V_2 - V_1)}{m}$$

(Equação 4)

Em que:

- GD é o grau de desacetilação (%);
- $M_{NaOH}$  é a molaridade da solução de hidróxido de sódio ( $\text{mol.L}^{-1}$ );
- Fc é o fator de correção da solução de hidróxido de sódio;
- $V_1$  e  $V_2$  são, respectivamente, os volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de quitosana protonada (mL), obtidos a partir das inflexões da curva de titulação potenciométrica;
- m é a massa da amostra (g) no estado seco tomada para titulação;
- 161 é a massa molar da unidade monomérica de quitosana.

#### **4.6.2 Espectrometria UV**

A fim de determinar a faixa de linearidade do método em função do material a ser analisado, primeiramente foi construída uma curva de calibração para cada um das amostras em análise. As concentrações de quitosana para amostras fornecidas pela Sigma-Aldrich e Cognis foram de  $11,0 \times 10^{-2}$ ,  $13,0 \times 10^{-2}$ ,  $15,0 \times 10^{-2}$ ,  $17,0 \times 10^{-2}$  e  $19,0 \times 10^{-2}$   $\text{mg.mL}^{-1}$ ; para amostra da Polymar foram de  $9,0 \times 10^{-2}$ ,  $10,0 \times 10^{-2}$ ,  $11,0 \times 10^{-2}$ ,  $12,0 \times 10^{-2}$  e  $13,0 \times 10^{-2}$   $\text{mg.mL}^{-1}$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Sob agitação magnética, dissolveu-se a amostra de quitosana, exatamente pesada, em 70mL de HCl 0,1M. Em seguida, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100mL e completou-se o volume com HCl 0,1M. Pipetou-se 2,5mL da solução e diluiu-se para 25mL utilizando HCl 0,1M. A leitura da amostra foi feita em espectrofotômetro Pharmacia LKB Biochrom, modelo Biochrom 4060 (Estados Unidos) a 201nm utilizando solução de HCl 0,1M como branco. Em seguida, calculou-se o grau de desacetilação (%GD) pela equação 5 proposta por Liu *et al.* (2006).

$$GD = 100 \times \left( \frac{161,1 \times A \times V - 0,0218 \times m}{3,3615 \times m - 42,1 \times A \times V} \right)$$

(Equação 5)

Em que GD é o grau de desacetilação (%); A é a absorvância a 201nm; V é o volume da solução (L) e m é a massa (mg) de quitosana em base seca.

#### **4.6.3 Espectroscopia de Infravermelho (IV)**

As amostras de quitosana foram analisadas em triplicata por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier em equipamento Bomem MB100 detector DTGS (Alemanha) usando discos de KBr contendo 1mg de amostra. Os espectros foram obtidos na região de 4000 a 400cm<sup>-1</sup>, fazendo-se 64 varreduras com resolução de 4cm<sup>-1</sup>. A partir destes espectros, as bandas foram interpretadas em relação aos principais grupos químicos. O cálculo do grau de desacetilação (GD) (equação 6) foi realizado através da razão entre a absorvância das bandas a 1320cm<sup>-1</sup> e 1420cm<sup>-1</sup> atribuídas

respectivamente aos grupamentos N-acetilglucosamina e glucosamina (BRUGNEROTO *et al.*, 2001b).

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0,3822 + 0,03133 \times (100 - GD)$$

(Equação 6)

Em que,  $A_{1320}$  = absorvância a  $1320 \text{ cm}^{-1}$ ;  $A_{1420}$  = absorvância a  $1420 \text{ cm}^{-1}$  e GD é o grau de desacetilação (%).

#### **4.6.4 Ressonância magnética nuclear de prótons - RMN $^1\text{H}$**

O método foi modificado a partir do procedimento desenvolvido por Lavertu *et al.* (2003). Em resumo, em um frasco de vidro, aproximadamente 10mg da amostra de quitosana foram solubilizados em solução de 1,96mL de  $\text{D}_2\text{O}$  e cerca de 40 $\mu\text{L}$  de DCI (35% p/p). Em seguida, a solução foi liofilizada. No momento da análise, o material foi dissolvido novamente na mesma mistura de solventes e mantido em repouso por cerca de 3h. Os espectros de prótons das amostras foram registrados em equipamento Bruker DRX 500 a 500 MHz, a temperatura de 70°C com 128 varreduras com intervalo de pulso de 5,18s. O solvente ( $\text{D}_2\text{O}$ ) foi utilizado como padrão interno.

Para avaliação do efeito da temperatura na resolução dos sinais, foram feitos espectros comparativos em temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C utilizando amostra Sigma-Aldrich. Em seguida, sob temperatura de 35°C, foi realizada a análise das amostras de quitosana dos três fornecedores.

O GD foi calculado usando as integrais do sinal do próton H1 do monômero desacetilado (H1D) e do sinal devido aos três prótons do grupo acetil (HAc) de acordo com a equação 7 (HEUX *et al.*, 2000; LAVERTU *et al.*, 2003).

$$GD = \left( \frac{H1D}{H1D + HAc/3} \right) \times 100$$

(Equação 7)

#### **4.6.5 Calorimetria exploratória diferencial – DSC**

Os eventos térmicos foram registrados em função da composição, estrutura do material e de sua história térmica. Para isso, as amostras foram caracterizadas em um calorímetro DSC50 da Shimadzu (Japão) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na vazão de 50mL.min<sup>-1</sup>. Foram pesados cerca de 5mg da amostra de quitosana que foram submetidos a uma primeira corrida, entre 25 a 110°C com razão de aquecimento de 15°C.min<sup>-1</sup>, a fim de apagar a memória térmica. Em seguida, a amostra foi pesada novamente (aproximadamente 3mg) e a segunda corrida foi feita em uma razão de 5°C.min<sup>-1</sup> entre 25 a 400°C. O ensaio foi repetido com novas amostras utilizando razões de aquecimento de 10 e 20°C.min<sup>-1</sup>. Todos os ensaios foram feitos em duplicatas.

#### **4.6.6 Termogravimetria – TG**

As amostras de quitosana de aproximadamente 5mg foram pesadas e avaliadas quanto a estabilidade térmica e comportamento em um analisador termogravimétrico DTG60 da Shimadzu (Japão), no intervalo de temperatura de 25 a 750°C sob atmosfera dinâmica

de nitrogênio na vazão de 50mL.min<sup>-1</sup>, usando uma taxa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>. Os ensaios foram feitos em duplicatas.

#### **4.6.7 Perda por dessecação**

Cerca de 1,0g, exatamente pesado, em triplicata, de cada uma das amostras de quitosana foi dessecado em estufa à vácuo Binder (Alemanha) a 100-105°C até peso constante (EUROPEAN ..., 2004).

O teor de umidade foi calculado de acordo com a equação 8:

$$\mathbf{Umidade} (\% m/m) = \left( \frac{\Delta m}{m_i} \right) \times 100$$

(Equação 8)

Em que:  $\Delta m$  é a diferença entre a massa inicial e final (g);

$m_i$  é a massa inicial da amostra (g).

#### **4.6.8 Acidez ou alcalinidade**

Foi disperso 1,0g da amostra em 100mL de água e agitou-se mecanicamente, de forma vigorosa, por 20 minutos. Em seguida, mediu-se o pH em peagômetro Mettler Toledo MP220 (Suíça) (EUROPEAN ..., 2004).

#### **4.6.9 Determinação de proteína**

A partir de uma solução de concentração de  $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de quitosana foi quantificado o resíduo de proteína pelo método micrométrico de Lowry conforme descrito no item 4.5.5.2. A análise foi realizada em duplicata para as três amostras de quitosana.

#### **4.6.10 Metais pesados**

Foi pesado exatamente cerca de 1,0g de cada amostra de quitosana, em triplicata e transferido para um béquer. Foi adicionado volume suficiente de uma mistura de 8mL de ácido sulfúrico e 10mL de ácido nítrico para umedecer a amostra. Aqueceu-se brandamente para início da reação. Em seguida, sob aquecimento a cada etapa, foram adicionadas pequenas porções da mistura de ácidos até que 18mL da mistura tivessem sido adicionados. A solução foi resfriada e mais 2mL de ácido nítrico foram adicionados. E, novamente, a solução foi aquecida até observar-se o escurecimento. Continuou-se o aquecimento, seguido da adição de ácido nítrico, até que não mais se observasse o escurecimento da solução. Em seguida, foram adicionados 5mL de água purificada e aqueceu-se solução até ebulição e desprendimento de densa fumaça branca. O aquecimento foi mantido para reduzir o volume para 2 a 3mL. A amostra foi resfriada e adicionou-se cuidadosamente 5mL de água e 1mL solução de peróxido de hidrogênio 30%(V/V). Novamente evaporou-se até formação de densa fumaça branca e redução do volume para 2 a 3mL. A solução foi resfriada e transferida tubo de Nessler, de maneira que o volume após a transferência não ultrapassasse 25mL. Ajustou-se o pH da solução para 3 a 4, utilizando amônia concentrada e fita indicadora de pH para verificação. A solução foi diluída com água purificada para 40mL e adicionou-se 2mL de solução tampão pH 3,5 e 1,2mL de solução tiocetamida ( $40\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Completou-se o volume para 50mL e a solução foi homogeneizada.

A solução tampão pH 3,5 foi obtida pela dissolução de 25,0g de acetato de amônio em 25mL de água e adição de 38mL de ácido clorídrico. O ajuste do pH foi realizado pela

adição de ácido clorídrico ou amônia diluída. Em seguida, a solução foi transferida para balão volumétrico de 100mL e o volume completado com água.

A solução referência (40ppm) foi preparada em paralelo, da mesma maneira descrita para preparo da solução teste, utilizando volume de solução padrão de chumbo 10ppm.

Após 2min de repouso, ambos os tubos foram examinados verticalmente contra fundo branco. A coloração da solução teste não deve ser mais intensa que a coloração da solução referência para passar no teste (EUROPEAN ..., 2004).

#### **4.6.11 Cinzas sulfatadas**

Os cadinhos de alumínio foram aquecidos a  $600\pm 50^{\circ}\text{C}$  por 30min em forno mufla Analógica AV 1232 (Brasil). Após resfriamento em dessecador, pesou-se exatamente cerca de 1,0g de cada quitosana, em triplicata. Foi adicionado sobre o material 1mL de ácido sulfúrico e aqueceu-se lentamente até que a amostra estivesse carbonizada. Adicionou-se mais 1mL de ácido sulfúrico e aqueceu-se até não mais liberar fumaça branca. Em seguida, levou-se a incineração a  $600\pm 50^{\circ}\text{C}$  tendo o cuidado de não inflamar até o final do processo. Os resíduos foram resfriados e pesados. Foi adicionado novamente mais 1mL de ácido sulfúrico e incinerou-se conforme descrito por 30min até que duas pesagens consecutivas não diferissem em 0,5mg (EUROPEAN ..., 2004). As cinzas sulfatadas foram calculadas conforme a equação 9.

$$\text{Cinzas sulfatadas } (\% m/m) = \left( \frac{\Delta m}{m} \right) \times 100$$

(Equação 9)

Em que:  $\Delta m$  é a diferença entre a massa inicial e final (g)

$m$  é a massa inicial da amostra (g)

#### **4.6.12 Cromatografia em Permeação em Gel avançado (GPC avançado)**

A análise foi realizada utilizando o sistema GPC Avançado, GPC Max – VE2001 da Viscotek (EUA) composto por bomba Waters modelo 515, desgaseificador Viscotek modelo VE7510, injetor Rheodyne modelo 7715i e detectores Viscotek modelo TDA302 que contém: refratômetro (RI), triplo viscosímetro, *light scattering* 90° e *light scattering* 7° e o software Viscotek OmniSEC V. 4.1.0.224. Os detectores foram calibrados utilizando padrões de PEO (polioxido de etileno, Polyanalytik, lote PP4794-EG2OH) e padrão de quitosana ( $M_w$  160.800g.mol<sup>-1</sup>) da American Polymer. Para separação dos componentes das amostras foram utilizadas duas colunas Ultrahydrogel Linear (7,8 x 300mm) da Waters em temperatura de 40°C, tampão de ácido acético 0,5M/acetato de sódio 0,2M, fluxo de 0,8mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 199μL. As amostras de quitosana foram preparadas na concentração de 1mg/mL em tampão de ácido acético 0,5M/acetato de sódio 0,2M, pH 4. Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana PVDF 0,45μm (Durapore, Millipore) antes da injeção no cromatógrafo. Foi utilizada como fase móvel o tampão de ácido acético 0,5M e acetato de sódio 0,2M, pH 4, filtrado em membrana PVDF 0,45μm (Durapore, Millipore) e desgaseificado.

Por esta técnica, emprega-se um detector de índice de refração e viscosidade para fornecer informações como concentração do polímero e detectores de espalhamento de luz para obtenção de informações da massa molar da amostra.

Conforme Akcelrud (2007), como os polímeros são uma mistura de moléculas com variadas massas molares, deve-se utilizar a massa molar média dos polímeros para caracterização:

- Massa molar numérica média

$$\mathbf{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}$$

(Equação 10)

Em que,  $n_i$  é o número de macromoléculas em cada fração;  $M_i$  é a massa molar de cada fração.

- Massa molar mássica ou ponderal média:

$$\mathbf{M}_w = \frac{\sum w_i M_i}{\sum w_i}$$

(Equação 11)

Em que,  $w_i$  é a fração mássica da fração  $i$ ;  $M_i$  é a massa molar de cada fração.

- Massa molar z médio:

$$\mathbf{M}_z = \frac{\sum w_i (M_i)^2}{\sum w_i M_i}$$

(Equação 12)

Em que,  $w_i$  é a fração mássica de cada fração;  $M_i$  é a massa molar de cada fração.

Para polímeros monodispersos, as três massas molares são as mesmas, mas para um polímero polidisperso a razão  $M_w/M_n$  corresponde ao valor de  $Q$  e a razão  $M_z/M_w$  ao valor de  $Q'$ , sendo que  $Q$  e  $Q'$  são medidas da polidispersão.

## **4.7 Preparo de micropartículas de quitosana**

Salvo quando especificado, os experimentos foram realizados utilizando quitosana Chitopharm®.

### **4.7.1 Curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio**

Em 90mL de uma solução de quitosana 0,25%(p/V) contendo 1,0%(p/V) de Lutrol F 127 com pH ajustado para 3,0, 5,0 ou 6,0 com ácido acético, foram adicionados volumes crescentes de uma solução de sulfato de sódio 20%(p/V) a um fluxo de 1,5mL.min<sup>-1</sup>. Completou-se o volume para 100mL e, em seguida, realizou-se a leitura das amostras no comprimento de onda de 500nm em espectrofotômetro Pharmacia Biotech 4300pro (Pharmacia, Inglaterra). Os dados obtidos foram plotados em um gráfico relacionando-se o volume de solução de sulfato de sódio e a absorvância lida. As amostras também foram avaliadas utilizando microscópio óptico Olympus BX40 (Estados Unidos).

### **4.7.2 Preparo das micropartículas carregadas**

Preparou-se 100mL de uma suspensão de micropartículas contendo quitosana a 0,25%(p/V) em quantidade suficiente de solução de ácido acético para solubilização (pH 5,0). Sobre 90mL da solução de quitosana, foram adicionados 2,0mL de solução contendo 2,47mg.mL<sup>-1</sup> de albumina de soro bovino (BSA) e gotejados 2,0mL da solução de sulfato de sódio 20%(p/V) a um fluxo de 1,5mL.min<sup>-1</sup>, sob agitação a 100RPM. Em seguida, o volume foi completado para 100mL e a suspensão foi centrifugada a 3800g por 10min em centrífuga Cientec CT 600 (Brasil). O sobrenadante foi coletado e as partículas foram lavadas com água para retirada da proteína não encapsulada e

centrifugadas novamente. As frações sobrenadantes foram reunidas para determinação da concentração de BSA pelo método de Lowry.

Em outro experimento, seguiu-se o procedimento acima descrito substituindo o BSA por 3,3mg do toxóide botulínico tipo D. A suspensão foi centrifugada a 3800g por 10min e o sobrenadante foi analisado pelo método micrométrico de Lowry com precipitação com reagente fenólico. A fim de evitar perdas de proteínas associadas à superfície das partículas não foi feita lavagem do *pellet*.

O percentual de encapsulamento foi calculado pela equação 13.

$$\text{Taxa Encapsulamento (\%)} = \frac{(Q_t - Q_s) \times 100}{Q_t}$$

(Equação 13)

Em que,  $Q_t$  é a quantidade de proteína teórica e  $Q_s$  é a quantidade de proteína no sobrenadante.

#### **4.7.3 Estudo do processo de preparação de micropartículas**

A ampliação do estudo de pré-formulação das micropartículas de quitosana foi realizada em três etapas a fim de se avaliar os principais parâmetros que poderiam influenciar a formação das micropartículas e a distribuição granulométrica. Não foi possível definir a taxa de encapsulamento porque o Lutrol F 127 interfere na técnica de quantificação de proteína pelo método micrométrico de Lowry.

No primeiro delineamento foram caracterizadas as micropartículas brancas, micropartículas brancas com Lutrol F 127 e micropartículas carregadas com toxóide

botulínico tipo D contendo Lutrol F 127 obtidas em função do volume adicionado de solução de sulfato de sódio 20%(p/V) (**Tabela 11**).

**Tabela 11 - Obtenção de micropartículas brancas, micropartículas brancas com Lutrol F 127 e micropartículas carregadas com toxóide e contendo Lutrol F 127 em função do volume adicionado de solução de sulfato de sódio 20%(p/V).**

Volume adicionado de solução de sulfato de sódio 20%(p/V) (mL)					
Micropartículas brancas			Micropartículas brancas com Lutrol F 127		Micropartículas com toxóide
0,1	1,3	2,5	0,4		0,4
0,3	1,5		0,7		0,7
0,5	1,7		1,1		1,1
0,7	1,9		1,5		1,5
0,9	2,1		1,9		1,9
1,1	2,3		2,3		2,3

Seguindo o procedimento padrão do item 4.7.2, com adição de solução de toxóide ou de salina, alteraram-se as quantidades de solução de sulfato de sódio em presença ou não de Lutrol F 127. As suspensões obtidas foram analisadas por espectrofotometria a 500nm, potencial Zeta e tamanho médio de partículas em equipamento Zetasizer 1000HS/3000HS quando o diâmetro médio obtido foi menor que 3000nm. Para amostras com tamanho médio de partículas maiores que 3000nm, utilizou-se o método de difração de raios laser em equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra). As análises foram realizadas em triplicata.

O segundo delinamento objetivou a avaliação da distribuição granulométrica e da absorvância em função da variação da velocidade de agitação durante o preparo ou do fluxo de adição da solução coagulante (**Tabela 12**). Inicialmente foram preparadas

solução estoque dos componentes: solução de quitosana 0,348%(p/V) em solução ácida de ácido acético 5%(V/V), solução de BSA 0,2%(p/V), solução de Lutrol F127 6,25%(p/V) e solução de sulfato de sódio 20%(p/V). Todas as soluções foram clarificadas através de filtração em membrana de microfibras de vidro AP 15. Adicionaram-se 179,5mL da solução estoque de quitosana, 15mL da solução estoque de BSA e 40mL da solução estoque de Lutrol F 127 ou de água purificada em um béquer de 400mL e misturou-se utilizando agitador mecânico Ika RW20DZM.n acoplado a uma hélice tipo naval 47mm. Adicionou-se 5,0mL de sulfato de sódio 20%(p/V) com o auxílio de uma bomba peristáltica. Foram feitas variações na velocidade de agitação ou na vazão da bomba peristáltica dentro dos limites de utilização dos equipamentos. Após 15min de agitação, adicionou-se 0,1%(p/V) de azida sódica e completou-se o volume para 250mL com salina. Alíquotas foram coletadas para leitura espectrofotométrica a 500nm (n=3) e medida da distribuição granulométrica por difração de raios laser (n=5).

**Tabela 12 - Estudo da influência da velocidade de agitação, do fluxo de adição de solução de sulfato de sódio 20%(p/V) e da massa molar de quitosana em presença ou não de Lutrol F 127 nas características das micropartículas carregadas com BSA.**

Parâmetro	Variável	Lutrol F 127
Velocidade de agitação (RPM)	100	+
	200	+
	300	+
	400	+
	500	+
	100	-
	200	-
	300	-
	400	-
	500	-

	0,5	+
	1,0	+
	1,5	+
	2,0	+
Fluxo de adição do sulfato de sódio	2,5	+
%(p/V) (mL.min <sup>-1</sup> )	0,5	-
	1,0	-
	1,5	-
	2,0	-
	2,5	-
	Hydagen®	+
Polímero	Sigma-Aldrich	+
	Hydagen®	-
	Sigma-Aldrich	-

(+) = adição de Lutrol F 127;

(-) = sem adição de Lutrol F 127

No terceiro delineamento foi alterada a marca comercial de quitosana (**Tabela 12**). A partir das soluções estoque acima descritas, adicionaram-se 179,5mL da solução estoque de quitosana, 15mL da solução estoque de BSA e 40mL da solução estoque de Lutrol F 127 ou de água purificada em um béquer de 400mL e misturou-se utilizando agitador mecânico Ika RW20DZM.n acoplado a uma hélice tipo naval 47mm. Sob agitação de 100RPM, foram gotejados 5,0mL de sulfato de sódio 20%(p/V) utilizando uma bomba peristáltica com vazão de 1,5mL.min<sup>-1</sup>. Após 15min de agitação, adicionou-se 0,1%(p/V) de azida sódica e completou-se o volume para 250mL. Alíquotas foram coletadas para leitura espectrofotométrica a 500nm (n=3) e medida da distribuição granulométrica por difração de raios laser (n=5).

Os dados foram submetidos ao Teste de Bartlett's e ao Teste de Kolmogorov & Smirnov para verificar homogeneidade de variância e normalidade, respectivamente. Em seguida,

as médias intragrupo foram comparadas entre si pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. A comparação entre médias dos experimentos com e sem adição de Lutrol F 127 foram analisadas pelo Teste T, de Student. O nível de significância adotado para ambos os testes foi de 5%. As análises foram efetuadas empregando-se o programa PASW Statistics 18 (2009).

#### **4.7.4 Caracterização das micropartículas de quitosana**

##### **4.7.4.1 Distribuição granulométrica das micropartículas**

As distribuições granulométricas das micropartículas de quitosana obtidas neste trabalho foram analisadas por difração a laser em aparelho Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra). Sob agitação, quantidade suficiente de micropartículas foram dispersas em água deionizada até atingirem o índice de obscuração requisitado pelo aparelho e analisadas na faixa de 0,020 - 2000 $\mu$ m.

Foram determinados os diâmetros médios e os diâmetros das partículas correspondentes a 90, 50 e 10% da distribuição acumulada, ou seja, os parâmetros  $D_{90}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{10}$ . A partir desses, foi calculado o índice de polidispersidade, span, pela equação 14.

$$\text{Índice span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$

(Equação 14)

##### **4.7.4.2 Forma e morfologia da superfície das micropartículas**

A análise morfológica das micropartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando Microscópio Eletrônico Zeiss de Varredura DSM-950 (Zeiss, Alemanha). Para montagem das amostras foram usadas lamínulas cortadas em um quarto do seu tamanho original. Sobre a lamínula foi gotejada a suspensão das micropartículas que, em seguida, foram colocadas em dessecador por 72 h.

Posteriormente, as lamínulas preparadas foram coladas no suporte para o microscópio por meio de uma fita adesiva de carbono de dupla face. As amostras montadas foram recobertas com uma camada de ouro de 2nm (metalização) e, em seguida, examinadas no microscópio eletrônico de varredura. Foram obtidas imagens das micropartículas em aumentos de 3.000, 5.000 e 10.000 vezes. As imagens foram ajustadas utilizando o programa Microsoft® Office Picture Manager (Microsoft Corporation, 2006, Estados Unidos).

#### **4.7.4.3 Determinação da concentração de proteína encapsulada por análise elementar**

A quantidade de proteína encapsulada foi determinada por análise elementar do sobrenadante da suspensão de micropartículas, uma vez que ocorreu interferência do Lutrol F 127 quando se utilizou os métodos de Bradford ou micro Lowry. O percentual de CHN foi determinado através da análise orgânica clássica pela técnica de Pregl-Dumas utilizando o analisador Elemental Analyser 2400 CHN (Perkin Elmer, Estados Unidos) onde ocorreu uma combustão, em presença de oxigênio puro, a 925°C. Os gases formados ( $C \rightarrow CO_2$ ,  $H \rightarrow H_2O$  e  $N \rightarrow N_2$ ) foram arrastados pelo gás hélio e separados por uma coluna cromatográfica, para posterior quantificação através de Detector de Condutividade Térmica (TCD).

#### **4.7.4.4 Potencial zeta**

O potencial da superfície das partículas foi determinado através da análise de potencial zeta em equipamento ZetaSizer 2000/3000 (Marlvern Instruments, Estados Unidos). A dispersão das microesferas de quitosana para as medidas de potencial zeta foi realizada em solução de NaCl 1mM e cada amostra foi medida 3 vezes.

## **4.8 Obtenção de vacinas**

### **4.8.1 Destoxificação da toxina botulínica**

A destoxificação dos lotes 01 e 02 de toxina botulínica tipo D foi realizada separadamente, conforme se segue. A amostra de toxina foi transferida para tubos de diálise de corte molecular 12kDa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e dialisada contra volume 20 vezes maior de tampão fosfato de sódio 50mM, pH 6,0, contendo 0,6%(V/V) de formol. A diálise foi realizada a 37°C por 10 dias trocando-se o tampão diariamente (MAHMUT *et al.*, 2002; BALDWIN *et al.*, 2008). Em seguida, as amostras de toxóide foram esterilizadas por filtração em membrana PVDF 0,22µm e armazenadas sob refrigeração. Duas alíquotas foram enviadas para teste de toxicidade e TCP.

### **4.8.2 Estudo de estabilidade do toxóide botulínico tipo D**

Alíquotas de toxóide botulínico tipo D dos lotes 01 e 02 foram armazenadas sob refrigeração por 4 meses. A estabilidade do toxóide foi determinada por teste de TCP.

### **4.8.3 Produção de vacinas contra botulismo tipo D**

#### **4.8.3.1 Preparação da vacina de micropartículas de quitosana**

Foram dissolvidos o equivalente a 0,25%(p/V) de quitosana Chitopharm® em uma solução aquosa contendo 1,0%(p/V) de Lutrol F 127 e quantidade suficiente de solução de ácido acético 5%(V/V) para obter pH 5,0 sob condições assépticas. A solução foi filtrada em membrana PVDF 0,22 $\mu$ m e colocada em banho de gelo, a fim de manter a temperatura entre 4 a 8°C. Foram gotejados sobre aproximadamente 97mL da solução de quitosana, contendo quantidade de toxóide botulínico estéril equivalente a 75.000DL<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup>, 2,0%(V/V) da solução de sulfato de sódio 20%(p/V) a um fluxo de 1,5mL.min<sup>-1</sup>, sob agitação constante de 100RPM. O volume final foi completado para 150mL com solução salina estéril 0,85%(p/V). A vacina foi envasada em frascos de vidro de 30mL e armazenada sob refrigeração.

#### **4.8.3.2 Preparação da vacina de micropartículas de quitosana em gel**

Foram dissolvidos o equivalente a 0,25%(p/V) de quitosana Chitopharm® em uma solução aquosa contendo 1,0%(p/V) de Lutrol F 127 e quantidade suficiente de solução de ácido acético 5%(V/V) para obter pH 5,0 sob condições assépticas. A solução foi filtrada em membrana PVDF 0,22 $\mu$ m e colocada em banho de gelo. Foram gotejados sobre aproximadamente 97mL da solução de quitosana, contendo quantidade de toxóide botulínico estéril equivalente a 10.000, 50.000 ou 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>, 2,0%(V/V) da solução de sulfato de sódio 20%(p/V) a um fluxo de 1,5mL.min<sup>-1</sup>, sob agitação constante de 100RPM. O volume final foi completado para 150mL com gel de quitosana 0,25%(p/V) estéril. A vacina foi envasada em frascos de vidro de 30mL e armazenada sob refrigeração.

#### **4.8.3.3 Preparação da vacina gelificada**

Foram dissolvidos o equivalente a 1,0%(p/V) de quitosana Chitopharm® em fase aquosa contendo quantidade suficiente de ácido acético 5%(V/V) para obter pH entre 4,0 e 5,0. A solução foi filtrada em membrana PVDF 0,22µm sob condições assépticas. Em seguida, foram tomados 25mL da preparação estéril para um béquer de 250mL e o pH foi ajustado para pH 6,0 a 6,5 utilizando solução estéril de hidróxido de sódio 0,17M. Em banho de gelo, adicionou-se volume do toxóide equivalente a 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> e manteve-se sob agitação por pelo menos 20min. Adicionou-se quantidade suficiente de solução de hidróxido de sódio 0,17M para se obter pH em torno de 6,8 a 7,2. Completou-se o volume com salina 0,85% (p/V) e homogeneizou-se.

#### **4.8.3.4 Preparação da vacina contendo hidróxido de alumínio**

Sob condições assépticas, adicionou-se em 50%(V/V) de salina estéril 0,85%(p/V) e volume equivalente a 25%(V/V) do volume final de gel de hidróxido alumínio (Vallée, lote 010/10). Após homogeneização, em banho de gelo, adicionou-se volume de toxóide estéril equivalente a 10.000, 50.000 ou 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>. Manteve-se a suspensão sob agitação a 100RPM por cerca de 30min. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,8 a 7,2 utilizando solução de hidróxido de sódio 0,17M. O volume final foi ajustado com salina 0,85%(p/V) e homogeneizou-se.

#### **4.8.4 Avaliação da eficácia das vacinas em cobaias**

O delineamento experimental foi dividido em três etapas: avaliação da dose-resposta em relação à quantidade de toxóide botulínico tipo D por dose de vacina, comparação de diferentes formulações e estabilidade e proteção das vacinas adjuvantadas com

quitosana. Os títulos de anticorpos contra toxina botulínica tipo D foram determinados por teste soroneutralização em amostras de *pool* ou soros individuais. Em todos os experimentos, durante o período de teste, os animais foram observados quanto à reação local.

No primeiro experimento, os animais foram separados aleatoriamente em 9 grupos de 12 cobaias, machos e fêmeas, pesando entre 350 a 450g. As vacinas foram formuladas com toxóide lote 01 e todos os grupos foram vacinados com 5,0mL por via subcutânea (**Tabela 13**). Os animais dos grupos H1a, H2a e H3a receberam dose de vacina formulada com gel de hidróxido de alumínio contendo quantidade de toxóide equivalente a 10.000, 50.000 e 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>, respectivamente, nos dias 0 e 21. Os animais dos grupos H1b, H2b e H3b receberam dose de vacina formulada com gel de hidróxido de alumínio contendo quantidade de toxóide equivalente a 10.000, 50.000 e 75.000DL<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, somente no dia 0. Os animais dos grupos Q1, Q2 e Q3 receberam dose de vacina formulada com micropartículas de quitosana em gel contendo quantidade de toxóide equivalente a 10.000, 50.000 e 75.000DL<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, somente no dia 0. O sangue de 06 cobaias, por grupo, foi coletado nos dias 21, 42, 63, 84, 105, 126 e 161. Nos casos em que no 42º dia o título de anticorpos se manteve abaixo de 2UI.mL<sup>-1</sup> interrompeu-se a coleta de sangue do grupo. As análises do *pool* de soros foram feitas em duplicata. Quando havia soro em quantidade suficiente, foi realizada a análise individual.

No segundo experimento os animais receberam por via subcutânea 5,0mL da vacina contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D lote 02 equivalente a 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> e compararam-se diferentes formulações de vacinas (**Tabela 14**). Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 12 cobaias, machos e fêmeas, pesando entre 350 a 450g. Os animais do grupo Ha' receberam dose de vacina formulada com gel de hidróxido de alumínio nos dias 0 e 21. Os animais dos grupos Q, G e M receberam dose de vacina preparada com micropartículas de quitosana em gel, gel de quitosana e micropartículas, respectivamente, somente no dia 0. O sangue de 6 a 9 cobaias, por grupo, foi coletado nos dias 21, 63, 84, 105, 126, 147 e 168. No dia 42 foi analisado *pool*

de soro de 12 animais (n=2). Quando havia soro em quantidade suficiente, foi realizada a análise individual.

**Tabela 13 – Primeiro esquema de imunização via subcutânea e sangria de cobaias para avaliação da formação de anticorpos contra toxina botulínica tipo D de vacinas adjuvantadas com hidróxido de alumínio (H1a, H2a, H3a, H1b, H2b e H3b) ou micropartículas de quitosana em gel (Q1, Q2 e Q3). Os grupos H1a, H2a e H3a com adjuvante hidróxido de alumínio receberam duas doses (dias 0 e 21) e os demais grupos apenas uma dose no dia inicial. As vacinas continham quantidade de toxóide botulínico tipo D (lote 01) equivalente a 10.000 (H1a, H1b, Q1), 50.000 (H2a, H2b, Q2) e 75.000 DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> (H3a, H3b e Q3).**

Grupo	Atividade/dia		
	Vacinação	Reforço	Sangria
H1a, H2a, H3a	0	21	21, 42, 63, 84, 105, 126, 147 e 161
H1b, H2b, H3b		não	
Q1, Q2, Q3		não	

As análises estatísticas dos resultados obtidos do primeiro e do segundo delineamento experimental foram efetuadas empregando-se o programa GraphPad InStat, versão 3.05 (2000). Primeiramente, os dados foram submetidos ao Teste de Bartlett's e ao Teste de Kolmogorov & Smirnov para verificar homogeneidade de variância e normalidade, respectivamente. Quando os dados atenderam as premissas de homogeneidade de variância e normalidade, foram considerados paramétricos, realizando-se a análise de variância, e quando significativo, o Teste T de Student. O nível de significância adotado foi de 5%. Quando os dados não atenderam as premissas de homogeneidade de variância e normalidade, foram considerados não paramétricos, realizando-se o Teste de Mann Whitney para comparação entre pares; Kruskal Wallis para a comparação entre medianas, e quando significativo, o teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

No terceiro experimento, os animais receberam uma única dose de 5,0mL, por via subcutânea, da vacina contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D lote 02 equivalente a 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 12 cobaias, machos e fêmeas, pesando entre 350 a 450g. A vacinas G e Q foram avaliadas após 4 meses de fabricação e as vacinas G' e Q' eram recém-preparadas. Os

animais dos grupos Q, Q', G e G' receberam dose de vacina formulada com micropartículas de quitosana em gel e gel de quitosana, respectivamente, somente no dia 0. O sangue de 12 cobaias de cada grupo foi coletado no dia 42 (SECRETARIA..., 2002). Em seguida, as cobaias foram divididas em 5 grupos de 4 animais imunizados. Sendo que, por grupo, foram mantidos 2 animais vacinados com G' e dois vacinados com Q'. Os grupos 1, 2, 3, 4 e 5 receberam dose de toxina botulínica tipo D, fornecida pelo LANAGRO-MG e diluída em salina 0,85%(p/V), equivalente a 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> DL<sub>50</sub>. Como testemunhas, dois animais não vacinados receberam dose de 10 DL<sub>50</sub>. Os animais foram observados por 14 dias.

**Tabela 14 - Esquema de imunização e sangria de cobaias para experimento de comparação da cinética de formação de anticorpos contra toxina botulínica tipo D em resposta a tratamentos com e sem dose de reforço, utilizando quantidade de toxóide lote 02 equivalente a 75.000DL<sub>50</sub>mL<sup>-1</sup>, variando-se formulações de vacinas utilizando adjuvante hidróxido de alumínio (Ha'), micropartículas de quitosana em gel (Q), gel de quitosana (G) e micropartículas de quitosana (M).**

Atividade	Grupo/dia		
	Vacinação	Reforço	Sangria
Ha'	0	21	21, 42, 63, 84, 105, 126, 147 e
Q, G, M		não	161 NR

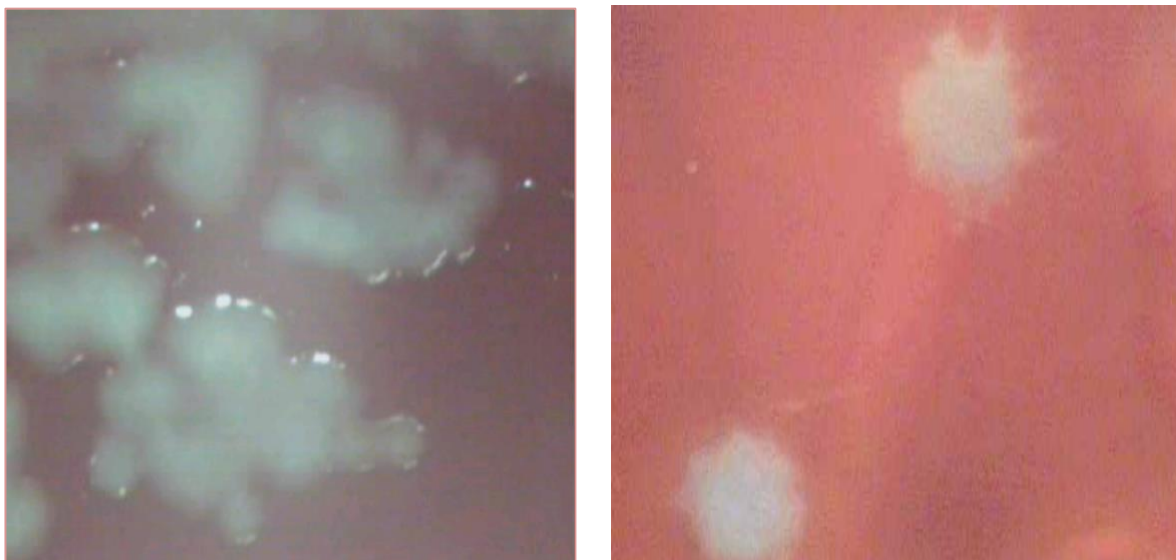
## CAPÍTULO 5

---

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Tipificação e cultivo da bactéria *Clostridium botulinum* tipo D

Na etapa de tipificação, as placas incubadas durante 48h a 37°C apresentaram colônias com morfologia homogênea e características similares a descrita por Mozzer (2004), com bordas irregulares e aspectos de rugosidade característicos da cultura de *C. botulinum* tipo D. Assim como para outras estirpes dos grupos I, II e III, forma-se uma fina margem de hemólise em torno das colônias (**Figura 7**).



**Figura 7 - Colônias de *C. botulinum* tipo D cultivadas em placas contendo meio PGYA observadas em estereomicroscópio. Aumento de 15X.**

A Figura 8 apresenta lâmina de células de *C. botulinum* tipo D após 3h de cultivo, observada ao microscópio com aumento de 1000 vezes. Conforme mostra a figura, as células na fase exponencial do cultivo apresentam-se como bastonetes grandes, Gram +, com coloração intensa (HATHEWAY; JOHNSON, 1998; JOHNSON; BRADSHAW, 2001). Rocke (1993) descreve este microorganismo pertencente à família Bacillaceae, como bastonetes móveis retos ou levemente curvos, de 0,5 a 2,0 $\mu$ m de largura e de 1,6 a 22 $\mu$ m de comprimento, com flagelos peritricos.



**Figura 8 - Células típicas de *C. botulinum* tipo D em fase exponencial, coradas pela técnica de Gram, observadas ao microscópio óptico. Aumento de 1000X.**

De acordo com Smith; Sugiyama (1977, *apud* FERREIRA, 2002), a temperatura para crescimento de *C. botulinum* tipos C e D é bastante ampla, sendo que a condição ótima é a 40°C, embora diversas estirpes cresçam bem entre 37°C e 45°C. O crescimento da bactéria a 25°C não é favorável e esta praticamente não cresce a 10°C. Quanto ao pH, o limitante para cepas isoladas do solo é de 5,6.

Gessler; Böhnelt (1999) e Gessler; Hampe; Böhnelt (2005) cultivaram *C. botulinum* tipo C e D em fermentador a 37°C por 4 dias em pH 6,8. Neste trabalho, foram seguidas as condições adotadas por Mozzer (2004). Mas, mantendo o cultivo por aproximadamente 4 dias sob agitação constante a 150 RPM, pH controlado em 6,5 através da adição automática de solução de NaOH 10N e temperatura mantida a 37°C.

A produção da toxina tipo D pelo clostrídio foi confirmada por ensaio de L+ em camundongos por meio da neutralização da toxina por anticorpo específico (JOHNSON; BRADSHAW, 2001). O ensaio de L+ foi realizado após 107h do cultivo e obteve-se resultado de  $10^2$  L+/10 mL<sup>-1</sup>. A confirmação da morte por toxina botulínica foi ratificada pela adição de quantidade em excesso de anticorpo específico à solução de toxina antes

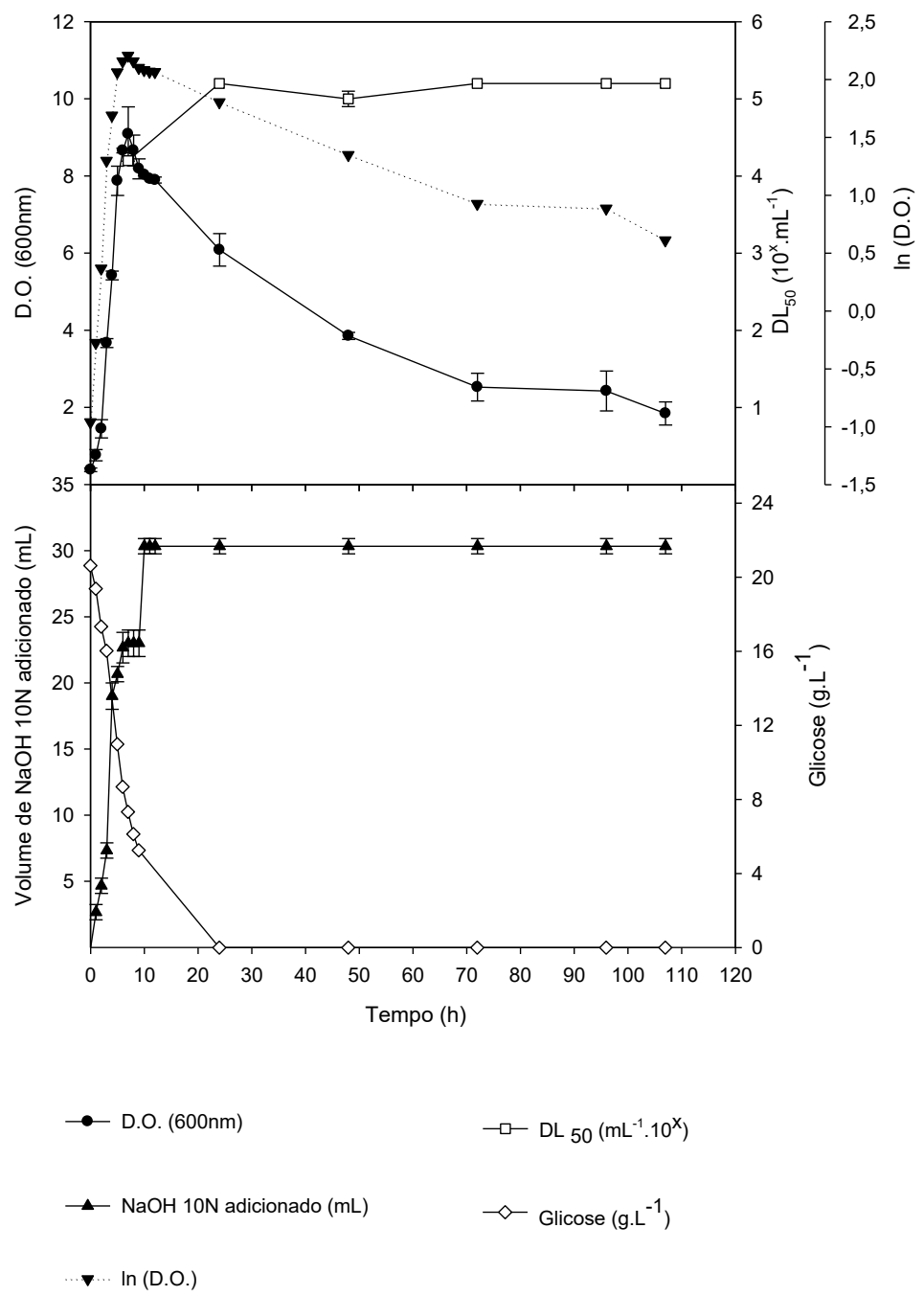
da injeção em camundongo. Verificou-se que não houve morte dos animais durante 4 dias de leitura, confirmando que a cultura era de *C. botulinum* tipo D e que a mesma estava pura. Este resultado é congruente com o plaqueamento (**Figura 8**) em que se observou somente um tipo de colônia.

A fim de melhor caracterizar o comportamento cinético do *C. botulinum* tipo D em ensaio descontínuo e em meio líquido, foram avaliadas a concentração celular, concentração de glicose e consumo de NaOH durante o cultivo (**Figuras 9 e 10**). No primeiro cultivo, as análises ocorreram nos tempos 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 24, 48, 72 e 107h. Nos dois ensaios seguintes a amostragem foi ampliada e foram coletadas amostras nos tempos 4, 10, 11, 12 e 96h do cultivo.

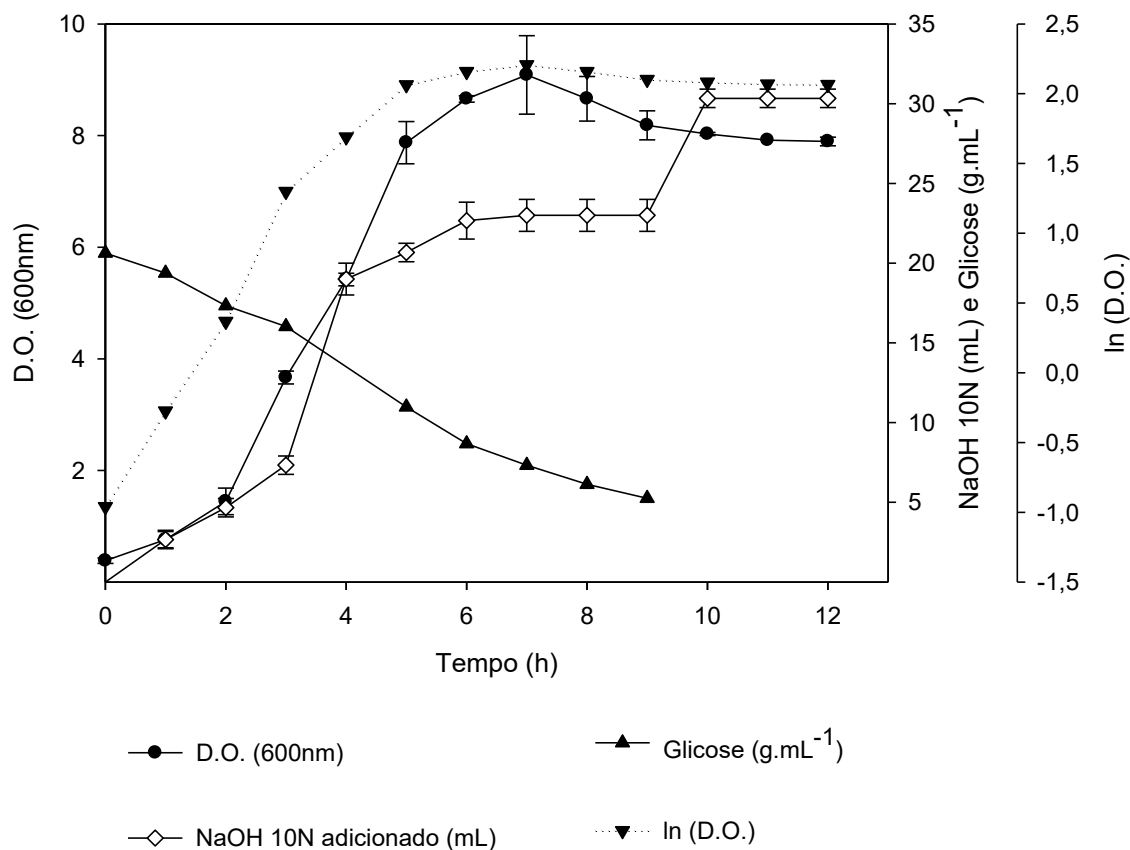
Os dados apresentados nas Figuras 9 e 10 permitem considerar que a finalização da fase de crescimento exponencial ocorreu em torno de 5h do cultivo, sendo que o maior valor da densidade ótica (D.O.) ocorreu após 7h de cultivo. Não foi observada presença de fase lag. Provavelmente, a fase lag em cultivo de bactérias do gênero *Clostridium* está principalmente relacionada à manutenção de condições anaeróbias do meio de cultura no início do ensaio, uma vez que a presença de oxigênio dissolvido inibe o crescimento do *C. botulinum* (SKULBERG; HAUSKEN, 1965). Considerando que as etapas iniciais do cultivo promoveram a adaptação do microorganismo às condições de nutrientes, temperatura e pH não se observou redução do número de células ou fase lag no cultivo em biorreator. O que se pode observar nos gráficos apresentados (**Figuras 9 e 10**) é que o crescimento do *C. botulinum* D seguiu um padrão comum de crescimento bacteriano apresentando fase exponencial, fase de desaceleração, fase estacionária e fase de declínio. A fase exponencial ou fase log ficou bem caracterizada nas primeiras horas de cultivo. Mais adiante, a entrada na fase estacionária e declínio estão associadas à redução de nutrientes, conforme se verifica pela redução da concentração de glicose em nível de não detecção (**Figuras 9 e 11**) após 24h. Além da redução de nutrientes essenciais, a formação de metabólitos, ácidos orgânicos e etanol, são responsáveis pela inibição do crescimento (MOAT; FOSTER, SPECTOR, 2002; MOZZER, 2004), o que foi comprovado pelos resultados apresentados na Figura 11.

O cultivo em batelada do *C. botulinum* tipo D em biorreator atingiu a etapa de concentração celular máxima após 7h, obtendo-se densidade óptica na ordem de 9u.a. Este fato é coerente com os resultados obtidos para consumo de solução de NaOH, uma vez que até 7h foram consumidos 23mL. A partir de 12h de cultivo não houve aumento da adição de solução de NaOH e ocorre reduções sucessivas da D.O., o que deve estar relacionado à redução da atividade celular e, conseqüentemente, da produção de metabólicos e morte celular (**Figuras 9 e 10**).

Os cromatogramas apresentados na Figura 11 caracterizam a formação de metabólitos ao longo da fermentação e o consumo de glicose. Os clostrídios são microorganismos que não apresentam citocromo oxidase ou oxigenases. Sendo assim, obtêm sua energia por meio da redução parcial do substrato, ou seja, compostos orgânicos liberados para o meio de cultura durante o crescimento da bactéria como subproduto do metabolismo anaeróbico são utilizados como receptores finais de elétrons no metabolismo de obtenção de energia (HATHEWAY; JOHNSON, 1998; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Os metabólitos produzidos durante o cultivo foram identificados como ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, além do etanol, e estão apresentados nos cromatogramas da Figura 11. O crescimento celular das bactérias do gênero *Clostridium* é fortemente inibido pelo acúmulo de ácidos orgânicos e etanol no meio fermentado (CARLIER, 2006; MOZZER 2004; ROGERS; GOTTSCHALK, 1993). A produção de ácido acético, propiônico e butírico durante a fermentação é uma característica que pode ser utilizada para classificar o *C. botulinum* em tipo C e D conforme Smith e Sugiyama (1977 *apud* FERREIRA, 2002).

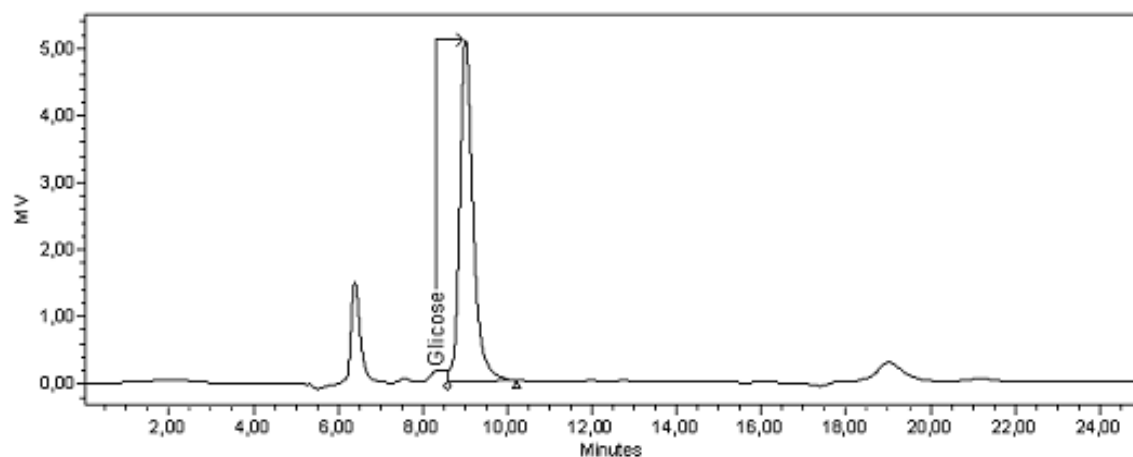


**Figura 9 -** Concentração de células (D.O.), concentração de glicose e volume de solução de NaOH 10N adicionado ao meio do cultivo de *C. botulinum* tipo D a 37°C, em meio de cultura PYG, pH controlado em 6,5, durante 107h.

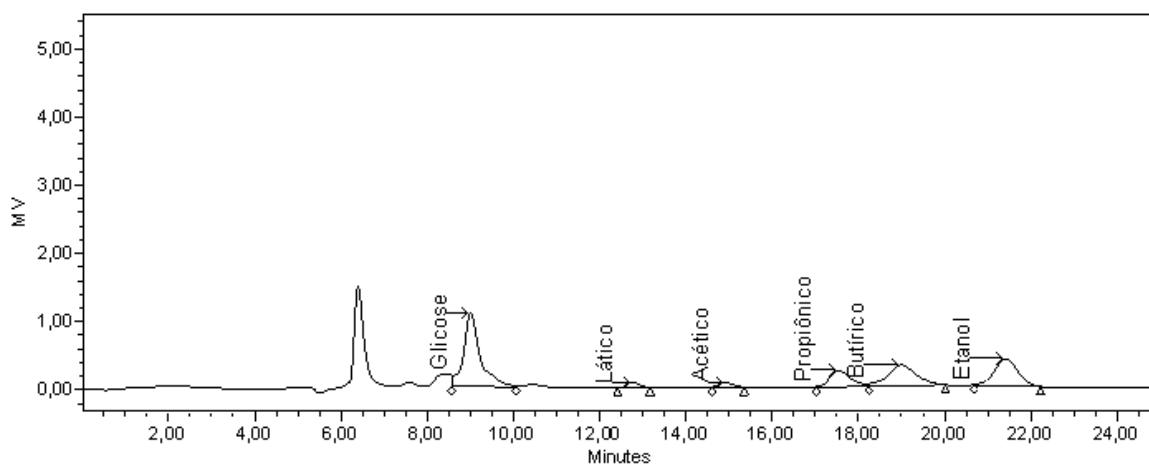


**Figura 10** – Concentração de células (D.O.), concentração de glicose e volume solução de NaOH 10N adicionado ao meio de cultivo do *C. botulinum* tipo D a 37°C, em meio de cultura PYG, pH controlado em 6,5, durante as primeiras 12h.

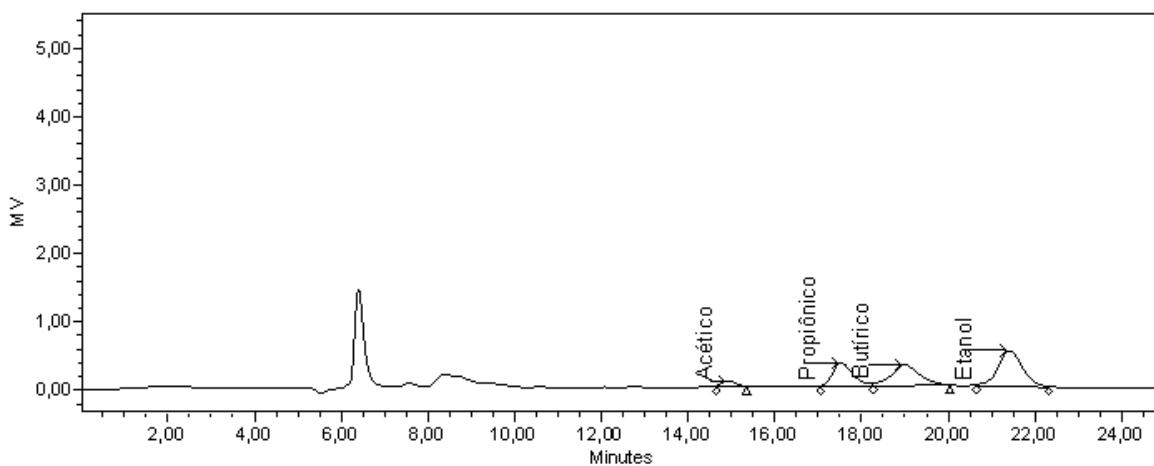
A quantidade média de toxina botulínica produzida durante o cultivo foi acompanhada por determinação da  $DL_{50}$ . Após 107h de cultivo foi obtido valor de  $DL_{50}$  mL<sup>-1</sup> de  $10^{5,2}$  (Figura 9). Portanto, a produção de toxina é compatível com os níveis encontrados por Gessler e Böhnelt (1999) que obtiveram valores de dose letal mínima (DMN) de  $1,6 \times 10^5$ .mL<sup>-1</sup> para *C. botulinum* tipo D.



A



B



C

**Figura 11** - Cromatogramas das amostras de meio de cultivo do *C. botulinum* tipo D nos tempos zero (A), 9h (B) e 24h (C) obtidos por CLAE. Verifica-se a redução da concentração de glicose e o surgimento de picos resultantes do metabolismo do microorganismo. Condições cromatográficas: coluna Aminex HPX-87H, solução de ácido sulfúrico 5mM como fase móvel, fluxo  $0,6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção  $10\mu\text{L}$ , temperatura  $43^\circ\text{C}$  e tempo de corrida 15min.

## **5.2 Purificação da toxina botulínica a partir de cultivo em biorreator do *C. botulinum* tipo D**

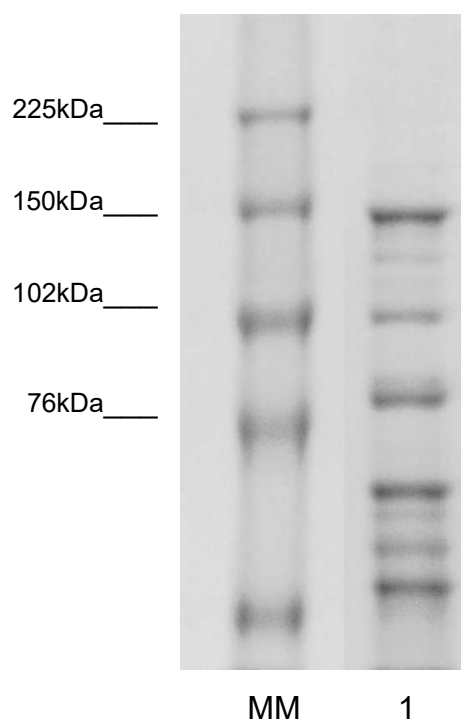
Conforme a Figura 12, a amostra do cultivo após filtração em membrana 0,22 $\mu$ m apresenta muitas bandas de proteínas de massa molar menor que 150kDa e que muito provavelmente compõem a estrutura complexa da toxina associada à proteínas protetoras. De acordo com Mahmut *et al.* (2002), o *C. botulinum* tipo D produz duas formas de toxinas progenitoras, 12S (300kDa, toxina M) e 16S (500kDa, toxina L). A toxina 12S consiste da neurotoxina (7S) e de uma fração de proteínas não tóxicas e sem atividade hemoaglutinante com massa molar próxima a da toxina. A toxina 16S é formada pela conjugação da toxina M e de outros componentes não tóxicos e com atividade hemoaglutinante. Estes componentes consistem em quatro subcomponentes, HA1(33kDa), HA2 (17kDa), HA3a (22-23kDa) e HA3b (53kDa).

Neste trabalho, as etapas de purificação foram divididas em separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo ou etapa de clarificação, purificação de baixa resolução e purificação de alta resolução conforme sugerido por Pessoa Junior; Kilikian (2005).

### **5.2.1 Clarificação**

Para a retirada de células, foram comparadas as técnicas de centrifugação e microfiltração convencional. Em ambos os métodos não houve perda de toxina, conforme ensaios de DL<sub>50</sub>, permanecendo o título em 10<sup>5,2</sup>.mL<sup>-1</sup>. Houve redução da concentração de proteína total após os procedimentos, ou seja, 0,51 e 0,44mg.mL<sup>-1</sup> para centrifugação e microfiltração, respectivamente. Apesar de ambos os métodos atenderem ao objetivo, do ponto de vista prático, vantagens e desvantagens precisam ser avaliadas. A centrifugação requer maior investimento inicial, enquanto a clarificação por meio filtrante utilizando membrana é trabalhosa, o que torna necessário a utilização de sistemas mais

eficientes como cartuchos, proporcionando um aumento significativo da área filtrante. Por outro lado, em longo prazo, a utilização de cartucho em uma produção de maior escala pode ser mais dispendiosa e apresentar riscos de biossegurança. Enquanto a centrifugação pode ser mais biossegura, pois a limpeza pode ser feita *clean in place*, embora exista o risco de formação de aerossol no ambiente. Uma alternativa muito aplicada em processos biotecnológicos nos últimos anos é a utilização da filtração tangencial. Esta é empregada para separação de pequenas partículas, além da concentração e separação de moléculas solúveis (GESSLER; BÖHNEL, 1999; PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005).

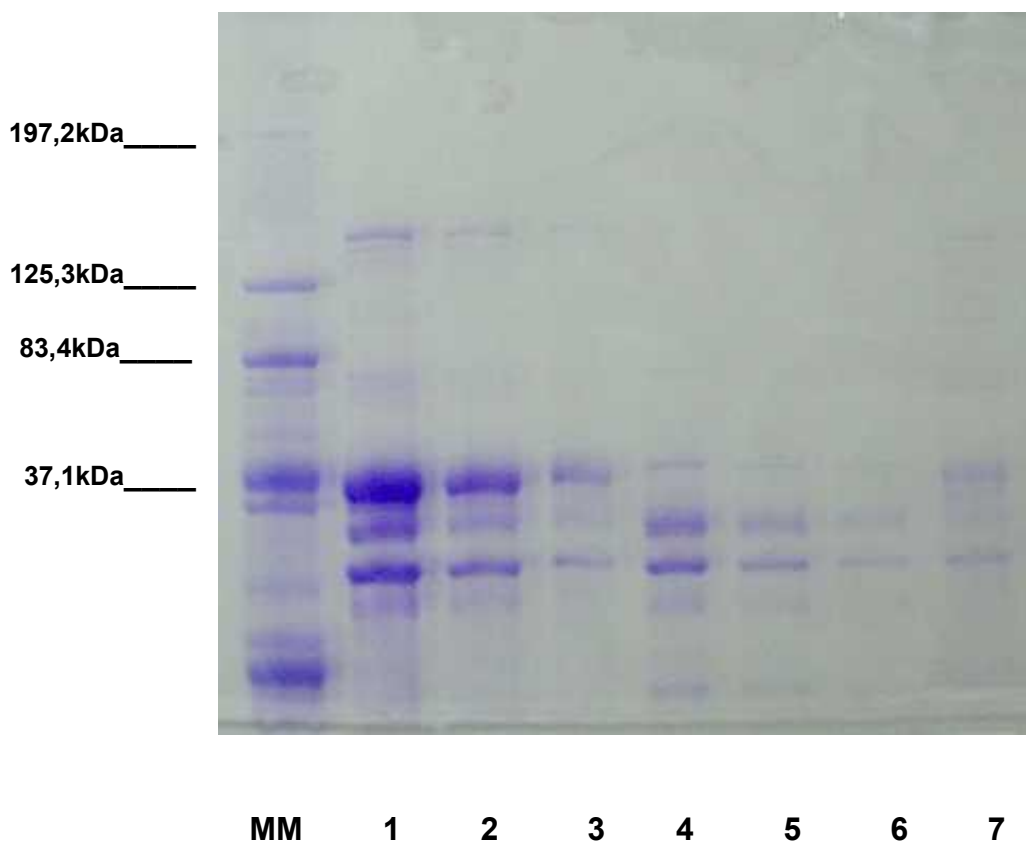


**Figura 12** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) da amostra da toxina de *C. botulinum* tipo D, após concentração em *Hollow Fiber* de corte molecular de 30kDa: (1); marcador de massa molar (MM). Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas.

### **5.2.2 Purificação de baixa resolução**

Conforme dados obtidos neste estudo, o processo de purificação por precipitação com sulfato de amônio ocorreu em concentração acima de 60% da saturação. Concentrações equivalentes a 10, 25 e 40% da saturação de sulfato de amônio não precipitaram proteínas e, por isso, somente concentrações de 60 e 85% da saturação foram avaliadas por eletroforese. Esse fato está congruente com o trabalho de purificação parcial apresentado por Mahmut *et al.* (2002) que também utilizou a precipitação de sulfato de amônio a 60% na etapa inicial de purificação. Observa-se pelo perfil protéico da Figura 13 a presença de bandas de menor massa molecular que permaneceram na amostra aplicada na canaleta dois e que, provavelmente, correspondem a proteínas associadas à toxina. De fato, o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  não foi seletivo. Mas, 60% da saturação já foram suficientes para precipitar a proteína de interesse, em torno de 150kDa, conforme mostra a Figura 13 (canaletas 1 e 2). Sob esta condição, a técnica poderia ser uma alternativa para concentração da amostra nas primeiras etapas de purificação. Contudo, a desvantagem é que em larga escala a precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  torna-se inviável devido aos grandes volumes de manipulação além de aumentar as etapas de purificação.

O segundo processo testado e que se mostrou mais prático, foi a ultrafiltração através de filtro tubular (filtração tangencial). De acordo com os resultados obtidos durante o monitoramento do processo de filtração tangencial em *Hollow Fiber*, a polarização da concentração leva uma redução do fluxo inicial em menos que 30%. Porém, a fim de evitar a formação de espuma, não foi alterada a pressão durante o processo. A concentração em aproximadamente 3,8 vezes resultou no aumento da concentração protéica de 0,44 para 1,44mg.mL<sup>-1</sup> e do valor de DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> de 10<sup>5,2</sup> para 10<sup>5,8</sup>.

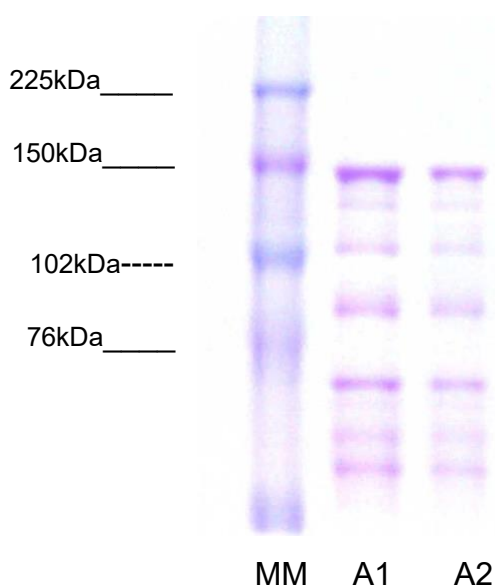


**Figura 13** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) do ensaio de precipitação com sulfato de amônio com 60 e 85% de saturação: marcador de massa molar (MM); precipitado a 60% de saturação 2x diluído (1); precipitado a 60% de saturação 5x diluído (2); precipitado a 60% de saturação 10x diluído (3); precipitado a 85% de saturação 2x diluído (4); precipitado a 85% de saturação 5x diluído (5); precipitado a 85% de saturação 10x diluído (6); amostra do cultivo microfiltrada (7). Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas.

A partir da solução concentrada da toxina, foi realizada a diafiltração, em etapas, através de diluições sucessivas do retentado por 6 vezes, em volume de 4 vezes mais, eluindo com tampão acetato de amônio 50mM, pH 8,0. A temperatura foi mantida na faixa de 4 a 8°C com banho de gelo. A escolha do pH foi baseada no trabalho de Gessler; Böhnel (1999) que utilizaram o pH 8,0 para promover a separação da toxina das demais proteínas. O retentado apresentou redução da concentração protéica de 1,44 para

0,89mg.mL<sup>-1</sup>. Também houve redução do valor de DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> de 10<sup>5,8</sup> para 10<sup>5,45</sup> e pode estar associada à instabilidade da toxina devido ao escoamento turbulento que ocorre em filtros tubulares.

A Figura 14 mostra o resultado da eletroforese da amostra após diafiltração e observou-se um perfil protéico similar em relação a amostra aplicada (**Figura 12**).



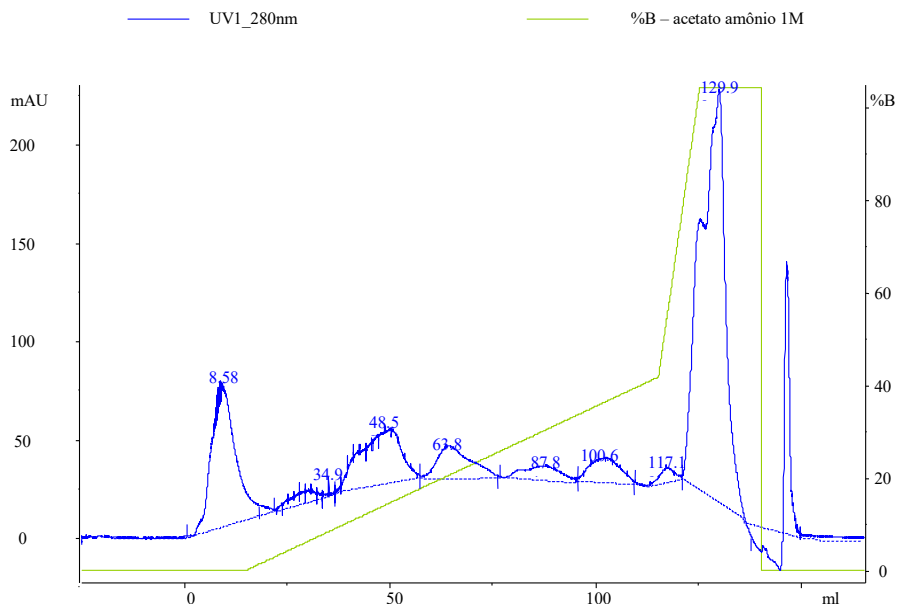
**Figura 14** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) da amostra do meio do cultivo de *C. botulinum* tipo D, concentrado 3,8x e diafiltrado em tampão acetato de amônio 50mM, pH 8,0, utilizando membrana *Hollow Fiber* (corte molecular de 30kDa): A1 e A2 (amostra diluída 1x); marcador de massa molar (MM). Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas.

### 5.2.3 Cromatografia de Troca Iônica – eluição gradiente

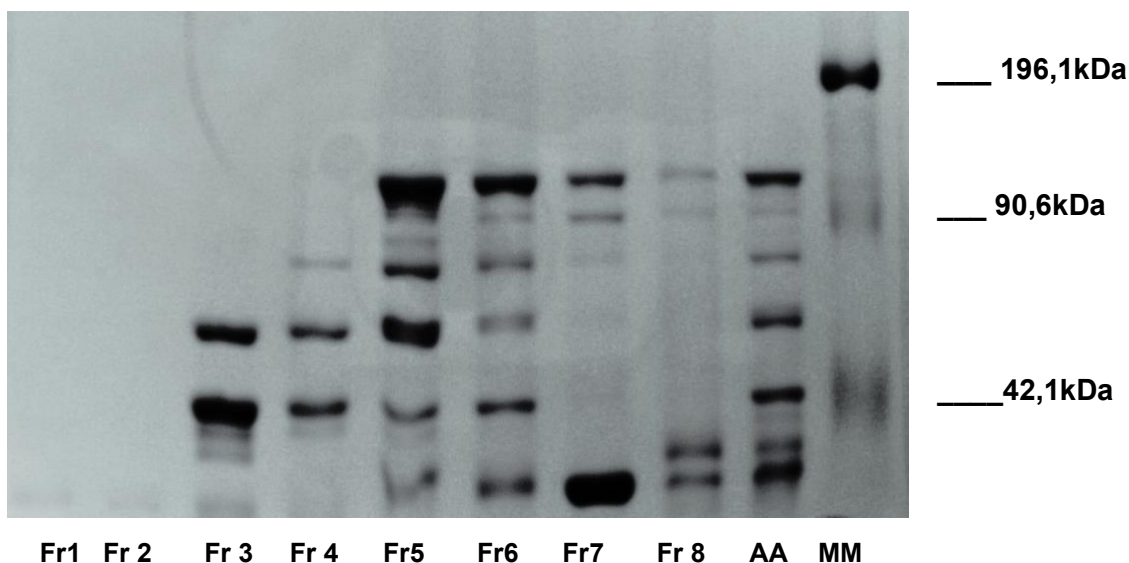
A Figura 15 representa um cromatograma típico das injeções de 5mL da amostra diafiltrada contendo toxina botulínica em coluna *Q-Sepharose Hi Trap* acoplada ao equipamento *Äkta System Purifier*, sob fluxo de 2mL.min<sup>-1</sup>, a temperatura de 25°C, detecção a 280nm e fase móvel gradiente de acetato de amônio 50mM (A) [pH 8,0, 15,30mS.cm<sup>-1</sup>] e acetato de amônio 1M (B) [pH 8,0, 86,35mS.cm<sup>-1</sup>].

Após três corridas cromatográficas sucessivas, as frações foram concentradas utilizando sistema Amicon com membrana de corte molecular de 10kDa. O perfil protéico obtido por eletroforese está apresentado na Figura 16. As frações 5, 6 e 7 apresentaram banda de tamanho de 150kDa que é atribuída a toxina botulínica (GESSLER; BÖHNEL, 1999). Em seguida, a amostra das frações 5, 6 e 7 foram liofilizadas em frascos de vidro contendo 2,0mL da solução. Para realização do bioensaio, após a liofilização, foram tomados 3 frascos de cada fração e diluiu-se para um volume de 600 $\mu$ L utilizando salina 0,85%(p/V). A administração de 200 $\mu$ L por via intravenosa resultou na morte de animais, comprovando a presença da toxina botulínica. A fração 7 foi reservada e as frações 5 e 6 foram utilizadas na segunda cromatografia. Porém, o volume da fração 7 foi muito pequeno e só permitiu a avaliação por SDS-PAGE e toxicidade.

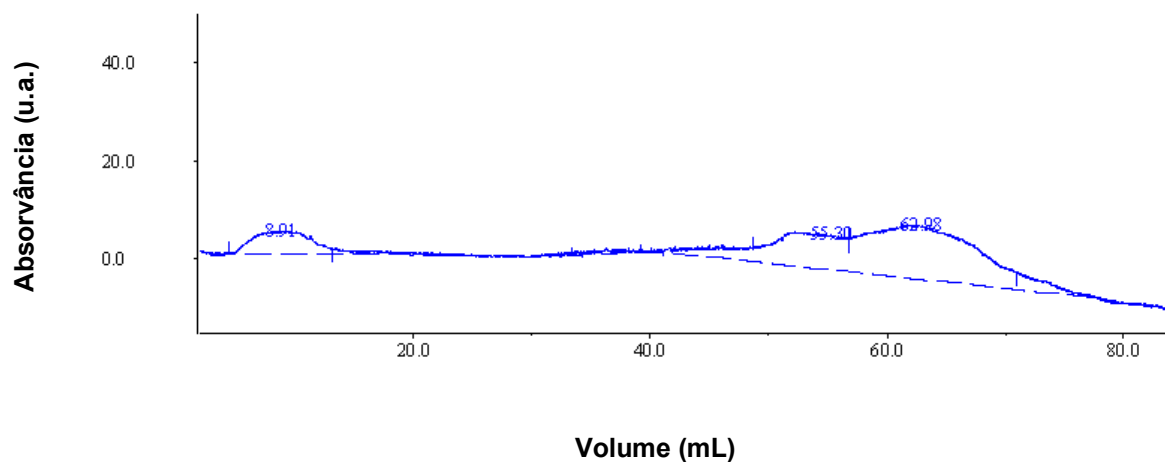
Na segunda etapa cromatográfica, a fração 6 foi novamente aplicada na coluna *Q-Sepharose Hi Trap* em equipamento Äkta System Purifier, temperatura de 25°C, volume de injeção de 5mL, detecção a 280nm e fase móvel gradiente de acetato de amônio 50mM (pH6,0, 4,80mS.cm<sup>-1</sup>) / solução de acetato de amônio 1M (pH 6,0, 64,10mS.cm<sup>-1</sup>). A Figura 17 apresenta um cromatograma típico da segunda corrida cromatográfica.



**Figura 15** - Primeira cromatografia de troca iônica: perfil cromatográfico da amostra do meio de cultura de *C. botulinum* tipo D previamente diafiltrada em *Hollow Fiber* de corte molecular de 30kDa, aplicada em coluna *Q-Sepharose Hi Trap* e eluída por gradiente utilizando solução de acetato de amônio 50mM (pH 8,0) e solução de acetato de amônio 1M (pH 8,0). As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo volume em mL do pico a 280nm: fração 1 (8,58), fração 2 (34,90), fração 3 (48,50), fração 4 (63,80), fração 5 (87,80), fração 6 (100,60), fração 7 (117,10) e fração 8 (129,90).

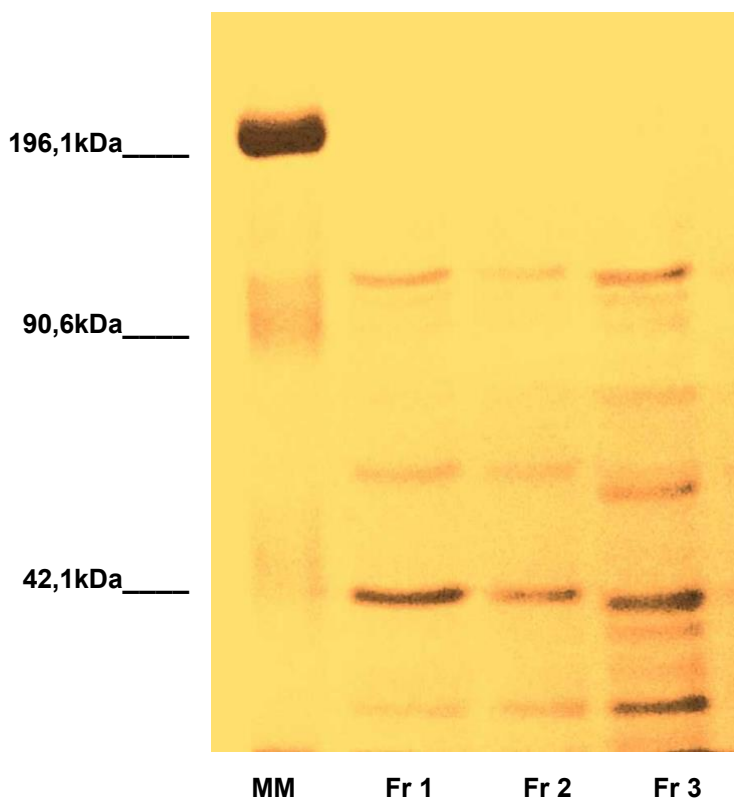


**Figura 16** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 8 eluídas em coluna *Q-Sepharose Hi-Trap* referente a primeira cromatografia de troca iônica: AA, amostra aplicada na coluna; MM marcador de massa molar. Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 15.



**Figura 17** - Segunda cromatografia de troca iônica: perfil cromatográfico da amostra da fração 6 obtida na primeira cromatografia de troca iônica, aplicada em coluna *Q-Sepharose Hi Trap* e eluída por gradiente utilizando solução de acetato de amônio 50mM pH 8,0 e solução de acetato de amônio 1M pH 8,0. As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo volume em mL do pico a 280nm: fração 1 (8,91), fração 2 (55,30) e fração 3 (62,98).

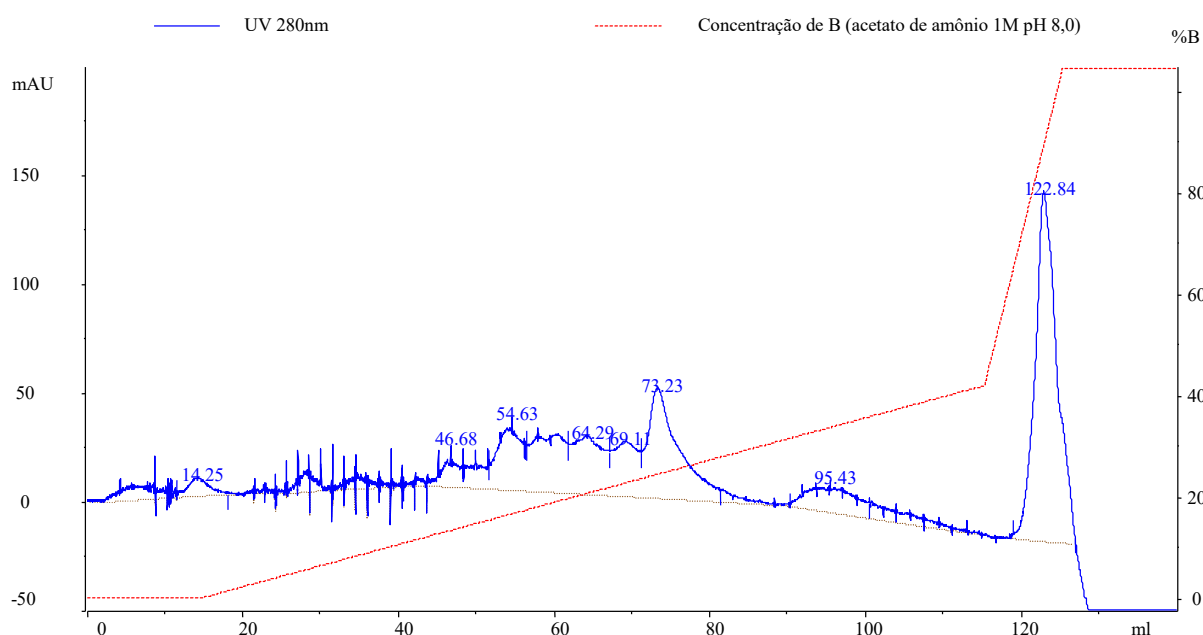
Amostras de cada fração foram reunidas após três corridas sob as mesmas condições, concentradas e liofilizadas em frascos contendo 2,0mL do eluente. Após a liofilização, foram tomados 3 frascos de cada fração, diluídos para 300 $\mu$ L e analisados por eletroforese (**Figura 18**). Os picos indicados na Figura 19 apresentam bandas de tamanho de 150kDa que são atribuídas à toxina botulínica (GESSLER; BÖHNEL, 1999). Conforme pode ser verificado, a segunda cromatografia apresentou bandas de 150kDa nas três frações, sendo que a fração 3 apresentou maior número de bandas. Possivelmente, a interação da carga da proteína de interesse e a resina de troca iônica não apresentou diferença em relação aos contaminantes sob as condições cromatográficas testadas.



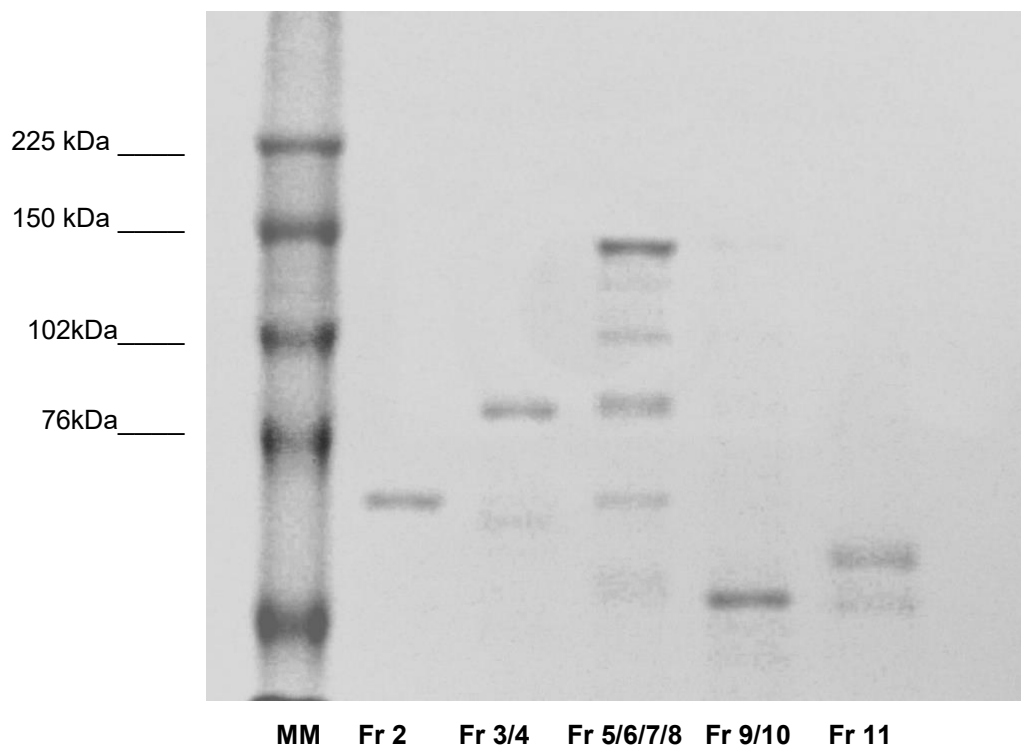
**Figura 18** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) 1, 2 e 3 eluídas da segunda cromatografia de troca iônica utilizando coluna *Q-Sepharose Hi-Trap*, gradiente tampão acetato de amônio 50mM pH 6,0 e tampão acetato de amônio 1M pH 6,0. Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 17.

Como alternativa, optou-se por testar uma nova resina de troca iônica de melhor resolução. Foi selecionada a resina Source 15Q 5mL, fortemente aniônica e de tamanho de partículas de 15 $\mu$ m. A partir das frações 5 e 6 obtidas na primeira cromatografia foram aplicados volumes de 5mL utilizando equipamento Äkta System Purifier, detecção a 280nm e fase móvel gradiente de acetato de amônio 50mM [pH 8,0 / 5,30mS.cm<sup>-1</sup>] e acetato de amônio 1M (B) [pH 8,0 / 65,85mS.cm<sup>-1</sup>] a temperatura de 25°C (**Figura 19**). Devido ao pequeno volume representado, as frações foram misturadas: 3 e 4; 5, 6, 7 e 8; 9 e 10. A Figura 20 apresenta o perfil eletroforético das proteínas das frações coletadas. A amostra das frações misturadas 5, 6, 7 e 8 apresentaram banda de 150kDa,

por isso foram avaliadas quanto a concentração de proteína total e DL<sub>50</sub>. Os resultados obtidos foram de 0,286mg.mL<sup>-1</sup> e 10<sup>4,2</sup> para concentração de proteínas totais e DL<sub>50</sub>, respectivamente.



**Figura 19 - Perfil cromatográfico da fração 5 e 6 reunidas da primeira cromatografia de troca iônica, aplicada em coluna Source 15Q e eluída por gradiente utilizando solução de acetato de amônio 50mM (pH 8,0) e solução de acetato de amônio 1M (pH 8,0). As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo volume em mL do pico a 280nm: fração 1 (14,25), fração 2 (31,50), fração 3 (39,02), fração 4 (46,68), fração 5 (54,63), fração 6 (64,29), fração 7 (73,23), fração 8 (95,43), fração 9 (122,84) e fração 10 (122,84). As frações 3 e 4, 9 e 10, bem como, 5, 6, 7 e 8 foram misturadas.**



**Figura 20** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 2 a 11 eluídas na cromatografia de troca iônica a temperatura de 25°C, utilizando coluna Source 15Q e gradiente de tampão acetato de amônio pH 8,0. Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 19.

Também foram feitos ensaios cromatográficos utilizando fase móvel gradiente de acetato de amônio 50mM [pH 6,0 / 4,90mS.cm<sup>-1</sup>] e acetato de amônio 1M (B) [pH 6,0 / 64,20mS.cm<sup>-1</sup>]. As frações coletadas durante três corridas cromatográficas foram concentradas e liofilizadas após distribuição de 2mL da solução em frascos de vidro. Após a reconstituição de 3 frascos com volume final de 600μL foram feitos ensaios de eletroforese. O perfil eletroforético das frações coletadas apresentaram banda de 150kDa em todas as frações coletadas (dados não apresentados). Portanto, esta condição cromatográfica não foi satisfatória.

#### **5.2.4 Cromatografia de Troca Iônica – eluição isocrática**

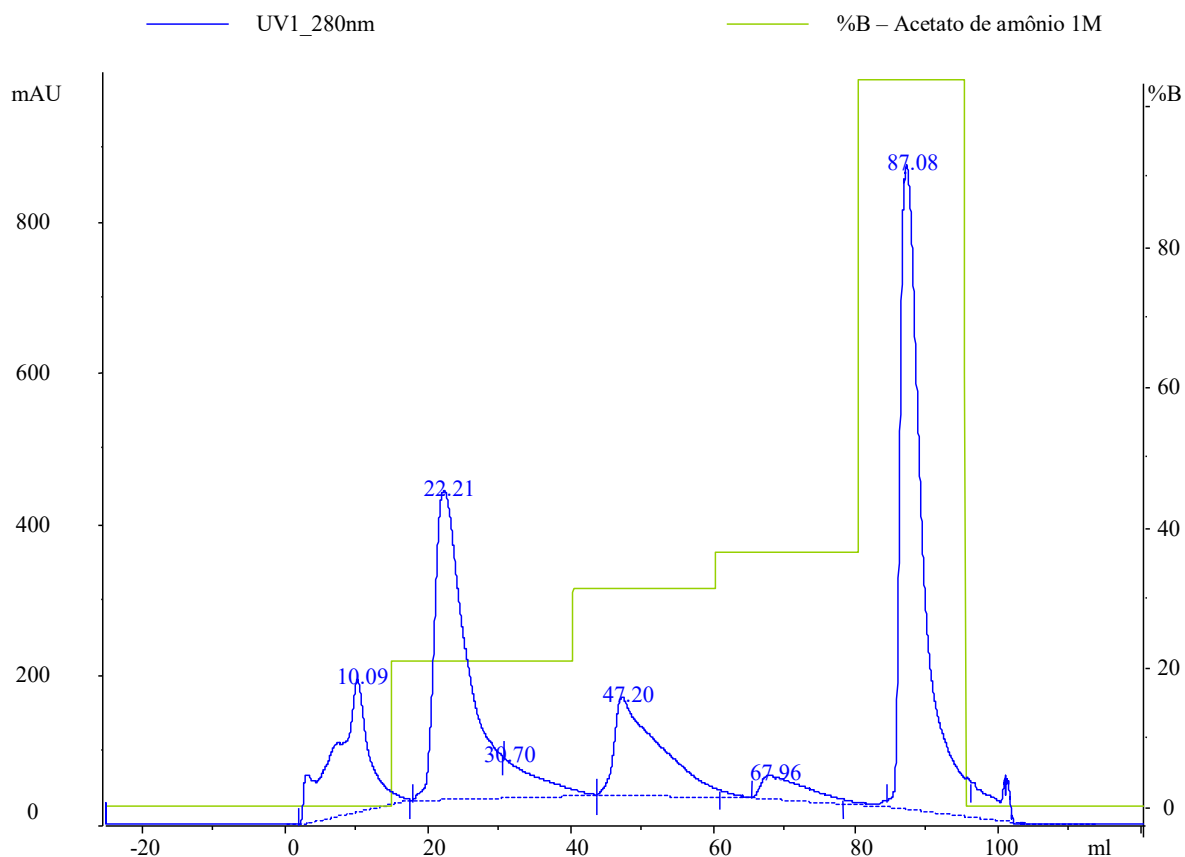
Nesta etapa, foram determinadas as condições cromatográficas isocráticas com a finalidade de posteriormente escalonar o processo e facilitar a operação da primeira etapa cromatográfica, uma vez que o volume de meio contendo toxina é alto e a concentração da toxina de interesse é muito baixa.

Utilizando equipamento Äkta System Purifier, coluna *Q Sepharose Hi-trap* 5mL, fluxo de 2mL.min<sup>-1</sup>, sob temperatura de 25°C, volume de injeção de 5mL, detecção a 280nm e fase móvel de acetato de amônio 50mM (A) [pH 8,0, 5,15mS.cm<sup>-1</sup>] e acetato de amônio 1M (B) [pH 8,0, 64,98 mS.cm<sup>-1</sup>], foram padronizadas as seguintes condições em etapas: 2 volumes de coluna A(100%):B(0%); 5 volumes de coluna A(80%):B(20%); 3 volumes de coluna A(70%):B(30%); 3 volumes de coluna A(75%):B(35%); 3 volumes de coluna A(0%):B(100%). A Figura 21 apresenta cromatograma típico desta cromatografia.

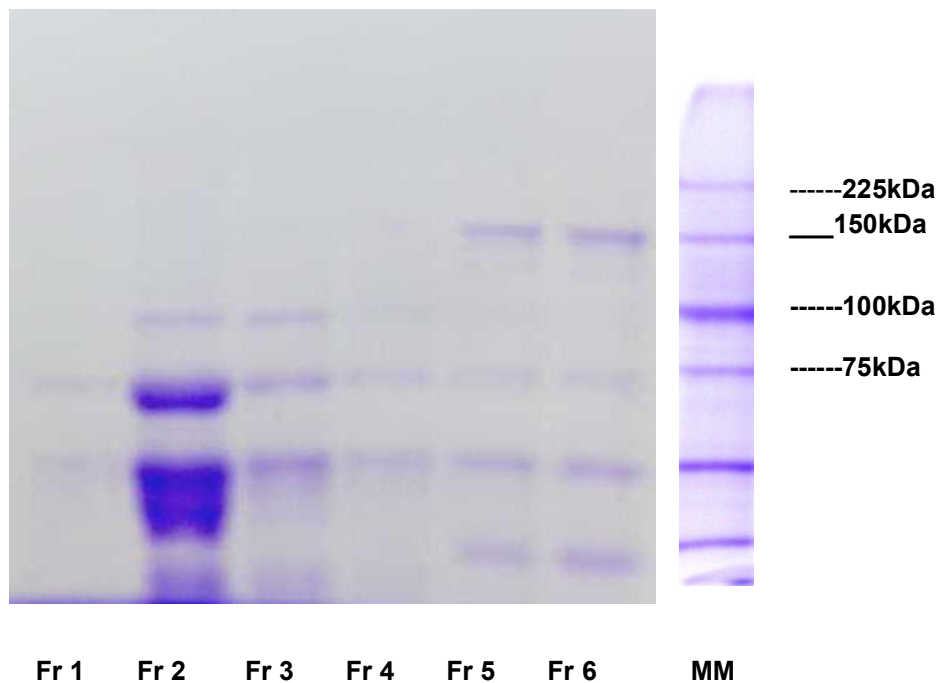
As frações de 3 cromatografias consecutivas foram coletadas e reunidas. Em seguida, foram liofilizadas em frascos contendo 2,0mL do eluente. Após a liofilização, foram tomados 3 frascos de cada fração e diluídos para 600µL com tampão acetato de amônio 50mM pH 6,0. Conforme a eletroforese (**Figura 22**), as frações de número 5 e 6 apresentaram bandas de tamanho aproximado de 150kDa.

A etapa de escalonamento foi realizada utilizando coluna XK 50 e resina de *Q-Sepharose HP* em um volume de 100mL. As condições cromatográficas estabelecidas foram: fluxo a 10mL.min<sup>-1</sup>, temperatura de 25°C, tampão acetato de amônio 1M (pH 8,0) em concentrações crescentes, utilizando um sistema cromatográfico Optical Unit (Amersham Pharmacia Biotech). Partindo dos parâmetros obtidos no equipamento Äkta System Purifier, foi proposta a Sequência A de purificação cromatográfica, conforme resumido na Tabela 15. As frações coletadas (**Figura 23**) foram concentradas por ultrafiltração a 10kDa, equilibradas com tampão acetato de amônio 50mM pH 6,0 e analisadas por SDS-PAGE (**Figura 24**). De acordo com resultado da eletroforese observou-se que a toxina estava presente em todas as frações coletadas e que as condições cromatográficas não estavam adequadas. Este resultado não foi compatível com a corrida cromatográfica realizada com a coluna *Q-Sepharose Hi-Trap* (**Figuras 21**

e 22) e deve estar relacionado ao menor empacotamento e menor número de pratos teóricos da coluna XK-50 Q-Sepharose HP em relação a coluna pré-montada.



**Figura 21** - Perfil cromatográfico da amostra do meio de cultura do *C. botulinum* tipo D previamente diafiltrada em *Hollow Fiber* 30kDa, aplicada em coluna *Q-Sepharose Hi Trap* e eluída por etapas utilizando solução de acetato de amônio 50mM (pH 8,0) e solução de acetato de amônio 1M (pH 8,0). As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo volume em mL do pico a 280nm: fração 1 (10,09), fração 2 (22,21), fração 3 (36,70), fração 4 (47,20), fração 5 (67,96) e fração 6 (87,08).

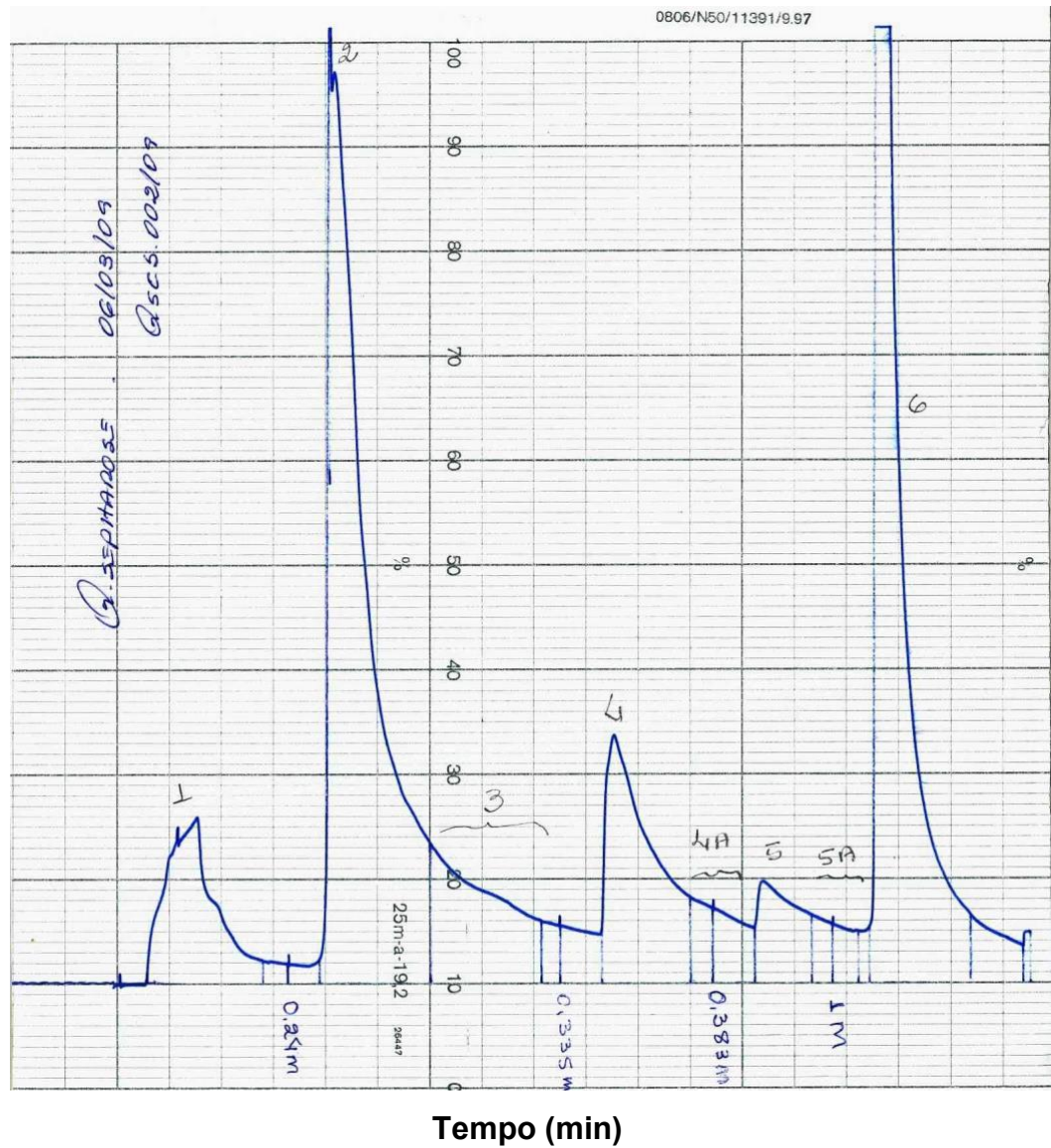


**Figura 22** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 6 eluídas em etapas em coluna *Q-Sepharose Hi-Trap*. Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 21.

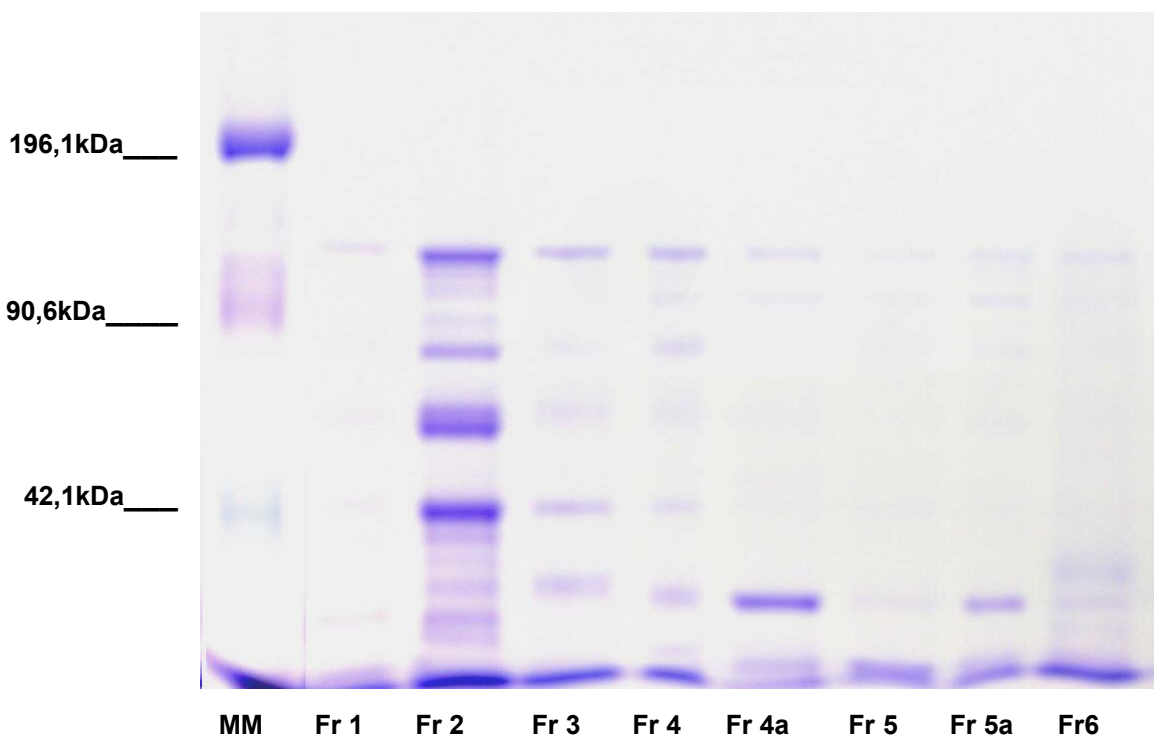
**Tabela 15** - Sequência A da cromatografia da amostra contendo toxina botulínica tipo D a partir da diafiltração em *Hollow Fiber 30kDa*.

Etapa	Concentração do		
	eluyente – tampão acetato de amônio pH=8 (mM)	Condutividade (mS.cm <sup>-1</sup> )	Número de volume de coluna eluído
A	50	4,96	5,0
B	240	20,50	4,0
C	335	27,50	3,0
D	380	30,00	3,0
E	1000	65,10	3,0

Absorvância (u.a.)



**Figura 23** - Perfil cromatográfico da amostra de meio de cultura de *C. botulinum* tipo D previamente diafiltrada em *Hollow Fiber* 30kDa, aplicada em coluna *Q-Sepharose HP XK-50* e eluída por etapas utilizando solução de acetato de amônio pH 8,0 (sequência A): 50mM, 240mM, 335mM, 380mM e 1M. As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo pico a 280nm: fração 1, fração 2, fração 3, fração 4, fração 4a, fração 5, fração 5a e fração 6. Leitura a 280nm e velocidade do papel de 1mm.min<sup>-1</sup>.



**Figura 24** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 6 eluídas da coluna *Q-Sepharose HP* conforme sequência A. Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 23. Observa-se banda referente à toxina botulínica tipo D em todas as frações.

O ajuste das condições cromatográficas foi realizado através da Sequência B de purificação cromatográfica resumida na Tabela 16. O cromatograma obtido a partir da inclusão de duas novas etapas em relação à sequência anterior está apresentado na Figura 25. O perfil eletroforético das proteínas das frações coletadas, previamente concentradas e equilibradas com tampão acetato de amônio 50mM pH 6,0 por ultrafiltração, está apresentado na Figura 26. Observa-se que sob estas condições, as frações 5, 6, 7 e 8 apresentam bandas em torno de 150kDa. As amostras foram ultrafiltradas em membrana de corte molecular de 10kDa e equilibradas com tampão acetato de amônio 50mM pH 6,0. Em seguida, foram esterilizadas através de filtração

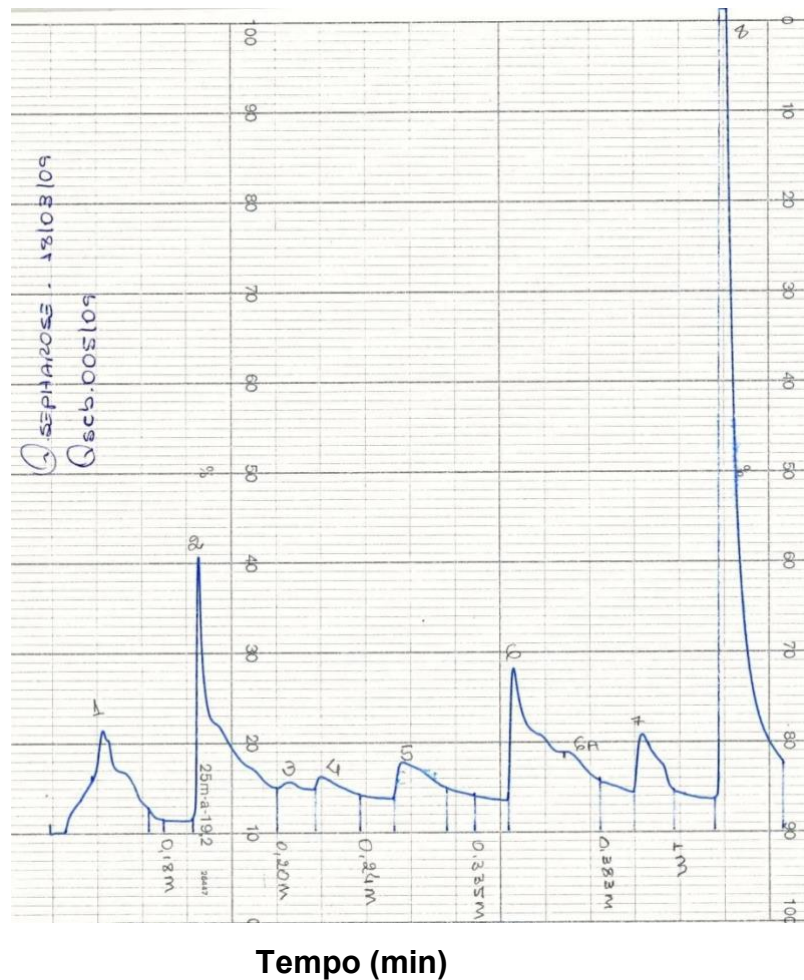
em membrana 0,22 $\mu$ m e administradas por via intravenosa em camundongo. Todas as frações resultaram em morte de animais, comprovando a presença da toxina botulínica.

**Tabela 16 - Sequência B da cromatografia da amostra contendo toxina botulínica tipo D a partir da diafiltração em *Hollow Fiber* 30kDa.**

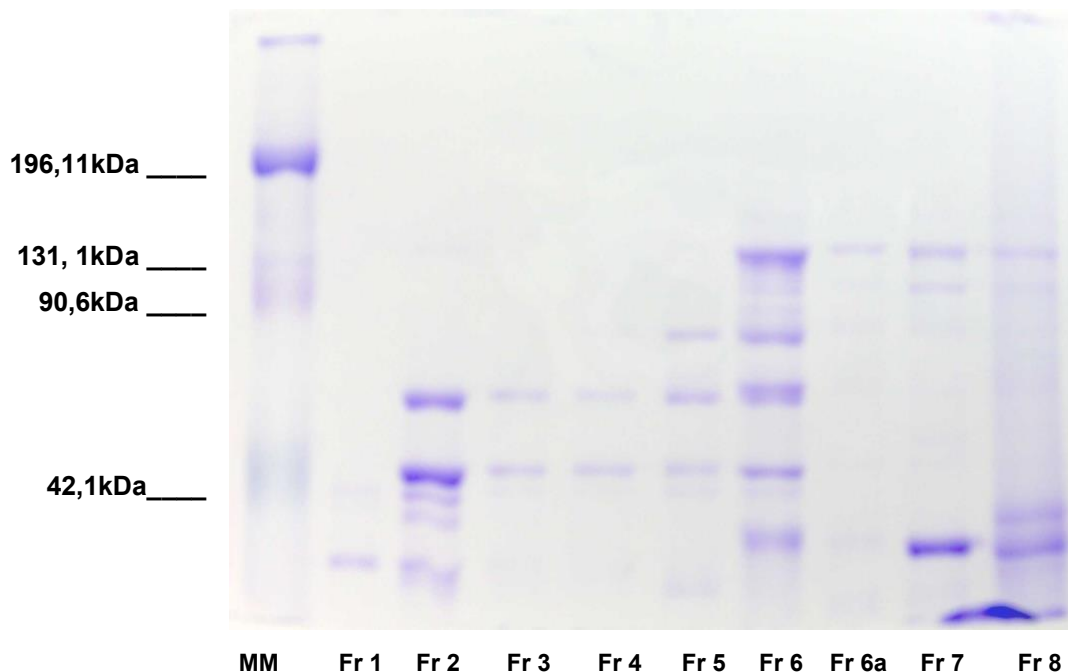
<b>Etapa</b>	<b>Concentração do eluente – tampão acetato de amônio pH=8 (mM)</b>	<b>Condutividade (mS.cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de volume de coluna eluído</b>
A	50	5,30	2,5
B	150	13,40	3,0
C	200	17,67	3,0
D	240	20,50	2,5
E	335	27,40	3,0
F	383	30,70	2,0
G	1000	65,10	2,0

A fim de reduzir o tempo e aumentar a concentração da toxina em menor número de frações foi testada a sequência C apresentada na Tabela 17. A Figura 27 apresenta cromatograma típico das corridas realizadas utilizando a sequência C. A Figura 28 apresenta o perfil eletroforético das proteínas das frações 2, 2a, 3, 4 e 5.

Absorvância (u.a.)



**Figura 25** - Perfil cromatográfico da amostra de toxina de *C. botulinum* tipo D previamente diafiltrada em *Hollow Fiber* 10kDa, aplicada em coluna *Q-Sepharose HP XK-50* e eluída por etapas utilizando solução de acetato de amônio pH 8,0 (sequência B): 50mM, 180mM, 200mM, 240mM, 335mM, 380mM e 1M. As frações coletadas foram indicadas no cromatograma pelo pico a 280nm: fração 1, fração 2, fração 3, fração 4, fração 5, fração 6, fração 6a, fração 7 e fração 8. Leitura a 280nm e velocidade do papel de 1mm.min<sup>-1</sup>.



**Figura 26** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 8 eluídas da coluna *Q-Sepharose HP* conforme sequência B. Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 25. Observa-se banda referente a toxina botulínica D nas frações 6, 6a, 7 e 8.

**Tabela 17** - Sequência C da cromatografia da amostra contendo toxina botulínica tipo D a partir da diafiltração em *Hollow Fiber 30kDa*.

Etapa	Concentração do		
	elute – tampão acetato de amônio pH=8 (mM)	Condutividade (mS.cm <sup>-1</sup> )	Número de volume de coluna eluído
A	50	5,05	2,0
B	250	21,33	4,0
C	350	28,50	3,0
D	400	31,80	2,0
E	1000	65,80	2,5

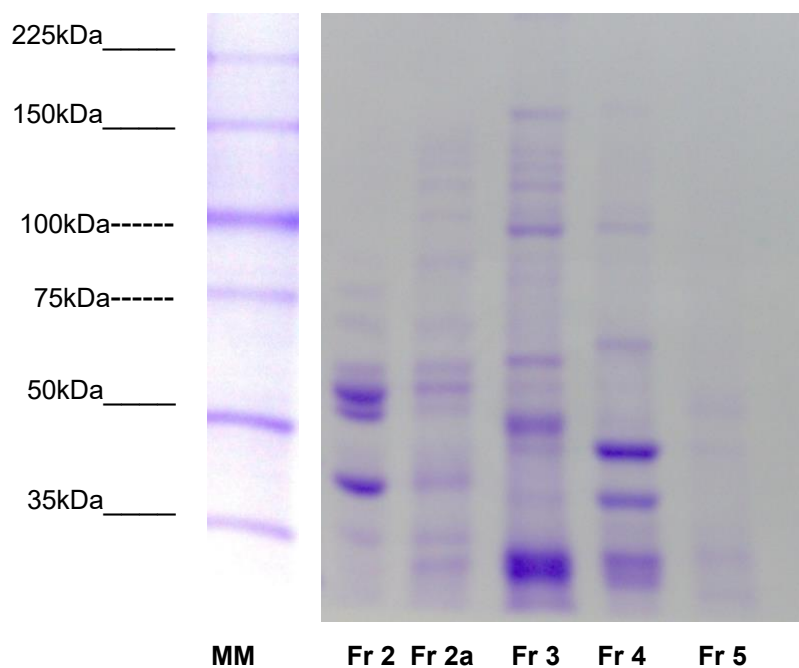
### **5.2.5 Desempenho das etapas de purificação**

As Tabelas 18, 19 e 20 apresentam os resultados dos ensaios de purificação a partir do cultivo de *C. botulinum* tipo D. O valor de recuperação protéica após a microfiltração foi de 57,1% devido à eliminação de células e de debris celulares neste processo. Na etapa de diafiltração, obteve-se 61,9% de recuperação e a perda durante o processo está relacionada com a redução de proteínas de massa molecular menor que 30kDa. Também pode ter ocorrido algum tipo de interação entre o meio filtrante e as proteínas nas condições utilizadas. O rendimento na etapa de diafiltração foi de 44,7%, confirmando que houve perda de proteína de interesse durante o processo. O fator de purificação ao final do processo de *downstream* foi de 1,43.

A Tabela 19 apresenta os resultados da primeira cromatografia da amostra diafiltrada em coluna XK-50 Q-Sepharose HP. Os valores de rendimento obtidos nesta etapa estão na ordem de 11,2% para a fração 3 e 8,4% para a fração 4. Considerando as duas frações reunidas, teoricamente a recuperação é de 19,6%. Este resultado é compatível com o trabalho apresentado por Gessler; Böhnelt (1999) que obtiveram após três etapas cromatográficas uma recuperação de 10,6%. O fator de purificação da fração 3 e 4 é de 4,9 e 2,7, respectivamente.

A Tabela 20 apresenta os resultados da segunda cromatografia em coluna de troca iônica com resina Source 15Q. A amostra aplicada foi obtida de um *pool* das frações 3 e 4 da etapa cromatográfica em coluna Q-Sepharose HP (**Figura 28**). Os resultados de rendimento foram muito baixos e praticamente não houve purificação. Vários fatores podem ser responsáveis por este baixo rendimento, tais como interação hidrofóbica e ligações de hidrogênio resultando em ligação da proteína com a resina, além da perda de atividade da toxina. Também deve ser considerada a possível desnaturação protéica durante o processo de liofilização resultando em redução da toxicidade.





**Figura 28** - SDS Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações (Fr) de 1 a 5 eluídas da coluna *Q-Sepharose HP* conforme sequência C. Gel corado por *comassie blue* para evidenciar proteínas: MM – marcador de massa molar. Os rótulos das frações estão de acordo com o cromatograma da Figura 27: fração 2, fração 2a, fração 3, fração 4, fração 5. Observa-se banda de 150kDa atribuída à toxina botulínica tipo D nas frações 3 e 4.

Outro requerimento importante para agilidade da pesquisa e quantificação de toxina ou anatoxina botulínica é o desenvolvimento de métodos quantitativos por CLAE ou Elisa para monitoramento das etapas de purificação.

Resultados de rendimento e fator de purificação das etapas de clarificação e purificação de baixa resolução da amostra de cultivo de *C. botulinum* tipo D.

Volume (mL)	DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup>	Toxicidade total <sup>1</sup> (DL <sub>50</sub> )	Concentração de Proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg)	Toxicidade <sup>2</sup> (DL <sub>50</sub> mg <sup>-1</sup> )	Recuperação de proteína (%)	Rendimento (%)	Fator de purificação
3.800	1,58x10 <sup>5</sup>	6,02x10 <sup>8</sup>	0,730	2774	2,17x10 <sup>5</sup>	100,0	100,0	
3.600	1,58x10 <sup>5</sup>	5,71x10 <sup>8</sup>	0,440	1584	3,60x10 <sup>5</sup>	57,1	94,7	1,7
900	6,31x10 <sup>5</sup>	5,68x10 <sup>8</sup>	1,440	1296	4,38x10 <sup>5</sup>	81,8	99,5	1,2
900	2,82x10 <sup>5</sup>	2,54x10 <sup>8</sup>	0,892	803	3,16x10 <sup>5</sup>	61,9	44,7	0,7

<sup>1</sup> = volume x DL<sub>50</sub>  
<sup>2</sup> = toxicidade total / proteína total

Resultados de rendimento e fator de purificação da primeira cromatografia de troca iônica (seqüência C) da etapa de purificação de alta resolução da amostra de toxina botulínica tipo D.

VOLUME (mL)	DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup>	Toxicidade total <sup>1</sup> (DL <sub>50</sub> )	Concentração de Proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg)	Toxicidade <sup>2</sup> de proteína (DL <sub>50</sub> mg <sup>-1</sup> )	Recuperação de proteína (%)	Rendimento (%)	Fator de purificação
100	2,82x10 <sup>5</sup>	2,82x10 <sup>7</sup>	0,892	89,20	3,16x10 <sup>5</sup>	100,0	100,0	-
20	1,58x10 <sup>5</sup>	3,17x10 <sup>6</sup>	0,102	2,04	1,55x10 <sup>6</sup>	2,3	11,2	4,9
15	1,58x10 <sup>5</sup>	2,38x10 <sup>6</sup>	0,183	2,75	8,66x10 <sup>5</sup>	3,1	8,4	2,7

Volume x DL<sub>50</sub>  
de total / proteína total

Resultados de rendimento e fator de purificação da segunda cromatografia de troca iônica da etapa de purificação de alta resolução da amostra de toxina botulínica tipo D.

Volume (mL)	DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup>	Toxicidade total <sup>1</sup> (DL <sub>50</sub> )	Concentração de Proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg)	Toxicidade <sup>2</sup> (DL <sub>50</sub> mg <sup>-1</sup> )	Recuperação de proteína (%)	Rendimento (%)	Fator de purificação
5,0	1,58x10 <sup>5</sup>	7,92x10 <sup>5</sup>	0,552	2,76	1,44x10 <sup>6</sup>	100,0	100,0	-
1,0	1,58x10 <sup>4</sup>	1,58x10 <sup>4</sup>	0,119	0,12	1,33x10 <sup>5</sup>	4,3	2,0	0,1
1,2	1,58x10 <sup>4</sup>	1,90x10 <sup>4</sup>	0,286	0,34	5,54x10 <sup>4</sup>	12,4	2,4	0,0

Volume x DL<sub>50</sub>  
Toxicidade total / proteína total

### **5.2.6 Purificação da toxina botulínica pelo processo de precipitação ácida**

Primeiramente, Myiazaki *et al.* (1977) propuseram a precipitação ácida utilizando ácido sulfúrico, seguida da precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de exclusão molecular como etapas chave da purificação da toxina botulínica tipo D. Gregory *et al.* (1996) alteraram o processo introduzindo a etapa de ultrafiltração com corte molecular de 30kDa primeiramente, e etapas consecutivas conforme anteriormente descrito. Neste trabalho, a partir do cultivo do *C. Botulinum* tipo D foram realizadas as etapas de purificação por microfiltração em membrana de clarificação e 0,22 $\mu$ m, concentração por de precipitação ácida e diafiltração em cartucho Hollow Fiber de corte de 30kDa. Em seguida, a amostra foi esterilizada por filtração em membrana PVDF 0,22 $\mu$ m, aliquoteada, rotulada como lote 02 e armazenada sob refrigeração. O resultado do teste de L+ após a diafiltração foi de 10<sup>3</sup>L+/10 mL<sup>-1</sup>. Os resultados de rendimento e fator de purificação estão na Tabela 21.

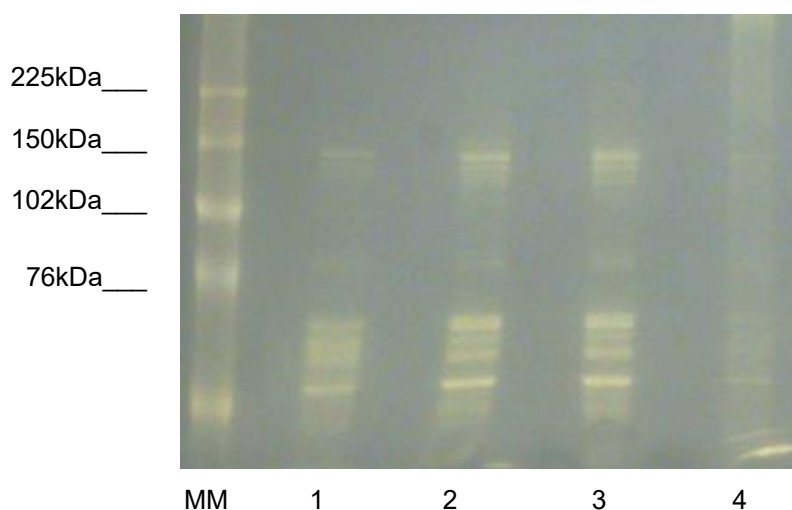
Os resultados apresentados na Tabela 21 mostram que a etapa de precipitação ácida é a etapa mais crítica e responsável pela perda de toxina durante o processo de purificação. Após diafiltração ocorre aumento da toxicidade e o fator de purificação obtido foi de 1,4.

As Figuras 29 e 30 apresentam os perfis eletroforéticos das proteínas das frações das etapas de purificação. O perfil eletroforético não apresenta diferenças importantes entre as etapas de microfiltração, precipitação e diafiltração (**Figura 29**). A Figura 30 mostra o perfil eletroforético comparativo entre as etapas de microfiltração, precipitado da etapa de acidificação e o sobrenadante desta mesma etapa. Assim como no perfil eletroforético número 4 da Figura 29, os perfis 3 e 4 não apresentam bandas em torno de 150kDa. Porém, é possível verificar bandas intensas de massa molar inferior a 76kDa no sobrenadante da etapa ácida.

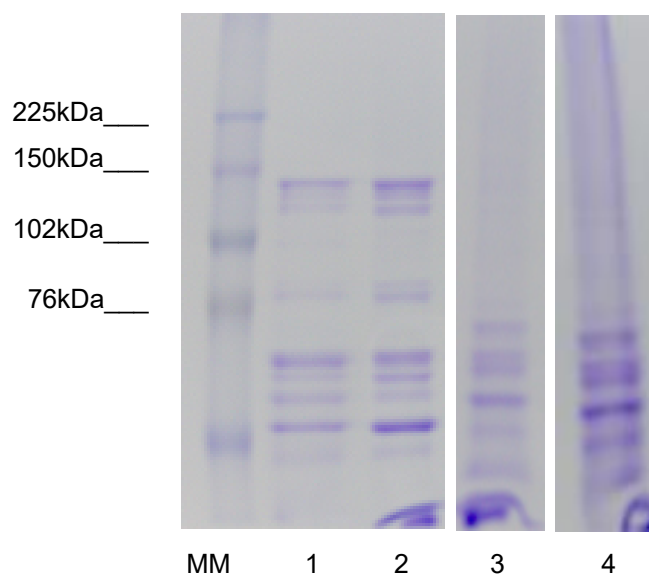
**Resultados de rendimento e fator de purificação após etapas de microfiltração, precipitação ácida e diafiltração a partir do meio de cultivo de *C. botulinum* tipo D.**

Volume (mL)	DL <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup>	Toxicidade total <sup>1</sup> (DL <sub>50</sub> )	Concentração de proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	Proteína total (mg)	Toxicidade <sup>2</sup> (DL <sub>50</sub> mg <sup>-1</sup> )	Recuperação Proteína (%)	Rendimento (%)	Fator de purificação
4000	1,58x10 <sup>6</sup>	6,32x10 <sup>9</sup>	0,351	1404	4,50x10 <sup>6</sup>	-	100	-
1000	1,58x10 <sup>6</sup>	1,58x10 <sup>9</sup>	0,448	448	3,53x10 <sup>6</sup>	31,9	25	0,78
1000	1,58x10 <sup>6</sup>	1,58x10 <sup>9</sup>	0,326	326	4,85x10 <sup>6</sup>	23,2	100	1,4
30000	-*	-	< LQ <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
3900	-*	-	0,069	269	-	19,2	-	-
500	-*	-	0,033	16,5	-	1,2	-	-

<sup>1</sup> DL<sub>50</sub> = volume x DL<sub>50</sub>  
<sup>2</sup> Toxicidade total / proteína total  
<sup>3</sup> quantificação do método de Bradford  
 \* Toxicidade em camundongo positivo



**Figura 29** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) do processo de purificação por precipitação ácida, corado por *comassie blue*: MM – marcador de massa molar; 1 - amostra microfiltrada; 2 - toxina precipitada em meio ácido; 3 - toxina diafiltrada; 4 - resíduo final após centrifugação. Imagem ajustada utilizando o programa Microsoft® Office Picture Manager.



**Figura 30** - Gel de poliacrilamida 7% (SDS-PAGE) das frações do processo de purificação por precipitação ácida, corado por *comassie blue*: 1 – marcador de massa molar; 2 – toxina precipitada em meio ácido; 3 – sobrenadante da precipitação ácida; 4 – sobrenadante da precipitação ácida (amostra concentrada por liofilização). Imagem ajustada utilizando o programa Microsoft® Office Picture Manager.

### **5.2.7 Estudo de estabilidade da toxina botulínica tipo D nas etapas intermediárias do processo de purificação**

A fim de se avaliar a estabilidade da toxina nas etapas intermediárias do processo de purificação foram coletadas amostras após centrifugação, microfiltração e diafiltração. Foi empregada a padronização em nível de teste L+ para o estudo de estabilidade, pois permite uma avaliação do antígeno quanto à sua capacidade de se ligar ao anticorpo específico, avaliando a qualidade da toxina. As amostras foram armazenadas sob refrigeração e avaliadas pelo teste de L+ durante 60 dias.

Os resultados da Tabela 22 mostram que a toxina se manteve estável após os processos de centrifugação, microfiltração, diafiltração em PBS pH 7,0 e em condição ácida pH 3,0, durante dois meses, sem alteração dos resultados dos testes de L+. Contudo, a toxina diafiltrada e armazenada em tampão acetato de amônio pH 8,0 apresentou instabilidade a partir do primeiro mês de armazenagem em que os valores do teste de L+ caíram de  $10^2$  para menor que  $10L+/10\text{ mL}^{-1}$ .

**Tabela 22 - Resultados de L+/10 do estudo de estabilidade da toxina botulínica após etapas de centrifugação, microfiltração e diafiltração pH 7,0 e 8,0 do processo de purificação.**

Amostra	Inicial	1 mês	2 meses
	L+/10 mL <sup>-1</sup> (10 <sup>x</sup> )	L+/10 mL <sup>-1</sup> (10 <sup>x</sup> )	L+/10 mL <sup>-1</sup> (10 <sup>x</sup> )
Centrifugada	2	2	2
Microfiltrada	2	2	2
Diafiltrada pH 3,0	2	2	2
Diafiltrada pH 7,0	2	2	2
Diafiltrada pH 8,0	2	<1	<1

### 5.3 Caracterização da quitosana

Como polímero, as propriedades físicas e químicas da quitosana são determinadas pelo grau de polimerização e pela estrutura da cadeia. O grau de polimerização está relacionado com a distribuição da massa molar enquanto a estrutura da cadeia é definida pela composição química das unidades monoméricas. A estrutura da quitosana pode ser descrita pela fração molar de unidades acetiladas ou desacetiladas, definida pelo grau de acetilação ou de desacetilação. O grau de acetilação (GA) ou de desacetilação (GD) é a porcentagem de unidades monoméricas que estão acetiladas ou desacetiladas, respectivamente. O GD influencia as propriedades físicas, químicas e biológicas, tais como características eletrostáticas, viscosidade, solubilidade, biodegradabilidade, auto-agregação, habilidade quelante de metais e sorção (KIANG *et al.*, 2004; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; YANG *et al.*, 2007). De forma geral, a maioria das quitosanas comerciais apresentam valores entre 70 a 80% de GD. Materiais especiais podem apresentar GD maiores que 95% a partir de processos com várias etapas de desacetilação, o que não só aumenta demasiadamente o custo quanto pode resultar em despolimerização parcial (BALÁZS; SIPOS, 2007; BRUGNEROTTO *et al.*, 2001a).

Nos últimos 50 anos várias técnicas foram empregadas para determinação do GD. Entre os métodos mais utilizados, pode-se ressaltar que a RMN <sup>1</sup>H apresenta alta precisão e pode ser empregada para todos os valores de GD, porém tem um custo mais alto que as demais técnicas (BALÁZS; SIPOS, 2007). Conforme Brugnerotto *et al.* (2001a), a titulação e RMN líquido são métodos válidos somente para amostras perfeitamente solúveis. Mesmo sob estas considerações, Rinaudo (2006) elege RMN <sup>1</sup>H como a técnica mais adequada quando se pretende caracterizar a quitosana. Contudo, sob aspectos pragmáticos, há necessidade de se estabelecer outros métodos para caracterização do GD da quitosana com técnicas mais acessíveis.

Neste trabalho, quitosanas fornecidas pela Sigma-Aldrich, Cognis (Hydagen<sup>®</sup>, Chitopharm<sup>®</sup>) e Polymar foram avaliadas e o GD determinado por RMN <sup>1</sup>H, FTIR,

titulação potenciométrica e espectrofotometria. As análises foram suplementadas por medidas complementares: calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), perda por dessecação, acidez ou alcalinidade, metais pesados, cinzas sulfatadas e cromatografia em permeação em gel (GPC).

### **5.3.1 Titulação potenciométrica**

A Figura 31 mostra as curvas de titulação potenciométrica e suas derivadas primeiras para amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen<sup>®</sup>, Polymar e Chitopharm<sup>®</sup>. Através das inflexões destas curvas, foram determinados os valores V1 e V2, volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de quitosana protonada, respectivamente. A partir da equação 4, foram determinados os valores percentuais do GD, descontando-se da massa pesada o valor de umidade da amostra. No ensaio de perda por dessecação, a umidade média das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen<sup>®</sup>, Polymar e Chitopharm<sup>®</sup> foram de  $6,14 \pm 1,69$ ,  $6,94 \pm 0,36$ ,  $10,31 \pm 0,35$  e  $3,59 \pm 0,18$ %p/p, respectivamente. As análises foram feitas em triplicata e os resultados na Tabela 23 mostram que as quatro amostras apresentam alto grau de desacetilação.

A titulação potenciométrica é um método bastante disseminado devido ao baixo custo de reagente e do equipamento utilizado. Entretanto, foram observadas dificuldades durante o procedimento analítico, tais como o aumento da viscosidade e o recobrimento do eletrodo por uma camada de gel. Isto ocorre a partir de 60 a 70% do volume do segundo ponto de equivalência e influencia consideravelmente no processo de mobilidade do próton resultando em variação da leitura do equipamento durante os primeiros minutos. De forma geral, as titulações potenciométricas apresentam precisão de  $\pm 0,5\%$  (BALÁZS; SIPOS, 2007). Contudo, para análise de quitosana, Jiang *et al.* (2003) afirmaram que a precisão pode ser reduzida devido ao aumento de viscosidade durante a análise, resultando na formação de aglomerados e recobrimento do eletrodo

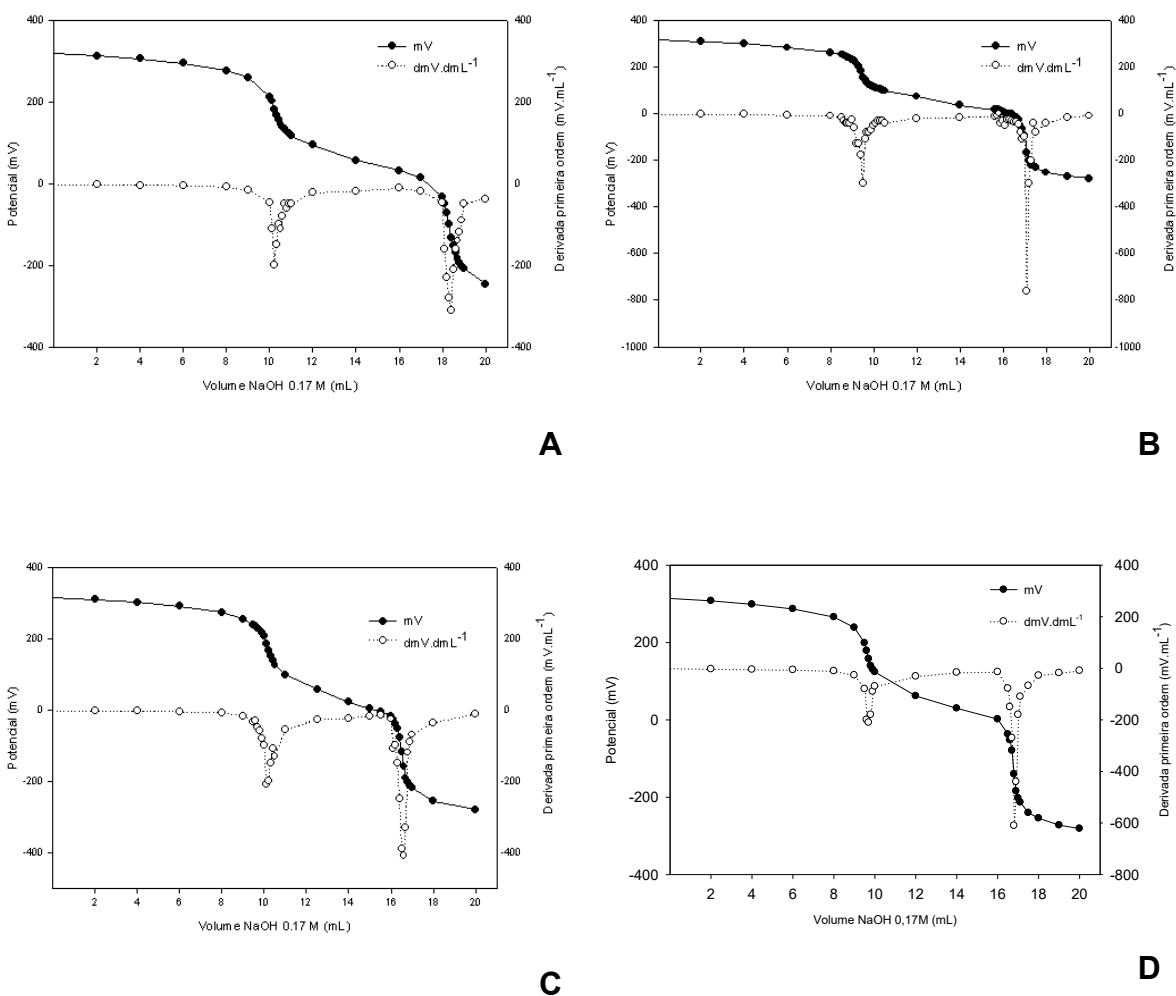
e precipitação do polímero em faixa de pH próxima a neutralidade. Além disso, a presença de contaminantes orgânicos, inorgânicos (BALÁZS; SIPOS, 2007) e a umidade deve ser considerada.

**Tabela 23 - Grau de desacetilação (GD) determinado por titulação potenciométrica das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen®, Polymar e Chitopharm® (n=3).**

Fornecedor	GD (%)	Média (%)	CV(%)
Sigma-Aldrich	76,58	77,66±1,01	1,30
	77,83		
	78,57		
Hydagen®	80,24	78,44±1,56	1,99
	77,46		
	77,62		
Polymar	69,25	68,55±0,79	1,15
	67,69		
	68,70		
Chitopharm®	75,62	75,81±1,12	1,48
	74,79		
	77,01		

A pesquisa de impurezas orgânicas e inorgânicas foi realizada por análises complementares de cinzas sulfatadas, teor de proteína, acidez/alcalinidade e metais pesados. A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos e observa-se alto valor de cinzas sulfatadas para a amostra fornecida pela Polymar, o que significa presença de contaminantes inorgânicos. A análise do pH da suspensão mostra presença de acidez residual na amostra da quitosana Hydagen®, normalmente ácido acético ou ácido clorídrico, e alcalinidade residual nas amostras fornecidas pela Sigma-Aldrich, Polymar e Chitopharm®. Todas as amostras apresentaram valores residuais de metais pesados abaixo de 40µg.g<sup>-1</sup> e, portanto, estão satisfatórias para aplicações farmacêuticas

(BALÁZS; SIPOS, 2007, EUROPEAN ..., 2004). O valor obtido para proteína total está abaixo da sensibilidade do método de Lowry para as três amostras. Porém, o alto valor do resultado de resíduo após incineração e a coloração fortemente amarelada da amostra fornecida pela Polymar demonstram menor purificação. As impurezas presentes podem interferir na análise por titulação potenciométrica aumentando o erro.



**Figura 31** - Curva de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para amostras de quitosana fornecidas pela Sigma-Aldrich (A), Hydagen® (B), Polymar (C) e Chitopharm® (D).

**Tabela 24 - Resultados de cinzas sulfatadas, proteína total, acidez/alcalinidade e metais pesados das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen<sup>®</sup>, Polymar e Chitopharm<sup>®</sup> (n=3).**

Análise	Sigma-Aldrich	Hydagen <sup>®</sup>	Polymar	Chitopharm <sup>®</sup>
Cinzas sulfatadas (%p/p)	1,44±0,006	0,93±0,035	4,09±0,18	0,16±0,035
Proteína total (mg.g <sup>-1</sup> )	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Acidez/ Alcalinidade (pH)	7,43	6,25	7,97	7,19
Metais pesados (µg.g <sup>-1</sup> )	<40	<40	<40	<40

### **5.3.2 Espectrofotometria na região ultra-violeta (UV)**

A quitosana é composta de dois grupos cromóforos, a N-acetilglucosamina e a glucosamina. Considerando que não há evidências de qualquer interação entre as cadeias internas do polímero que possa afetar a absorção da radiação ultra-violeta, as contribuições das unidades monoméricas podem ser consideradas simplesmente aditivas para o valor de absorvância total (LIU *et al.*, 2006).

A fim de determinar a concentração da amostra a ser analisada, primeiramente foi determinada a faixa de linearidade do método para as amostras em análise. A linearidade foi satisfatória no intervalo de concentração de  $11 \times 10^{-2}$  a  $19 \times 10^{-2}$  mg.mL<sup>-1</sup> para amostras Sigma-Aldrich ( $R^2 = 0,994$ ), Hydagen<sup>®</sup> ( $R^2 = 0,996$ ) e Chitopharm<sup>®</sup> ( $R^2 = 0,997$ ) e de  $9 \times 10^{-2}$  a  $13 \times 10^{-2}$  mg.mL<sup>-1</sup> para amostra de quitosana da Polymar ( $R^2 = 0,995$ ).

As análises foram feitas em triplicata e o valor do GD foi obtido pela equação 5. O GD determinado por espectrofotometria UV das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen®, Polymar e Chitopharm® foi de  $82,23 \pm 0,29$ ,  $84,38 \pm 0,07$ ,  $78,37 \pm 0,03$  e  $82,88 \pm 0,21\%$ , respectivamente.

O método espectrofotométrico por UV é bastante simples e rápido. Mas, deve ser empregado com restrição para amostras com baixo GD, devido à baixa solubilidade e interferência de proteína contaminante presente. Outra restrição foi observada durante o procedimento da amostra fornecida pela Polymar que apresentou material em suspensão, mesmo após 8h de agitação. Por isso, foi necessário filtrar o material antes da leitura.

### **5.3.3 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)**

A espectroscopia na região do infravermelho é uma das técnicas mais empregadas para determinação do grau de desacetilação, apresentando as vantagens de ser precisa, rápida e não destrutiva (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001a).

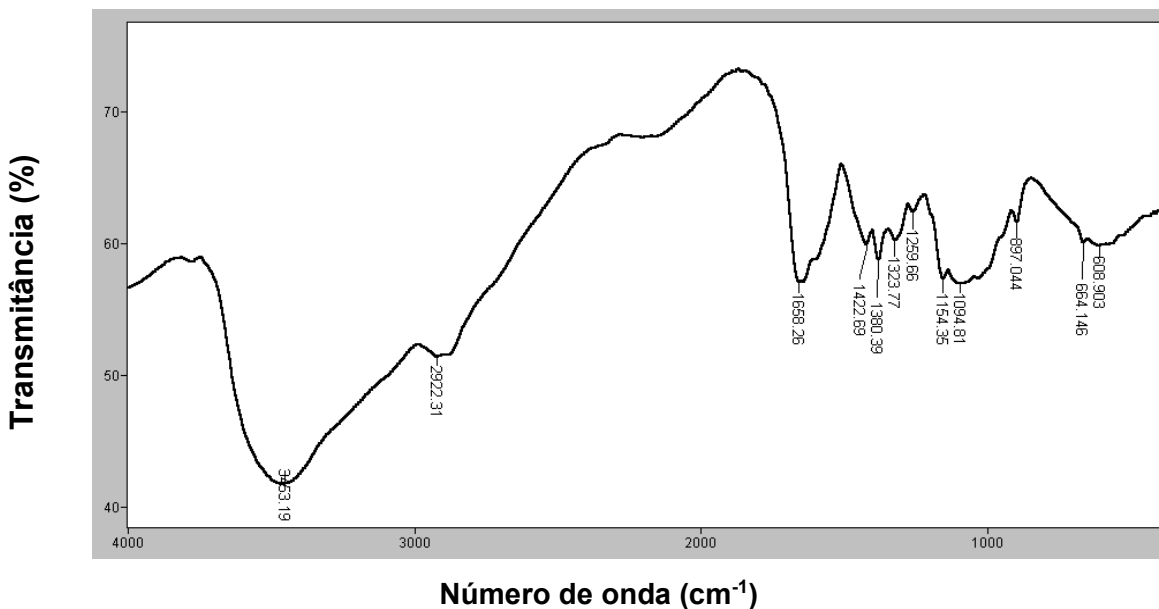
A Tabela 25 apresenta as principais bandas de absorção no infravermelho das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen®, Polymar e Chitopharm® em coerência com os dados apresentados por Canella; Garcia (2001), Costa Júnior; Mansur (2008), Duarte *et al.* (2002) e Shigemasa *et al.* (1996). Não foram observadas diferenças importantes entre os espectros obtidos das quatro amostras. A Figura 32 apresenta o espectro da quitosana Chitopharm®.

**Tabela 25 - Relação de bandas de absorção da quitosana no infravermelho.**

Bandas (cm <sup>-1</sup> )	Grupos
3600-3200	vOH ligado vNH <sub>2</sub>
2930	vCH (assimétrico)
2881	vCH (simétrico)
1655	vC=O de amida I
1596	δN-H de aminas
1550	δN-H de amida II
1425-1420	δOH e CH <sub>2</sub>
1379-1377	δCH <sub>3</sub>
1340-1250 1379	δC-N (terciária)
1324-1321	vC-N (primário)
1300-1000	vC-O cíclico
1160-1154 898-896	δC-O-C (glicose-β-1-4)
1100-1070	vC-OH anel e grupos COC e CH <sub>2</sub> OH
1030	δC-O-C

v = estiramento ou deformação axial, δ = deformação ou deformação angular

Ainda não há um consenso com relação à seleção dos picos que apresentam maior precisão para estimar os valores do grau de desacetilação. Alguns fatores influenciam na seleção do pico de referência: fonte e método de purificação, a presença de água adsorvida e o grau de acetilação. As bandas de referência mais comuns incluem: deformação de O-H em 3450cm<sup>-1</sup> (DOMARD; RINAUDO, 1983; DUARTE *et al.*, 2002); deformação de C-H dos grupos -CH<sub>2</sub>OH e -CH<sub>3</sub>, em 2877cm<sup>-1</sup> (DUARTE *et al.*, 2002) e deformação de C-O dos grupos C-OH, C-O-C, -CH<sub>2</sub>OH em 1159, 1074 e 1025cm<sup>-1</sup> (DUARTE *et al.* 2002).



**Figura 32 - Espectro na região do infravermelho da quitosana Chitopharm®.**

Alguns trabalhos mostram que não é significativo o efeito da água adsorvida no polímero sobre a intensidade da banda de estiramento O-H a  $3463\text{cm}^{-1}$ . Porém, a presença de água aumenta a banda em  $1640\text{cm}^{-1}$  e interfere na banda da amida I. Também, em amostras de quitosana, ocorre o desaparecimento da banda de amida II de resíduos acetilados (SHIGEMASA *et al.*, 1996). Deste modo, optou-se pelas bandas sugeridas por Brugnerotto *et al.* (2001a,b),  $1420\text{cm}^{-1}$  e  $1320\text{cm}^{-1}$ , uma vez que em uma ampla faixa de desacetilação (>95% a <5%) não apresentam nenhuma alteração em sua intensidade. Além disso, de acordo com o autor são mais estáveis independentes da técnica, estados ou estrutura secundária. Esta foi a primeira vez que a banda de  $1320\text{cm}^{-1}$  foi usada como banda de referência e foi atribuída como característica dos grupos OH,  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{CO}$ . Os valores de GD foram calculados utilizando a equação 6 e estão apresentados na Tabela 26.

**Tabela 26 - Grau de desacetilação (GD) determinado por análise no infravermelho das amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen<sup>®</sup>, Polymar e Chitopharm<sup>®</sup>.**

<b>AMOSTRA DE QUITOSANA</b>	<b>GD(%)</b>
Sigma-Aldrich	82,04±0,16
Hydagen <sup>®</sup>	81,08±0,02
Polymar	81,64±0,06
Chitopharm <sup>®</sup>	80,94±0,30

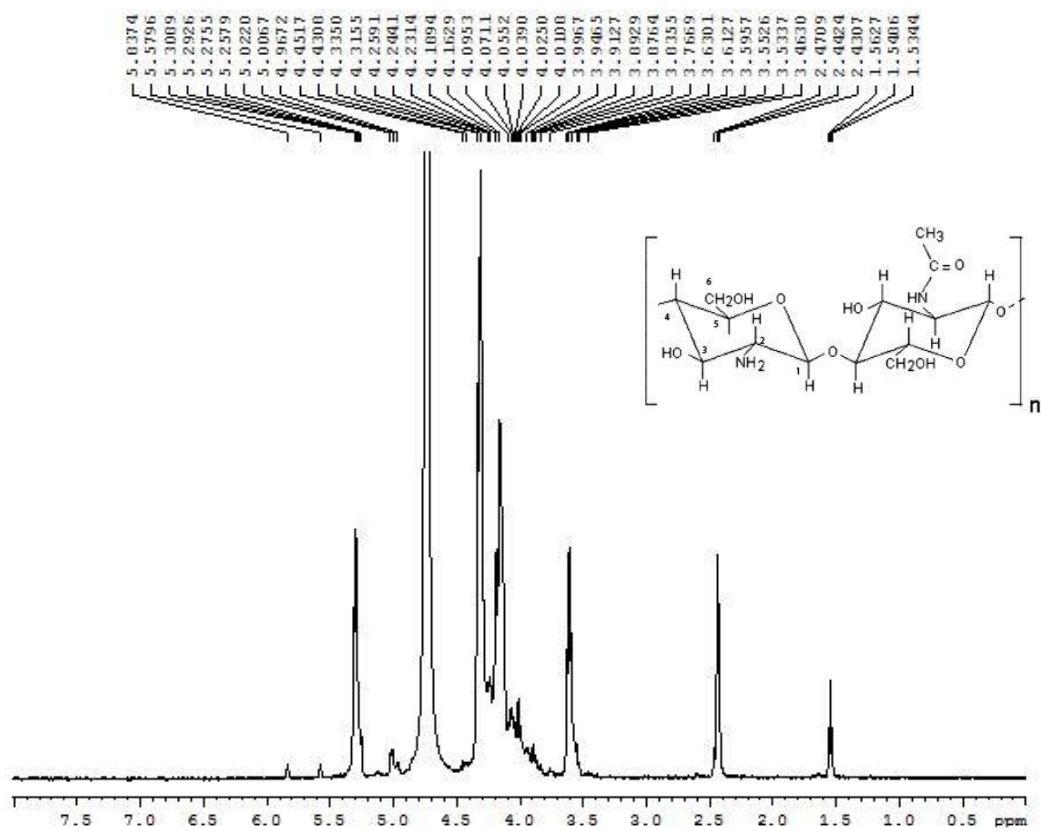
### **5.3.4 Análise de quitosana por RMN <sup>1</sup>H**

A Figura 33 mostra o espectro de RMN <sup>1</sup>H e atribuição dos sinais obtidos para a amostra Sigma-Aldrich a 70°C seguindo procedimento adaptado de Brugnerotto *et al.*, (2001b) e Lavertu *et al.* (2003). O grau de desacetilação foi calculado conforme equação 7 e obteve-se valores de 83,04%, 81,85% e 76,47% para amostras de quitosana da Sigma-Aldrich, Hydagen<sup>®</sup> e Polymar, respectivamente.

Com a finalidade de determinar as condições mínimas de operação para uma boa resolução do espectro, a amostra Sigma-Aldrich foi submetida a análises a temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C (**Figura 34**). Pode-se observar que a elevação da temperatura de análise melhora a resolução dos picos. Contudo, sob condições a 35°C foi possível verificar o aparecimento do sinal referente ao hidrogênio H1 na faixa de 5,0-5,1ppm. A análise das amostras foi realizada a 35°C e apresentou valores de GD de 82,85, 82,15, 78,01, 78,06% para amostras de quitosana Sigma-Aldrich, Hydagen<sup>®</sup>, Polymar e Chitopharm<sup>®</sup>, respectivamente.

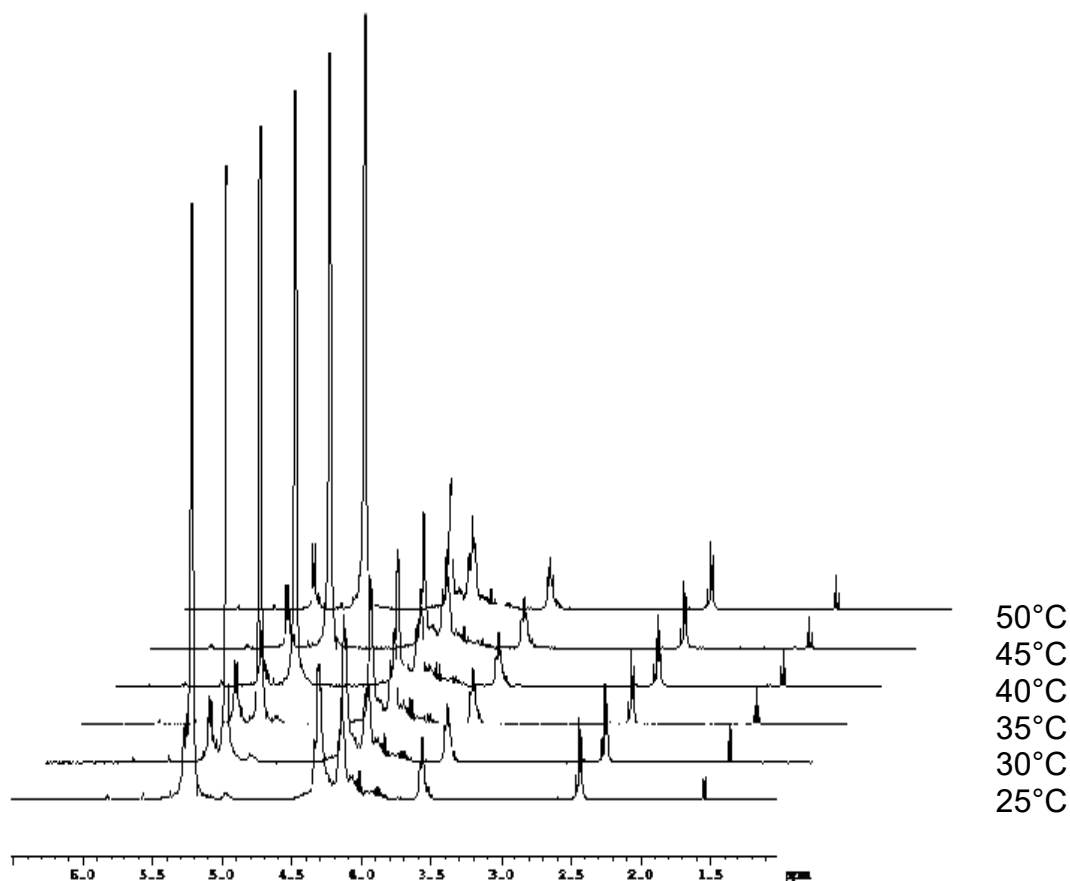
Comparando-se os resultados obtidos pelas técnicas de titulação potenciométrica, UV, IV e RMN <sup>1</sup>H verifica-se que a maior variação do resultado do GD entre as técnicas ocorreu na titulação potenciométrica. Entre as demais técnicas há boa concordância entre os resultados, ou seja, o valor do GD médio para as amostras de quitosana da

Sigma-Aldrich, Hydagen<sup>®</sup>, Polymar e Chitopharm<sup>®</sup> foi de  $82,54 \pm 0,53$ ,  $82,37 \pm 1,42$ ,  $78,62 \pm 2,17$  e  $79,93 \pm 2,27$  respectivamente, e o CV foi menor que 2,84%.



RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O + DCI, 500MHz) δppm: 5,2 (d, J = 8,15Hz, H1, 1H); 5,0 (d, J = 7,65, H1a, 1H); 4,6-4,8 (sl, H2O); 3,8-4,3 (m, H2a, H3, H4, H5, H6, 6H); 3,6 (t, J = 17,2Hz, H2, 1H); 2,4 (s, H8, 3H).

**Figura 33** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H obtido para a amostra de quitosana Sigma-Aldrich (500MHz, D<sub>2</sub>O + DCI, 70°C).



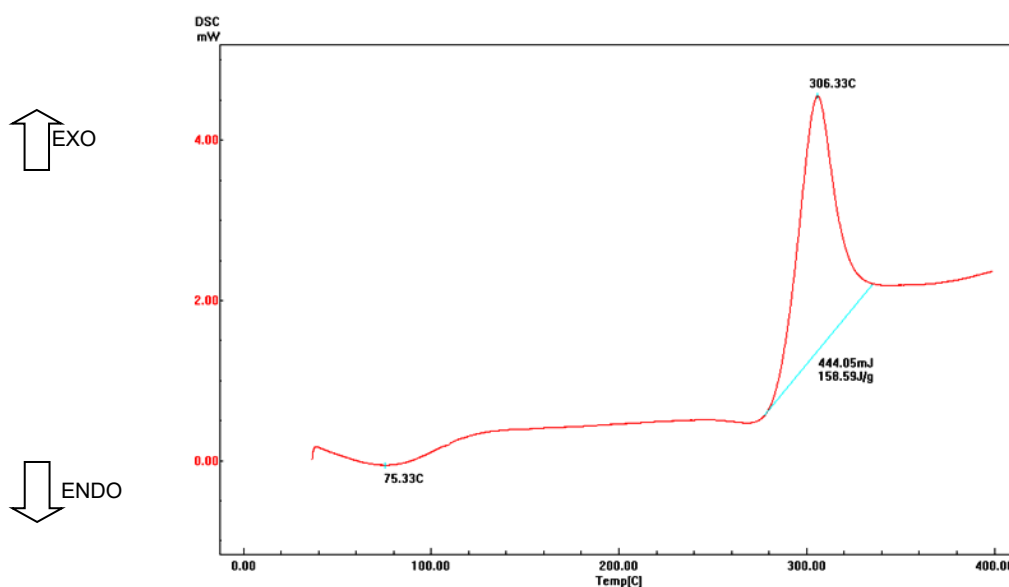
**Figura 34** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H da quitosana Sigma-Aldrich em temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 50°C (500MHz, D<sub>2</sub>O + DCI).

### **5.3.5 Análise calorimétrica**

Uma vez que a DSC é uma técnica de análise térmica bastante utilizada para a obtenção de informações sobre as temperaturas de transição dos materiais como a temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>), a temperatura de cristalização (T<sub>c</sub>) e a temperatura de fusão cristalina (T<sub>m</sub>), foram realizados ensaios de DSC sob razões de aquecimento de 5, 10 e 20°C min<sup>-1</sup> em atmosfera dinâmica de nitrogênio. As amostras (aproximadamente 3,0mg) foram pesadas em cadinhos (porta-amostras) de alumínio hermeticamente fechados contendo um furo. Tal avaliação foi necessária, porque a razão de aquecimento influencia significativamente no aspecto qualitativo da curva de DSC, pois razões de

aquecimento maiores levam a uma menor definição e poderiam induzir uma sobreposição de eventos térmicos sucessivos. Por outro lado, razões menores tornam o experimento demorado. Apesar da semelhança nos perfis das curvas de DSC, foi selecionada a razão de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  como a mais adequada para estudo envolvendo as quitosanas devido ao perfil mais bem definido das curvas em relação aos  $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$  e ao menor tempo de análise em relação aos  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Os resultados obtidos do segundo ciclo de aquecimento das amostras encontram-se ilustrados nas Figuras 35 a 38. As curvas apresentam eventos térmicos característicos que mudam de temperatura e altura de acordo com a razão de aquecimento. O pico exotérmico devido ao resíduo de N-acetilglicosamina que ocorre em torno de  $400^{\circ}\text{C}$  não é observado em amostras de quitosana devido à baixa quantidade de grupos acetilas (GUINESI; CAVALHEIRO, 2006).



**Figura 35** - Perfil térmico obtido por DSC da amostra de quitosana fornecida pela Sigma-Aldrich, sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$ .

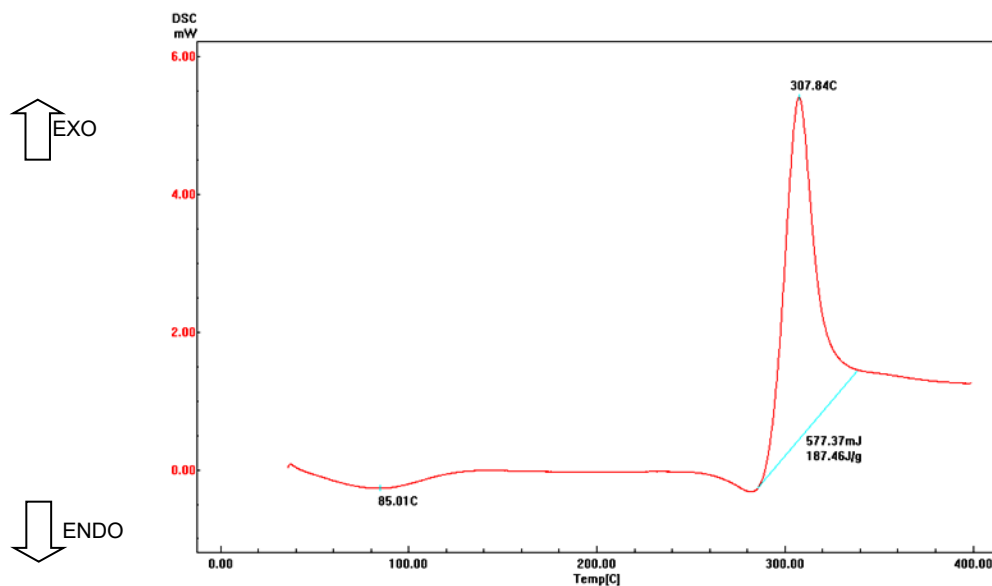


Figura 36 - Perfil térmico obtido por DSC da amostra de quitosana Hydagren<sup>®</sup>, sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>.

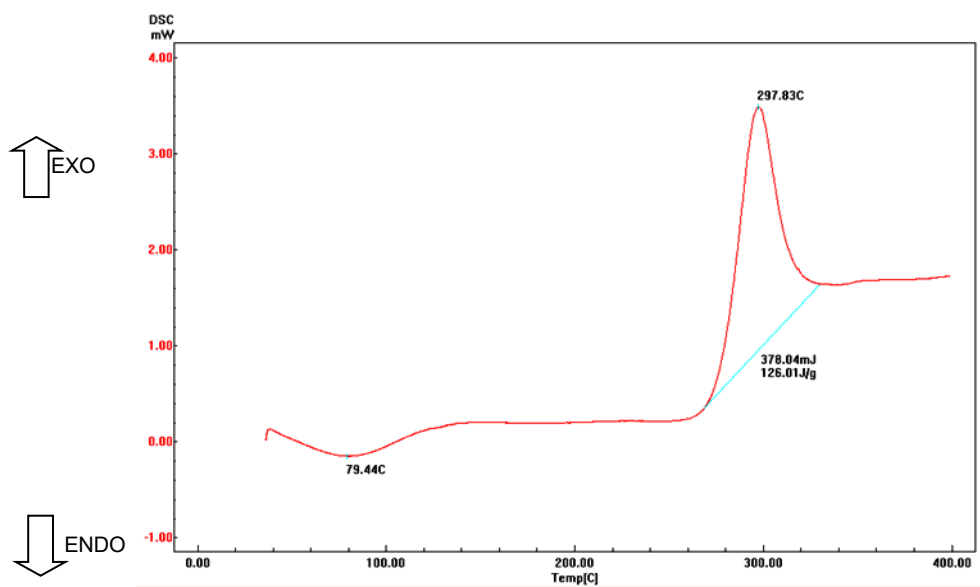
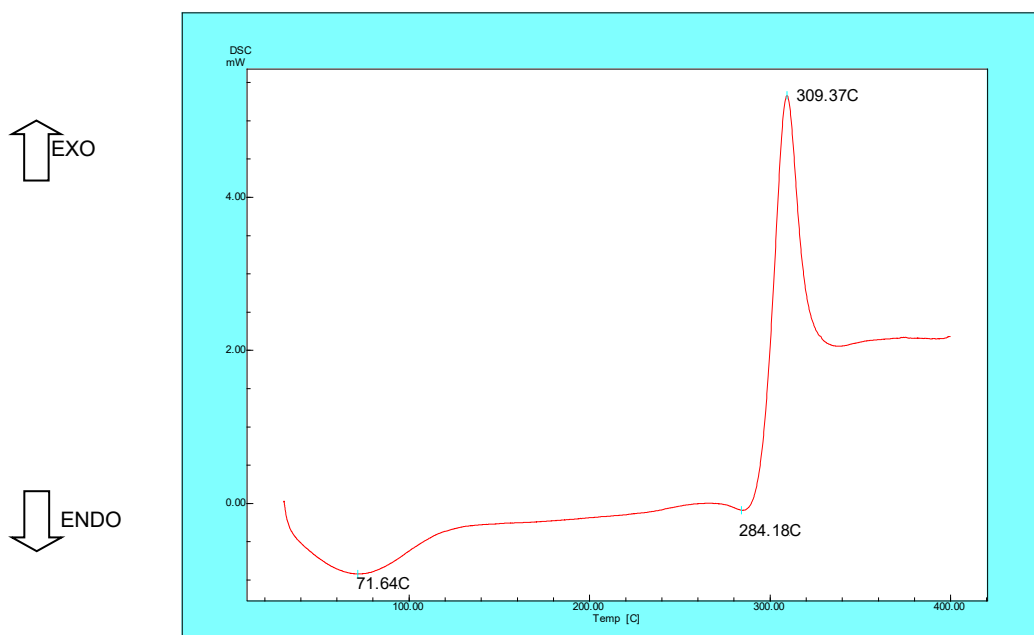


Figura 37 - Perfil térmico obtido por DSC da amostra de quitosana fornecida pela Polymar, sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>.



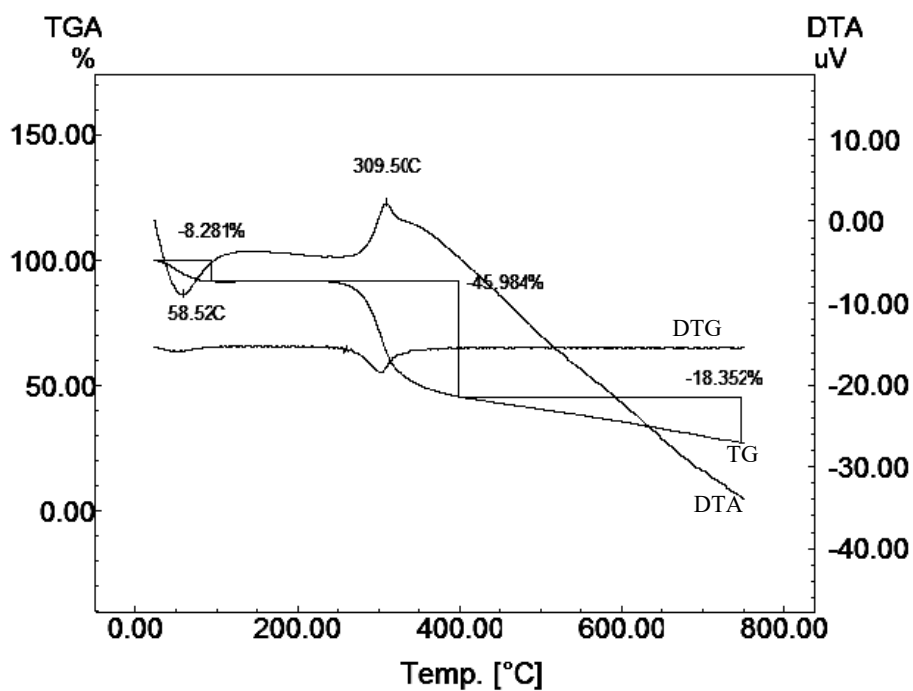
**Figura 38 - Perfil térmico obtido por DSC da amostra de quitosana Chitopharm<sup>®</sup>, sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>.**

A temperatura de transição vítrea,  $T_g$ , é uma propriedade do material na qual ocorre a passagem do estado rígido para um estado flexível ou elastomérico, sem ocorrência de uma mudança estrutural. A parte amorfa do material, na qual as cadeias moleculares estão desordenadas é responsável pela caracterização da  $T_g$ . Na análise por DSC, a temperatura de transição vítrea de um material pode ser visualizada por uma mudança na linha base. Uma vez que a presença de água nas amostras interfere na visualização da temperatura de transição vítrea dos materiais (SAKURAI; MAEGAWA; TAKAHASHI, 2000), foram realizados dois ciclos de aquecimento e resfriamento com as amostras, sendo considerados apenas os segundos para análise dos eventos térmicos. Conforme confirmado pelo trabalho de Quijada-Garrido *et al.* (2007), a  $T_g$  em amostra pura de quitosana não é característica e o que pode gerar confusão é considerar a eliminação de água mais fortemente associada à estrutura do polímero como o valor de  $T_g$ . Isto pode ser verificado nas Figuras 35 a 38. Por exemplo, a uma razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , os eventos endotérmicos a 75,33, 85,01, 79,44 e 71,64 $^{\circ}\text{C}$  para as amostras da Sigma-Aldrich, Hydagen<sup>®</sup>, Polymar e Chitopharm<sup>®</sup> respectivamente, provavelmente são

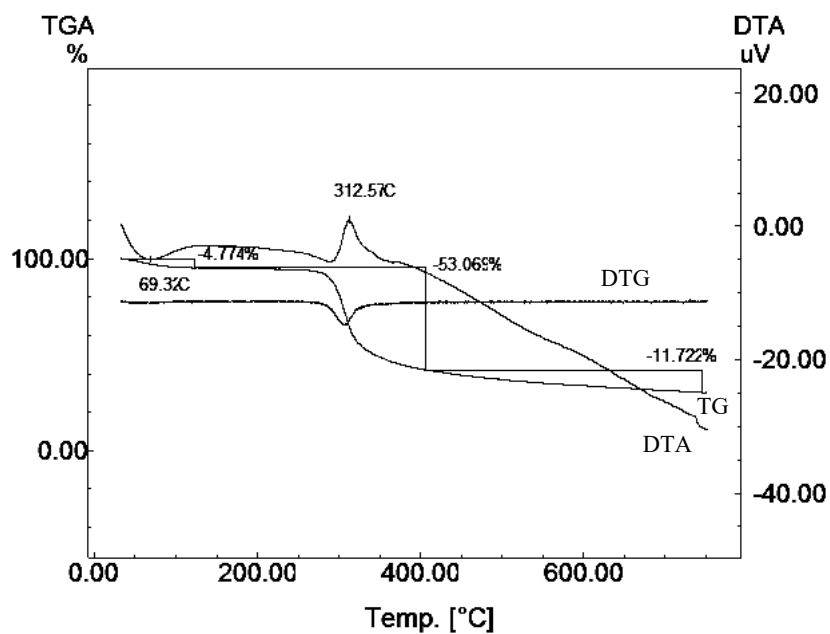
devidos a eliminação de água. Há diversos dados controversos na literatura com relação a Tg da quitosana. De acordo com Santos *et al.* (2003) a Tg da quitosana apresentou indícios de ocorrer a 33°C. Segundo Sakurai, Maegawa e Takahashi (2000), esta mesma variável foi determinada em 203°C e Argin-Soysal, Kofinas e Lo (2009) atribuíram valor de 148°C. Este fato pode ser explicado porque a quitosana é um polímero semi-cristalino devido a fortes ligações de hidrogênio inter e intramoleculares que estabilizam o polímero e, além disso, apresenta certa rigidez mesmo em sua fase amorfa devido a unidades heterocíclicas. Em consequência, quando a quitosana é aquecida dentro de certa faixa abaixo da temperatura de decomposição, as variações térmicas próximas a Tg são provavelmente muito pequenas para serem detectadas pela técnica de DSC (WAN *et al.*, 2009).

O segundo evento térmico ocorreu entre 297,83 a 309,37°C para as quatro amostras de quitosana e deve estar associado à degradação do material, conforme também demonstram as curvas termogravimétricas (**Figuras 39 a 42**) (GUINESI; CAVALHEIRO, 2006). Ressalta-se o menor valor ocorreu para amostra fornecida pela Polymar e que portanto a degradação do material deve ocorrer em temperatura mais baixa para este material.

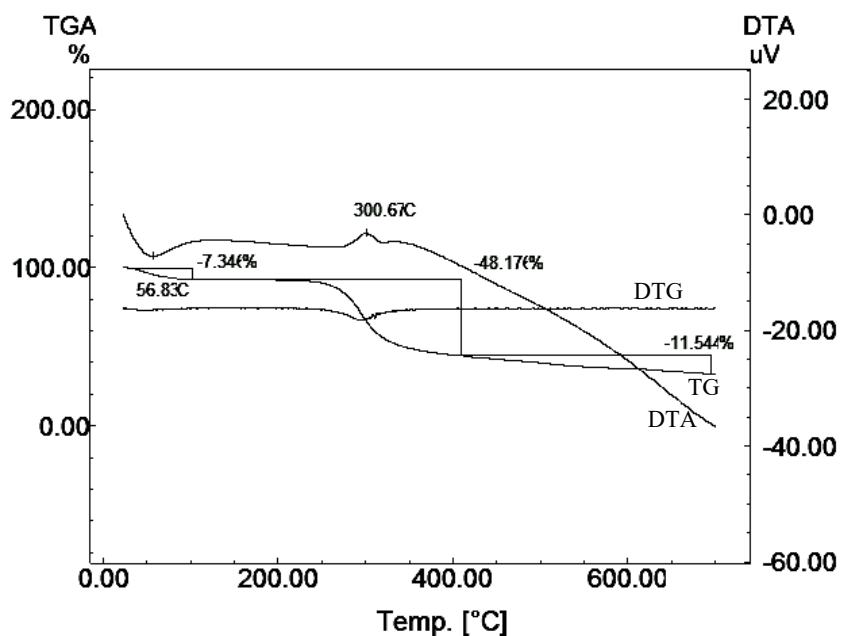
O principal uso da TG na caracterização de polímeros está no estudo da estabilidade e decomposição térmica dos mesmos. Supondo-se que a degradação térmica das quitosanas pudesse apresentar comportamentos diferenciados quanto às suas decomposições térmicas, foram realizados ensaios de análise termogravimétrica com as mesmas. As amostras, de aproximadamente 5mg, foram pesadas em suporte de platina e analisadas sob razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>. As Figuras 39, 40, 41 e 42 mostram os resultados obtidos das análises de TG para as quatro amostras de quitosana.



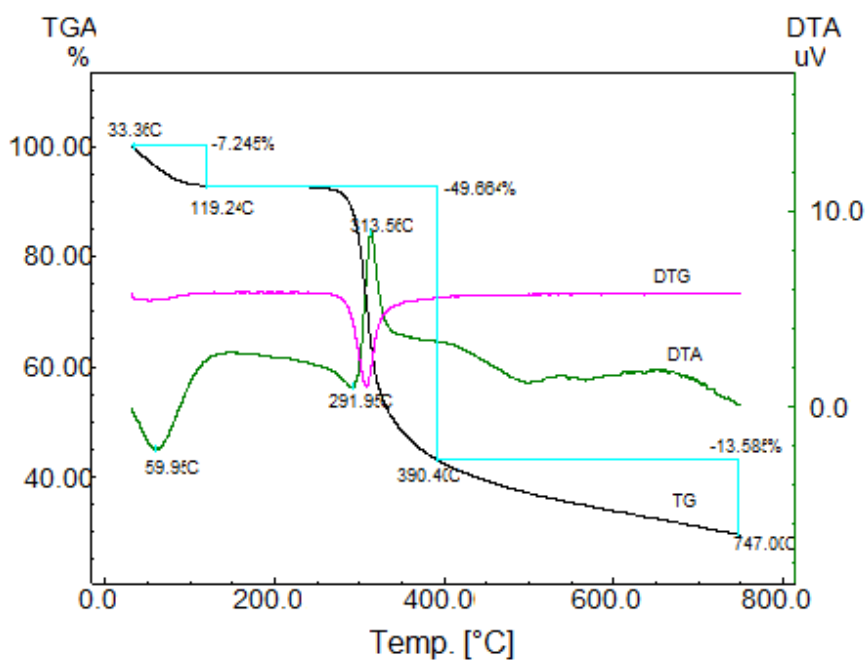
**Figura 39** - Curva termogravimétrica da amostra de quitosana fornecida pela Sigma-Aldrich, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.



**Figura 40** - Curva termogravimétrica da amostra de quitosana Hydagen®, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.



**Figura 41 - Curva termogravimétrica da amostra de quitosana fornecida pela Polymar, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.**



**Figura 42 - Curva termogravimétrica da amostra de quitosana Chitopharm®, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.**

Utilizando espectrômetro de massa acoplado ao equipamento, Quijada-Garrido *et al.* (2007) descreveram cinco etapas de degradação do polímero. Contudo, de forma mais simples, pode-se resumir a degradação da quitosana em três estágios distintos. O primeiro referente à perda de água residual da amostra. O segundo, referente à degradação da amostra propriamente dita, e por último, à decomposição e carbonização (TORRES *et al.*, 2005). A água eliminada pode ter duas diferentes origens, da adsorção e ligação da mesma por ligações de hidrogênio ao polímero, ou ser resultado de uma reação de eliminação,  $\text{NH}_3^+ \cdot \text{OOC}-\text{CH}_3 \xrightarrow{80-100^\circ\text{C}} \text{-NH-OC-CH}_3 + \text{H}_2\text{O}$ . No primeiro estágio, que ocorre na faixa de temperatura de 56 a 69°C, é possível verificar que a amostra Sigma-Aldrich, Polymar e Chitopharm<sup>®</sup> apresentaram maior perda de massa em relação à amostra Hydagen<sup>®</sup>, ou seja, 8,3%, 7,3%, 7,5% e 4,8%, respectivamente. Enquanto a curva DTA mostra um evento endotérmico que é coerente com a desidratação. O segundo e mais importante estágio de decomposição ocorreu na faixa de temperatura de 300 a 314°C estando envolvidos, a partir deste estágio, processos como desidratação, despolimerização e decomposição pirolítica, os quais resultam da transformação da estrutura polissacarídea em compostos mais simples como a água, o monóxido de carbono, o dióxido de carbono, o metano, a amônia e outros fragmentos do anel glicosamínico (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). Essa perda de massa na TG ocorre juntamente com um pico exotérmico na DTA. Coerente com os resultados de DSC, a amostra da Polymar apresentou menor estabilidade (300,67°C). No terceiro estágio, observa-se que não ocorreram decomposição e carbonização completas do material mesmo a temperatura acima de 700°C (SANTOS *et al.*, 2003). Os fluxos de massa perdidos das quatro amostras apresentaram comportamentos similares e valores de perda de massa total entre 67 a 72,6%.

### **5.3.6 Cromatografia em Permeação em Gel avançado (GPC avançado)**

A cadeia de um polímero é formada pela adição de uma grande quantidade de monômeros durante a polimerização. Cadeias com diferentes comprimentos são formadas e, portanto, uma distribuição de comprimentos de cadeia é obtida. Além disso, polímeros naturais podem apresentar variações maiores em sua massa molar devido aos processos de extração e purificação. Conseqüentemente, não é possível obter um valor único e definido para a massa molar do polímero, sendo este calculado baseado numa média das massas molares da distribuição.

Através da técnica de GPC acoplado a três detectores, índice de refração, viscosímetro e *light scattering*, foi possível obter os valores de massa molar das amostras de quitosana utilizando o *software* OmniSEC que promove a interação algorítmica para correlacionar os dados obtidos pelos três detectores (CANEVAROLO JÚNIOR, 2004; CARLSON *et al.*, 1999).

As propriedades mecânicas e o comportamento do polímero durante o processamento são altamente dependentes do tamanho médio e da distribuição de comprimentos das cadeias do polímero. Embora a estrutura química do polímero seja igual, massas molares diferentes podem mudar completamente as propriedades do polímero (propriedades físicas, mecânicas, térmicas, reológicas, de processamento outras), e por esta razão, os polímeros são caracterizados principalmente por sua massa molar.

A Tabela 27, resume os valores de massa molar numérica média ( $M_n$ ), massa molar ponderal média ( $M_w$ ), massa molar z média ( $M_z$ ), índices de polidispersividade ou de polidispersão ( $Q$ ,  $Q'$ ). Os valores obtidos para  $M_n$  e  $M_w$  estão congruentes com o trabalho de Canella & Garcia (2001) que encontraram valores de massa molar média de quitosana entre  $10^5$ - $10^6$ g.mol<sup>-1</sup>. Os resultados aqui apresentados são mais confiáveis porque são obtidos valores absolutos.

**Tabela 27 - Distribuição de massas molares médias  $M_n$ ,  $M_w$  e  $M_z$  e dos valores de Q e Q' de quitosanas de diferentes marcas comerciais utilizando a técnica de GPC realizada em um TDA 302 – Triple Detector Array (detectores de índice de refração, viscosímetro e *ligh scattering*) calculadas pelo software Viscotek OmniSEC V.4.1.0.224 (n=2).**

Quitosana	$M_n$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$M_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$M_z$ (g.mol <sup>-1</sup> )	Q	Q'
Sigma-Aldrich	88283±15667	159918±6407	316805±7336	1,81	1,98
Hydagen®	140340±2021	167133±361	225572±1492	1,19	1,35
Polymar	47628±2432	115581±6407	625215±60511	2,13	5,41
Chitopharm®	138665±5351	175129±1396	256245±11872	1,26	1,46

O valor da massa molar numérica média ( $M_n$ ) indica o número de pontas soltas das cadeias capaz de exercer efeito considerável sobre as propriedades mecânicas, como a resistência à tração. As propriedades volumétricas relacionadas a grandes deformações tal como viscosidade da solução são dominadas pela massa molar ponderal média ( $M_w$ ). A presença de ligações cruzadas tem um efeito pronunciado nos valores determinados nos ensaios para avaliação dessas propriedades. Por sua vez, o valor da massa molar z média ( $M_z$ ) está associado a propriedades viscoelásticas típicas (AKCELRUD, 2007).

De acordo com a Tabela 27, a quitosana fornecida pela Hydagen® e Chitopharm® apresenta os melhores índices de Q e Q'. Quanto mais próximos de 1,0 os valores de Q e Q' o polímero apresenta mais uniforme ou monodispersão. Dessa forma, pode-se esperar propriedades físicas mais uniformes, desempenho mais homogêneo e reprodutibilidade entre ensaios deste material quando comparado aos demais. Por outro lado, os valores de Q e Q' da quitosana Polymar são muito altos, ou seja, na amostra existe uma cauda de baixa massa molar (valor alto de Q) e outra cauda ainda maior devido à presença de cadeias de alta massa molar (valor muito alto de Q').

### **5.3.7 Avaliação geral dos resultados de caracterização**

A utilização da quitosana está associada com as suas propriedades funcionais e atividades biológicas que estão primariamente governadas pelas suas propriedades estruturais, massa molar e grau de desacetilação. Contudo, quitosanas comerciais apresentam diferentes características a depender da origem ou dos métodos de produção e extração (ARCA; GÜNBEYAZ; SENEL, 2009; KASAAI, 2010). Esse fato justifica a necessidade da caracterização do material a fim de definir sua aplicação e as propriedades do produto final, tais como a atividade antimicrobiana, mucoadesão e formação de compósitos (GAN *et al.*, 2005; KASAAI, 2010; KEAN; THANOU, 2010; MACLAUGHLIN *et al.*, 1998; MAO; SUN; KISSEL, 2010; ROMØREN *et al.*, 2003)

A caracterização da quitosana é passo inicial para definição da sua aplicação e para reprodutibilidade das propriedades de um derivado ou produto final. As diversas técnicas aqui apresentadas permitiram acessar as mais importantes características das amostras estudadas visando à aplicação farmacêutica do polímero.

A identificação das amostras foi realizada por IV e RMN H<sup>1</sup> através da atribuição de bandas e picos relacionados à estrutura. O grau de desacetilação (GD) foi coerente entre as técnicas titulação, IV, UV e RMN H<sup>1</sup> e os resultados médios obtidos apresentaram variação menor que 5%, entre 78,62 a 82,54%, para as quatro quitosanas analisadas. A presença de contaminantes nas amostras foi avaliada, sendo que, contaminantes inorgânicos foram analisados por cinzas sulfatadas, proteínas residuais por método de micro-Lowry, chumbo por ensaio limite de metais pesados e alcalinidade/acidez residual por medida do pH da suspensão. A quitosana Polymar apresentou resultado de cinzas sulfatadas muito alto, o que evidencia presença de resíduos inorgânicos. A quitosana Chitopharm<sup>®</sup> apresentou menor resíduo de cinzas sulfatadas o que indica maior pureza. Entre as quatro amostras, não houve diferença nos resultados encontrados para resíduos de proteínas e metais pesados. A análise de acidez/alcalinidade revelou provável diferença entre os processos de purificação e os resultados de pH variaram

entre 6,25 a 7,97, para quitosanas Sigma-Aldrich e Hydagen<sup>®</sup>, respectivamente. A estabilidade do material, que pode ser afetada pela presença de contaminantes, foi avaliada por análises calorimétricas e os resultados obtidos de TG sugerem diferenças de estabilidade térmica entre as quatro amostras estudadas, sendo que o material de maior estabilidade foi a quitosana Chitopharm<sup>®</sup>.

A massa molar (Mw) da quitosana é importante requerimento capaz de influenciar o tamanho das partículas (GAN *et al.*, 2005; KASAAI, 2010; KEAN; THANOU, 2010; MAO; SUN; KISSEL, 2010; ROMØREN *et al.*, 2003). Os resultados obtidos de distribuição das massas molares médias por GPC avançado mostraram que as amostras Polymar e Sigma-Aldrich apresentaram menor uniformidade.

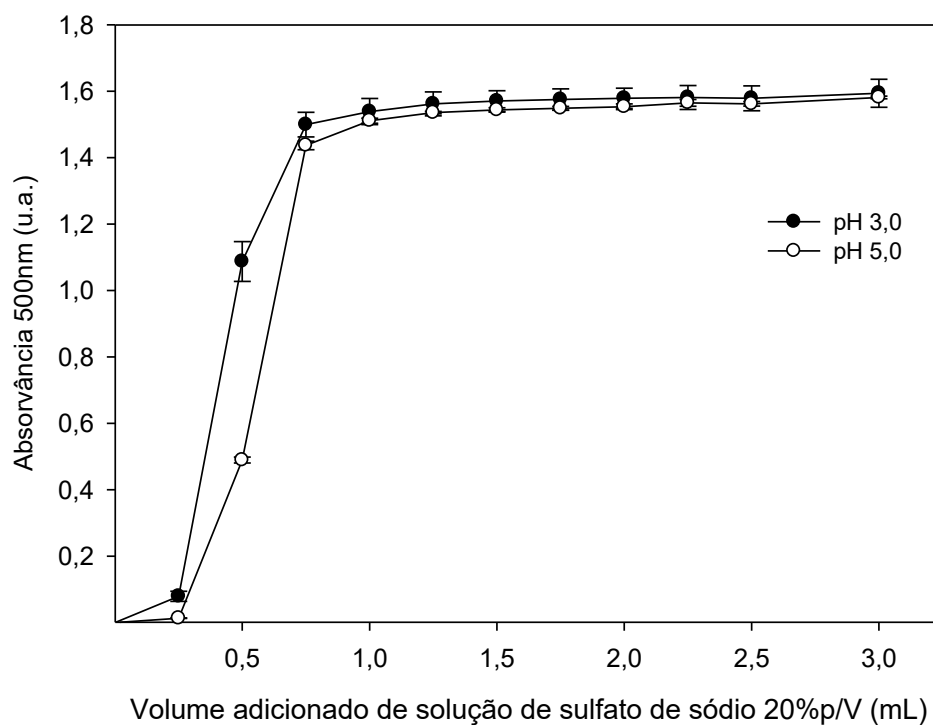
Portanto, considerando os resultados de caracterização, utilizando o grau de pureza como critério principal, optou-se pela utilização do polímero Chitopharm<sup>®</sup> para continuidade dos estudos deste trabalho.

## **5.4 Obtenção de micropartículas de quitosana por precipitação com sulfato de sódio**

### **5.4.1 Avaliação do pH na formação de micropartículas**

O processo de obtenção de micropartículas de quitosana foi baseado no comportamento da mesma em relação à solubilidade, uma vez que este polímero é muito pouco solúvel em presença do ânion sulfato. O estudo de pré-formulação foi estruturado para se avaliar a formação de micropartículas em diferentes condições de pH, o encapsulamento de proteínas e, por último, formulação e condições de processo para obtenção de micropartículas.

A avaliação do efeito do pH na formação de micropartículas foi realizado em pH 3,0, 5,0 e 6,0. Os dados obtidos das análises espectrofotométricas estão apresentados na Figura 43 e mostram a relação entre a absorvância e o volume adicionado de solução de sulfato de sódio em pH 3,0 e 5,0. Observa-se curvas similares que apresentam após a adição de 1,5mL de solução precipitante aumento muito pequeno do valor de absorvância. Também, através da observação por microscopia óptica não foi possível verificar diferenças entre as micropartículas formadas em pH 3,0 ou 5,0. Em pH 6,0 ocorreu gelificação da preparação resultando na formação de grumos e gel aderido a parede do béquer.



**Figura 43 –** Curva turbidimétrica da precipitação de quitosana em pH 3,0 e 5,0 em função do volume adicionado de solução de sulfato de sódio 20%(p/V).

#### **5.4.2 Taxa de encapsulamento das micropartículas de quitosana**

Considerando-se que para estabilidade de proteína o pH 5,0 é mais favorável, foi realizado ensaio de encapsulamento nesta condição utilizando BSA como modelo e não se utilizou tensoativo na preparação. A quantidade de proteína encapsulada foi determinada pelo método de Lowry e a taxa de encapsulamento obtida foi de 43,4%. Porém, deve-se considerar que a lavagem das micropartículas pode arrastar as proteínas associadas que estão na superfície das mesmas (Grenha *et al.*, 2005). Por isso, no experimento utilizando toxóide botulínico tipo D foi suprimida a etapa de lavagem do *pellet*. O experimento foi realizado em duplicata e a taxa de encapsulamento foi de  $62,6 \pm 12,8\%$ . Pode-se considerar que as taxas de encapsulamento foram satisfatórias se comparadas aos resultados de outros trabalhos na literatura. Por exemplo, 3,64 a 78,69% de encapsulamento de insulina (WANG *et al.*, 2006) de acordo com o tipo de excipiente utilizado em combinação com quitosana, de 46,41 a 69,63% de encapsulamento de toxóide diftérico em microesferas de poli-ácido láctico-co-glicólico (NAMUR, 2007) e de 65 a 70% de encapsulamento em microesferas de quitosana obtidos por Kang *et al.* (2007) para antígeno de *Bordetella bronchiseptica*.

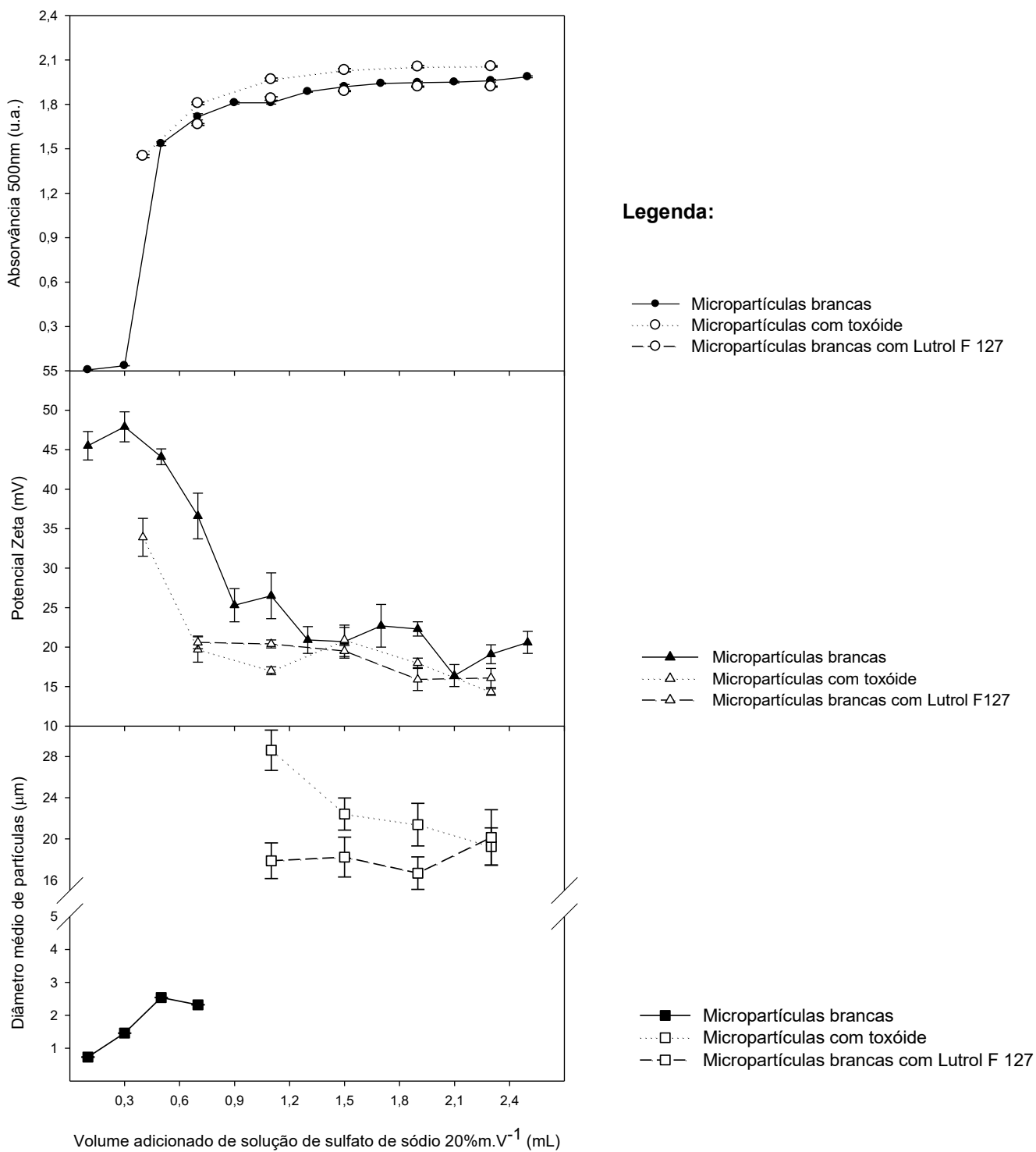
A principal limitação encontrada durante o estudo de pré-formulação e no preparo das vacinas foi a impossibilidade de se avaliar a taxa de encapsulamento devido a interferência do Lutrol F 127 nos métodos analíticos como Bradford e Lowry. Outro problema foi a baixa concentração protéica na preparação, que impossibilitou a utilização do método de análise elementar para quantificação. A solução de toxóide diluída para a concentração encontrada na vacina apresentou valor de nitrogênio de  $0,16 \pm 0,02\%$  e está abaixo do limite de quantificação da técnica.

#### **5.4.3 Estudo do processo de preparo das micropartículas**

A avaliação das variáveis de processo e de formulação na formação e nas características das micropartículas foi estudada por meio dos esquemas experimentais I, II e III. O primeiro objetivou a definição da quantidade de solução do agente precipitante, com e sem toxóide. No segundo, avaliou-se a variação da velocidade de agitação e o fluxo de adição da solução do agente precipitante no preparo de micropartículas carregadas com BSA com e sem adição de tensoativo. Por último, variou-se a massa molar da quitosana utilizada no preparo das micropartículas carregadas com BSA.

No esquema experimental I, foram produzidas micropartículas brancas sem utilização do Lutrol F 127, micropartículas brancas com Lutrol F 127 e micropartículas carregadas com toxóide botulínico tipo D contendo tensoativo. As micropartículas foram obtidas a partir de quantidades crescentes de solução de sulfato de sódio 20%(p/V) e caracterizadas por espectrofotometria, potencial zeta e distribuição granulométrica (**Figura 44**). O gráfico apresentado na Figura 44 mostra o aumento de absorvância das amostras à medida que se aumenta a quantidade de solução precipitante nos três experimentos. Para micropartículas brancas, a média da leitura de absorvância variou entre 0,008 a 1,986 u.a. para quantidades de 0,1 a 2,5mL de solução de sulfato de sódio 20%p/V e são valores muito próximos aos da curva de micropartículas brancas com tensoativo na faixa de 0,7 a 2,3mL de volume adicionado de solução precipitante. Porém, a curva de micropartículas carregadas apresenta valores um pouco maiores de absorvância e deve estar associado a diferenças de tamanho e distribuição granulométrica de partículas.

Acompanhando-se os valores de potencial zeta dos três tipos de micropartículas estudados, observa-se que ocorre redução do potencial à medida que aumenta a quantidade de agente precipitante. Porém, enquanto as micropartículas brancas com Lutrol F 127 e micropartículas carregadas com toxóide botulínico contendo tensoativo apresentam comportamento próximos, a curva das micropartículas brancas apresenta valores maiores (**Figura 44**).



**Figura 44 – Resultados dos ensaios do esquema experimental I (n=3).**

Sabe-se que a extensão da interação com o ânion sulfato ou com proteínas negativamente carregadas pode determinar o número de grupos amino livres, responsáveis pela superfície positivamente carregada das micropartículas de quitosana. O efeito do volume adicionado de sulfato de sódio 20%(p/V) sobre a carga superficial das micropartículas de quitosana está demonstrado na Figura 44. Como se pode verificar, a interação com o ânion sulfato levou a um decréscimo do potencial zeta das micropartículas de quitosana. A relação potencial zeta/volume de solução precipitante foi: (a) micropartículas brancas de  $+45,5 \pm 1,8 \text{ mV}/0,1 \text{ mL}$  para  $+20,6 \pm 1,4 \text{ mV}/2,5 \text{ mL}$ ; (b) micropartículas brancas com Lutrol F127 de  $+20,6 \pm 0,8 \text{ mV}/0,7 \text{ mL}$  para  $+16,1 \pm 1,2 \text{ mV}/2,3 \text{ mL}$ ; (c) micropartículas contendo toxóide de  $+33,9 \pm 2,4 \text{ mV}/0,4 \text{ mL}$  para  $+19,3 \pm 1,9 \text{ mV}/2,3 \text{ mL}$ . Ressalta-se que partículas com valor do potencial zeta mais baixo tendem a formar aglomerados. Os resultados encontrados para micropartículas brancas, estão coerentes ao encontrados por Il'ina *et al.* (2008) que estudaram o potencial zeta de micropartículas de quitosana obtidas por precipitação com sulfato de sódio e verificaram que o potencial zeta aumenta 20% para aumentos de 10 vezes da massa molar do polímero. Os valores de potencial obtidos variaram entre 30,7 a 38,6mV para formulações com quitosanas com Mw de 42 a 340kDa utilizando 1%(V/V) de sulfato de sódio 10%(p/V). Quanto a redução do potencial zeta verificada em ambas preparações contendo Lutrol F127, que é um copolímero de bloco de polioxietileno-polioxipropileno, foi estudada por Pepić *et al.* (2009) que atribuiu a mesma à interação eletrostática entre o oxigênio do copolímero e os grupos amino da quitosana.

A medida do tamanho das partículas no ZetaSizer só foi possível até a adição de 0,7mL do agente precipitante, pois acima desta quantidade os valores foram muito variáveis e acima do limite de determinação do equipamento. O tamanho médio obtido variou entre 729,1 a 2.316,5nm para quantidades de 0,1 e 0,7mL de solução de sulfato de sódio 20%(p/V) (n=3). Quanto ao tamanho médio das micropartículas das composições com tensoativo e carregadas com toxóide há variação dos resultados, sendo que as micropartículas carregadas apresentaram tamanho médio maior em preparações contendo 1,1, 1,5 e 2,1%(V/V) de solução de sulfato de sódio 20%(p/V) (n=3).

No esquema experimental II foram obtidas micropartículas carregadas com BSA sob variação da velocidade de agitação e do fluxo de adição de sulfato de sódio 20%(p/V), em presença ou não de Lutrol F 127, correspondentes aos grupos G1, G2, G3 e G4 da Tabela 28. A quantidade de solução precipitante foi fixada em 2,0%(V/V). Os resultados estão sumarizados nas Figuras 45 e 46.

A Figura 45 mostra a distribuição granulométrica obtida por difração de raios laser representada pelas curvas  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$ . Observa-se que a variação na velocidade de agitação durante a preparação de partículas ou do fluxo de adição de solução precipitante apresentou um impacto pequeno na distribuição granulométrica dentro do mesmo grupo G1, G2, G3 e G4. Verifica-se que para as micropartículas carregadas sem Lutrol F 127 há tendência de aumento do tamanho de partículas com aumento da agitação durante o processo (G2) e de redução com o aumento do fluxo (G4). Porém, os dados apresentados para distribuição granulométrica com tensoativo não permitem definir uma tendência. Também na avaliação intragrupo das leituras espectrofotométricas de G1, G2 G3 e G4 não é possível definir uma correlação do aumento da velocidade de agitação ou do fluxo de adição da solução precipitante com a absorvância. Entretanto, observa-se valores de absorvância maiores nas preparações sem tensoativo, ou seja,  $G2 > G1$  e  $G4 > G3$  (**Figura 46**).

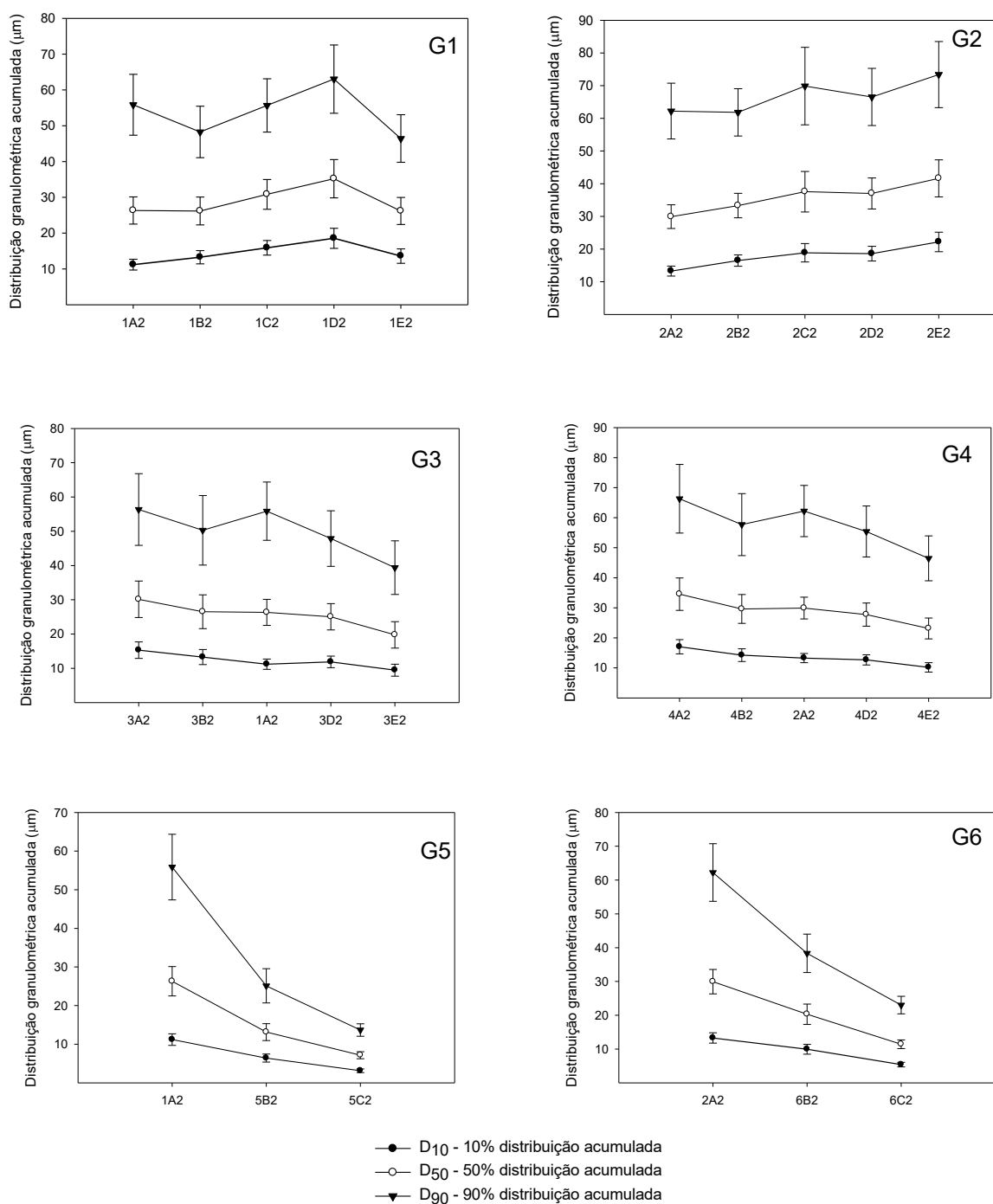
Foi realizada a avaliação estatística do valor de  $D_{50}$  médio ( $n=5$ ) entre grupos de micropartículas G1 e G2 e também G3 e G4 (**Tabela 29**). Comparando-se as médias dos grupos de experimentos G1 e G2 obteve-se valor de  $t = -4,502$  ( $p = 0,000$ ). Da mesma forma, na comparação entre médias intergrupos dos experimentos variando-se o fluxo de adição da solução de sulfato de sódio 20%(p/V), G3 e G4, obteve-se  $t = -2,405$  ( $p = 0,020$ ). Portanto, a sem a adição de tensoativo, Lutrol F127, altera-se significativamente o valor de  $D_{50}$  das preparações, resultando na formação de partículas maiores.

**Tabela 28 – Esquema experimental II e III: estudo da obtenção de micropartículas carregadas com BSA sob variação da velocidade de agitação e do fluxo de adição de sulfato de sódio 20%(p/V), em presença (G2 e G4) ou não (G1 e G3) de Lutrol F 127; alteração da massa molar de quitosana com adição (G6) ou não de Lutrol F127 (G5).**

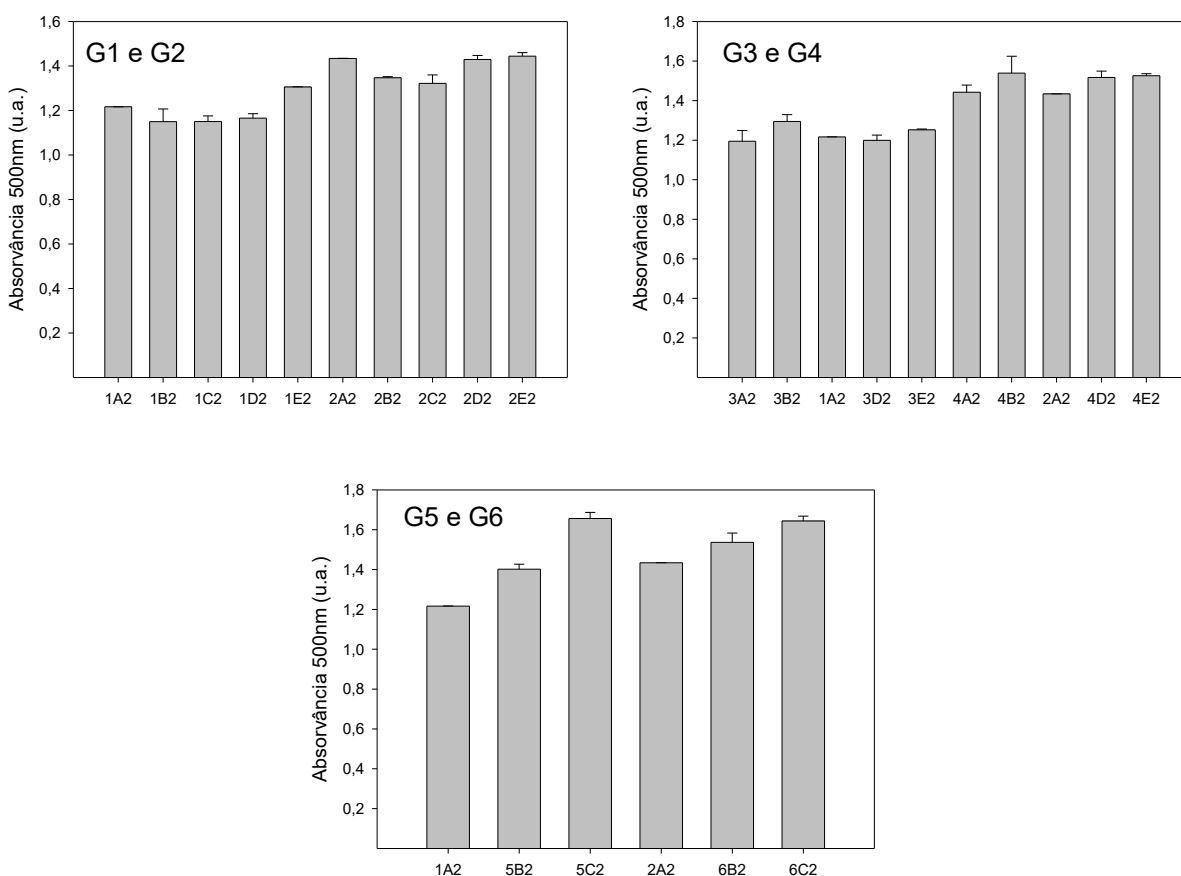
Parâmetro	Grupo	Variável	Lutrol F 127	Codificação
Velocidade de agitação (RPM)	G1	100	+	1A2
		200	+	1B2
		300	+	1C2
		400	+	1D2
		500	+	1E2
	G2	100	-	2A2
		200	-	2B2
		300	-	2C2
		400	-	2D2
		500	-	2E2
Fluxo de adição do sulfato de sódio 20%(p/V) (mL.min <sup>-1</sup> )	G3	0,5	+	3A2
		1,0	+	3B2
		1,5	+	1A2
		2,0	+	3D2
		2,5	+	3E2
	G4	0,5	-	4A2
		1,0	-	4B2
		1,5	-	2A2
		2,0	-	4D2
		2,5	-	4E2
Polímero	G5	Chitopharm®	+	1A2
		Hydagen®	+	5B2
		Sigma-Aldrich	+	5C2
	G6	Chitopharm®	-	2A2
		Hydagen®	-	6B2
		Sigma-Aldrich	-	6C2

(-) sem adição de Lutrol F 127

(+) com adição de Lutrol F 127



**Figura 45 - Distribuição granulométrica acumulada D<sub>10</sub>, D<sub>50</sub> e D<sub>90</sub> correspondentes aos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 (esquemas experimentais II e III).**



**Figura 46 – Valores médios de absorvância a 500nm das preparações de micropartículas carregadas com BSA correspondentes aos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 (esquemas experimentais II e III).**

Em seguida, foram realizadas comparações intragrupos, e os resultados estão apresentados na Tabela 30. O grupo de experimentos G1 não apresentou uma tendência. Entre os ensaios do grupo G1 não houve diferença significativa entre as amostra 1A2, 1B2 e 1C2 e no grupo G2 observa-se que há diferença somente entre as amostras 2A2 e 2E2 ( $p = 0,008$ ). Ou seja, em uma ampla faixa de agitação não ocorre variação significativa de  $D_{50}$ . A análise das amostras intragrupo G3 e G4 também permite concluir que não há diferença significativa entre os fluxos de adição de 0,5 a 2,0 mL.min<sup>-1</sup>, uma vez que ocorreu diferença apenas entre 3A2 e 3E2 ( $p = 0,007$ ) e 4A2 e 4E2 ( $p =$

0,004). Portanto, considerando os resultados intragrupo de G1 e G3, verifica-se que a agitação do sistema entre 100 a 300RPM e a adição de solução precipitante a um fluxo entre 0,5 a 2,0mL.min<sup>-1</sup> representam faixas de trabalho que resulta na produção de partículas com valor D<sub>50</sub> que não são diferentes estatisticamente.

Comparando-se as médias de absorvância dos grupos dos experimentos G1 e G2 obteve-se valor de  $t = 10,701$  ( $p = 0,000$ ) e entre G3 e G4,  $t = -14,229$  ( $p = 0,000$ ) (**Tabela 30**). Deste modo, conclui-se que a adição de Lutrol F 127 interfere na formação de partículas carregadas com BSA resultando em valores de absorvância significativamente menores. Em seguida, foram avaliadas as múltiplas comparações intergrupos e todas mostram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Isto ratifica que em adição de Lutrol F127 ocorre redução do valor de absorvância. Na análise estatística intragrupo não se verifica uma correlação entre o valor de absorvância e o aumento da agitação ou do fluxo de adição de solução precipitante. Salvo, no caso do experimento G4 em que não se verifica diferença significativa entre os experimentos ( $p > 0,05$ ). Ou seja, para G4 a variação do fluxo de adição da solução precipitante entre 0,5 a 2,5mL.min<sup>-1</sup> não interfere na formação das micropartículas.

Os resultados de medida de tamanho de partículas por difração de raios laser se relacionam com a medida da absorvância em que se verifica pelos dados apresentados para G1, G2, G3 e G4 que o aumento do tamanho de partículas também aumenta o valor de absorvância da suspensão. Observa-se que a adição do tensoativo resulta em micropartículas com valores de D<sub>50</sub> menores e este fato deve estar associado a estabilização da suspensão devido ao efeito estérico produzido pelo tensoativo na superfície das partículas.

**Tabela 29 – Valores médios de D<sub>50</sub> e desvio padrão, obtidos no preparo de micropartículas dos grupos G1, G2, G3 e G4.**

Parâmetro	Grupo	D <sub>50</sub> (μm)	Estatística	Grupo	D <sub>50</sub> (μm)	Estatística		
Agitação	G1	1A2	24,74±1,73	Ab	G2	2A2	30,15±3,61	Bb
		1B2	26,48±3,89	Ab		2B2	33,52±3,74	Bab
		1C2	31,11±4,16	Aab		2C2	38,11±6,20	Aab
		1D2	35,60±5,34	Aa		2D2	37,35±4,73	Aab
		1E2	26,45±3,78	Ab		2E2	42,02±5,67	Ba
	Média	28,88±4,44	A	Média	36,23±1,15	B		
Fluxo	G3	3A2	30,65±5,34	Aa	G4	4A2	35,01±5,40	Aa
		3B2	27,01±4,92	Aab		4B2	30,04±4,79	Aab
		1A2	24,74±1,73	Aab		2A2	30,15±3,61	Bab
		3D2	25,32±3,84	Aab		4D2	28,00±3,86	Aab
		3E2	20,14±3,86	Ab		4E2	23,40±3,48	Ab
	Média	25,57±3,81	A	Média	29,32±0,83	B		

Letras maiúsculas distintas na mesma linha, indicam diferença estatística intergrupos.  
Letras minúsculas distintas na mesma coluna, indicam diferença estatística entre intragrupo.

O terceiro esquema experimental foi proposto comparando-se três tipos de quitosana: Chitopharm<sup>®</sup>, Hydagen<sup>®</sup> e Sigma-Aldrich que correspondem às massas molares de 159.918, 167.133 e 175.129g.mol<sup>-1</sup>, respectivamente (**Tabela 28**) (**Figura 45 e 46**). Os resultados obtidos mostram ampla diferença entre da distribuição granulométrica, sendo que o tamanho de partículas foi maior para a amostra Chitopharm<sup>®</sup> e menor para Sigma-Aldrich (**Figura 45**).

**Tabela 30 – Valores médios de absorvância e desvio padrão das leituras das preparações de micropartículas dos grupos G1, G2, G3 e G4.**

Parâmetro	Grupo	Absorvância	Estatística	Grupo	Absorvância	Estatística
Agitação	G1	1A2	1,217±0,021	G2	2A2	1,435±0,042
		1B2	1,110±0,030		2B2	1,344±0,006
		1C2	1,168±0,019		2C2	1,349±0,013
		1D2	1,180±0,016		2D2	1,443±0,015
		1E2	1,307±0,009		2E2	1,456±0,017
		Média	1,196±0,073		Média	1,405±0,054
		A			B	
Fluxo	G3	3A2	1,195±0,054	G4	4A2	1,443±0,036
		3B2	1,295±0,035		4B2	1,539±0,085
		1A2	1,217±0,021		2A2	1,435±0,042
		3D2	1,255±0,017		4D2	1,518±0,032
		3E2	1,252±0,005		4E2	1,480±0,029
		Média	1,243±0,038		Média	1,483±0,046
		A			B	

Letras maiúsculas distintas na mesma linha, indicam diferença estatística intergrupos.  
Letras minúsculas distintas na mesma coluna, indicam diferença estatística entre intragrupo.

Comparando-se as médias dos valores de  $D_{50}$  entre G5 e G6 obteve-se diferença entre os pares correspondentes: 1A2 e 2A2 ( $p = 0,017$ ), 5B2 e 6B2 ( $p = 0,002$ ) e 5C2 e 6C2 ( $p = 0,000$ ) (**Tabela 31**). Deste modo, conclui-se que a adição de Lutrol F127 reduz a distribuição granulométrica das suspensões de micropartículas carregadas com BSA obtidas a partir de diferentes massas molares. Na análise intragrupos verifica-se que há diferença entre o valor de  $D_{50}$  das micropartículas de quitosanas de diferentes massas molares ( $p < 0,05$ ). Esses dados diferem dos resultados de Berthold *et al.* (1996) e Il'ina *et al.* (2008) que não verificaram relação entre tamanho de partículas e massa molar em seus experimentos. Contudo, deve-se considerar também que há diferenças de formulação e de técnicas utilizadas para medida da distribuição granulométrica.

Quanto a leitura de absorvância, verifica-se que se utilizando a quitosana de menor massa molar não houve diferença significativa entre os valores de absorvância 5C2 e

6C2 ( $p = 0,548$ ). Esse resultado pode estar associado ao menor tamanho de partículas e, conseqüentemente, sedimentação mais lenta e maior uniformidade da suspensão.

De forma geral, os dados dos esquemas experimentais I, II e III mostram que ocorre redução do valor de  $D_{50}$  e absorvância em formulações com adição de Lutrol F 127. Portanto, o tensoativo auxilia na estabilização da suspensão. Em preparações sem tensoativo, provavelmente ocorre aglomeração de partículas devido a redução do valor de potencial zeta, conforme anteriormente discutido, resultando em tamanhos maiores de partículas.

**Tabela 31 – Valores médios de  $D_{50}$  e de absorvância a 500nm e seus respectivos desvios padrão das preparações de micropartículas dos grupos G5 e G6.**

Parâmetro	Grupo G5	Média	Estatística	Grupo G6	Média	Estatística
Absorvância	1A2	1,217±0,021	Aa	2A2	1,435±0,042	Ba
	5B2	1,402±0,025	Ab	6B2	1,537±0,047	Bb
	5C2	1,656±0,031	Ac	6C2	1,644±0,024	Ac
$D_{50}$	1A2	24,74±1,73	Aa	2A2	30,15±3,61	Ba
	5B2	13,33±2,18	Ab	6B2	20,52±2,99	Bb
	5C2	7,19±0,89	Ac	6C2	11,49±1,28	Bc

Letras maiúsculas distintas na mesma linha, indicam diferença estatística intergrupos.

Letras minúsculas distintas na mesma coluna, indicam diferença estatística entre intragrupo.

A Tabela 32 mostra o valor médio de  $D_{50}$  por grupo, coeficiente de variação (CV%) e o índice span. Pode-se verificar que entre as modificações de processo propostas, a alteração da massa molar de quitosana resulta em maior valor de CV(%) e, portanto, este foi o fator mais crítico. Ressalta-se que foram obtidos baixos índices de span, indicando proximidade dos resultados em torno da média. Os valores apresentados são inferiores aos índices de span encontrados na literatura: Torres (2006) obteve span 2,29 na produção de microesferas de quitosana por atomização em solução coagulante; Domingues *et al.* (2008) encontraram na produção de micropartículas de Eudragit S100

e RS 30D por *spray drying* o melhor resultado com índice span igual 1,59; Oliveira (2004) na obtenção de micropartículas de quitosana por *spray drying* obteve span de 1,99.

A Tabela 33 apresenta os valores médios de absorvância por grupo e o coeficiente de variação. Novamente, os grupos G5 e G6 apresentaram valores muito maiores de CV(%), mostrando que as características da quitosana, em especial a massa molar, impacta no processo de obtenção de micropartículas.

**Tabela 32 – Comparação entre os valores médios de D<sub>50</sub>, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6.**

Grupo	Amostras	Média D <sub>50</sub> do grupo (µm)	CV (%)	Índice span
G1	1A2, 1B2, 1C2, 1D2, 1E2	28,88±4,44	15,39	1,38±0,18
G2	2A2,2B2,2C2,2D2,2E2	36,23±12,55	12,55	1,38±0,15
G3	3A2, 3B2, 1A2, 3D2, 3E2	25,57±3,81	14,91	1,49±0,13
G4	4A2, 4B2, 2A2, 4D2, 4E2	29,32±4,20	14,31	1,54±0,08
G5	1A2, 5B2, 5C2	15,09±8,91	59,03	1,54±0,14
G6	2A2,6B2, 6C2	20,89±9,58	45,89	1,53±0,12

**Tabela 33 - Comparação entre os valores médios de absorvância, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6.**

Grupo	Grupo experimental	Média absorvância do grupo (u.a.)	CV (%)
G1	1A2, 1B2, 1C2, 1D2, 1E2	1,20±0,07	5,50
G2	2A2,2B2,2C2,2D2,2E2	1,38±0,06	4,50
G3	3A2, 3B2, 1A2, 3D2, 3E2	1,25±0,04	2,90
G4	4A2, 4B2, 2A2, 4D2, 4E2	1,49±0,05	3,30
G5	1A2, 5B2, 5C2	1,42±0,22	15,50
G6	2A2,6B2, 6C2	1,54±0,10	6,80

## 5.5 Obtenção de vacinas para experimentação *in vivo*

As principais motivações para purificação cromatográfica foram a obtenção de um antígeno mais puro, capaz de resultar numa resposta imunológica mais específica contra

toxina botulínica, e a redução da quantidade de proteína por dose de vacina. Porém, considerando-se que o rendimento e o fator de purificação das etapas cromatográficas foram baixos foi decidido utilizar a toxina botulínica purificada parcialmente após a etapa de diafiltração (lote 01 e 02). Nesta etapa, considerou-se satisfatória a qualidade antigênica devido à redução acima de 70% de proteínas do meio e aos bons resultados obtidos nos testes de L+ e DL<sub>50</sub>, apresentados anteriormente.

Por meio da caracterização das amostras de quitosana, verificou-se que a Chitopharm® apresentou maior pureza, menor resíduo de cinzas sulfatadas e baixa polidispersividade. Portanto, a Chitopharm® foi escolhida para o preparo de vacinas.

As amostras dos lotes 01 e 02 de toxina botulínica tipo D foram destoxificadas por intermédio da diálise durante 10 dias a 37°C contra tampão fosfato 50mM, pH 6,0, contendo formol a 0,6%(V/V). A inativação da toxina foi verificada por teste de toxicidade em camundongo e a qualidade do toxóide foi avaliada pelo teste de TCP. A Tabela 34 resume os resultados obtidos após a destoxificação da toxina.

As vacinas foram preparadas conforme procedimento descrito no item 4.8.3. Considerando os resultados do estudo do processo de obtenção de partículas, principalmente quanto ao parâmetro D<sub>50</sub>, a velocidade de agitação e fluxo de adição do agente precipitante foram padronizados em 100RPM e 1,5mL.min<sup>-1</sup>, respectivamente. A Tabela 35 resume a composição e as formulações obtidas para experimentação animal. As vacinas contendo micropartículas de quitosana apresentaram comportamento reprodutível de distribuição granulométrica com valor de D<sub>50</sub> de 23,8±3,8µm.

**Tabela 34 – Resultados do teste de inativação e do teste TCP das amostras de toxóide lote 01 e 02 recém preparadas e após 4 meses sob refrigeração.**

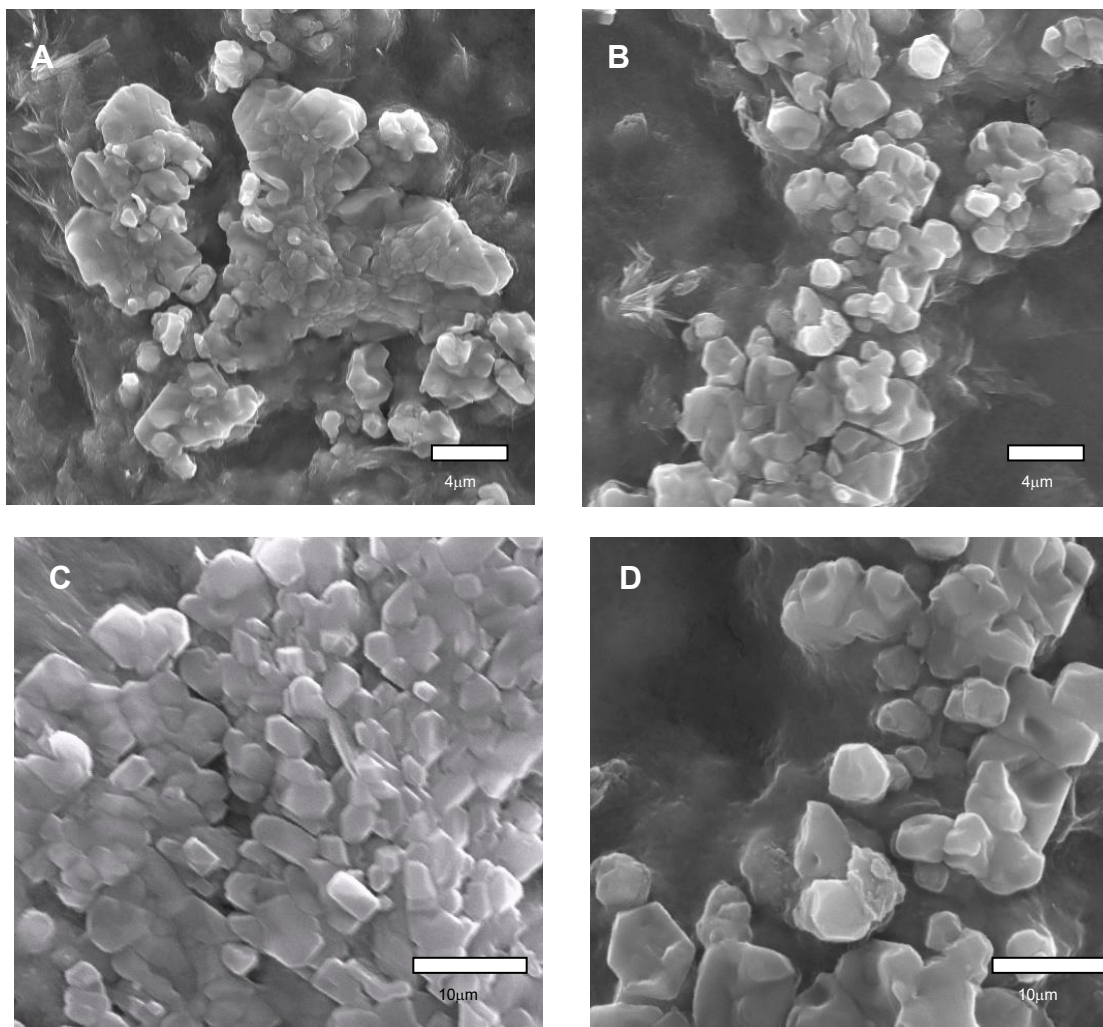
Parâmetros	Amostra de toxóide
------------	--------------------

	Lote 01	Lote 02
Toxicidade	negativo	negativo
TCP.mL <sup>-1</sup> (10 <sup>X</sup> )	2	3
TCP.mL <sup>-1</sup> (10 <sup>X</sup> ) (após 4 meses, 4 a 8°C)	2	3

**Tabela 35 – Resumo das formulações de vacinas preparadas para testes biológicos.**

Vacina	Toxóide (lote)	Adjuvante
H1a, H2a, H3a, H1b, H2b, H3b	01	Hidróxido de alumínio
Q1, Q2, Q3	01	Micropartículas quitosana em gel
Ha'	02	Hidróxido de alumínio
Q, Q'	02	Micropartículas quitosana em gel
G, G'	02	Gel de Quitosana
M	02	Micropartículas quitosana

A Figura 47 mostra as fotomicrografias das micropartículas de quitosana da vacina Q3 obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens mostram que as partículas possuem tamanho menor que 5µm, mas se apresentam como aglomerados irregulares. O tamanho de partículas está próximo ao obtido em outros trabalhos na literatura, conforme descritos por Chen *et al.* (2007) e Il'ina *et al.* (2008). Contudo, é diferente do resultado obtido por difração de raios laser e, provavelmente, deve estar associado à formação de aglomerados resultantes do número de partículas formadas, que depende da quantidade de solução coagulante, possibilitando a interações eletrostáticas. Il'ina *et al.* (2008) também relatou a formação de agregação de micropartículas obtidas por coacervação com sulfato de sódio. Também há possibilidade da formação de um raio hidrodinâmico em torno das partículas que pode interferir na leitura por difração de raios laser.



**Figura 47** - Fotomicrografias das micropartículas de quitosana carregadas com toxóide botulínico tipo D (vacina Q3) aumentos de 3000 (A), 5000 (B) e 10000 (C e D) vezes (15 kV).

### 5.6 Estudo de eficácia das vacinas utilizando quitosana como adjuvante

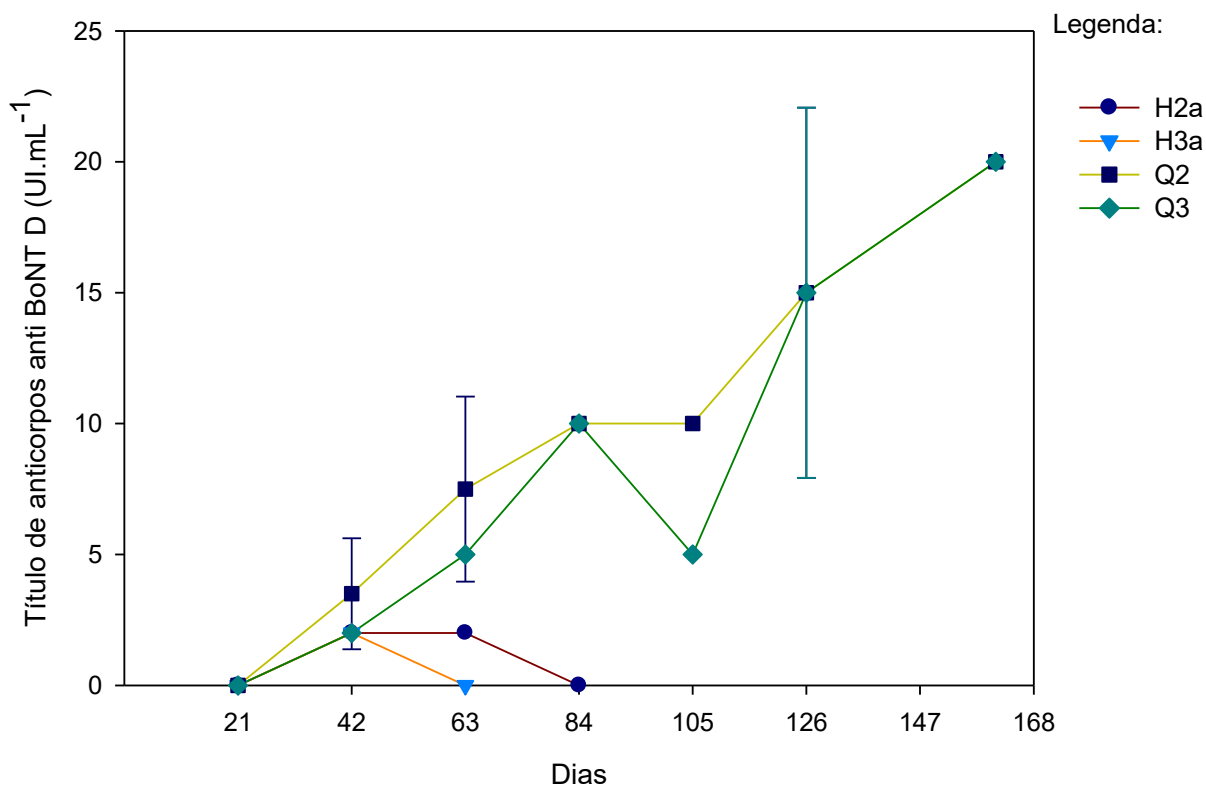
Foram realizados três delineamentos experimentais com finalidade de avaliar a dose-resposta de cobaias em relação à quantidade de toxóide botulínico, o efeito de diferentes formulações na eficácia da vacina e, por último, a estabilidade e a proteção das vacinas adjuvantadas com quitosana.

No primeiro experimento, os animais foram divididos aleatoriamente em 9 grupos. Os animais dos grupos H1a, H2a e H3a receberam dose de vacina formulada com gel de

hidróxido de alumínio contendo quantidade de toxóide equivalente a 10.000, 50.000 e 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>, respectivamente, nos dias 0 e 21. Os animais dos grupos H1b, H2b e H3b receberam dose de vacina formulada com hidróxido de alumínio contendo quantidade de toxóide equivalente a 10.000, 50.000 e 75.000DL<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, somente no dia 0. Os animais dos grupos Q1, Q2 e Q3 receberam dose de vacina formulada com micropartículas de quitosana em gel contendo quantidade de toxóide equivalente a 10.000, 50.000 e 75.000DL<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, no dia 0. A coleta de sangue foi realizada nos dias 21, 42, 63, 84, 105, 126, 147 e 161 após a administração das vacinas no dia 0. As vacinas que apresentaram título menor que 2UI.mL<sup>-1</sup> no 42° dia ou título <1UI.mL<sup>-1</sup> nos dias subsequentes à coleta tiveram o experimento interrompido.

Os tratamentos com as vacinas contendo dose de toxóide equivalente a 10.000DL<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup> (H1a, H1b e Q1) ou com dose única de vacina adjuvantada com hidróxido de alumínio (H2b e H3b) não induziram resposta imunológica nos animais, pois apresentaram títulos menores que 1UI.mL<sup>-1</sup> nos dias 21 e 42. A relação dose-resposta foi evidente comparando-se os resultados entre vacinas contendo 10.000DL<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup> (H1a e Q1) e 50.000DL<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup> (H2a e Q2). Mas, não houve uma relação dose-resposta entre as vacinas contendo 50.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> (H2a e Q2) e 75.000 DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>(H3a e Q3) e, provavelmente, é devido a uma estreita diferença de quantidade de toxóide. Woodward *et al.* (2003) trabalhando com vacina recombinante contra botulismo tipo D também verificou que há uma relação dose-dependente para a resposta imunológica ao comparar a proteção obtida para doses de 0,6, 1 e 10µg de toxóide por dose.

A Figura 48 mostra que enquanto as vacinas H3a e H2a, adjuvantadas com hidróxido de alumínio, apresentaram títulos de anticorpos <1UI.mL<sup>-1</sup> pelo teste de soroneutralização nos dias 63 e 84, respectivamente. As vacinas a base de micropartículas em gel, Q2 e Q3, mantiveram o título de anticorpos ao longo dos 161 dias acima de 2UI.mL<sup>-1</sup>, sugerindo prolongamento da resposta imune. A comparação estatística entre os resultados de título do *pool* de soro de seis animais tratados com as vacinas Q2 e Q3, coletados a cada tempo, não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,175$ ).



**Figura 48** – Título de anticorpos do *pool* de soros de cobaias (n=6) contra toxina botulínica tipo D (BoNT D) em função do tempo após administração de dose de 5mL por via subcutânea no dia zero contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente a 50.000 DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> (H2a e Q2) e 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> (H3a e Q3). Os animais dos grupos H2a e H3a receberam dose reforço de mesmo volume no dia 21. Os animais dos grupos Q2 e Q3 foram imunizados com dose única. As análises foram realizadas em duplicata.

A Tabela 36 apresenta os valores das médias dos títulos de anticorpos dos indivíduos durante os 126 dias do experimento. Na avaliação intragrupo, os resultados dos títulos para vacina Q2 ( $p = 0,07$ ) e Q3 ( $p = 0,13$ ) não apresentaram diferença significativa ao longo do tempo. Ou seja, o título de anticorpos se mantém ao longo dos 126 dias de análise, enquanto o mesmo não ocorreu com as vacinas a base de hidróxido de alumínio. Comparando-se as médias entre Q2 e Q3, não houve diferença significativa entre vacinas nos diversos dias de coletas ( $p > 0,05$ ). As respostas imunológicas para os tratamentos com as vacinas Q2 e Q3 apresentaram perfis semelhantes e não houve diferença estatística entre as vacinas ( $p = 0,20$ ). Deve-se considerar que há um intervalo

muito curto entre as quantidades de toxóide das vacinas Q2 e Q3, equivalente a um aumento de 50%, enquanto a relação entre Q1 e Q2 foi de 500%.

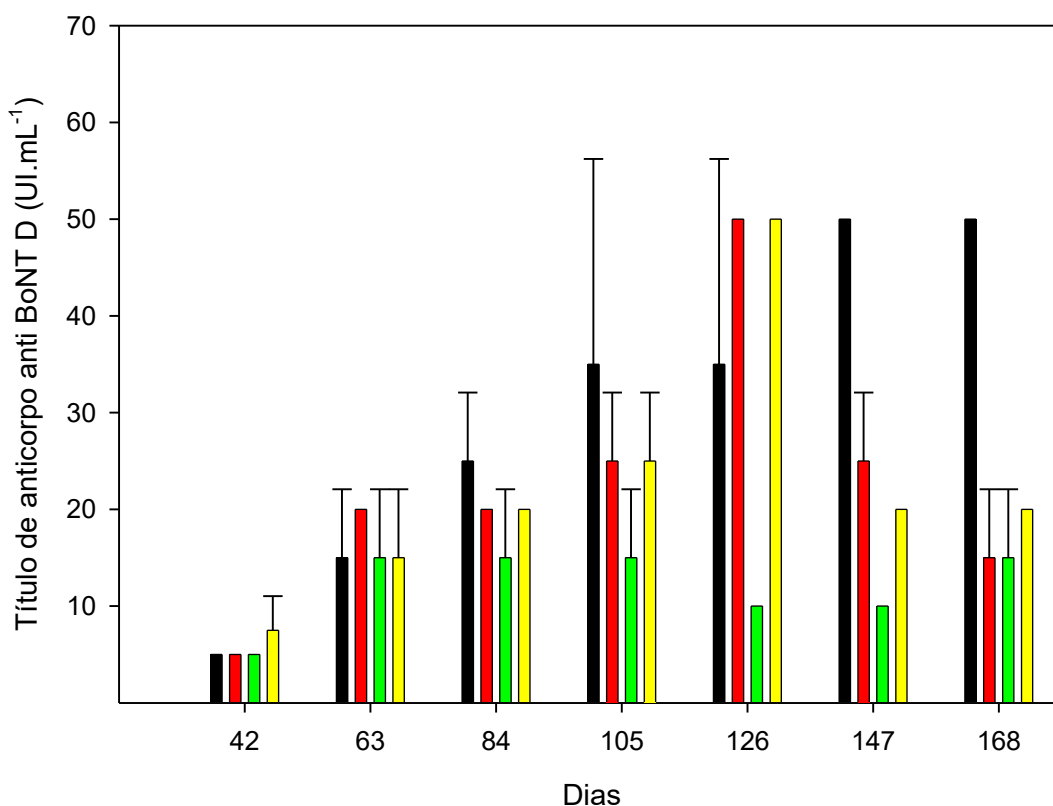
**Tabela 36 – Média e desvio padrão dos títulos de anticorpos dos indivíduos dos grupos Q2 e Q3 obtidos nos dias 42, 63, 84, 105 e 126 após imunização.**

Dias	Q2	Q3
42	4,0±1,5 <sup>Aa</sup> (n=6)	1,8±2,0 <sup>Aa</sup> (n=5)
63	6,2±3,2 <sup>Aa</sup> (n=6)	2,6±1,3 <sup>Aa</sup> (n=5)
84	10,0±7,1 <sup>Aa</sup> (n=4)	7,0±8,4 <sup>Aa</sup> (n=5)
105	9,0±2,2 <sup>Aa</sup> (n=5)	6,8±3,9 <sup>Aa</sup> (n=4)
126	13,0±8,7 <sup>Aa</sup> (n=4)	11,8±9,6 <sup>Aa</sup> (n=4)
Média	7,9±5,39 <sup>A</sup>	5,7±6,44 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas distintas na mesma linha, indicam diferença estatística entre as vacinas. Letras minúsculas distintas na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os tempos (dias de mensuração).

No segundo experimento os animais receberam dose de vacina contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente a 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>. Os animais do grupo Ha' receberam dose de vacina formulada com gel de hidróxido de alumínio nos dias 0 e 21. Os animais dos grupos Q, G e M receberam dose de vacina formulada com micropartículas de quitosana em gel, gel de quitosana e micropartículas, respectivamente, somente no dia zero. A coleta de sangue ocorreu nos dias 21, 42, 63, 84, 105, 126, 147 e 168 (**Figura 49**). Após 3 dias de administração, foi observada reação local para as vacinas contendo quitosana com formação de um pequeno nódulo, tamanho 2x2cm, e leve edema que regrediu após cerca de três semanas da administração. A vacina adjuvantada com hidróxido de alumínio apresentou também formação de nódulo e de edema mais intenso e com persistência maior que quatro semanas.

No dia 21 todos os tratamentos apresentaram resultados de título menor que  $1\text{UI.mL}^{-1}$ . Os resultados da Figura 49 mostram que a formação de anticorpos contra toxina botulínica tipo D foi satisfatória para todos os tratamentos, pois todas as vacinas apresentam título acima de  $2\text{UI.mL}^{-1}$  no dia 42. Os perfis de formação de anticorpos mostram aumento ao longo do tempo para as vacinas adjuvantadas com quitosana.



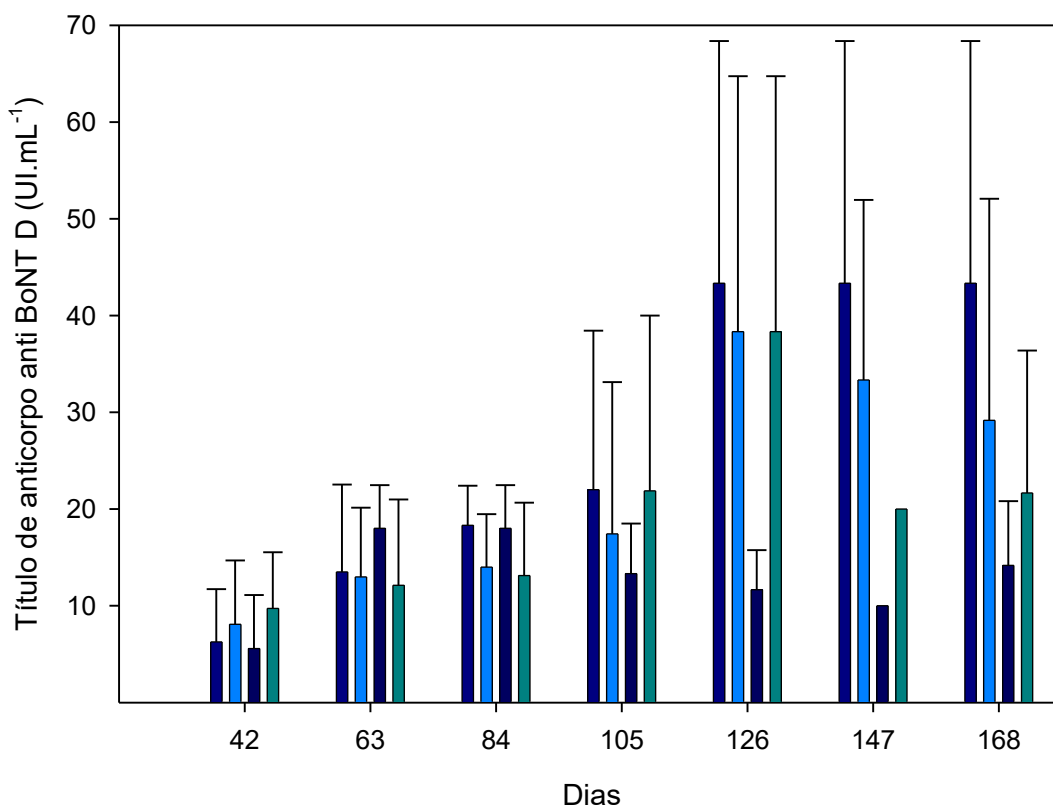
**Legenda:**

- Micropartículas (M)
- Micropartículas em gel (Q)
- Hidróxido de alumínio (Ha')
- Gel de quitosana (G)

**Figura 49** – Título de anticorpos do *pool* de soros de cobaias contra toxina botulínica tipo D (BoNT D) em função do tempo após administração de dose de 5mL por via subcutânea contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente  $75.000\text{DL}_{50}\text{ mL}^{-1}$ . Os animais do grupo Ha' foram imunizados nos dias 0 e 21. Os animais dos grupos Q, G e M foram imunizados com dose única no dia 0. Foi analisado *pool* de soro de 12 animais no dia 42 e de no mínimo 6 animais nos dias 63, 84, 105, 126, 147 e 168. As análises foram realizadas em duplicata.

Destaca-se que há diferença significativa entre os tratamentos com vacinas a base de quitosana e hidróxido de alumínio, ou seja, M e Ha' ( $p = 0,001$ ), Q e Ha' ( $p = 0,011$ ) e G e Ha' ( $p = 0,011$ ). Porém, não há diferença significativa entre as vacinas adjuvantadas com quitosana. Ressalta-se que Q e G são semelhantes entre si ( $p = 0,94$ ). Esses dados mostram que a formação de anticorpos utilizando a vacina M é bastante superior a vacina a base de hidróxido de alumínio. Apesar das respostas imunológicas entre M, Q e G não apresentarem diferença significativa, a maior diferença entre M e Ha' indica uma tendência deste sistema apresentar maior título de anticorpos.

A Figura 50 apresenta as médias dos títulos de anticorpos das análises de soro dos indivíduos nos dias 42, 63, 84, 105, 126, 147 e 168 tratados com as vacinas M, Q, Ha' e G. A comparação entre as medianas mostra que M apresentou uma resposta imune superior a Ha' ( $p = 0,012$ ) e que há forte tendência da vacina G ser diferente da Ha' ( $p = 0,052$ ). Verificou-se que nos dias 126 e 147 as vacinas M, Q e G apresentaram maiores respostas imunológicas que Ha', ( $p = 0,036$ ) e ( $p = 0,015$ ), respectivamente. Ressalta-se que há tendência de diferença entre as vacinas G e Ha' ( $p = 0,051$ ) no dia 42 e entre M e Ha' ( $p = 0,053$ ) no dia 168. Provavelmente, o aumento do número de amostras pode evidenciar estas diferenças. Na avaliação intragrupo (**Tabela 37**) os títulos de anticorpos do dia 42 foram menores que os dias 126, 147 e 168 ( $p = 0,01$ ) para M, que nos dias 126 e 147 ( $p = 0,05$ ) para vacina Q, que nos dias 63 e 84 para vacina Ha' e que no dia 126 ( $p = 0,05$ ) para G. Esses resultados sugerem que as vacinas adjuvantadas com quitosana estejam liberando o antígeno de forma mais lenta que o hidróxido de alumínio, e que ocorre um *burst* no dia 126 para as primeiras e no dia 63 para a última.



**Legenda:**

- Micropartículas (M)
- Micropartículas em gel (Q)
- Hidróxido de alumínio (Ha')
- Gel de quitosana (G)

**Figura 50** – Título de anticorpos dos soros individuais de cobaias contra toxina botulínica tipo D (BoNT D) em função do tempo após administração de dose de 5mL por via subcutânea contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente  $75.000DL_{50} mL^{-1}$ . Os animais do grupo Ha' foram imunizados nos dias 0 e 21. Os animais dos grupos Q, G e M foram imunizados com dose única no dia 0. Foram analisadas amostras de soro de 12 animais no dia 42 e de no mínimo 5 animais nos dias 63, 84, 105, 126, 147 e 168.

**Tabela 37 – Medianas dos títulos de anticorpos dos indivíduos dos tratamentos com vacinas M, Q, Ha' e G obtidos nos dias 42, 63, 84, 105, 126, 147 e 168 após imunização.**

DIAS	M	Q	Ha	G
42	5 <sup>Ab</sup> (n=11)	7,5 <sup>Ab</sup> (n=12)	5 <sup>Ab</sup> (n=12)	10 <sup>Ab</sup> (n=12)
63	20 <sup>Aab</sup> (n=8)	10 <sup>Aab</sup> (n=9)	20 <sup>Aa</sup> (n=5)	15 <sup>Aab</sup> (n=8)
84	20 <sup>Aab</sup> (n=6)	10 <sup>Aab</sup> (n=5)	20 <sup>Aa</sup> (n=5)	15 <sup>Aab</sup> (n=8)
105	20 <sup>Aab</sup> (n=5)	10 <sup>Aab</sup> (n=7)	10 <sup>Aab</sup> (n=6)	15 <sup>Aab</sup> (n=8)
126	50 <sup>Aa</sup> (n=6)	35 <sup>Aa</sup> (n=6)	10 <sup>Bab</sup> (n=6)	35 <sup>Aa</sup> (n=6)
147	50 <sup>Aa</sup> (n=6)	35 <sup>Aa</sup> (n=6)	10 <sup>Bab</sup> (n=6)	20 <sup>Aab</sup> (n=6)
168	50 <sup>Aa</sup> (n=6)	30 <sup>Aab</sup> (n=6)	15 <sup>Aab</sup> (n=6)	20 <sup>Aab</sup> (n=6)
<b>MEDIANA</b>	<b>20<sup>A</sup></b>	<b>10<sup>AB</sup></b>	<b>10<sup>B</sup></b>	<b>20<sup>AB</sup></b>

Letras maiúsculas distintas na mesma linha, indicam diferença estatística entre as vacinas. Letras minúsculas distintas na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os tempos (dias de mensuração).

No terceiro experimento, 12 animais por grupo receberam dose única da vacina contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente a 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> que foram preparadas com micropartículas em gel (Q e Q') ou com gel de quitosana (G e G') (**Tabela 38**). Para avaliação da estabilidade da preparação, Q e G foram conservadas por 120 dias sob refrigeração. As vacinas contendo antígeno encapsulado em micropartículas de quitosana em gel (Q e Q') e suspenso em gel (G e G') apresentaram após 42 dias níveis de anticorpos 2,5 e 5 vezes maior que o necessário para aprovação no teste de eficácia preconizado pela legislação brasileira.

**Tabela 38** – Título de anticorpos contra toxina botulínica tipo D do *pool* de soro de cobaias (n=12) no dia 42 após administração subcutânea de dose única das vacinas adjuvadas com micropartículas de quitosana em gel (Q e Q') e com gel de quitosana (G, G') contendo quantidade de toxóide botulínico tipo D equivalente 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>.

Vacina	Armazenagem 4-8°C (dias)	Título de anticorpo após 42 dias de vacinação (UI.mL <sup>-1</sup> )
Q	120	5
Q'	7	5
G	120	10
G'	7	10

Logo em seguida, os animais imunizados com Q' e G' foram desafiados contra doses crescentes de toxina botulínica tipo D (**Tabela 39**). As cobaias foram separadas em cinco grupos de 4 indivíduos. Em cada grupo, havia 2 animais que foram tratados com a vacina Q' e outros dois animais tratados com a vacina G'. Os grupos de 1 a 5 receberam dose intraperitoneal equivalente a 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup>DL<sub>50</sub>, respectivamente. Como grupo controle, os animais não imunizados receberam dose de 10DL<sub>50</sub>. Após 1 dia de observação, os animais do grupo controle já haviam morrido e após 14 dias nenhum dos animais imunizados morreu ou apresentou sinais de paralisia. Portanto, a imunização com a vacina adjuvada com quitosana foi capaz de proteger os animais contra dose de até 10<sup>5</sup>DL<sub>50</sub>. Woodward *et al.* (2003) após a imunização de camundongos com 10µg/dose de toxina recombinante tipo D (rBoNT/D) utilizando adjuvante completo de Freund na primeira (dia zero) e adjuvante incompleto de Freund na segunda dose (2 semanas após), desafiou 5 camundongos com quantidades crescentes de 10 a 10<sup>5</sup>DL<sub>50</sub> de toxina. Os resultados obtidos mostraram que até a dose de 10<sup>3</sup>DL<sub>50</sub> todos os animais sobreviveram, porém com doses acima houve morte de 40%. Webb *et al.* (2007) desafiou dez camundongos previamente vacinados com três doses de vacina contendo 5µg de rBoNT/D Hc a base de gel de alumínio (0, 4 e 8 semanas) e obteve máxima proteção contra 10<sup>5</sup>DL<sub>50</sub> de toxina botulínica tipo D. Comparando-se os tratamentos, apesar da diferença entre espécies, os resultados mostram que as vacinas Q' e G', após uma única administração, demonstram boa eficácia com proteção das vinte cobaias.

Portanto, os três delineamentos experimentais para vacinas adjuvantadas com quitosana, administradas em dose única, apresentam resultados de eficácia a partir de diferentes lotes de toxóide botulínico e com dose de toxóide equivalente a 50.000 e 75.000DL<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>. Os resultados apresentados nas Figuras 48 e 49, obtidos a partir da avaliação do *pool* de soros, mostram que a respostas imunológica utilizando vacinas adjuvantadas com quitosana apresentam título de anticorpos mais alto quando comparada com a vacina a base de hidróxido de alumínio após dose de reforço. Conseqüentemente, a utilização deste adjuvante possibilita a otimização de dose pela redução da quantidade de antígeno administrado ou a inclusão de outros antígenos na mesma dose.

**Tabela 39 - Sobrevivência de cobaias a dose de desafio com toxina botulínica tipo D devido ao efeito da vacinação com as formulações Q' e G'.**

Grupo	Número de sobreviventes/número total de animais por dose desafio (número de DL <sub>50</sub> de toxina botulínica tipo D)				
	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
Q'	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
G'	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Não vacinado	0/2	-	-	-	-

A comparação entre os resultados apresentados para vacina a base de micropartículas em gel, nos três delineamentos experimentais, mostra uma melhor performance das formulações obtidas a partir do lote 02 (**Figuras 49 e 50**). Esses resultados inferiores podem estar associados tanto ao processo de purificação que pode influenciar a qualidade do antígeno (**Tabela 34**), bem como ao fato dos animais não serem isogênicos. Em ambas as formas farmacêuticas, micropartículas ou em gel, a cinética de formação de anticorpos contra botulismo tipo D sugere prolongamento da resposta imune, conferindo altos níveis de anticorpos ao longo de 168 dias (**Figuras 49 e 50**). A

possibilidade de utilizar os dois tipos de formas farmacêuticas apresenta vantagens importantes a destacar. O processo de produção da vacina com gel de quitosana é simples, conseqüentemente, mais rápido e de menor custo. Por outro lado, a utilização de micropartículas permite a separação física de proteínas e, deste modo, torna-se potencial sistema quando se pretende proteger o antígeno e aumentar a estabilidade e eficácia em vacinas associadas, por exemplo.

Até os dias atuais, o hidróxido de alumínio é considerado referência ouro para desenvolvimento de novos adjuvantes, porque é uma alternativa de substância não tóxica para o adjuvante completo de Freund e permanece como o adjuvante mais comumente utilizado. Porém, desvantagens associadas a incapacidade de induzir resposta imunológica celular e a necessidade de vacinas baseadas em subunidades e peptídeos de utilizar um melhor potencializador que o hidróxido de alumínio (USINGER, 1997), colocam a quitosana como um ótimo candidato para substituí-lo na área veterinária, e especificamente, para vacinas contra botulismo pelo baixo custo e a capacidade de imunização a partir de dose única.

## 5.7 Perspectivas futuras

- Verificar a viabilidade de utilizar os sistemas desenvolvidos em vacinas associadas para tratamento de clostridioses.
- Investigar a utilização da iodação para destoxificação da toxina botulínica;
- Avaliar a capacidade das vacinas em induzir resposta imune em animais de grande porte, como ovinos, caprinos e bovinos.
- Obtenção da patente da vacina que foi depositada no INPI – “*Vacina single shot contra botulismo*” sob número de protocolo 014100003401 em 29/09/10.

- Monitoramento de publicações:

1. Edson de S. MOURA; Armando S. CUNHA JÚNIOR; Otto DOMECCI MOZZER; Luiz G. DIAS HENEINE. **Polymer microparticles as controlled release vaccines in veterinary medicine.** Em revisão - revista Ciência Rural.
2. Edson S. MOURA; Armando S. CUNHA JÚNIOR ; Luiz G. D. HENEINE; André A. G. FARACO. **Characterization and basic guidelines for the quality control of chitosan for drug delivery in pharmaceutical applications.** Aceito pela revista Latin American Journal of Pharmacy.

- Escrever e submeter artigos:

1. Controle da distribuição granulométrica de micropartículas de quitosana obtidas por processo de coacervação. Edson S. MOURA; Luiz G. D. HENEINE; Armando S. CUNHA JÚNIOR.
2. Obtenção de vacina *single shot* contra botulismo tipo D com base em micropartículas e hidrogel de quitosana. Edson S. MOURA; Armando S. CUNHA JÚNIOR ; Luiz G. D. HENEINE.

## CAPÍTULO 6

---

### 6. CONCLUSÕES

- Foram desenvolvidas e produzidas duas vacinas contra botulismo tipo D a base de hidrogel e micropartículas de quitosana que apresentaram alta imunogenicidade,

antigenicidade específica, ausência de efeitos colaterais e capacidade de imunização de animais a partir de uma dose única.

- Obteve-se a toxina de *C. botulinum* tipo D parcialmente purificada com sua atividade tóxica preservada.
- A utilização de formol para destoxificação da toxina mostrou ser eficaz na obtenção de um antígeno atóxico, conforme bioensaio em camundongo, e com qualidade antigênica preservada avaliada pelo teste de TCP.
- As amostras de quitosana foram caracterizadas e apresentaram como diferenças principais a pureza, a massa molar e a uniformidade.
- Foi possível definir que a adição de Lutrol F 127, a agitação e o fluxo de adição da solução de sulfato de sódio impactam na formação e na distribuição granulométrica de micropartículas de quitosana, mas os fatores de maior relevância foram a massa molar e a concentração polimérica.
- As vacinas a base de micropartículas e hidrogel de quitosana apresentaram resposta imunológica satisfatória após 42 dias a partir de uma única administração em cobaias.
- Os perfis de formação de anticorpos mostram que os níveis de anticorpos específicos no soro podem ser mantidos pela resposta imune de longa duração e sugerem que as formulações a base de quitosana se comportam como sistemas de liberação prolongada do antígeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKCELRUD, L. Propriedades de Soluções Poliméricas. In: \_\_\_\_\_. Fundamentos da Ciência dos Polímeros. Baueri: Manole, 2007. 221-268.

ALEXAKIS, T. *et al.* Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and cross-linked chitosan for in vivo applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 93-106, 1995.

ALPAR, H. O.; GROVES, M. J. Vaccines: ancient medicines to modern therapeutics. In: GROVES, M. J. **Pharmaceutical Biotechnology**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 307-332.

ANAL, K. A.; STEVENS, W. F.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. **International journal of Pharmaceutics**, v. 312, n.1-2, p. 166-173, 2006.

ARCA, H. Ç.; GÜNBEYAZ, M.; SENEL, S. Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 7, p. 937-953, 2009.

ARGIN-SOYSAL, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. M. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 202-209, 2009.

ARNON, S. S. *et al.* Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. **The Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 8, p. 1059-1070, 2009.

ATASSI, M. Z.; OSHIMA, M. Structure, activity, and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 219-260, 1999.

ATLAS, M. R. **Handbook of Microbiological Media**. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, 2051 p.

BAJPAI, A. K. *et al.* Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, 2008.

BALÁZS, N.; SIPOS, P. Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 1, p. 124-130, 2007.

BALDWIN, M. R. *et al.* Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1314-1318, 2008.

BARROS, C. S. L. *et al.* **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Agns Gráfica & Editora, 2006. 207 p. (Coleção Vallée)

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros**, v. 9, n. 4, 1999.

BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 35-52, 2004a.

BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004b.

BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 39, n. 1, p. 17-25, 1996.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia: em suas aplicações a medicina e a higiene**. 7. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1955. 835 p.

BÖHNEL, H.; GESSLER, F. Botulism toxins – cause of botulism and systemic diseases? **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 4, p. 313-345, 2005.

BÖHNEL, H.; WAGNER, C.; GESSLER, F. Tonsils – Place of botulinum toxin production: results of routine laboratory diagnosis in farm animals. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, p. 403-409, 2008.

BOWERSOCK, T. L.; MARTIN, S. Controlled release vaccines in veterinary medicine. In: RATHBONE, M. J.; GURNY, R. **Controlled Release Veterinary Drug Delivery**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000. p. 269-310.

BRAMWEELL, V. W.; EYLES, J. E.; ALPAR, H. O. Particulate delivery system for biodefense subunit vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 9, p.1247-1265, 2005.

BRANDI, Igor Viana. **Desenvolvimento e análises de validação de metodologias para o controle de processo de purificação e fabricação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipo D**. 2007. 260 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo-USP, Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas-IPT, São Paulo, 2007.

**BRITISH Pharmacopoeia (Veterinary)** 2007. London: The Stationery Office, 2006. 276 p.

BROWN, A. T. *et al.* Comparative immunogenicity of two bivalent botulinum vaccines. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 6, p. 388-391, 1999.

BRUGNEROTTO J. *et al.* An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001a.

BRUGNEROTTO, J. *et al.* Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution. **Macromol. Symp.**, v. 168, n. 1, p. 1-20, 2001b.

BYRNE, M. P.; SMITH, L. A. Development of vaccines for prevention of botulism. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 955-966, 2000.

CAI S.; SINGH, B. R.; SHARMA S. Botulism diagnostics: from clinical symptoms to *in vitro* assays. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 109-125, 2007.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros**, v. 11, n. 4, p. 169-173, 2001.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CANEVAROLO JÚNIOR, S. Cromatografia de exclusão por tamanho. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004. p. 117-145.

CARLIER, J. Gas chromatography of metabolic end products and cellular fatty acids for identifying anaerobic bacteria. In: MAINIL J. *et al.* **Genus *Clostridium* - clostridia in medical, veterinary and food microbiology diagnosis and typing**. Brussels: European Commission, 2006. p.130-141.

CARLSON, D. *et al.* Maleation of polylactide (PLA) by reactive extrusion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 72, n. 4, p. 477-485, 1999.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, n. 3, p. 261-268, 2001.

CHENG, L. W. *et al.* Effects of purification on the bioavailability of botulinum neurotoxin type A. **Toxicology**, v. 249, p.123-129, 2008.

CHENITE, A. *et al.* Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v. 21, n. 21, p. 2155-2161, 2000.

COESHOTT, C. M. *et al.* Pluronic® F127-based systemic vaccine delivery systems. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2396-2405, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). **Princípios éticos para o uso de animais de laboratório**. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>>. Acesso em: 22 mai. 2007.

COSTA JÚNIOR, E. C.; MANSUR, H. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, 1460-1466, 2008.

CSL Limited. John Cooper Cox *et al.* **Spray dried vaccine preparation comprising aluminium adsorbed immunogens..** US 5,902,565, July 10 1995, May 11, 1999.

CURCI, Vera Cláudia Lorenzetti Magalhães. **Resposta humoral de bovinos para os toxóides botulínicos C e D**. Orientador: Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra. 2008. 52 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

DANG, J. M.; LEONG, K. W. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 4, p. 487-499, 2006.

DE CAMPOS; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 159-168, 2001.

DEPAZ, R. A.; HENDERSON, I.; ADVANT, S.J. Formulation of botulinum neurotoxin heavy chain fragments for vaccine development: mechanisms of adsorption to an aluminum-containing adjuvant. **Vaccine**, v. 23, n. 31, p. 4029-4035, 2005.

DEPREZ, P. R. Tetanus and botulism in animals. In: Mainil, J. *et al.* **Genus Clostridium - clostridia in medical, veterinary and food microbiology diagnosis and typing**. Brussels: European Commission, 2006. p. 27-36.

DINI, E.; ALEXANDRIDOU, S.; KIPARISSIDES, C. Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 3, p. 375-385, 2003.

DOMARD, A.; RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 5, n.1, p. 49-52, 1983.

DOMINGUES, G. S. *et al.* Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco Modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008.

DUARTE, M. L. *et al.* An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1-3, p. 1-8, 2002.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A. M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 115-119, 2005.

DUTRA, I. S. *et al.* Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 43-48, 2001.

DYR, J. E.; SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 699, n. 1-2, p. 383-401, 1997.

ELLIS, C. E. *et al.* In vitro evaluation methods for *Clostridium botulinum* type C and D vaccines. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 369-372, 1999.

**EUROPEAN Pharmacopoeia 2005**. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2004. v. 2, p. 1248-1249.

FATTAL, E. *et al.* Biodegradable microparticles for the development of less-painful and less-irritating parenterals. In: GUPTA, P. K.; BRAZEAU, G. A. **Injectable drug development**. Denver: Interpharm Press, 1999. p. 355-372.

FERRARI, N. D.; WEISSE, M. E. Botulism. **Advances in Pediatric Infectious Diseases**, v. 10, p. 81-91, 1995.

FERREIRA, Rosa Maria Moraes. **Contaminação ambiental pelo *Clostridium botulinum* tipos C e D de valas de captação hídrica e cultivo do micorganismo em um sistema experimental**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular) – Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FONSECA, Fábio de Souza. **Comparação da resposta humoral de bovinos e cobaias vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D**. 2001. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2001.

GALLO, J. M.; HASSAN, E. E. Receptor-mediated magnetic carries: basis for targeting. **Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 5, p. 300-304, 1988.

GAN, Q. *et al.* Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, p. 65-73, 2005.

GESSLER, F.; BÖNHEL, H. Production and purification of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxin. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 361-367, 1999.

GESSLER, F. *et al.* Immunomagnetic beads assay for the detection of botulinum neurotoxin types C and D. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, n. 3, p. 225-232, 2006.

GESSLER, F., HAMPE, K., BOHNEL, H. Sensitive detection of botulinum. neurotoxin types C and B with an immunoaffinity chromatographic column test. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p.7897-7903, 2005.

GREGORY, A. R. *et al.* Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 73, n. 2, p. 55-61, 1996.

GRENHA, A.; SEIJO, B.; RMUÑÁN-LÓPEZ, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles of lung protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 4-5, p. 427-437, 2005.

GROVES, M. J. Proteins as drug delivery systems. In:\_\_\_\_\_. **Pharmaceutical biotechnology**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Ranton: CRC Press, 2006. p. 215-245.

GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Termochimica Acta**, v. 444, n. 2, p. 128-133, 2006.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 6, p. 744-756, 2006.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 505-517, 2007.

HANES, J.; CLELAND, J. L.; LANGER, R. New advances in microsphere-based single-dose vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 1, p. 97-119, 1997.

HATHEWAY, C. L.; JOHNSON, E. A. *Clostridium*: the spore-bearing anaerobes. In: COLLIER, L.; BALLOW, A.; SUSSMAN, M. (Ed). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**, 9<sup>nd</sup> ed. New York: Oxford University Press, 1998. p. 731-82.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, n. 1, p. 53-65, 1999.

HEUX, I. *et al.* Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 746-751, 2000.

HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS. Protein electrophoresis - applications Guide. San Francisco, CA: Hoefer, 1994. 106 p.

HORA, M.; RADHAKRISHNAN, R. Applications in vaccine and gene delivery. In: SENIOR, J.; RADOMSKY, M. **Sustained-release injectable products**. Englewood: Interpharm Press, 2000. p. 335-370.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal - 2009. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1761&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1761&id_pagina=1)>. Acesso em 02 dez. 2010.

ILLUM, L.; FARRAJ, N. F.; DAVIS, S. S. Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Peptide Drugs. **Pharmaceut. Res.**, v. 11, n. 8, p. 1186-1189, 1994.

ILLUM, L. *et al.* Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, n. 1-3, p. 81-96, 2001.

ILYINSKII, P. Aspects of microparticle utilization for potentiating of novel vaccines: promises and risks. In: MAGARSHAK, Y. *et al.* **Silicon versus carbon: fundamental nanoprocess, nanobiotechnology and risks assessment**. Dordrecht: Springer, 2009. p. 397-411.

ISSA, M. M.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ARTURSSON, P. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2005.

JAGANATHAN, K. S. *et al.* Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly(D,L-lactic-co-glycolic

acid) versus chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, n. 1-2, p. 23-32, 2005.

JAMEELA, S. R.; MISRA, A.; JAYAKRISHNAN, A. Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs. **Journal of Biomaterial Science: Polymer edition**, v. 6, n. 7, p. 621-632, 1994.

JANSEN, B. C.; KNOETZE, P. C.; VISSER, F. The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* types C and D toxoids. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 4, p. 165-174, 1976.

JIANG, T.; ABDEL-FATTAH, W. I.; LAURENCIN, C. T. In vitro evaluation of chitosan/poly (lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 28, p. 4894-4903, 2006.

JIANG, Z. X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 457-463, 2003.

JOHNSON, E. A.; BRADSHAW, M. *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. **Toxicon**, v. 39, n. 11, p. 1703-1722, 2001.

JONGH, K. S.; SCHWARTZKOFF, C. L.; HOWDEN, E. H. *Clostridium botulinum* type D neurotoxin: purification and detection. **Toxicon**, v. 27, n. 2, p. 221-228, 1989.

KANG M. L. *et al.* In vivo induction of mucosal immune responses by intranasal administration of chitosan microspheres containing Bordetella bronchiseptica DNT. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 215-220, 2006.

KANG, M. L. *et al.* Pluronic® F127 enhances the effect as an adjuvant of chitosan microspheres in the intranasal delivery of *Brodetella brochiseptica* antigens containing dermonecrototoxin. **Vaccine**, v. 25, n. 23, p. 4602-4610, 2007.

KANKE, M.; SNIECINSKI, I.; DE LUCA, P. P. Interaction of microspheres with blood constituents: I. Uptake of polystyrene spheres by monocytes and granulocytes and effect on immune responsiveness of lymphocytes. **Journal Parenteral Science Technology**, v. 37, n. 6, p. 210-217, 1983.

KAS, H. S. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. **Journal Microencapsulation**, v. 14, n. 6, p. 689-711, 1997.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010.

KIANG, T. *et al.* The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. **Biomaterials**, v. 25, n. 22, p. 5293–5301, 2004.

KLEWITZ, T. *et al.* Immunochromatographic assay for determination of botulinum neurotoxin type D. **Sensors and Actuators B**, v. 113, n. 2, p. 582-589, 2006.

KONDO, H. *et al.* Titration of botulinum toxins for lethal toxicity by intravenous injection into mice. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, v. 37, p. 131-135, 1984.

KOSAKA, T. *et al.* Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 10, p. 963-967, 1996.

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

KURAZONO, H. *et al.* Procedures for large-scale production and purification of *Clostridium botulinum* C1 toxin for preparation of toxoid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 30, n. 1-2, p. 47-51, 1985.

LAEMMILI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J. Botulismo enzoótico em búfalos no Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1-2, p. 37-42, 1988.

LAVERTU, M. *et al.* A validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1149-1158, 2003.

LEE, J. C.; PUTNAM, M. Veterinary sustained-release parenteral products. In: SENIOR, J.; RADOMSKY, M. **Sustained-release injectable products**. Englewood: Interpharm Press, 2000. p. 309-334.

LEHR, C. M. *et al.* In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 78, n. 1-3, p. 43-48, 1992.

LISBOA, J. A. N. *et al.* Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizoótico dos bovinos no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, n. 2-3, p.67-74, 1996.

LIU, D. *et al.* Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 6, p. 782-785, 2006.

LOBATO, F. C. F. *et al.* Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóides botulínicos monovalentes e bivalente tipos C e D. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 25-27, 1999.

MACLAUGHLIN, F. C. *et al.* Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. **J. Control. Release**, v. 56, n. 1-3, p. 259-272, 1998.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER J. **Biology of Microorganisms**. 9<sup>nd</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2000. 991 p.

MAHMUT, N. *et al.* Mucosal immunisation with *Clostridium botulinum* type C 16 S toxoid and its non-toxic component. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 813-820, 2002.

MAO, S.; SUN, W.; KISSEL, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 62, n. 1, p. 12-27, 2010.

MI, F. L. *et al.* Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. **Biomaterials**, v. 20, n. 17, p. 1603-1612, 1999.

MIYAZAKI, S.; IWASAKI, M.; SAKAGUCHI, G. *Clostridium botulinum* type D toxin: purification, molecular structure, and some immunological properties. **Infection and Immunity**, v. 17, n. 2, p. 395-401, 1977.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **Microbial Physiology** 4<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley-Liss, 2002, 715 p.

MOREIN, B.; HU, K.; ABUSUGRA, I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1367-1382, 2004.

MOURA, Edson Souza. **Preparo, caracterização e perfil de liberação *in vitro* de microesferas de sílica processadas por *spray drying***. 2005. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte, 2005.

MOZZER, Otto. **Cultivo em alta densidade do *Clostridium botulinum* tipo D visando à fabricação de vacinas veterinárias**. Orientador: Maria Candida Reginato Facciotti. 2004. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo-USP, Instituto de Pesquisas Tecnológicas-IPT, Butantan, São Paulo, 2004.

MURILO, M. *et al.* Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 242, n. 1-2, p. 341-344, 2002.

MYLLYKOSKI, J. *et al.* The detection and prevalence of *Clostridium botulinum* in pig intestinal samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.172-177, 2006.

MYLLYKOSKI, J. *et al.* Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 2, p. 284-293, 2009.

NAMUR, Jocimara Ambrosio de Moraes. **Toxóide diftérico: nova roupagem para uma vacina tradicional**. 2007. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Programa

de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), Universidade de São Paulo-USP, Instituto de Química, São Paulo, 2007.

NISHIMURA, K. *et al.* Immunological activity of chitin and its derivatives. **Vaccine**, v. 2, n. 1, p.93-99, 1984.

**OFFICIAL Methods of Analysis of AOAC International** 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg: AOAC International, 2005, cap. 17, p. 96-98.

OGUMA, K. *et al.* Homogeneity and heterogeneity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. **Infection and Immunity**., v. 34, n. 2, p. 382-388, 1981.

OGUMA, K. *et al.* Biochemical classification of clostridium botulinum type c and d strains and their nontoxigenic derivatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 256-260,1986.

O'HAGAN, D. T.; SINGH, M.; ULMER, J. B. Microparticle-based technologies for vaccine. **Methods**, v. 40, n. 1, p. 10-19, 2006.

OLIVEIRA, Bergson Fogaça. **Preparação de microesferas de quitosana por spray drying com diferentes tipos de reticulação para uso na vacinação gênica**. 2004. 107 f. (Dissertação Mestrado em engenharia química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas- Unicamp, Campinas, 2004.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Imobilização e liberação de antígenos solúveis de *Leishmania amazonensis* em microesferas de quitosana. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 146-149, 2005. Suplemento.

ORTOLANI, L. C. *et al.* Botulism outbreak associated with poultry litter consumption in three brazilian cattle herds. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 89-92, 1997.

PACKHAEUSER, C. B. *et al.* In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 445-455, 2004.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nature medicine**, v. 11, n. 4, p. S63-S68, 2005.

Pepić I.; Filipović-Grčić J., Jalšenjak, I.. Bulk properties of nonionic surfactant and chitosan mixtures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 336, p. 135–141, 2009.

PDRhealth. Herbal & Supplements: Chitosan. Disponível em: <[http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/chi\\_0067.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/chi_0067.shtml)> Acesso em: 09 jan. 2007.

PELUSO, G. *et al.* Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. **Biomaterials**, v. 15, n. 15, p. 1215-1220, 1994.

PESSOA JR. A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 444 p.

PORTE, H.; COUARRAZE, G; Microencapsulation processes for the manufacture of systems providing modified release of the active constituent. In: CHULIA, D.; DELAIL, M.; POURCELOT, Y. **Powder technology and pharmaceutical processes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. p. 513-543.

PREIS, I.; LANGER, R. S. A single-step immunization by sustained antigen release. **Journal of Immunological Methods**, v. 28, n. 1-2, p. 193-197, 1979.

QUEIROZ, Rosângela Alencar. **Desenvolvimento de teste de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra as toxinas C e D de *Clostridium botulinum* em bovinos**. 2001. 52 f. Dissertação (Mestrado em biologia parasitária) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (interinstitucional), Mato Grosso do Sul, 2001.

QUIJADA-GARRIDO, I. *et al.* The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol). **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 173–186, 2007.

RADOSTITS, O.M. et al. Diseases associated with bacteria – II. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.** Philadelphia: Elsevier, p. 830-832, 2007.

RAWAT, R.; AHMED, S. A.; SWAMINATHAN, S. High level expression of the light chain of botulinum neurotoxin serotype C1 and an efficient HPLC assay to monitor its proteolytic activity. **Protein Expression and Purification**, v. 60, n. 2, p. 165-169, 2008.

RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 331-336, 1993.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

REGE, P. R.; GARMISE, R. J.; BLOCK, L. H. Spray-dried chitosans Part I: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 252, n. 1-2, p. 41-51, 2003.

**REMINGTON – The science and practice of pharmacy.** 20. ed. Baltimore: University of the Sciences in Philadelphia, 2000.

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

RIVERA, V. R. *et al.* Rapid detection of *Clostridium botulinum* toxins A, B, E, and F in clinical samples, selected food matrices, and buffer using paramagnetic bead-based electrochemiluminescence detection. **Analytical Biochemistry**, v. 353, p.248-256, 2006.

ROCKE, T. E. *Clostridium botulinum*. In: GYLES, C. L.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals.** 2<sup>nd</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. p. 86-96.

ROGERS, P.; GOTTSCHALK, G. Biochemistry and regulation of acid and solvent production in Clostridia. In: WOODS, D. R. **The Clostridia and biotechnology**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1993. p. 25-40.

ROMØREN, K. *et al.* The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. **Int. J. Pharm.**, v. 261, n. 1-2, p. 115–127, 2003.

ROTHEN-WEINHOLD, A.; GURNY, R.; DAHN, M. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 7, p. 222-231, 2000.

SAKAGUCHI, G. *Clostridium botulinum* toxins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 165-194, 1983.

SAKURAI, K.; MAEGAWA, T.; TAKAHASHI, T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(*N*-vinyl pyrrolidone) blends. **Polymer**, v. 41, n. 19, p. 7051-7056, 2000.

SALVARANI, Felipe Masiero. Padronização de um teste de potência de toxóide de Clostridium Septicum em linhagem contínua de célula. 2007. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007 Disponível em: <[www.bibliotecadigital.ufmg.br/.../disserta\\_\\_o\\_felipe\\_masiero\\_salvarani](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/.../disserta__o_felipe_masiero_salvarani)>. Acesso em 03 ago. 2010.

SANTOS, J. E. *et al.* Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SAWAYANAGI, Y.; NAMBU, N.; NAGAI, T. Enhancement of Dissolution Properties of Griseofulvin from Ground Mixtures with Chitin or Chitosan. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 12, p. 4464-4467, 1982.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. *et al.* First case of type A botulism in zebu (*Bos Indicus*). **The Veterinary Record**, v. 3, n. 9, p. 217-218, 1990.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (Brasil). **Instrução normativa nº 23, de 18 de março de 2002**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 21 mar 2002. n. 55, Seção 1.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potencial applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467-1480, 2004.

SHADLE, P. J. Development of recovery process for recombinant proteins and peptides. In: BONTEMPO, J. A. **Development of biopharmaceutical parenteral dosage form**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 31-90.

SHARP, F. A. *et al.* Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. **PNAS**, v. 106, n. 3, p. 870-875, 2009.

SHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. Structure and action of botulinum and tetanus toxins. In: ROOD, J. I. *et al.* **The Clostridia: molecular biology and pathogenesis**. New York: Academic Press, 1997, p. 295-322.

SHIGEMASA, Y. *et al.* Evaluation of different absorbance ratios from spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.18, n. 3, p. 237-242, 1996.

SIEGEL L. S.; METZGER J. F. Effect of Fermentation Conditions on Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1023-1026, 1980.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Veterinários. Informações – mercado veterinário 2009. Disponível em: <  
<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso em 02 dez. 2010.

SINHA, V. R. *et al.* Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 2004.

SINHA, V. R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **Journal Controlled Release**, v. 90, n. 3, p. 261-280, 2003.

SKULBERG A.; HAUSKEN, O. W. The Differentiation of Various Strains of *Clostridium botulinum* and Transformation Experiments with Type E. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 28, n. 1, 1965.

SMITH, L. D. S; SUGIYAMA, H. **Botulism: the organism, its toxins, the disease.** Springfield: Charles C. Thomas, 1977 *apud* FERREIRA, R.M.M. **Contaminação ambiental pelo *Clostridium botulinum* tipos C e D de valas de captação hídrica e cultivo do micorganismo em um sistema experimental.** 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular). Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SONGER, J. G. Clostridial Diseases of Animals. In: ROOD, J. I. *et al.* **The Clostridia: molecular biology and pathogenesis.** New York: Academic Press, 1997. p. 153-182.

SOUZA JÚNIOR, M.F. *et al.* Padronização da titulação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D em linhagem contínua de células como alternativa ao bioensaio animal. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 600-603, 2010.

SPICKLER, A. R.; ROTH, J. A. Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 273-281, 2008

STEINMAN, A. *et al.* Cattle immune response to botulinum type D toxoid: results of a vaccination study. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7636-7640, 2007.

STEINMAN, A. *et al.* Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against Botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 8, p. 862-868, 2006.

STORNI, T. *et al.* Innate Immunity Together with Duration of Antigen Persistence Regulate Effector T Cell Induction. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 795-801, 2003.

SYUTO, B.; KUBO, S. Isolation and molecular size of *Clostridium botulinum* type C toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 400-405, 1977.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. **Advanced Polymer Science**, v. 94, p. 107-141, 1990.

TERAJIMA, J. *et al.* Purification and characterization of neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* type C 6813. **Infection and Immunity** v. 48, n. 2, p. 312-317 1985.

TIPTON, A. J.; DUNN, R. L. In situ gelling systems. In: SENIOR, J.; RADOMSKY, M. **Sustained-release injectable products**. Englewood: Interpharm Press, 2000, p. 241-278.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária – uma introdução**. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998.

TOBIO, M. *et al.* A novel system based on a poloxamer /PLGA blend as a tetanus toxoid delivery vehicle. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 5, p. 682-688, 1999.

TOKARNIA, C. H. *et al.* Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, n. 3, p. 465-472, 1970.

TOMIHATA, K; IKADA, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 567-575, 1997.

TORRES, M. A. *et al.* Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros**, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.

TORRES, Marco Antonio. **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima**. Orientador: Cesar Costapinto Santana. 2006. 123 f. Tese (Doutorado Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, Campinas, 2006.

UNITED States Department of Agriculture. *Clostridium Botulinum* Type C Bacterin – Toxoid. In: **CODE of Federal Regulations – CFR**, Title 9: Animals and Animal Products,

Chapter I: Animal and Plant Health Inspection Service, Department of Agriculture . Sec. 113.110, 2009. Disponível em: < <http://frwebgate6.access.gpo.gov/cgi-bin/TEXTgate.cgi?WAISdocID=288006268681+1+1+0&WAIAction=retrieve>> Acesso em: 22 Jun. 2009.

VAN DER LUBBEN, I. M. *et al.* Chitosan for mucosal vaccination. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 139-144, 2001.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 5, p. 999-1022, 2008.

VU, T. L. A. **Incidence of *Clostridium botulinum* Spores in Honey and Infant Food Samples Collected from Vietnam and Germany.** Orientador: Prof. Dr. Hegel Bönhel. 2006. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrícolas) – Faculty of Agricultural Sciences, Georg-August-University Göttingen, Göttingen, 2006.

WALKER, P. D. *et al.* Development, preparation and safety testing of a *Clostridium welchii* type C toxoid. I: preliminary observations in man in Papua New Guinea. **Journal of Biological Standardization**, v. 7, n. 4, p. 315-323, 1979.

WAN, Y. *et al.* Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes. **Thermochimica Acta**, v. 487, n. 1-2, p. 33–38, 2009.

WANG, C. *et al.* Molecularly engineered poly (ortho ester) microspheres for enhanced delivery of DNA vaccines. **Nature Materials**, v. 3, p. 190-196, 2004.

WANG, L. Y. *et al.* Preparation and improvement of release behaviour of chitosan microspheres containing insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1-2, p. 187-195, 2006.

WESTERINK, M.A.J. *et al.* ProJuvant™ (Pluronic F127®/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxóide. **Vaccine**, v. 12, p. 711-723, 2001

WEBB, R. P. *et al.* Protection with recombinant *Clostridium botulinum* C1 and D binding domain subunit (Hc) vaccines against C and D neurotoxins. **Vaccine**, v. 25, p. 4273-4282.

WHITLOCK, R. H.; WILLIAMS, J. M. Botulism toxicosis of cattle. In: SMITH, R. A. (Ed.), **Proceedings of the 32nd annual convention of the American Association of Bovine Practitioners**. American Association of Bovine Practitioners, Nashville, Tenn. 1999. p. 45-53.

WINZENBURG, G. *et al.* Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1453-1466, 2004.

WISDOM C.; MIDURA T. F. Effects of *Clostridium botulinum* toxins on infant and adult mice. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 4, p. 955-957, 1982.

WOODWARD, L.A. *et al.* Expression of Hc subunits from *clostridium botulinum* types C and D and their evaluation as candidate vaccine antigens in mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2941–2944, 2003.

WU, J.; SU, Z.; MA, G. H. A thermo-and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 315, n. 1-2, p. 1-11, 2006.

XIANG, S. D. *et al.* Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1-9, 2006.

XUE, Z. X. *et al.* Application of chitosan microspheres as carries of LH-RH analogue TX46. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, n. 9, p. 893-901, 2006.

Yang, Y. M. *et al.* The effect of different sterilization procedures on chitosan dried powder. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 3, p. 1968–1972, 2007.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, n. 5, p. 575–579, 2004.



## ANEXO A – Certificados do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 107/2008**, relativo ao projeto intitulado "*Encapsulamento de toxóide botulínico purificado em microesferas de quitosana para fins de imunização de cobaias*", que tem como responsável(is) **Armando da Silva Cunha Júnior**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 08/2008**.

Este certificado expira-se em **13/ 08/ 2013**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 107/2008**, related to the project entitled "*Encapsulation of purified botulinum toxoid in chitosan microspheres for immunization of guinea pigs*", under the supervisors of **Armando da Silva Cunha Júnior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 13, 2008**.

This certificate expires in **August 13, 2013**.

Belo Horizonte, 18 de Agosto de 2008.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Coordenador do CETEA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 17/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Desenvolvimento de vacina de dose única contra o botulismo tipo D utilizando microesferas de quitosana**", que tem como responsável(is) **Armando da Silva Cunha Júnior**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 04/2010**.

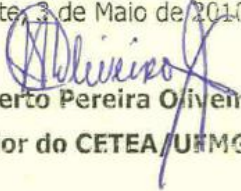
Este certificado expira-se em **28/ 04/ 2015**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 17/2010**, related to the project entitled "**Development of a single shot vaccine against botulism type D using chitosan microspheres**", under the supervisors of **Armando da Silva Cunha Júnior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 28, 2010**.

This certificate expires in **April 28, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Maio de 2010.

  
**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 -- Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II -- 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

