

ROGER SHOJI SARI

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
CONTRA *C. botulinum* TIPO C E TIPO D UTILIZANDO QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof.^a Anna Christina de Almeida
Coorientador: Prof. Igor Viana Brandi

MONTES CLAROS

2010

S243d
2010

Sari, Roger Shoji.
Desenvolvimento de vacina de liberação controlada contra *C. botulinum* tipo c e tipo d utilizando quitosana / Roger Shoji Sari.
Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2010.
141 f: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

Orientadora: Prof.^a Anna Christina de Almeida.

Banca examinadora: Wagner Quintilio, Rogério Marcos de Souza, Igor Viana Brandi, Anna Christina de Almeida.

Inclui bibliografia: f. 130-140.

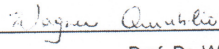
1. Vacina controlada - Botulismo. 2. Bovino - Doenças. 3. Agroecologia. I. Almeida, Anna Christina de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 636.09

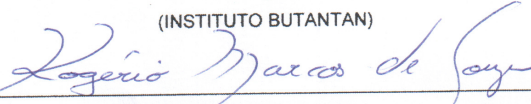
Elaborada pela BIBLIOTECA COMUNITÁRIA DO ICA/UFMG

Roger Shoji Sari

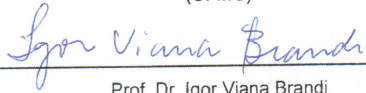
DESENVOLVIMENTO DE VACINA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
CONTRA *C. BOTULINUM* TIPO C E TIPO D UTILIZANDO
QUITOSANA



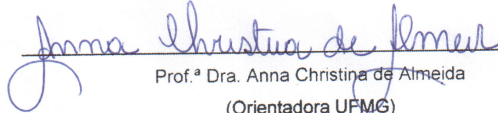
Prof. Dr. Wagner Quintilio
(INSTITUTO BUTANTAN)



Prof. Dr. Rogério Marcos de Souza
(UFMG)



Prof. Dr. Igor Viana Brandi
(Co-orientador UFMG)



Prof.ª Dra. Anna Christina de Almeida
(Orientadora UFMG)

Aprovada em 15 de outubro de 2010.

Montes Claros - MG
2010

Aos meus pais, Lauro e Harumi.
A Simone, minha companheira
incondicional de todos os
momentos.
Por estarem sempre ao meu
lado, me incentivando e
apoiando, com a certeza do meu
sucesso em todas as batalhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A Vallée S/A, na pessoa do Dr. Otto Domenici Mozzer, pelo suporte fornecido à execução deste trabalho, sempre buscando levar ao pecuarista brasileiro produtos e serviços de primeira qualidade. Obrigado pela oportunidade de fazer parte desta família.

A Prof.^a Anna Christina de Almeida, por aceitar-me como seu orientado, pelo apoio sempre constante, pelas conversas e oportunidades oferecidas.

Obrigado ao Prof. Dr. Igor Viana Brandi, grande idealizador deste trabalho, por ser fundamental na minha conquista da oportunidade de fazer o mestrado estando em uma empresa privada.

A Eliane Macedo Sobrinho, por todo seu esforço, conversas e auxílio em todas as atividades com experimentação animal realizadas no biotério experimental da Vallée S/A.

Ao Alex Sander Rodrigues Cangussu, pelo incentivo e por toda sua experiência no cultivo e formulação de vacinas clostridiais.

Agradeço ao grande amigo e colega de laboratório Adair, meu braço direito em todos os experimentos de formulação de vacinas e padronização da quitosana, por todo o apoio e idéias que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Márcio e ao José Geraldo, os especialistas em fermentação, pelo auxílio e apoio durante todas as etapas de produção antigênica.

A Cássia, ao Roney, ao Ricardo Oliveira, ao Diogo e à Rafaela, pelo companheirismo ao longo da realização de todo este trabalho.

Ao Diego, meu amigo de empresa e mestrado, pela dura, mas prazerosa batalha que enfrentamos juntos durante toda esta empreitada.

A todos os colegas de mestrado da UFMG.

Obrigado ao meu sogro Roberto e a minha sogra Keiko, por todo carinho e incentivo ao longo desta jornada.

A todos os meus amigos, pelas conversas e conhecimento compartilhado.

Agradeço especialmente aos meus pais, pois sem seu amor, incentivo e apoio, jamais chegaria aonde cheguei.

De todas as pessoas para as quais agradei, deixei por último a mais especial, minha eterna companheira, amiga e esposa Simone. Obrigado por todos os momentos de esforço, apoio, companheirismo, conversas, dedicação. Dedico o resultado deste trabalho a você! Muito obrigado por tudo!

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver..."*
(Martin Luther King)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

- FIGURA 1 -** Esquema de purificação das toxinas botulínicas tipo C e tipo D..... 28
- FIGURA 2 -** Esquema de purificação da toxinas botulínicas tipo D, descrito..... 28
- FIGURA 3 -** Estrutura bioquímica do polímero de quitosana, mostrando seus dois copolímeros e a ligação entre eles 40

CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE TOXÓIDES BOTULÍNICOS TIPO C E TIPO D PARA UTILIZAÇÃO COMO ANTÍGENOS VACINAIS

- FIGURA 1 -** Coloração de Gram de *Clostridium botulinum* tipo C, obtida a partir da amostra de Banco de Trabalho cultivada em meio de cultura PYGA, em câmara de anaerobiose a $37\pm 2^\circ\text{C}$, por 72 horas. Aumento: 1000 X 66
- FIGURA 2 -** Coloração de Gram de *Clostridium botulinum* tipo D, obtida a partir da amostra de Banco de Trabalho cultivada em meio de cultura PYGA, em câmara de anaerobiose a $37\pm 2^\circ\text{C}$, por 72 horas. Aumento: 1000 X 67
- GRÁFICO 1 -** Dados de densidade óptica a 600 nm obtidos nos três ensaios de *C. botulinum* tipo C, mostrando o perfil de crescimento bacteriano ao longo do tempo..... 71
- GRÁFICO 2** Dados de densidade óptica a 600 nm obtidos nos três ensaios de *C. botulinum* tipo D, mostrando o perfil de crescimento bacteriano ao longo do tempo..... 71

CAPÍTULO 3 - UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA ENCAPSULAMENTO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE COACERVAÇÃO SIMPLES

- FIGURA 1 -** Estrutura molecular do Polisorbato 80. Percebe-se na estrutura a presença de vários radicais oxietileno, dispostos nas cadeias a, b, c e d, ligadas a uma molécula de sorbitol, e finalizadas com um grupo hidroxila, com exceção da cadeia d, que leva um ácido graxo monoinsaturado ao final de sua cadeia..... 98

FIGURA 2	Estrutura molecular do Poloxamer. Precebe-se na estrutura a presença de vários radicais oxietileno (a) intercalados com radicais oxipropileno (b).....	98
GRAFICO 1 -	Curva padrão de BSA utilizando a metodologia proposta por Bradford (1976), adaptada conforme os procedimentos internos da Vallée S.A.....	93
GRAFICO 2 -	Gráfico de % de Polisorbato 80 x Absorbância a 595 nm, utilizando a metodologia de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), adaptada.....	94
GRAFICO 3 -	Gráfico de % de Poloxamer X Absorbância a 595 nm, utilizando a metodologia de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), adaptada.....	94
GRAFICO 4 -	Comparação entre as concentrações teóricas de BSA na amostra e as concentrações observadas pela técnica de Bradford na presença de 1,25% de Poloxamer.....	96
GRAFICO 5 -	Comparação entre as concentrações teóricas de BSA na amostra e as concentrações observadas pela técnica de Bradford na presença de 1,25% de Polisorbato 80.....	97
GRAFICO 6 -	Curva de precipitação da quitosana em função do volume de adição da solução de sulfato de sódio 20%.....	99
GRÁFICO 7 -	Curva padrão de BSA utilizando a metodologia proposta por Bradford (1976), adaptada conforme os procedimentos internos da Vallée S.A.....	100

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE TOXÓIDES BOTULÍNICOS TIPO C E TIPO D PARA UTILIZAÇÃO COMO ANTÍGENOS VACINAIS

1 -	Dados de morte ou sobrevivência de camundongos inoculados com a mistura de amostra de toxina botulínica tipo C e anticorpo específico.....	68
2 -	Dados de morte ou sobrevivência de camundongos inoculados com as diluições da amostra de toxina botulínica tipo C, sem a reação com o anticorpo específico.....	68
3 -	Dados de morte ou sobrevivência de camundongos inoculados com a mistura de amostra de toxina botulínica tipo D e anticorpo específico.....	68
4 -	Dados de morte ou sobrevivência de camundongos inoculados com as diluições da amostra de toxina botulínica tipo D, sem a reação com o anticorpo específico.....	69
5 -	Dados de sobrevivência ou morte dos camundongos inoculados com 0,2 mL das diluições da amostra obtida ao final dos três ensaios de <i>C. botulinum</i> tipo C, via endovenosa.....	73
6 -	Dados de sobrevivência ou morte dos camundongos inoculados com 0,2 mL das diluições da amostra obtida ao final do primeiro ensaio de <i>C. botulinum</i> tipo D, via endovenosa.....	74
7 -	Dados de sobrevivência ou morte dos camundongos inoculados com 0,2 mL das diluições da amostra obtida ao final do segundo e terceiro ensaios de <i>C. botulinum</i> tipo D, via endovenosa.....	75
8 -	Dados de sobrevivência dos cobaios ao longo dos 14 dias de teste, inoculados com toxina botulínica tipo C submetida a inativação com 0,6% de formalina, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 100 rpm, durante 7 dias.....	78
9 -	Dados de sobrevivência dos cobaios ao longo dos 14 dias de teste, inoculados com toxina botulínica tipo C submetida a inativação com 0,8; 1; 1,2 e 1,5% de formalina, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 100 rpm, durante 7 dias.....	78
10 -	Dados de sobrevivência dos cobaios ao longo dos 14 dias de teste, inoculados com toxina botulínica tipo D submetida à inativação com 0,6% de formalina, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 100 rpm, durante 7 dias.....	79

11 -	Dados de sobrevivência dos cobaios ao longo dos 14 dias de teste, inoculados com toxina botulínica tipo D submetida a inativação com 0,8; 1; 1,2 e 1,5% de formalina, a 37±2°C sob agitação de 100 rpm, por 7 dias. V = vivo.....	79
------	---	----

CAPÍTULO 3 - UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA ENCAPSULAMENTO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE COACERVAÇÃO SIMPLES

1 -	Concentrações de soroalbumina bovina presentes nas amostras utilizadas para a construção da curva padrão, utilizada para posterior determinação de concentração protéica pelo método de Bradford (1976).....	87
2 -	Concentração de polisorbato 80 presentes nas amostras, preparadas para verificação de leitura pelo método de Bradford (1976) a 595 nm.....	88
3 -	Concentração de poloxamer presentes nas amostras, preparadas para verificação de leitura pelo método de Bradford (1976) a 595 nm.....	88
4 -	Concentrações das amostras de BSA preparadas, na presença de 1,25% de Polisorbato 80 ou Poloxamer, para verificação da interferência sobre a quantificação proteica pelo método de Bradford.....	89
5 -	Volume de solução de sulfato de sódio 20% (m/v) adicionada a cada recipiente contendo 50 mL de solução base de quitosana, para avaliação da precipitação do polímero.....	90
6 -	Concentração proteica final das seis soluções base de quitosana preparadas, posteriormente submetidas aos testes de encapsulamento.....	91
7 -	Teste de quantificação de diferentes concentrações de BSA na presença de 1,25% de Poloxamer, através da metodologia de Bradford (1976).....	95
8 -	Teste de quantificação de diferentes concentrações de BSA na presença de 1,25% de Polisorbato 80, através da metodologia de Bradford (1976).....	96
9 -	Teste de porcentagem de encapsulamento de BSA depois da precipitação da quitosana, para avaliação da eficiência de encapsulamento da metodologia proposta.....	101

10 -	Resultados de eficiência dos testes de encapsulamento dos toxóides botulínicos tipos C e D, utilizando a metodologia proposta.....	102
------	--	-----

CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE UMA VACINA DE DOSE ÚNICA CONTRA O BOTULISMO ANIMAL, FORMULADA UTILIZANDO O POLÍMERO DE QUITOSANA COMO ADJUVANTE

1 -	Vacinas controle formuladas com diferentes quantidades de toxóides botulínicos tipo C e tipo D, utilizando como adjuvante o hidróxido de alumínio, elaboradas para avaliação da eficácia e inocuidade e comparação com as vacinas <i>single shot</i>	111
2 -	Composição das vacinas experimentais de dose única com quitosana, elaboradas na primeira etapa, a serem avaliadas em comparação com as vacinas controle.....	113
3 -	Composição das vacinas experimentais de dose única com quitosana, elaboradas na segunda etapa, a serem avaliadas em comparação com as vacinas controle.....	114
4 -	Diluições do <i>pool</i> de soros obtidos para cada vacina e reação com a toxina padrão, para o teste das vacinas controle.....	116
5 -	Diluições do <i>pool</i> de soros obtidos para cada vacina e reação com a toxina padrão, para o teste das vacinas de liberação controlada.....	118
6 -	Resultado do teste de potência das vacinas controle obtido através da técnica de soroneutralização em camundongos, em U.I./mL.....	120
7 -	Resultado do teste de potência das vacinas <i>single shot</i> , primeiro teste, obtido através da técnica de soroneutralização em camundongos, em U.I./mL.....	122
8 -	Resultado do teste de potência das vacinas <i>single shot</i> , segundo teste, obtido através da técnica de soroneutralização em camundongos, em U.I./mL.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP –	Adenosine Monophosphate
ATP –	Adenosine Triphosphate
A/O –	Água/Óleo
A/O/A –	Água/Óleo/Água
BSA –	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CETEA/UFMG –	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais
DL₅₀ –	Dose Letal Capaz de Matar 50% dos Animais Inoculados
DMAE –	Dimetilaminoetanol
DNA –	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA –	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
HPLC –	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IgA –	Munoglobulina Tipo A
IgE –	Imunoglobulina Tipo E
IgG –	Imunoglobulina Tipo G
L+/10 –	Menor quantidade de toxina que, quando misturada a 0,1u.i. de antitoxina padrão, é capaz de matar 100% dos animais inoculados, em um período de 72 horas
LANAGRO –	Laboratório Nacional Agropecuário
LTV –	Laboratório de Tecnologia de Vacinas
MAPA –	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NAP –	<i>Non-toxic Neurotoxin Associated Proteins</i>
O/A –	Óleo/Água
PLGA –	<i>Poly Lactic Co-Glycolic Acid</i>

PTM –	Pressão Transmembranar
PYGA –	<i>Peptone Yeast Glucose Agar</i>
SDS –	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TH1 –	<i>T helper 1</i>
TPP –	Tripolifosfato
TSA –	<i>Tryptic Soy Agar</i>
U.I. –	Unidade Internacional
Vvm –	Volume de gás por volume de meio por minuto

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1.1	Botulismo.....	20
1.2	Botulismo Animal.....	21
1.3	Agente etiológico.....	22
1.4	Neurotoxinas botulínicas.....	23
1.5	Controle da expressão dos genes produtores de neurotoxinas	24
1.6	Mecanismo de ação das neurotoxinas botulínicas.....	25
1.7	Reações imunológicas cruzadas entre neurotoxinas botulínicas.....	26
1.8	Purificação de neurotoxinas botulínicas tipo C e tipo D.....	27
1.9	Inativação de toxinas com formaldeído.....	29
1.10	Prevenção do botulismo.....	31
1.11	Eficiência da vacinação contra o botulismo.....	32
1.12	Reações vacinais.....	35
1.13	Estresse animal.....	37
1.14	Sistemas de liberação de proteínas.....	39
1.15	Quitosana.....	40
1.15.1	Caracterização bioquímica.....	40
1.15.2	Preparo de microesferas de quitosana.....	41
1.15.3	Eficiência de encapsulamento.....	44
1.15.4	Utilização.....	46

	CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE TOXÓIDES BOTULÍNICOS TIPO C E TIPO D PARA UTILIZAÇÃO COMO ANTÍGENOS VACINAIS.....	51
	RESUMO.....	51
	ABSTRACT.....	52
1	INTRODUÇÃO.....	53
1.1	Objetivo geral.....	54
1.2	Objetivos específicos.....	54
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1	Origem das cepas referência.....	56
2.2	Meios de cultura utilizados.....	56
2.3	Produção dos Bancos Máster.....	56
2.4	Produção dos Bancos de Trabalho.....	57
2.5	Cultivo de <i>C. botulinum</i> tipo C e tipo D.....	58
2.5.1	Ativação.....	58
2.5.2	Pré-semente 1.....	58
2.5.3	Inóculo.....	59
2.5.4	Cultivo.....	59
2.6	Clarificação do sobrenadante do cultivo.....	59
2.7	Purificação parcial da toxina.....	60
2.8	Inativação da toxina parcialmente purificada.....	61
2.8.1	Cinética de inativação.....	61
2.8.2	Inativação.....	61
2.9	Controles de qualidade.....	61
2.9.1	Testes de pureza.....	61
2.9.2	Interpretação da prova de pureza.....	62

2.9.3	Teste de capacidade de produção de toxina específica.....	62
2.9.4	Interpretação do teste de capacidade de produção de toxina específica.....	63
2.9.5	Teste de esterilidade.....	63
2.9.6	Interpretação da prova de esterilidade.....	64
2.9.7	Teste de toxicidade em DL ₅₀ /mL.....	64
2.9.8	Teste de inativação.....	65
2.9.9	Interpretação do teste de inativação.....	65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1	Teste de pureza dos Bancos de Trabalho de <i>C. botulinum</i> tipo C e tipo D.....	66
3.2	Teste de capacidade de produção de toxina específica.....	67
3.3	Produção e obtenção dos toxoides botulínicos tipos C e D.....	70
3.3.1	Cultivo de <i>Clostridium botulinum</i> tipo C e tipo D.....	70
3.3.1.1	Crescimento celular.....	70
3.3.2	Produção de toxina.....	72
3.3.3	Pureza do cultivo.....	76
3.3.4	Clarificação do caldo fermentado.....	76
3.3.4.1	Análise de toxicidade do caldo clarificado.....	76
3.3.5	Purificação parcial das toxinas botulínicas.....	77
3.3.5.1	Resultados de toxicidade da toxina parcialmente purificada.....	77
3.3.6	Inativação das toxinas botulínicas.....	78
3.3.6.1	Cinética de inativação.....	78
3.4	Teste de esterilidade dos toxoides botulínicos tipo C e tipo D	79
4	CONSIDERAÇÃO FINAL.....	80

	CAPÍTULO 3 - UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA ENCAPSULAMENTO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE COACERVAÇÃO SIMPLES.....	81
	RESUMO.....	81
	ABSTRACT.....	82
1	INTRODUÇÃO.....	83
1.1	Objetivo geral.....	84
1.2	Objetivos específicos.....	84
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1	Testes preliminares de trabalho com o polímero de quitosana	85
2.1.1	Preparo da solução base de quitosana.....	85
2.1.2	Precipitação da quitosana.....	85
2.2	Determinação de parâmetros de trabalho com o polímero de quitosana.....	86
2.2.1	Teste de interferência do agente tensoativo.....	86
2.2.1.1	Curva padrão de soroalbumina bovina.....	86
2.2.1.2	Quantificação do polisorbato 80 e do poloxamer.....	87
2.2.1.3	Quantificação proteica na presença de polisorbato 80 e poloxamer.....	88
2.2.2	Volume de agente precipitante para precipitação do polímero..	89
2.2.3	Medida da eficiência de encapsulamento de proteína.....	90
2.2.3.1	Curva padrão de soroalbumina bovina.....	90
2.2.3.2	Testes de encapsulamento.....	90
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
3.1	Testes preliminares de trabalho com o polímero de quitosana	92
3.2	Teste de interferência do agente tensoativo.....	92
3.2.1	Curva padrão de soroalbumina bovina.....	92

3.2.2	Quantificação do Polisorbato 80 e do Poloxamer.....	93
3.2.3	Quantificação proteica na presença de Polisorbato 80 e Poloxamer.....	95
3.3	Volume de agente precipitante para precipitação do polímero	99
3.4	Medida da eficiência de encapsulamento de proteína.....	100
3.4.1	Curva padrão de soroalbumina bovina.....	100
3.4.2	Testes de encapsulamento.....	101
5	CONSIDERAÇÃO FINAL.....	105
	CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE UMA VACINA DE DOSE ÚNICA CONTRA O BOTULISMO ANIMAL, FORMULADA UTILIZANDO O POLÍMERO DE QUITOSANA COMO ADJUVANTE.....	106
	RESUMO.....	106
	ABSTRACT.....	107
1	INTRODUÇÃO.....	108
1.1	Objetivo geral.....	109
1.2	Objetivos específicos.....	109
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	110
2.1	Formulação de vacinas.....	110
2.2	Formulação das vacinas controles.....	110
2.2.1	Preparo do gel de hidróxido de alumínio.....	110
2.2.2	Preparo do diluente da vacina.....	110
2.2.3	Antígenos.....	110
2.2.4	Preparo das vacinas.....	110
2.2.5	Vacinas de liberação controlada.....	111
2.2.5.1	Preparo da solução base de quitosana.....	111
2.2.5.2	Preparo do gel de quitosana.....	112

2.2.5.3	Preparo da solução de sulfato de sódio 20%.....	112
2.2.5.4	Preparo da vacina – Primeiro teste.....	112
2.2.5.4.1	Antígenos.....	112
2.2.5.4.2	Formulação.....	112
2.2.5.5	Preparo da vacina – Segundo teste.....	113
2.2.5.5.1	Antígenos.....	113
2.2.5.5.2	Formulação.....	113
2.2.6	Testes de esterilidade.....	114
2.2.7	Interpretação da prova de esterilidade.....	115
2.2.8	Testes clínicos.....	115
2.2.8.1	Animais.....	115
2.2.8.2	Teste das vacinas controle.....	116
2.2.8.2.1	Vacinação.....	116
2.2.8.2.2	Soroneutralização em camundongos.....	116
2.2.8.3	Testes das vacinas de liberação controlada.....	117
2.2.8.3.1	Vacinação.....	117
2.2.8.3.2	Soroneutralização em camundongos.....	118
2.2.8.4	Testes de inocuidade.....	119
2.2.9	Análise dos dados.....	119
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	120
3.1	Testes de esterilidade.....	120
3.2	Testes de potência.....	120
3.2.1	Vacinas controle.....	120

3.2.2	Vacinas de liberação controlada.....	122
3.2.2.1	Primeiro teste.....	122
3.2.2.2	Segundo teste.....	122
3.3	Testes de inocuidade.....	127
4	CONSIDERAÇÃO FINAL.....	129
	REFÊRENCIAS.....	130
	ANEXO A – Certificado do CETEA.....	141

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Botulismo

Em regiões com grandes períodos de seca, o solo e o pasto permanecem com níveis baixos de minerais, principalmente o fósforo. O baixo teor desse elemento mineral faz com que os animais sofram uma deficiência, o que os leva à osteofagia, que é o hábito de roer ossos de cadáveres. Por isso, a região do cerrado, de clima semiárido, como o norte de Minas Gerais, que possui solo considerado mais pobre, registra muitos casos de botulismo (BARROS *et al.*, 2006).

O botulismo é uma intoxicação alimentar resultante da ingestão e absorção de toxinas presentes em ossos e restos de cadáveres em decomposição, que levam o animal a um quadro de paralisia flácida dos músculos. A toxina botulínica é produzida pela bactéria *Clostridium botulinum* e também pode ser encontrada em silagem ou feno, muito utilizado como ração dos animais, contaminado pelas carcaças de pequenos animais mortos acidentalmente e incorporado ao alimento durante sua preparação (SCHIAVO; MONTECUCCO, 1997).

A toxina botulínica também pode ser encontrada em ração mal conservada, com matéria orgânica em decomposição, que cria condições ideais para multiplicação bacteriana e a produção de neurotoxina botulínica. Reservatórios de água contaminados por carcaças de roedores ou pequenas aves também podem ser considerados possíveis fontes de infecção para bovinos (SCHIAVO; MONTECUCCO, 1997).

O botulismo é uma doença bacteriana considerada endêmica em alguns continentes como a América do Sul, América do Norte, Oceania e África. A doença está associada a hábitos de osteofagia, normalmente em áreas deficientes em fósforo (QUEIROZ, 2001; SONGER, 1997). Os agentes causadores do botulismo são bactérias do gênero *Clostridium*, como o *Clostridium botulinum*, *Clostridium barati* e *Clostridium butyricum* (SCHIAVO;

MONTECUCCO, 1997). O *C. botulinum* é responsável por 99,5% dos casos de botulismo. As neurotoxinas botulínicas bloqueiam as junções neuromusculares voluntárias e autonômicas, impedindo, desta forma, a estimulação das fibras motoras (KOUSSOULAKOS, 2009). É uma doença caracterizada por sintomas de paralisia nervosa, frequentemente fatal, resultado da ingestão de alimentos que contêm a neurotoxina produzida principalmente pelo *Clostridium botulinum*. A doença também pode se originar a partir da toxina produzida *in vivo* por organismos que crescem em feridas infectadas ou por colonização do trato gastrointestinal (HATHEWAY, 1995).

1.2 Botulismo Animal

O botulismo animal é o mais prevalente em toda a face da Terra e ocasiona graves perdas de animais selvagens e domésticos. O botulismo possui importância econômica em gado, frangos, perus, gansos e carneiros. O crescimento da bactéria responsável pela doença em silos ou a suplementação alimentar baseada em produtos de origem animal pode levar à intoxicação dos rebanhos (SMITH; SUGYAMA, 1998).

Geralmente os bovinos são acometidos pelo *Clostridium botulinum* tipo C e tipo D. Animais que ingerem água contaminada por carcaças de outros animais acometidos pelo botulismo podem adquirir a doença. Outras fontes de contaminação são pastos em decomposição, possíveis locais para a proliferação do *C. botulinum* (SCHIAVO; MONTECUCCO, 1997).

Em condições favoráveis, o *C. botulinum* permanece na sua forma vegetativa e quando em condições desfavoráveis a bactéria esporula. Sua forma esporulada pode ser encontrada no solo, na água e no próprio trato digestivo do animal. Quando o animal morre, são criadas condições de putrefação ideais para o desenvolvimento dos esporos, que passam à forma vegetativa e produzem a toxina, que, nestas condições, é estável e altamente letal. Quando ingerida, causa a doença (BLOOD; RADOSTITS, 1991).

A sintomatologia da doença está diretamente relacionada ao montante de toxina ingerida, bem como sua gravidade. Maiores quantidades ingeridas

levam a um quadro clínico de rápida evolução dos sintomas, normalmente direcionando a óbito em poucas horas, enquanto que menores quantidades ingeridas determinam um quadro de evolução mais lento, podendo levar até cerca de uma semana, sendo que alguns animais podem resistir à intoxicação (SCHIAVO; MONTECUCCO, 1997).

O botulismo é uma das principais causas de mortalidade bovina nos sistemas de produção de corte e de leite, nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. Ovinos, caprinos, equinos, aves e, esporadicamente, os suínos também podem ser acometidos (BARROS *et al.*, 2006). 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).

1.3 Agente etiológico

O gênero *Clostridium* é formado por bactérias anaeróbias, Gram-positivas, bacilos formadores de endósporos e incapazes de realizar a redução dissimilatória do sulfato. O gênero é um dos maiores no reino procarioto e, portanto, apresenta uma ampla diversidade fisiológica e metabólica (MITCHELL, 2001).

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria que pode ser encontrada no solo, poeira, frutas, vegetais frescos, carnes, peixes, água e no tubo digestivo de espécies animais e também do homem. Cadáveres em decomposição têm papel importante como fonte de contaminação. Quando em estado vegetativo, o *Clostridium botulinum* pode ser inativado por compostos clorados após cerca de vinte minutos de contato, pela luz solar após uma a três horas ou por aquecimento a 85°C durante cinco minutos. Porém, seus esporos são muito resistentes ao calor, luz, desidratação e radiação. Podem ser inativados por calor a 121°C durante pelo menos quinze minutos e através de cloro, formol, ácidos e bases fortes, óxidos de etileno e propileno. São capazes de resistir à luz ultravioleta, alcoóis, compostos fenólicos e compostos orgânicos mercuriais (FERRARI; WEISSE, 1995; VU, 2006).

1.4 Neurotoxinas botulínicas

As neurotoxinas botulínicas são as substâncias mais letais conhecidas em todo o mundo. Um micrograma é certamente suficiente para matar uma pessoa quando inalado, portanto um grama seria, teoricamente, suficiente para matar um milhão de pessoas (KOUSSOULAKOS, 2009). A toxina botulínica é efetiva se inoculada por vias intravenosa, intraperitoneal ou por inalação de aerossol. (FRANZ *et al.*, 1993). Quando a toxina é injetada por via parenteral, as doses necessárias para causar óbito são muito menores quando comparadas com as doses necessárias se a toxina for ingerida. Isso pode ser devido à digestão de parte da toxina por proteases presentes no trato digestivo (GILL, 1982; BLOOD; RADOSTITIS, 1991).

As neurotoxinas produzidas por *Clostridium botulinum* são classificadas em sete tipos sorologicamente distintos (A, B, C, D, E, F e G), que, apesar de serem neutralizadas somente pelos respectivos anticorpos homólogos, possuem ação farmacológica semelhante (SONGER, 1997; RAWAT *et al.*, 2008). Os genes que codificam a produção das neurotoxinas botulínicas tipo C e tipo D estão associados ao fago, enquanto que para a neurotoxina tipo G os genes estão associados ao plasmídeo. Os demais tipos de neurotoxina possuem genes associados ao DNA cromossômico (JOHNSON; BRADSHAW, 2001).

As bactérias do gênero *Clostridium* produzem toxinas progenitoras como complexos de 300, 500 ou 900 kDa, com componentes não tóxicos, as chamadas NAPs, sendo que alguns desses componentes possuem atividade hemaglutinante. As NAPs variam entre os diversos sorotipos e formam complexos de 900 e 500 kDa com as toxinas tipos A, B, D e G enquanto que as dos tipos E e F formam somente complexos de 500 e 300 kDa. A formação da toxina de 300 kDa de *Clostridium botulinum* tipo D resulta da clivagem da toxina de 500 kDa na ligação peptídica entre tirosina e serina. Embora as NAPs não desempenhem nenhum papel na sinapse nervosa, apresentam especial função na estabilidade, captura e transcitose da neurotoxina botulínica no trato gastrointestinal. A dissociação entre

neurotoxina e NAP ocorre em condições alcalinas (CHENG *et al.*, 2008; OGUMA *et al.*, 1981).

As neurotoxinas produzidas pelo *C. botulinum* são sintetizadas como cadeias polipeptídicas únicas, as quais são subsequentemente clivadas por enzimas proteolíticas da própria bactéria ou do hospedeiro, para formar toxinas de cadeia dupla, cada uma formada por uma cadeia leve (50 kDa) e pesada (100 kDa), ligadas por uma única ponte dissulfeto (HANDERSON *et al.*, 1997). O domínio amino-terminal (HN) da cadeia pesada tem o papel de translocação, enquanto a parte carboxi-terminal (HC) é responsável pela ligação neuroespecífica. Por sua vez, a cadeia leve, que é uma zinco-endopeptidase, é responsável pela atividade catalítica intracelular (BYRNE; SMITH, 2000).

1.5 Controle da expressão dos genes produtores de neurotoxinas

Os genes das bactérias do gênero *Clostridium* podem estar alocados no DNA cromossômico, como ocorre para a maioria dos microrganismos presentes nesse gênero, mas também podem estar localizados em um elemento genético móvel, como fagos e plasmídeos, uma vez que já foi demonstrada, diversas vezes, a transferência lateral desses genes (QUINN; MINTON, 2001).

Várias estirpes de *C. botulinum* possuem bacteriófagos, porém uma relação direta entre o fago e produção de neurotoxinas só foi estabelecida entre a produção das neurotoxinas tipo C e tipo D. A transferência lateral dos genes codificantes para a produção destas neurotoxinas já foi demonstrado diversas vezes através de diferentes técnicas, sendo possível que uma bactéria antes classificada como *Clostridium botulinum* tipo C possa ser curada do gene toxigênico e passe a ser classificada como *Clostridium botulinum* tipo D, após infecção com o fago contendo o gene codificador tipo D (EKLUND *et al.*, 1989).

Uma vez que a capacidade toxigênica das cepas de *C. botulinum* tipo C e tipo D são capazes de perder seus prófagos de uma maneira relativamente fácil, sugere-se que o prófago não esteja integrado ao

cromossomo de uma forma suficientemente estável, existindo em uma forma extracromossômica, que pode ser chamada de pseudolisogenia (BINZ *et al.*, 1990; HAUSER *et al.*, 1990).

Os microrganismos são capazes de desenvolver sistemas de regulação genética muito precisos para controlar a produção de determinadas proteínas, dependendo das circunstâncias em que se encontram. De uma maneira geral, os mecanismos complexos de regulação atuam em níveis de transcrição do DNA. Esses mecanismos são capazes de detectar pequenas mudanças no ambiente externo, como por exemplo a disponibilidade de um determinado nutriente no meio de cultura, e atuam na expressão de proteínas específicas, como as neurotoxinas botulínicas. Estudos fisiológicos clássicos estabeleceram que a expressão dos genes produtores de neurotoxinas botulínicas está intimamente relacionada com a disponibilidade de nitrogênio no meio (BOWERS *et al.*, 1963; PATTERSON-CURTIS; JOHNSON, 1989; SCHANTZ; JOHNSON, 1992).

1.6 Mecanismo de ação das neurotoxinas botulínicas

As cadeias leves das neurotoxinas botulínicas são zinco-endopeptidases, capazes de clivar diversas proteínas que estão envolvidas nas etapas de ancoragem e fusão da vesícula sináptica e, dessa maneira, bloqueiam a liberação da acetilcolina. Por sua vez, a cadeia pesada da toxina tem papel acessório e se liga ao receptor pré-sináptico da célula nervosa. Promove a translocação da cadeia leve para o citoplasma celular (CAI *et al.*, 2007).

As neurotoxinas penetram nas células através de um mecanismo de quatro estágios: ligação, internalização, translocação através da membrana plasmática e modificação do alvo. As toxinas se ligam com alta afinidade aos ecto-receptores na membrana pré-sináptica. Após a ligação, a toxina é internalizada por um processo dependente de ATP (energia). Dentro da sinapse, a neurotoxina botulínica atua em várias proteínas de um determinado grupo, que fazem parte do mecanismo de ancoramento e fusão. Este grupo de proteínas é formado pela proteína de membrana associada à

vesícula (VAMP), também conhecida como sinaptobrevina, pela proteína sinaptossomal associada (SNAP-25) e syntaxina. Várias observações têm levado à conclusão de que as neurotoxinas exercem seu efeito através de ação endopeptidásica (WICTOME; SHONE, 1998).

Quando injetada diretamente em músculos hiperativos, a neurotoxina botulínica induz um bloqueio colinérgico reversível na junção neuromuscular, o que reduz as contrações musculares. O bloqueio da liberação da acetilcolina envolve três passos: ligação, internalização e inibição da exocitose. A cadeia pesada da neurotoxina botulínica, seletiva para terminais nervosos colinérgicos, é responsável pela ligação ao receptor e internalização, enquanto que a cadeia leve é responsável pela inibição da exocitose. No decorrer deste processo, a membrana citoplasmática dobra-se em torno do complexo toxina-receptor, formando uma vesícula contendo a toxina no interior do terminal nervoso. Uma vez internalizada, as vesículas liberam a cadeia leve, que então cliva as proteínas intracelulares essenciais para a exocitose e a liberação da acetilcolina (PENNA; KESSLICK, 2002).

1.7 Reações imunológicas cruzadas entre neurotoxinas botulínicas

Apesar dos sete sorotipos de neurotoxinas (A, B, C, D, E, F e G) produzidas pelo *C. botulinum* apresentarem importantes diferenças, principalmente relacionadas à potência, mecanismo e duração da ação farmacológica, eles também compartilham, entre si e também com a toxina tetânica, um certo grau de homologia entre algumas sequências de aminoácidos (HALPERN *et al.*, 1989).

Alguns resultados mostraram que camundongos tratados com fragmentos da neurotoxina botulínica tipo A desenvolveram anticorpos capazes de reagir com toxinas de outros sorotipos, o que fornece um indício da reatividade cruzada entre os diferentes sorotipos (DERTZBAUGH; WEST, 1996).

Sabe-se que as neurotoxinas botulínicas produzidas pelas bactérias *C. botulinum* tipo C e tipo D possuem alguma similaridade antigênica, pois soros obtidos de coelhos imunizados com pequenas quantidades de toxinas tipo C

purificadas, foram capazes de neutralizar toxinas tipo D. Além disso, soros obtidos de coelhos imunizados com toxinas tipo D parcialmente purificadas foram capazes de neutralizar toxinas tipo C. Isso deixa clara a reação cruzada que ocorre entre as neurotoxinas tipo C e D, o que pode ser explicado pela presença de um epítipo comum em suas moléculas, fato corroborado por testes de imunodifusão em agar (OGUMA *et al.*, 1980).

Oguma *et al.* (1981) reforçaram essa hipótese em um novo trabalho, em que utilizaram cinco cepas de *C. botulinum*, três do tipo D e três do tipo C. As toxinas produzidas por estas cepas foram purificadas, coelhos foram imunizados com as mesmas e os respectivos soros foram coletados, através de procedimentos específicos. Em seguida, utilizando imunodifusão em gel de agar, os pesquisadores demonstraram a reatividade cruzada entre as toxinas, pois os soros dos animais imunizados com pequenas quantidades de toxinas tipo C foram capazes de neutralizar toxinas tipo C e D, como, da mesma forma, ocorreu com os soros imunizados com toxinas tipo D. Nessa ocasião, os pesquisadores sugeriram a possibilidade de existência de mais de um epítipo em comum entre toxinas tipo C e D.

Outros resultados sugerem que a cadeia leve das neurotoxinas tipo C e tipo D possuem pelo menos um epítipo em comum, fato evidenciado através da reação de anticorpos policlonais obtidos de uma imunização com a exoenzima C3, obtida de uma cepa de *Clostridium botulinum* tipo D. Esses anticorpos anti-C3 foram capaz de se ligar às cadeias leves das neurotoxinas tipo C e tipo D, porém não com suas respectivas cadeias pesadas (TORATANI *et al.*, 1989).

1.8 Purificação de neurotoxinas botulínicas tipo C e tipo D

As neurotoxinas botulínicas podem ser purificadas seguindo diversas etapas de *downstream*. Pesquisadores relataram a purificação das toxinas tipo C e tipo D através das seguintes etapas:

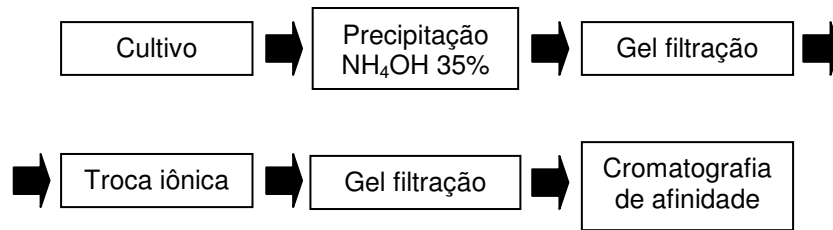


FIGURA 1 - Esquema de purificação das toxinas botulínicas tipo C e tipo D
Fonte: OCHANDA *et al.*, 1984.

Através dessa sequência de operações unitárias, atingiram 89,5% de pureza para a toxina tipo C e 85,8% para a toxina tipo D (OCHANDA *et al.*, 1984).

Variações do protocolo descrito acima conseguiram purificar a toxina tipo D 1009 vezes em comparação ao sobrenadante obtido do cultivo, com um rendimento final de 30%, apresentando toxicidade de $1,1 \times 10^7$ DL₅₀/mg de proteína (TERAJIMA *et al.*, 1985).

Outros pesquisadores estudaram exaustivamente a precipitação ácida de neurotoxinas botulínicas, como o primeiro passo de purificação destas proteínas. Essa precipitação é alcançada através da redução do pH do meio contendo as proteínas. Esse procedimento mostrou bons resultados para as toxinas dos sorotipos A, B e F, porém resultou em baixos rendimentos para os sorotipos C, D e E (IWASAKI; SAKAGUSHI, 1978).

Utilizando a precipitação ácida, o mesmo grupo de pesquisadores descreveu um protocolo de purificação da neurotoxina tipo D, através dos seguintes passos:

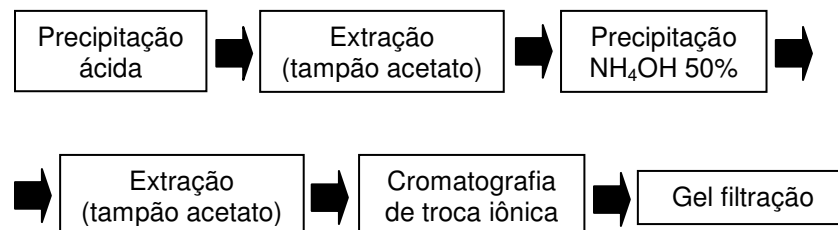


FIGURA 2 - Esquema de purificação da toxinas botulínicas tipo D, descrito
Fonte: MIYAZAKI *et al.*, 1977.

Ainda, Moriishi *et al.* (1991) descreveram as etapas de purificação da exoenzima proveniente de *C. botulinum* tipo C e tipo D, através de prévias etapas de centrifugação e diálise, seguidas de cromatografias de troca iônica e gel filtração, ou troca iônica e coluna de hidroxapatita, conseguindo purificar a proteína de cadeia única com massa molecular de 25 a 25,5 kDa, fato confirmado através de análises de eletroforese SDS-PAGE.

Por sua vez, mais recentemente, pesquisadores relataram a purificação das neurotoxinas tipo C e tipo D partindo de uma purificação parcial em duas etapas, utilizando filtração tangencial em membranas de fibra oca, seguida de quatro etapas cromatográficas. A purificação parcial consistiu na obtenção do sobrenadante do cultivo através da microfiltração em fibra oca com valor de corte de 1000 kDa, seguida de uma ultrafiltração do permeado obtido na etapa anterior em uma membrana de fibra oca de corte igual a 30 kDa (GESSLER; BÖHNEL, 1999).

A purificação propriamente dita foi realizada seguindo as seguintes etapas de cromatografia: interação hidrofóbica, troca aniônica, nova troca aniônica (mudando-se a resina) e cromatografia de exclusão. Os rendimentos obtidos foram de 12,6% para a toxina tipo C e 10,6% para a toxina tipo D, com toxicidades de $1,86 \times 10^7$ DL₅₀/mg para a toxina tipo C e $5,26 \times 10^7$ DL₅₀/mg para a toxina tipo D (GESSLER; BÖHNEL, 1999).

1.9 Inativação de toxinas com formaldeído

A maioria das vacinas antitubulínicas presentes atualmente no mercado são formuladas com toxinas inativadas com formaldeído. O procedimento de inativação com o formol normalmente envolve concentrações de 0,2 a 0,6%, por períodos de cerca de 7 dias, a 30°C, normalmente sob sistema de diálise. Esse protocolo geralmente resulta em toxoides com elevados níveis de ligações cruzadas entre si (TORII *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2005).

A reação que ocorre durante o processo de inativação com formaldeído é bastante complexa, envolvendo a formação de pontes de metileno com anéis indol, fenol ou imidazol, com grupamentos amida ou

guanidina, com vários aminoácidos lisina realizando ligações cruzadas entre si (SATHYAMOORTHY; DASGUPTA, 1988; PETRE *et al.*, 1996).

Toxinas bacterianas tratadas com formaldeído podem ser consideradas altamente imunogênicas, quando são medidos os níveis totais de anticorpos ligantes. Porém, quando são considerados somente anticorpos neutralizantes, baixos níveis são produzidos, o que resulta em baixa proteção, provavelmente em função de deformações conformacionais resultantes da ação do formaldeído (NENCIONI *et al.*, 1991). Além disso, o toxoide obtido através da inativação com formol é capaz de se ligar plenamente a antitoxoides, porém perde muito a capacidade de se ligar a antitoxinas neutralizantes, o que mostra que a inativação com formol causa diversas modificações estruturais em nível molecular, fazendo com que o toxoide perca alguns epítomos presentes na toxina, tornando-se, portanto, menos imunogênico (HEIMSCH *et al.*, 1970).

Keller (2008) estudou a antigenicidade e a imunogenicidade de diversos toxoides botulínicos inativados com formaldeído, utilizando técnicas de ELISA de inibição e sanduíche (antigenicidade) e imunização de camundongos (imunogenicidade). Os toxoides estudados tiveram origem comercial e experimental, sendo que os últimos foram obtidos em laboratório através do melhoramento das condições de inativação com formalina. Os resultados mostraram que a antigenicidade de alguns toxoides comerciais tinha sido drasticamente prejudicada, sendo que os obtidos em laboratório se mostraram tão antigênicos quanto a toxina nativa nos testes de ELISA de inibição, apesar de apresentarem uma redução de toxicidade de cem mil vezes. Nos testes de ELISA sanduíche, os toxoides experimentais mostraram ser de duas a três vezes menos antigênicos que a toxina nativa, enquanto que os toxóides comerciais se mostraram cem vezes menos antigênicos.

Ainda com relação ao estudo citado acima, nos testes de imunogenicidade os toxoides experimentais inoculados em camundongos incitaram a produção de altos títulos de IgG, sendo que os animais permaneceram assintomáticos quando desafiados com 10^6 de DL_{50} da neurotoxina. Por sua vez, os toxoides obtidos comercialmente não desenvolveram títulos de IgG mensuráveis, sendo que os animais, quando

desafiados com a neurotoxina, somente suportaram uma dose de 2 DL₅₀ (KELLER, 2008).

1.10 Prevenção do botulismo

A utilização de alimentos e água de boa qualidade, a eliminação de cadáveres das pastagens e uma boa suplementação mineral de fósforo constituem as medidas para profilaxia e controle da doença. Todavia, a vacinação é o mais importante fator para redução de 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 toxoide C e D. Os anticorpos contra toxoides C e D agem bloqueando a ligação das toxinas ao receptor, ou seja, agem como neutralizadores da toxina (QUEIROZ, 2001). Alguns experimentos demonstraram que anticorpos podem atuar extracelularmente por interferir na ligação da toxina botulínica com a superfície da célula, bem como intracelularmente pela inativação de qualquer toxina botulínica que tenha escapado da primeira linha de defesa (ATASSI; OSHIMA, 1999). De acordo com a Instrução Normativa nº 23, de 18/03/2002, do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002), foi estabelecido que as vacinas contra o botulismo em animais devem obter títulos mínimos de 5UI/mL para a antitoxina C e 2 UI/mL para a antitoxina D, de acordo com o ensaio de soroneutralização.

Entretanto, a eficácia de uma determinada vacina depende de muitos fatores. Podemos classificar estes fatores como intrínsecos, como o tipo de adjuvante que compõe a fórmula da vacina e a qualidade e quantidade de antígeno utilizado; e extrínsecos, como, por exemplo, boas condições sanitárias do rebanho, nutrição balanceada e equilibrada e manejo adequado dos animais dentro da unidade produtiva (QUEIROZ, 2001; BARROS *et al.*, 2006).

As vacinas estão entre as práticas sanitárias recomendadas para prevenção de doenças animais em todos os sistemas de produção, inclusive naqueles que adotam sistemas orgânicos. De acordo com a legislação atual

(BRASIL, 2008), todas as vacinas e exames determinados pela legislação de sanidade animal serão obrigatórios.

1.11 Eficiência da vacinação contra o botulismo

Existem, disponíveis no mercado brasileiro e mundial, diversos tipos de vacinas contra o botulismo em animais, formuladas com os toxoides botulínicos tipo C e tipo D em suas composições, associados a outros antígenos clostridiais ou não, e, ainda, adjuvantedas com hidróxido de alumínio e outros compostos. Vários autores descrevem a eficiência dessas vacinas, testadas em cobaios, bovinos e ovinos, sob diferentes condições experimentais e avaliando diversos parâmetros de resposta imunológica, principalmente utilizando as técnicas de soroneutralização e ELISA indireto (CURCI, 2008).

Jansen *et al.*, (1976) avaliaram a resposta imunológica de bovinos vacinados com vacinas bivalentes (toxoides botulínicos tipos C e D), em experimento realizado na África do Sul. Na ocasião, duas vacinas com diferentes adjuvantes foram utilizadas, uma oleosa e uma aquosa adjuvanteda com uma suspensão alumínio-fosfato. Os animais foram imunizados em esquema de vacinação de duas doses, com uma dose de reforço seis semanas após a primovacinação e a sangria feitos em intervalos pré-determinados. A eficiência foi testada por soroneutralização em camundongos. Os resultados mostraram a superior eficiência da vacina oleosa, com títulos chegando a 20UI/mL de antitoxinas tipo C e 100UI/mL de antitoxinas tipo D, enquanto que a aquosa apresentou títulos de 2UI/mL para o tipo C e 10UI/mL para o tipo D. Entretanto, a vacina oleosa apresentou maiores problemas em relação à inocuidade.

Por sua vez, Mathews (1976) avaliou a resposta imunológica de cobaios vacinados com os toxoides botulínicos tipos C e D, presentes em vacinas monovalentes e bivalentes, utilizando um esquema de vacinação com apenas uma única dose. Constatou que na quarta semana após a primovacinação, os títulos alcançados não atingiam os requisitos mínimos, fato que mudou

após a sexta semana, atingindo 8UI/mL para antitoxinas tipo C e 5UI/mL para antitoxinas tipo D.

Fonseca (2001) avaliou a resposta humoral de cobaios e bovinos vacinados com toxoides botulínicos bivalentes tipo C e tipo D, comparando 3 vacinais bivalentes disponíveis comercialmente. Foram testadas as diferentes respostas imunológicas contra os toxoides C e D, geradas pelas vacinas, intra e interespecies, além do impacto da variação do intervalo de reforço das vacinas sobre o título de anticorpos incitado pelos procedimentos de vacinação. Os títulos de anticorpos (em UI/mL) foram avaliados pela metodologia de soroneutralização, conforme preconiza o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002). Foi detectada uma variação de 2UI/mL a >20UI/mL de anticorpos neutralizantes em cobaios e uma variação de 1UI/mL a 20 UI/mL em bovinos, sendo que o comportamento da resposta humoral nas duas espécies foi semelhante, porém os cobaios apresentaram uma tendência de gerar respostas imunológicas superiores em relação aos bovinos (magnitude da resposta).

Por sua vez, Dutra; Döbereiner (1996) testaram a eficácia de uma vacina bivalente contra o botulismo animal em bovinos, em um teste a campo, utilizando somente uma dose de vacinação. Os animais vacinados foram mantidos no pasto juntamente com os animais não vacinados, em um local onde a prevalência da doença era sabidamente grande. Além da vacinação, não foram adotadas outras medidas de controle do botulismo, como a eliminação de carcaças e a suplementação mineral dos animais. Após um ano de observação, registrou-se a morte de 36 animais não vacinados e apenas um animal vacinado, o que comprovou a eficiência da vacina.

No Norte da Austrália, duas vacinas bivalentes comerciais, contendo os toxoides botulínicos tipos C e D em suas composições foram comparadas. Porém as vacinas diferiam com relação ao adjuvante e ao esquema de vacinação recomendado pelo fabricante. Uma das vacinas continha hidróxido de alumínio, com esquema de vacinação de duas doses, enquanto a outra era oleosa, com esquema de vacinação de dose única. O teste de comparação das duas vacinas supracitadas foi realizado utilizando bezerros,

com esquema de vacinação de apenas uma dose. A sangria dos animais foi realizada nos tempos 0, 8 e 24 semanas e os títulos de anticorpos gerados analisados através de uma técnica de ELISA indireto. Os resultados demonstraram que a vacina oleosa foi estatisticamente mais eficiente que a vacina aquosa, somente com relação aos títulos de antitoxina tipo C. Ambas produziram títulos de anticorpos semelhantes contra o toxoide tipo D (BROWN *et al.*, 1999).

A eficiência dos imunógenos antibotulínicos bivalentes produzidos no Brasil no período de 1986 a 1989 foram avaliados, através do teste de soroneutralização em camundongos, vacinando-se cobaios e bovinos. Concluiu-se que nenhum dos produtos conferiu níveis mínimos de antitoxinas tipos C e D em cobaios vacinados e que conferiram baixos títulos em bovinos (0,1UI/mL para o tipo C e 0,5UI/mL para o tipo D). Dessa forma, as vacinas não atendiam aos requisitos mínimos exigidos em legislação (LOBATO *et al.*, 1998).

Lobato *et al.* (1999) verificaram a capacidade imunogênica de toxoides botulínicos monovalentes e bivalentes tipo C e tipo D, em cobaios vacinados, utilizando a técnica de soroneutralização como metodologia de titulação de anticorpos neutralizantes. Os resultados das vacinas monovalentes indicaram níveis de anticorpos 9,8UI/mL e 8,4UI/mL, contra os toxoides tipos C e D, respectivamente. As vacinas bivalentes, por sua vez, geraram títulos de 6UI/mL e 7UI/mL para os toxoides botulínicos tipos C e D, respectivamente.

Nóbrega (2007), avaliou a resposta humoral de ovinos vacinados com os toxoides botulínicos tipos C e D, utilizando vacinas bivalentes e polivalentes (contendo outros antígenos clostridiais). O esquema de vacinação contemplou uma dose de reforço 42 dias após a primovacinação, e a sangria dos animais foi realizada nos tempos 15, 42, 90 e 180 dias após a administração da primeira dose da vacina. A avaliação dos títulos de anticorpos foi realizada através de um ELISA indireto. Os resultados apontaram que, para a resposta imunológica contra o toxoide tipo C, a dose de reforço foi importante para a elevação dos títulos de anticorpos, ao contrário do que ocorreu com o tipo D.

A resposta humoral de bovinos vacinados com quatro vacinas comerciais contendo em suas composições os toxoides botulínicos tipos C e D foi avaliada, através da técnica de ELISA. Duas vacinas bivalentes e duas vacinas polivalentes (contendo outros antígenos clostridiais) foram utilizadas para vacinar os animais, utilizando o esquema de vacinação recomendado pelos fabricantes. As sangrias foram realizadas nos dias 0, 42, 75, 160, 250, e 342 dias após a primovacinação. Houve diferenças significativas entre as vacinas, quanto à sua potência para os toxoides tipos C e D, nos diferentes tempos de sangria. O método de ELISA indireto se mostrou eficiente para avaliar a eficiência de vacinas antitoxinogênicas (CURCI, 2008).

1.12 Reações vacinais

Uma vacina, para ser considerada ótima e possuir uma boa aceitação do produtor, deve gerar o mínimo possível de reações adversas ao animal, pois essas reações adversas, dependendo do grau de severidade, podem comprometer o bom crescimento e desenvolvimento do animal, causando perda da produtividade do rebanho e conseqüentes prejuízos econômicos (JUNQUEIRA *et al.*, 2000).

A prevenção e o controle das doenças infecciosas em bovinos são baseados principalmente em técnicas de vacinação. Porém, as vacinas podem causar reações adversas indesejáveis, principalmente em decorrência da presença de adjuvantes nestas vacinas (JUNQUEIRA *et al.*, 2000).

Eventos adversos decorrentes de vacinação incluem a reversão da virulência em vacinas atenuadas ou a contaminação do produto por microrganismos. Esses eventos também podem estar relacionados a reações imunológicas desencadeadas pela exposição do organismo aos antígenos, adjuvantes ou outros componentes presentes na fórmula da vacina. Dentre esses eventos, podem ser destacadas as reações de hipersensibilidade do tipo I mediadas por IgE e as reações de hipersensibilidade do tipo III (SIEGRIST, 2007).

Outros fatores, que parecem estar diretamente relacionados com as reações adversas às vacinas, são a sua potência, dose de administração,

rota de administração, idade do receptor, o status imunológico do organismo (organismos comprometidos imunologicamente parecem apresentar reações adversas mais evidentes) e a habilidade do administrador da vacina (MURPHY *et al.*, 2008).

Nos dias de hoje, há uma grande preocupação com a qualidade da carne gerada na produção animal, especialmente para consumidores mais exigentes. Nesse contexto, há uma associação direta com o manejo pré-abate, seja na propriedade, transporte dos animais ou no frigorífico. Dessa maneira, fez-se necessária a melhoria na qualidade dos insumos envolvidos na produção animal, destacando-se as vacinas e os medicamentos. Entretanto, ainda hoje, as reações inflamatórias oriundas da utilização desses produtos são causas de preocupação entre os criadores e empresários que atuam no segmento de carnes e derivados, em decorrência de significativas perdas econômicas resultantes dessa utilização (FRANÇA FILHO *et al.*, 2006).

De acordo com a legislação vigente no Brasil, carcaças ou órgãos atingidos por abscessos vacinais devem ser submetidas à remoção, condenando apenas os órgãos e partes atingidas. Ainda, carcaças (ou parte delas) que se contaminarem acidentalmente com pus devem ser também condenadas (BRASIL, 1997).

Diante do exposto e considerando a relevância do tema, França Filho *et al.*, (2006) propuseram um estudo com o objetivo de conhecer as perdas econômicas resultantes da retirada do tecido muscular de carcaças devido à presença de abscessos vacinais. Nesse trabalho, constataram elevadas perdas econômicas decorrentes da presença de abscessos na musculatura das carnes de bovinos. Isso impõe a necessidade de reflexão a respeito do manejo dos animais a serem vacinados e/ou submetidos a outros tratamentos, bem como sobre a via de aplicação desses, no intuito de diminuir a frequência dessas lesões e, conseqüentemente, a depreciação da carcaça.

Braggion; Silva (2004) descreveram que, conforme o programa de qualidade da carne bovina do Estado de Nova Iorque, nos Estados Unidos da América, as lesões ocasionadas pelo manejo pré-abate e transporte

representam a maior perda da indústria de carne bovina norte-americana. Nesse contexto, realizaram um estudo visando quantificar as possíveis lesões relacionadas a vacinas, medicamentos e transporte encontrados nos bovinos ao chegarem ao frigorífico e nas carcaças no abate e sugerir soluções preventivas de melhorias aos produtores e aos frigoríficos. Concluíram que o manejo pré-abate inadequado compromete o bem-estar animal e a qualidade das carcaças. As lesões são causadas por fatores que vão desde o estresse, contusões, machucaduras, até aplicações inadequadas de medicamentos.

1.13 Estresse animal

Em atividades de pecuária, o estresse é tido como uma reação do organismo que reflete condições ambientais adversas, podendo acarretar uma série de reações indesejáveis, desde o desconforto até a morte do animal. Aspectos psicológicos relacionados aos estímulos provenientes do ambiente são poderosos ativadores de respostas endócrinas, sendo que respostas hormonais e comportamentais estão intimamente relacionadas em situações de estresse (DANTZER; MORMÈDE, 1983).

O estresse do rebanho representa hoje uma grande preocupação na área de medicina veterinária, devido à grande importância econômica e repercussão do tema. Uma atenção maior vem sendo voltada ao estudo das causas do estresse em animais domésticos e dos respectivos efeitos sobre a produtividade. Mudanças alimentares, parição, lactação, desmame, fadiga de transporte, privação de água e alimento durante a comercialização e exposição de animais, variações climáticas bruscas, infecções, trauma, vacinação, parasitoses, inanição, exercício muscular exaustivo e mudança de ambiente são os principais fatores geradores de estresse nos animais (BISPO; PEREIRA, 1994).

O estresse animal está diretamente relacionado ao manejo e ao transporte, atividades corriqueiras em um rebanho de produção. O manejo pode gerar estresse psicológico, relacionado ao medo sentido pelo animal durante as atividades e estresse físico, decorrente de fome, sede, fadiga,

injúria ou extremos térmicos. Procedimentos como o confinamento em tronco de contenção, comum em campanhas de vacinação do rebanho, não causa dores significativas, mas pode ser um fator provocador de estresse psicológico, principalmente em animais criados de maneira extensiva (GRANDIN, 1997).

Salak-Johnson *et al.* (2007) relataram que o estresse é geralmente considerado com um fator de supressão do sistema imune, podendo levar ao aumento da ocorrência de determinada doença na presença do seu respectivo patógeno. Um estressor pode favorecer a resposta mediada por células e diminuir a resposta humoral, desta forma comprometendo o balanço ótimo entre as duas respostas imunológicas.

A ativação crônica de respostas ao estresse, relacionadas aos eixos hipotálamo-pituitário-adrenal e simpático-adrenal-medular, resulta na produção crônica de hormônios glicocorticoides e catecolaminas. Receptores de glicocorticóides, presentes em algumas células do sistema imunológico, fazem com que haja a interferência na produção de citocinas, através da interferência na regulação da expressão gênica de certos genes, o que impacta diretamente sobre a resposta imunológica (PADGET; GLASER, 2003).

O estresse provoca uma série de alterações orgânicas nos animais domésticos, com repercussões em todos os órgãos e sistemas. O animal reage ao estresse através de um aumento na produção e liberação de vários hormônios, neurotransmissores e eicosanoides. Muitas prostaglandinas elevam os níveis de AMP cíclico, que está associado com a inibição da maturação e diferenciação das funções dos linfócitos. Portanto, o sistema imunológico do animal é extremamente prejudicado sob condições de estresse (BREAZILE, 1988).

Fatores de estresse também podem ser responsabilizados por uma reduzida eficiência reprodutiva do rebanho, pois o estresse pode interferir nos mecanismos fisiológicos do sistema reprodutor dos animais domésticos (MOBERG, 1991). Desta forma, falhas na reprodução podem servir como indicadores de que o estresse, associado ao manejo, tenha um significativo impacto na vida dos animais. Portanto, eventos de monitoramento

reprodutivo podem ser importantes para se avaliar as práticas de manejo dos animais (BISPO; PEREIRA, 1994).

Uma boa vacina deve possuir um esquema de vacinação que permita diminuir ao máximo o nível de estresse gerado aos animais devido ao manejo do rebanho durante o período de vacinação. De modo geral, vacinas disponíveis no mercado requerem a administração de duas ou três doses para incitarem uma boa resposta imunológica por parte do animal, o que invariavelmente estressa os animais, podendo ocasionar perda de produtividade do rebanho (BISPO; PEREIRA, 1994).

1.14 Sistemas de liberação de proteínas

Alguns anos atrás houve considerável aumento do interesse em desenvolver efetivos sistemas de liberação de proteínas, com o objetivo de atender a grande variedade de proteínas recombinantes que foram obtidas para aplicação terapêutica. A obtenção de um sistema eficaz que permita o alcance do sítio de ação pela proteína no tempo e duração adequada é o grande desafio. Nesse contexto, quatro fatores principais devem ser considerados: rota de administração, perfil de liberação, método de liberação e modo de fabricação da formulação (SINHA *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de um sistema de liberação para proteína depende de algumas 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 proteica, ocorre redução de sua atividade biológica e imunogênica. Essas modificações podem ser por desnaturação ou por degradação química envolvendo oxidação, desaminação, hidrólise, entre outras (SINHA *et al.*, 2004).

A motivação para encapsular antígenos proteicos no interior de 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 outros adjuvantes (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 μm , tamanho ótimo para fagocitose por células apresentadoras de antígenos. Essa, e outras características, são importantes parâmetros para se conseguir uma liberação sustentada de antígenos proteicos e para prolongar a estimulação do sistema imune, o que possibilita a obtenção de uma vacina de dose única. (BOWERSOCK; MARTIN, 2000).

1.15 Quitosana

1.15.1 Caracterização bioquímica

A 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, obtido de exoesqueletos de crustáceos e outros animais marinhos (ALPAR ; GROVES, 2006). É formada pelos copolímeros β -(1->4)-2-amino 2-desoxi-D-glicose e β -(1->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 *et al.*, 2006). Na FIG. 3 é apresentada a estrutura bioquímica básica do polímero de quitosana.

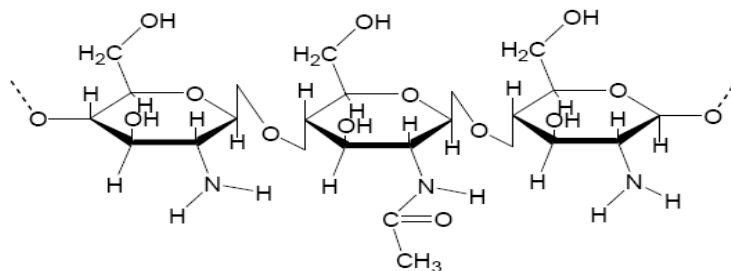


FIGURA 3 - Estrutura bioquímica do polímero de quitosana, mostrando seus dois copolímeros e a ligação entre eles

Fonte: TORRES *et al.* 2006.

A quitosana e seus derivados são considerados como polímeros heterogêneos, pois possuem, na cadeia polimérica, tanto monômeros acetilados quanto desacetilados. A proporção relativa dessas unidades nas cadeias macromoleculares de quitosana tem influência sobre sua solubilidade em água. O grupo amino comporta-se como uma base fraca, com pKa de 6,2 a 7,0, e isso torna a quitosana insolúvel em água e em solventes orgânicos. A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-NH_3^+$) presentes ao longo do polímero. 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).

Comercialmente, a quitosana está disponível na forma de flocos secos, solução e pó fino. Possui massa molar entre 3.800 e 2.000.000 Daltons e grau de desacetilação entre 66 a 95% (ALPAR; GROVES, 2006). É um material semicristalino, 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).

1.15.2 Preparo de microesferas de quitosana

O método de preparo tem muita influência nas propriedades das microesferas e alguns fatores devem ser considerados: taxa de encapsulamento de proteínas, 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 seringibilidade através das agulhas. O processo não deve expor a proteína a solventes desnaturantes e ser simples, reprodutível e escalonável. Além disso, as microesferas devem estar estéreis para sua utilização (WANG *et al.*, 2006).

O processamento da quitosana para obtenção de microesferas carregadas com proteínas tem sido bastante pesquisado há três décadas. As técnicas mais comumente utilizadas são: gelificação ionotrópica com um polieletrólito de carga oposta, tais como o TPP ou alginato (KANG, 2006); emulsificação com evaporação de solvente (XUE *et al.*, 2006); secagem por atomização (OLIVEIRA, 2004); atomização e coagulação (TORRES *et al.*, 2005); método de emulsificação/reticulação (JAGANATHAN, 2005); emulsificação através de membrana (WANG *et al.*, 2006) e a 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). A etapa final dos diversos processos envolve a lavagem, separação e secagem das microesferas (SINHA *et al.*, 2004).

No processo de gelificação ionotrópica, a solução de quitosana é preparada e extrusada através de uma agulha em uma solução aquosa de tripolifosfato ou outro ânion, sob agitação. As esferas são removidas da solução iônica por filtração, lavadas com água destilada e secadas à temperatura ambiente (SINHA *et al.*, 2004). A principal vantagem deste método é a não utilização de agentes de reticulação que podem induzir a efeitos tóxicos e outros efeitos indesejáveis (DUMITRIU; CHORNET, 1998).

O processo de coacervação simples 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 de um tensoativo, como o polissorbato 80, e banho de ultrassom para evitar formação de aglomerados (BERTHOLD *et al.*, 1996).

Na emulsificação com evaporação do solvente, uma emulsão simples é obtida entre a solução polimérica 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. 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).

Nos processos de atomização e coagulação, inicialmente a quitosana é solubilizada e, em seguida, é adicionado o ativo de interesse. A preparação resultante é atomizada utilizando gás nitrogênio através de um bico atomizador sobre um banho contendo o agente coagulante. As microesferas são mantidas em contato com a solução coagulante até completa solidificação (TORRES *et al.*, 2005).

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). 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. 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).

1.15.3 Eficiência de encapsulamento

Pesquisadores investigaram a resposta imunológica de camundongos imunizados com nanopartículas de quitosana contendo DNA plasmidial codificante de uma proteína alergênica. Na ocasião, utilizaram uma técnica de coacervação complexa do DNA plasmidial com a quitosana, utilizando uma proporção de 0,02% de quitosana com 10 µg de DNA. Nessas condições, relataram 100% de eficiência de retenção do DNA nas nanopartículas de quitosana (LI *et al.*, 2009).

A utilização de micropartículas de quitosana, cobertas com alginato, para adsorção de antígenos foi estudada, utilizando o método de gelificação ionotrópica e a soroalbumina bovina (BSA) como modelo de proteína. As micropartículas foram preparadas e, em seguida, a BSA foi adicionada e a mistura permaneceu sob agitação em condições controladas de laboratório. Para determinar a eficiência de encapsulamento/adsorção da BSA nas micropartículas de quitosana, os pesquisadores centrifugaram a mistura e avaliaram a concentração de BSA livre no sobrenadante. Os resultados indicaram uma eficiência de encapsulamento de 60% (LI *et al.*, 2008).

Manivannan *et al.* (2008) avaliaram a eficiência de uma vacina *single shot* contra o tétano através do encapsulamento do toxoide tetânico em microesferas de quitosana, utilizando a técnica da ligação cruzada em emulsão, em que primeiramente as micropartículas são preparadas e, em seguida, há a adsorção do antígeno (toxóide tetânico) às micropartículas de quitosana. A porcentagem de adsorção foi estimada através da técnica de limite de floculação. Os resultados indicaram uma eficiência de encapsulamento variando de 70 a 84%.

Para preparar micropartículas de quitosana contendo moléculas de interferon- γ em seu interior, Il'ina *et al.* (2008) utilizaram o método de coacervação simples, solubilizando diferentes concentrações de quitosana e precipitando o polímero com 10% de sulfato de sódio para obter a solução de micropartículas. A adsorção da molécula de interferon foi realizada utilizando uma suspensão de 1% de micropartículas para 0,036% de solução de interferon. A quantidade não adsorvida foi determinada pela metodologia de

Bradford (1976), após a centrifugação das micropartículas contendo interferon adsorvido. Os rendimentos de encapsulamento/adsorção relatados variaram de 47 a 88%.

Outro estudo utilizou microesferas de quitosana, preparadas através da técnica de coacervação simples, para encapsular moléculas de DMAE, molécula muito utilizada em cosméticos para evitar o envelhecimento da pele. O polímero de quitosana foi solubilizado em solução ácida, fez-se a adição do DMAE, e posteriormente a quitosana foi precipitada com sulfato de sódio para a formação das microesferas contendo o ativo em seu interior. Na solução havia a presença de um tensoativo, para evitar a aglomeração das microesferas, e a precipitação ocorreu sob banho de ultrassom. A eficiência de encapsulamento foi determinada sabendo-se a massa de DMAE adicionada na formulação e medindo-se a posterior massa contida nas microesferas. O rendimento do encapsulamento relatado nesse trabalho variou de 63,2 a 64% (LOURENÇO, 2006).

Moléculas de glicirizinato de amônio, um poderoso anti-inflamatório, antitumoral e antihepatóxico foram adsorvidas em microesferas de quitosana, preparadas através de gelificação ionotrópica. A eficiência do processo de encapsulamento do princípio ativo nas microesferas foi feita centrifugando-se a suspensão após a adsorção e medindo-se a quantidade do princípio ativo presente no sobrenadante, utilizando HPLC. Os rendimentos de encapsulamento variaram muito de acordo com a concentração de quitosana utilizada no preparo das microesferas, com valores na faixa de 68 a 82% de eficiência (WU *et al.*, 2005).

Outros estudos avaliaram a utilização de microesferas de quitosana para a liberação controlada do antibiótico ampicilina, utilizando duas diferentes técnicas de encapsulamento, o *spray drying* e a emulsificação ionotrópica. As microesferas derivadas de variações destas técnicas foram caracterizadas quanto ao tamanho das partículas, morfologia de superfície, eficiência de encapsulamento, liberação controlada e estabilidade. Para avaliar a eficiência no encapsulamento, os pesquisadores submeteram as microesferas contendo ampicilina um procedimento de extração alcalina, seguida de um procedimento de centrifugação e outro de filtração. A

quantidade do ativo presente no sobrenadante foi avaliada através de espectrofotometria a 203 nm. A eficiência foi, então, calculada dividindo-se a quantidade lida no sobrenadante, que equivale ao que estava encapsulado, pela quantidade teórica submetida ao encapsulamento. Os resultados variaram de 65,2 a 89,3% de eficiência, dependendo das condições utilizadas para cada técnica (ANAL *et al.*, 2006).

Van der Lubben *et al.* (2001) avaliaram a utilização de microesferas de quitosana para ser utilizada em ensaios de vacinação via oral. As microesferas foram preparadas utilizando-se a coacervação simples e a proteína encapsulada foi a ovalbumina (albumina obtida da clara de ovos). As partículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, eficiência de encapsulamento e liberação controlada. A eficiência do encapsulamento foi avaliada analisando-se a quantidade da proteína presente no sobrenadante, após a adsorção nas microesferas, através da técnica de Lowry. Dependendo das condições testadas, como porcentagem de microesferas e de ovalbumina submetida ao encapsulamento, foram obtidos resultados de eficiência de encapsulamento variando de 32 a 85%.

1.15.4 Utilização

Quitina e quitosana são polímeros naturais não tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis. Nos últimos anos, estes materiais têm ganhado interesse da comunidade científica como biomateriais utilizados em engenharia de tecidos e para liberação controlada de drogas (JAYAKUMAR *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de novos adjuvantes de vacinas, mais seguros e potentes, tem se mostrado necessário para utilização com novos antígenos vacinais que vêm sendo desenvolvidos. Nesse contexto, a quitosana é muito promissora, pois é biodegradável, não tóxica e muito abundante, pois é proveniente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. A quitosana possui a capacidade de aumentar as respostas imunes humoral e celular, além de ser capaz de se depositar no local de administração e promover a liberação lenta do antígeno, além de ter se mostrado melhores respostas imunológicas

quando comparada ao adjuvante incompleto de Freund e ao hidróxido de alumínio (ZAHAROFF *et al.*, 2007).

A não toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade fazem da quitosana uma boa candidata no desenvolvimento de novas formas de liberação de drogas. O polímero de quitosana tem sido utilizado na liberação de genes, cultura de células, engenharia de tecidos. A modificação química da quitosana, como por exemplo a adição de alguns grupamentos químicos em sua estrutura molecular, vem tornando a utilização da quitosana ainda mais promissor, pois permite o ajuste adequado de condições de associação do polímero com as moléculas bioativas e também do perfil de liberação do composto no organismo (PRABAHARAN, 2008).

Chen *et al.* (2006) comprovaram a biocompatibilidade e a não citotoxicidade do polímero de quitosana a fibroblastos humanos e de camundongos, cultivados em laboratório, pois esses foram capazes de aderir-se a microesferas de quitosana preparadas através de emulsificação e crescer em alta densidade.

Vários estudos têm demonstrado que a quitosana e alguns de seus derivados são excelentes em melhorar o transporte de macromoléculas hidrofílicas, como peptídeos e proteínas. A quitosana apresenta capacidade de abrir junções intercelulares, facilitando, dessa forma, o transporte de macromoléculas para o interior das células nos mais diferentes tecidos. Além disso, o polímero de quitosana possui excelente atividade de liberação controlada de antígenos, uma vez que algumas vacinas experimentais contendo quitosana resultaram em uma maior captação antigênica pelos tecidos linfóides, induzindo, portanto, fortes respostas imunológicas sistêmicas e de mucosa (VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001).

Microesferas de quitosana, preparadas através de um processo conhecido como gelificação ionotrófica, foram utilizadas para a formulação de uma vacina nasal contra a rinite atrófica dos suínos, através do encapsulamento da toxina dermonecrótica de *Bordetella bronchiseptica* no interior das microesferas. A atividade do sistema imunológico como resposta da vacinação foi demonstrado pelo aumento da secreção de fator de necrose

tumoral alfa, indicando a eficiência na liberação gradual da toxina no organismo no animal vacinado (JIANG *et al.*, 2004).

Rauw *et al.* (2010) descreveram o efeito adjuvante positivo da quitosana, sobre a imunidade antígeno-específica mediada por células, em aves vacinadas com uma vacina viva contra a doença de *Newcastle*. Quando comparada com uma vacina convencional, a vacina contendo quitosana provocou uma maior produção de células do sistema imune no baço, sendo que a resposta se deu mais cedo e mais forte, o que reforçou o potencial da quitosana como um promissor adjuvante para administração de vacinas vivas em aves, pois é capaz de aumentar a resposta imune de células TH1.

O sistema de liberação controlada, utilizando microesferas de quitosana, tem sido utilizado para veicular antibióticos, anti-hipertensivos, agentes anticâncer, proteínas, peptídeos e vacinas (DANG; LEONG, 2006). Em revisão feita por Issa *et al.* (2005) foram apontadas as áreas de engenharia de tecidos biológicos e vacinas como principais aplicações da quitosana como material biomédico.

Características como biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade impulsionaram a utilização da quitosana em formulações farmacêuticas e em bioprodutos (ALPAR; GROVES, 2006). Além disso, a propriedade mucoadesiva e a atividade imunoadjuvante estão sendo extensivamente pesquisadas (VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001).

Nishimura *et al.* (1984) demonstraram que a quitosana é capaz de induzir tanto a ativação de macrófagos como linfócitos T citotóxicos. Também já foi demonstrado que implantes subcutâneos de quitosana em cães aumentaram o número de células sanguíneas brancas, particularmente neutrófilos, e ativaram tanto células polimorfonucleares quanto macrófagos (KOSAKA *et al.*, 1996).

Testes clínicos utilizando quitosana não têm reportado nenhum efeito inflamatório 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 eliminados pelo sistema excretor (CHATELET *et al.*, 2001).

Em vacinologia, estudos realizados com micropartículas de quitosana apresentaram significante resposta imune contra doenças como influenza, pertússis e difteria. Vacinas administradas por via nasal obtiveram similares níveis de IgG e superiores níveis de IgA quando comparadas a vacinas administradas por via parenteral. O mecanismo de ação principal envolveu uma melhor promoção da absorção do material (ILLUM *et al.*, 2001).

Ravichandran *et al.* (2007) demonstraram o grande potencial de uma vacina trivalente contra o botulismo, administrada via oral, formuladas com o polímero de quitosana. Como antígenos, foram utilizados peptídeos da região carbóxi-terminal das toxinas nativas, que apresentaram boa capacidade de se ligar e penetrar em barreiras epiteliais *in vitro*. A administração de tais peptídeos em camundongos gerou altos títulos de IgA de mucosa, bem como altos títulos de IgA e IgG circulantes, além desses animais apresentarem boa resistência contra desafios com toxina. Quando adjuvados com quitosana, esses peptídeos tornaram os animais ainda mais resistentes contra o desafio.

Bacon *et al.* (2000) investigaram o potencial de biopolímeros no sentido de aumentar a produção de anticorpos em animais vacinados com antígenos de superfície do vírus da influenza, via intranasal. Os carboidratos testados foram a quitosana e a gelana. Os resultados obtidos indicaram a quitosana como sendo o composto com o maior potencial adjuvante, pois foi capaz de estimular respostas locais e sistêmicas fortes de anticorpos neutralizantes contra o vírus, fato comprovado posteriormente com ensaios utilizando antígenos de superfície de um vírus da influenza de outra cepa.

Por sua vez, outro estudo demonstrou a imunização de coelhos contra o *anthrax*, utilizando uma única vacinação com uma vacina em pó, utilizando um antígeno recombinante protetivo contra a doença recombinante associado com quitosana e outros compostos. Após nove semanas da imunização, os animais resistiram ao desafio contra um aerosol letal contendo esporos de *Bacillus anthracis* (KLAS *et al.*, 2008).

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, quitosana 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 toxoide tetânico em matrizes de quitosana e PLGA (ácido polilático-co-glicólico) e observaram que, em presença de estabilizante, ambas apresentaram resultados satisfatórios resultantes de um bom nível de antitoxina, com reduzido efeito *burst* em comparação com vacinas formuladas com hidróxido de alumínio. Os resultados demonstraram que microesferas de toxoide tetânico têm potencial aplicação para modular a liberação, ressaltando que em comparação ao PLGA, a quitosana torna o custo final do produto mais viável.

CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE TOXÓIDES BOTULÍNICOS TIPO C E TIPO D PARA UTILIZAÇÃO COMO ANTÍGENOS VACINAIS.

RESUMO

Cepas de *Clostridium botulinum* tipo C e tipo D, a serem utilizadas na produção de antígenos vacinais foram selecionadas e procedeu-se o cultivo das mesmas até que se obtivesse um banco master e um banco de trabalho, ambos na forma liofilizada. A primeira etapa para obtenção das toxóides botulínicos tipos C e D foram os cultivos das respectivas bactérias, em biorreatores utilizando meio de cultivo específico, sem controles de pH, sob condição de anaerobiose obtida através de constante borbulhamento de nitrogênio gasoso (0,05 vvm). O crescimento bacteriano nas etapas de cultivo foi monitorado através da densidade óptica a 600 nm através de espectrofotometria. A suspensão celular obtida foi submetida à centrifugação a 3000 g, durante 30 minutos, para obtenção do sobrenadante contendo a toxina específica. O sobrenadante obtido foi submetido a um processo de purificação parcial da toxina, utilizando ultrafiltração com uma membrana *hollow fiber* de 100 kDa, em sistema de diálise com salina 0,85%. O produto obtido após a purificação parcial foi submetido à inativação com formalina 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 e 1,5% durante 7 dias a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, para determinação da melhor concentração de formalina para inativar a toxina sob as condições mencionadas. Os bancos master e de trabalho se mostraram puros nas análises de pureza. Os níveis de concentração celular chegaram a valores de DO_{600} maiores que 8,0, tanto para os cultivos de *C. botulinum* tipo C e tipo D. Os processos de centrifugação e ultrafiltração/diálise não comprometeram a toxicidade das toxinas. Os títulos em DL_{50}/mL obtidos em todas as etapas foram de $10^{5,2}$ para a toxina botulínica tipo C e de $10^{5,2}$ e $10^{6,2}$ para a toxina botulínica tipo D. As cinéticas de inativação mostraram que 0,8% de formalina é a melhor condição para inativar as toxinas tipos C e D, em cinco dias de processo, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os testes de esterilidade não indicaram contaminações em nenhuma das amostras.

Palavras-chave: *Clostridium botulinum*. Produção de antígenos. Inativação.

CHAPTER 2 – PRODUCTION OF BOTULINIC TOXOIDS TYPE C AND TYPE D FOR USE AS VACCINE ANTIGENS

ABSTRACT

Strains of *Clostridium botulinum* type C and type D were selected in order to be used to produce vaccine antigens and were cultivated to obtain a master and a work seed, both freeze dried. The first step to get botulinic toxoids types C and D was the culture of the mentioned bacteria in bioreactors, using a specific culture medium without pH control under anaerobiosis condition ensured through constant nitrogen bubbling (0,05 vvm). The bacterial growth in the culture phase was monitored through the measurement of the optical density at 600 nm using a spectrophotometer. The obtained cell suspension was centrifuged at 3000 *g* for 30 minutes and the supernatant with the specific toxin was collected. This supernatant was partially purified through ultrafiltration, using a 100 kDa hollow fiber membrane in a dialysis system with NaCl 0.85%. The product after the partial purification was inactivated with formalin 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.5%, during 7 days at 37±2°C in order to determine the best formalin concentration needed to inactivate the toxin under the mentioned conditions. The master and work seeds remained pure in the purity tests. The levels of cell concentration reached optical density 600 values higher than 8.0 for both *C. botulinum* type C and type D. The centrifugation and ultrafiltration / dialysis processes did not affect the toxins' toxicity. The titles on DL₅₀/mL at all stages were 10^{5.2} for *botulinum* toxin type C and 10^{5.2} and 10^{6.2} for *botulinum* toxin type D. The inactivation kinetics showed that 0.8% formalin is the best condition to inactivate the toxin types C and D in five days of proceedings at 37 ± 2 °C. The sterility tests indicated no contamination in any sample.

Keywords: *Clostridium botulinum*. Antigen production. Inactivation.

1 INTRODUÇÃO

Entre as diversas enfermidades que acometem o rebanho animal brasileiro, destaca-se o botulismo, doença classificada como uma intoxicação, provocada pelas neurotoxinas produzidas principalmente pela bactéria *Clostridium botulinum*. No Brasil, o botulismo animal está intimamente relacionado aos hábitos alimentares, principalmente em regiões em que o solo é deficiente em minerais, como o fósforo. A deficiência mineral na alimentação do rebanho faz com que os animais pratiquem a osteofagia, que é a prática de roer ossos de carcaças de animais mortos presentes no pasto. Essas carcaças constituem ambientes favoráveis ao crescimento do *C. botulinum* e, conseqüentemente, à produção das neurotoxinas, sendo, portanto, focos de intoxicação animal.

Além das carcaças, o agente etiológico do botulismo animal pode estar presente em silagem e feno mal-conservados, rações com matéria orgânica em decomposição e em reservatórios de água, contaminados com carcaças de outros animais.

O *C. botulinum* é um bacilo anaeróbio restrito, formador de esporos, Gram positivo, amplamente disseminado no ambiente, possuindo, portanto, caráter ubiqüitário. Pode estar presente no solo, em carcaças em decomposição e também no trato digestivo dos homens e dos animais.

A espécie *Clostridium botulinum* é capaz de produzir sete sorotipos diferentes de neurotoxinas, denominadas A, B, C, D, E, F e G, que determinam também a sorotipagem da bactéria. Por exemplo, o *C. botulinum* que produz a neurotoxina tipo A é o *C. botulinum* tipo A, e assim por diante. O botulismo animal no Brasil está mais relacionado com a intoxicação provocada pelas neurotoxinas tipo C e tipo D.

O cultivo do *Clostridium botulinum* em laboratório requer uma série de cuidados, pois este microrganismo é inserido na classe de risco três, de acordo com os riscos que sua manipulação oferece ao indivíduo e à comunidade, conforme o Ministério da Saúde. Além disso, a bactéria requer um controle rigoroso de anaerobiose, além do fornecimento de alguns nutrientes imprescindíveis ao crescimento e à produção de toxina. Tomados

esses cuidados, a bactéria produzirá sua neurotoxina específica e a secretará no meio de cultura.

A recuperação da toxina produzida após o cultivo também requer muito cuidado, pois a neurotoxina botulínica está entre as substâncias mais letais conhecidas, pois doses muito pequenas podem levar à morte, dependendo da via de administração. Para recuperar a toxina botulínica produzida durante o cultivo várias metodologias podem ser utilizadas, desde a utilização de processos clarificantes como filtração, centrifugação, precipitação até a utilização de técnicas mais apuradas, como a cromatografia, dependendo do grau de pureza que se exige.

No intuito de utilizar as toxinas botulínicas como antígenos vacinais, a forma mais segura é, sem dúvida, na sua forma inativada, ou seja, na forma de toxoide. Existem diversas técnicas de obtenção dos toxoides botulínicos a partir das respectivas toxinas, desde a utilização de aldeídos, como o formaldeído, até a utilização de organismos recombinantes capazes de expressar parte da molécula da toxina, suficientemente imunogênica, porém sem atividade neurotóxica.

1.1 Objetivo geral

Obter os toxoides botulínicos tipo C e tipo D, a serem utilizados como antígenos para formulação de vacinas, através do cultivo das bactérias *Clostridium botulinum* tipo C e *Clostridium botulinum* tipo D.

1.2 Objetivos específicos

Produzir bancos máster e de trabalho das cepas de *C. botulinum* tipo D e tipo D, através do cultivo em biorreatores de 10 L e atingir altos títulos de toxinas tipo C e tipo D.

Realizar clarificação e purificação parcial das toxinas obtidas nos ensaios de cultivo, através de centrifugação e filtração tangencial, e avaliar impacto dessas etapas sobre a capacidade toxigênica.

Efetuar cinética de inativação das toxinas tipo C e tipo D obtidas, utilizando diferentes concentrações de formalina, a 37°C, durante uma semana (7 dias) e avaliar a melhor condição de inativação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das cepas referência

As cepas referência de *Clostridium botulinum* tipo C e tipo D, utilizadas em todos os experimentos de obtenção de antígenos vacinais, foram fornecidas pelo Banco de Cepas do Laboratório de Tecnologia de Vacinas, Vallée S.A, Montes Claros, MG, na forma de ampolas liofilizadas com volume de 2 mL.

2.2 Meios de cultura utilizados

Todos os meios de cultura utilizados nos experimentos foram produzidos no Laboratório de Tecnologia de Vacinas (LTV) da Vallée S.A.. As composições dos meios de cultura foram omitidas nesse trabalho, por questões de sigilo.

2.3 Produção dos Bancos Máster

A produção dos bancos máster de *C. botulinum* tipo C e tipo D seguiu procedimentos internos da Vallée S.A.. Para ambas as bactérias, o banco máster foi produzido ressuspendendo-se os 2 mL da ampola da cepa referência com 2 mL de meio de ativação LTV, que continha em sua superfície uma camada de parafina de 5 mm de espessura. Todo o conteúdo ressuspendido foi inoculado em 8 mL de meio de ativação e incubado a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa incubadora (FANEM), por 12 a 16 horas, de forma estática em frasco de 30 mL, completamente fechado. O crescimento da bactéria foi constatado por exame visual de turbidez do meio e produção de gás. Em seguida, o conteúdo do vial foi transferido para 90 mL de meio líquido LTV. O conteúdo foi incubado a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa incubadora (FANEM), por 8 horas, até a confirmação visual do crescimento bacteriano indicado pela turbidez e pela produção de gás. A suspensão bacteriana obtida foi submetida à centrifugação, a 3000 g por 30 minutos e o *pellet* celular foi ressuspendido

para 40 mL com meio estabilizador LTV. Os 40 mL obtidos foram fracionados em frascos de vidro de 8 mL, de modo a se obter 20 frascos com 2 mL de suspensão cada. Os frascos foram, então, submetidos a um congelamento a $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$, em ultrafreezer (THERMO) durante 48 horas e, posteriormente, foram liofilizados (EDWARDS) por 72 horas. Em seguida, os frascos dos Bancos Máster obtidos foram armazenados a $20\pm 10^{\circ}\text{C}$.

2.4 Produção dos Bancos de Trabalho

A produção dos bancos de trabalho seguiu metodologias internas da Vallée S.A.. Para produção dos Bancos de Trabalho de *C. botulinum* tipo C e tipo D, uma ampola de Banco Máster foi ressuspensa com 2 mL de meio de ativação LTV. O conteúdo ressuspensa foi inoculado em 8 mL de meio de ativação e incubado a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa incubadora (FANEM), por 12 a 16 horas, de forma estática em vial de 30 mL, completamente fechado. O crescimento da bactéria foi constatado por exame visual de turbidez e produção de gás. Em seguida, o conteúdo do vial foi transferido para 90 mL meio líquido LTV, em frasco de vidro de 500 mL. O conteúdo foi incubado a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa incubadora (FANEM), por 8 horas, até a confirmação visual do crescimento bacteriano indicado pela turbidez e pela produção de gás. Por sua vez, a suspensão obtida foi inoculada em 310 mL de meio líquido LTV, em frasco de vidro de 1000 mL. O conteúdo foi, mais uma vez, incubado a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa incubadora (FANEM), por 8 horas, até a confirmação visual do crescimento bacteriano indicado pela turbidez e pela produção de gás (formação de bolhas na superfície do meio de cultura). A suspensão bacteriana obtida foi, então, submetida a centrifugação, a 3000 *g* por 30 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensa para 100 mL com meio estabilizador LTV. Os 100 mL obtidos foram fracionados em frascos de vidro de 8 mL, de modo a se obter 50 frascos com 2 mL de suspensão cada. Os frascos foram, então, submetidos a um congelamento a $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$, em ultrafreezer (THERMO) durante 48 horas e, posteriormente, foram liofilizados (EDWARDS) por 72 horas. Em seguida, os frascos dos Bancos de Trabalho obtidos foram armazenados a $20\pm 10^{\circ}\text{C}$. Três ampolas foram coletadas de

cada um dos Bancos de Trabalho de *C. botulinum* tipo C e tipo D e cada uma foi ressuspensa com 2 mL de solução salina 0,85% estéril. Em seguida, as amostras foram testadas quanto a sua pureza e quanto à capacidade de produção de toxina específica das cepas selecionadas, conforme descrito em 2.9. (controles de qualidade).

2.5 Cultivo de *C. botulinum* tipo C e tipo D

Ambas as bactérias foram cultivadas utilizando-se exatamente o mesmo procedimento, inclusive o meio de cultura. O cultivo para produção das toxinas botulínicas tipo C e tipo D seguiu as seguintes etapas: Ativação, pré-semente 1, inóculo e cultivo. Todas as etapas seguiram metodologias internas da Vallée S.A..

2.5.1 Ativação

Na etapa de ativação, uma ampola do Banco de Trabalho foi ressuspensa em 2 mL de meio de ativação LTV e a suspensão bacteriana obtida foi inoculada e 8 mL de meio de ativação, em vial de 30 mL. O vial foi incubado a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 12 a 16 horas, em estufa incubadora (FANEM) até a constatação do crescimento bacteriano, através da análise visual de turbidez e formação de gás.

2.5.2 Pré-semente 1

A suspensão bacteriana obtida na fase de ativação foi, então, inoculada em 90 mL de meio líquido LTV. A incubação foi feita a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 8 horas em estufa incubadora (FANEM), até a constatação visual de crescimento bacteriano, através da averiguação da turbidez do meio e da formação de gás.

2.5.3 Inóculo

A suspensão bacteriana obtida na fase anterior foi posteriormente inoculada em 900 mL de meio líquido LTV. A incubação foi feita a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 8 horas em estufa incubadora (FANEM), até a constatação visual de crescimento bacteriano, através da averiguação da turbidez do meio e da formação de gás.

2.5.4 Cultivo

Antes de iniciar o cultivo, 9 L de meio líquido LTV foram adicionados ao biorreator BioFlo 410 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC INC.), Realizou-se o borbulhamento do meio de cultura com nitrogênio gasoso a uma vazão de 0,05 vvm, durante 30 minutos.

A suspensão de *Clostridium botulinum* obtida na fase anterior foi inoculada em 9 L de meio líquido LTV, totalizando 10 L de cultivo. Manteve-se o cultivo agitado (50 rpm), com borbulhamento constante de nitrogênio gasoso (0,05 vvm), sem controle de pH, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 7 dias. Durante as 8 primeiras horas de cultivo, monitorou-se o crescimento bacteriano através da medida da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}), de hora em hora, com o auxílio de espectrofotômetro (PHARMACIA). No restante do cultivo, coletou-se uma amostra para a medida da DO_{600} a cada 24 horas, até o término.

Ao final do cultivo, coletou-se uma amostra do caldo fermentado e realizou-se teste de pureza, como descrito no item 2.9..

2.6 Clarificação do sobrenadante do cultivo

Após a etapa de cultivo, todo o caldo fermentado foi submetido à centrifugação a 3000 g, durante 30 minutos, a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, em centrífuga (BECKMAN). O sobrenadante obtido foi coletado assepticamente em balão de vidro de 20 L. Após, coletou-se uma amostra do balão para análise de título de toxina, em DL_{50}/mL , conforme descrito em 2.9. Em seguida, o balão

foi armazenado em câmara fria a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ até a realização das etapas posteriores.

2.7 Purificação parcial da toxina

O sobrenadante obtido após a etapa de centrifugação foi submetido a um processo de purificação parcial com o auxílio de filtração tangencial em cartucho fibra oca (GE HEALTHCARE), de corte de 100 kDa, lúmen igual a 0,5 mm e área de filtração igual a 4800 cm^2 . O cartucho *hollow fiber* foi conectado a uma estrutura de filtração tangencial composta por: bomba de lóbulos (LABTOP), de deslocamento positivo, suporte para encaixe do cartucho através de conexões sanitárias *tri-clamp*, manômetros de pressão (psi) na alimentação de entrada do cartucho e na saída do retentado de filtração e válvulas sanitárias reguladoras de pressão transmembranar.

Depois de conectado ao sistema de filtração tangencial, o cartucho *hollow fiber* foi submetido a um procedimento de sanitização, seguindo protocolos internos da Vallée S.A.. Primeiramente, lavou-se o cartucho com água purificada, durante 10 minutos, com a frequência da bomba ajustada em 300 rpm e pressão transmembranar (PTM) igual a zero, para retirada do preservante (NaOH 0,01 N). Em seguida, recirculou-se no cartucho uma solução de 100 ppm de NaOCl, durante 60 minutos, nas mesmas condições de frequência da bomba e PTM. Lavou-se novamente com água, durante 10 minutos e, após, recirculou-se no cartucho solução de formalina 1%, durante 60 minutos. Por final, lavou-se o cartucho com 50 L de água esterilizada através de filtração, assepticamente e, por fim, conectou-se o balão contendo o produto obtido na etapa de centrifugação à bomba de lóbulos.

Ao balão conectado na bomba de lóbulos adicionou-se salina 0,85% estéril, até que se dobrasse o volume da solução (o sobrenadante foi diluído duas vezes). Em seguida, iniciou-se o processo de filtração tangencial, ajustando-se a frequência da bomba de lóbulos para 300 rpm e a pressão transmembranar em 5 psi. Prosseguiu-se com o processo de filtração até que o volume do retentado retornasse ao valor inicial. Repetiu-se esse processo por mais duas vezes (adição de salina até dobrar o volume e filtração até

reduzir ao volume inicial). Ao final do processo, coletou-se uma amostra do dialisado para titulação de toxina em DL_{50}/mL , conforme descrito em 2.9..

2.8 Inativação da toxina parcialmente purificada

2.8.1 Cinética de inativação

Para inativação da toxina botulínica tipo C ou tipo D presente no dialisado, testaram-se cinco diferentes concentrações de formalina: 0,6, 0,8, 1, 1,2 e 1,5%. Amostras de 50 mL de dialisado contendo as cinco diferentes concentrações de formalina foram incubadas a $37\pm 2^{\circ}C$ sob agitação constante de 100 rpm, em agitador magnético (IKA), durante 7 dias. Amostras foram coletadas ao final dos 7 dias e enviadas ao Biotério Experimental da Vallée S.A. para teste de inativação de toxina botulínica, conforme descrito em 2.9.. Ao final desta etapa, determinou-se a melhor concentração de formalina para inativação da toxina botulínica tipo C e tipo D.

2.8.2 Inativação

O volume restante obtido na etapa de diálise foi submetido à inativação, utilizando-se a melhor condição de inativação determinada na cinética de inativação. Após a realização do procedimento, uma amostra foi coletada e enviada ao Biotério Experimental da Vallée S.A., para confirmação da inativação e outra amostra foi coletada e submetida a teste de esterilidade, conforme descrito em 2.9..

2.9 Controles de qualidade

2.9.1 Testes de pureza

Todos os testes de pureza seguiram procedimentos internos da Vallée S.A.. Para avaliar a pureza, a amostra foi inoculada nos seguintes meios de

cultura, em triplicata: PYGA LTV – 0,1 mL (diluição 10^{-2}), Meio de ativação LTV – 1 mL, TSA (DIFCO) – 1mL e Thioglicolato (DIFCO) – 1 mL. O meio PYGA, contido em placas de Petri, foi incubado em câmara de anaerobiose (OXOID) durante 72 horas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, o meio de ativação incubado por 24 horas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ e os meios TSA e Thioglicolato foram incubados por 7 dias a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após, todos os meios foram submetidos a análises visuais de crescimento bacteriano, de 24 em 24 horas e de Coloração de Gram, ao final do teste.

2.9.2 Interpretação da prova de pureza

Foi considerada pura a amostra que apresentou crescimento de colônias homogêneas quanto aos aspectos de morfologia da colônia no meio PYGA, que apresentou crescimento expressivo em meio de ativação LTV, com intensa formação de gás, que apresentou bom crescimento no fundo do tubo contendo meio Thioglicolato (tanto a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ quanto a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$), que não apresentou nenhum crescimento no meio TSA (tanto a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ quanto a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e que, além disso, apresentou bacilos Gram positivos após a Coloração de Gram.

2.9.3 Teste de capacidade de produção de toxina específica

Para avaliar a capacidade das cepas dos Bancos de Trabalho de *C. botulinum* tipo C e tipo D em produzir suas toxinas específicas, o seguinte procedimento foi proposto neste trabalho: uma ampola de cada Banco foi ressuspensa em 2 mL de meio de ativação LTV. Em seguida, o conteúdo ressuspendido foi inoculado em 8 mL de meio de ativação em vial de 30 mL e incubado por 7 dias a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa incubadora. Em seguida, o conteúdo do vial foi centrifugado a 3000 g por 30 minutos. Após, o sobrenadante foi coletado e enviado ao Biotério Experimental da Vallée S.A., para confirmação da produção de toxina específica. A amostra foi, primeiramente, diluída com fator de diluição 10 até a diluição 1/100000000. Em seguida, 0,5 mL de cada uma das diluições foi misturado com 0,5 mL de antitoxina específica padrão,

1 U.I./mL, fornecida pelo LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário)-MG/MAPA. A mistura foi incubada a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos e, posteriormente, 0,2 mL dessa mistura foi inoculada via intravenosa em seis camundongos, que ficaram sob observação por quatro dias. Paralelamente, as mesmas diluições da amostra foram inoculadas em dois camundongos, porém sem a reação com o anticorpo, para avaliar a morte em função da inoculação.

2.9.4 Interpretação do teste de capacidade de produção de toxina específica

Foi considerada capaz de produzir toxina específica a cepa de *C. botulinum* tipo C ou tipo D, cujas amostras diluídas causaram morte dos animais, com sintomas típicos de botulismo, nas diluições sem a reação com o anticorpo e, nas diluições reagidas com o anticorpo, apresentaram sinais de neutralização, caracterizados pela sobrevivência dos camundongos, a partir de determinada diluição (na qual a quantidade de anticorpo foi capaz de neutralizar completamente a toxina contida na amostra). Por exemplo, se com as diluições sem reação com o anticorpo os camundongos só começaram a sobreviver na diluição 1/1000000 e com as diluições com reação com o anticorpo os camundongos começaram a sobreviver na diluição 1/1000, houve um sinal claro da ação do anticorpo específico sobre a toxina presente na amostra, o que caracteriza, indiretamente, a capacidade da cepa em produzir a toxina específica.

2.9.5 Teste de esterilidade

Os testes de esterilidade seguiram procedimentos internos da Vallée S.A.. Para avaliar a esterilidade, a amostra foi inoculada nos seguintes meios de cultura: Thioglicolato LTV – 1 mL e TSA LTV – 1 mL, em triplicata. Ambos meios de cultura foram, então, incubados à $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ e à $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 14 dias, com o monitoramento diário de avaliação de crescimento microbiano.

2.9.6 Interpretação da prova de esterilidade

Foi considerada estéril a amostra que não gerou crescimento de microrganismos em nenhum dos meios inoculados, em nenhuma das temperaturas de incubação, ao final dos 14 dias de teste.

2.9.7 Teste de toxicidade em DL₅₀/mL

Para avaliar a toxicidade da toxina botulínica tipo C ou tipo D em camundongos da linhagem *Swiss*, realizou-se diluições da amostra a ser testada, utilizando fator de diluição 10, até a diluição 10⁻⁸ ou 1/100000000. Em seguida, seis camundongos foram inoculados com 0,2 mL de cada diluição via endovenosa e a morte dos animais foi observada por um período de 48 horas. A toxicidade da amostra foi calculada através de uma interpolação matemática dos dados obtidos (REED; MÜENCH, 1938). O resultado obtido foi em DL₅₀/mL. Para calcular o valor da toxicidade em DL₅₀/mL, as equações 1, 2, 3 e 4 foram utilizadas:

$$I = \frac{\% \text{ infectados na diluição acima de } 50\% - 50\%}{\% \text{ infectados na diluição acima de } 50\% - \% \text{ infectados na diluição abaixo de } 50\%} \quad (1)$$

Em que:

I = Fator de interpolação matemática (distância proporcional).

$$\log DL_{50} = - \log \text{ diluição acima de } 50\% + (I \times \log \text{ fator de diluição}) \quad (2)$$

$$\log DL_{50}/\text{mL} = \log DL_{50} + \log \text{ fator de correção} \quad (3)$$

$$DL_{50}/\text{mL} = 10^{\log DL_{50}/\text{mL}} \quad (4)$$

Onde:

Fator de correção = Fator utilizado para corrigir o valor de log DL₅₀ para log DL₅₀/mL.

2.9.8 Teste de inativação

Para avaliar a efetividade do processo de inativação, inoculou-se 5 mL da amostra em dois cobaios da espécie *Cavia porcellus*, via subcutânea, que ficaram sob observação por um período de 14 dias, para avaliação de sobrevivência, conforme procedimentos internos da Vallée S.A.

2.9.9 Interpretação do teste de inativação

A amostra contendo toxoide botulínico tipo C ou tipo D foi considerada inativada se nenhum dos dois animais inoculados morreu. Caso tenha ocorrido a morte de um dos animais, a amostra foi submetida a um reteste e considerada aprovada se nenhum dos animais morreu e reprovada se ocorreu morte de qualquer animal, no reteste.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de pureza dos Bancos de Trabalho de *C. botulinum* tipo C e tipo D

Ambos os Bancos de Trabalho de *C. botulinum* tipo C e tipo D foram aprovados nos testes de pureza, pois geraram o crescimento de culturas puras nos meios em que supostamente deveriam crescer (PYGA, Thioglicolato e meio de ativação - LTV) e não foram capazes de crescer no meio em que não havia condições ideais de crescimento (TSA). Nas FIG. 1 e 2 são mostrados os resultados das colorações de Gram de *C. botulinum* tipo C e tipo D obtidas a partir de amostras retiradas das placas de meio PYGA, incubadas em ambiente estritamente anaeróbio.



FIGURA 1 - Coloração de Gram de *Clostridium botulinum* tipo C, obtida a partir da amostra de Banco de Trabalho cultivada em meio de cultura PYGA, em câmara de anaerobiose a $37\pm 2^\circ\text{C}$, por 72 horas. Aumento: 1000 X



FIGURA 2 - Coloração de Gram de *Clostridium botulinum* tipo D, obtida a partir da amostra de Banco de Trabalho cultivada em meio de cultura PYGA, em câmara de anaerobiose a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 72 horas. Aumento: 1000 X

Os resultados obtidos apontam a pureza dos bancos de trabalho de *C. botulinum* tipo C e tipo D, estando, portanto, aptos à utilização na produção de antígenos para formulação de vacinas contra o botulismo.

3.2 Teste de capacidade de produção de toxina específica

Nas TAB. 1 e 2 são apontados os resultados das inoculações em camundongos, 0,2 mL via endovenosa, da amostra de Banco de Trabalho de *C. botulinum* tipo C crescida em meio de ativação LTV por 7 dias a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa incubadora, bem como das suas diluições (até $1/10^8$ com fator de diluição igual a 10). Por sua vez, os resultados referentes ao *C. botulinum* tipo D são apresentados nas TAB. 3 e 4. Nas TAB. 1 e 3 são indicados os resultados quando 0,5 mL de amostra foi misturada e incubada com antitoxina padrão padronizada em 1 U.I./mL, por 60 minutos a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ e, por sua vez, nas TAB. 2 e 4 são mostrados os resultados obtidos sem a etapa de reação com o anticorpo específico.

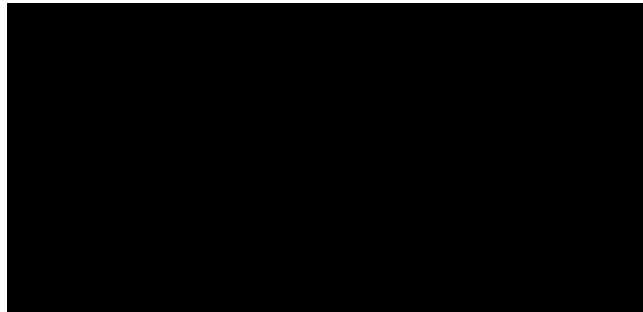
TABELA 1

Dados de morte ou sobrevivência de camundongos inoculados com a mistura de amostra de toxina botulínica tipo C e anticorpo específico

Amostra	Diluição	Mortos	Vivos
1	1/10	6	0
2	1/100	6	0
3	1/1000	0	6
4	1/10000	0	6
5	1/100000	0	6
6	1/1000000	0	6
7	1/10000000	0	6
8	1/100000000	0	6

TABELA 2

Dados de morte ou sobrevivência de camundongos inoculados com as diluições da amostra de toxina botulínica tipo C, sem a reação com o anticorpo específico

**TABELA 3**

Dados de morte ou sobrevivência de camundongos inoculados com a mistura de amostra de toxina botulínica tipo D e anticorpo específico

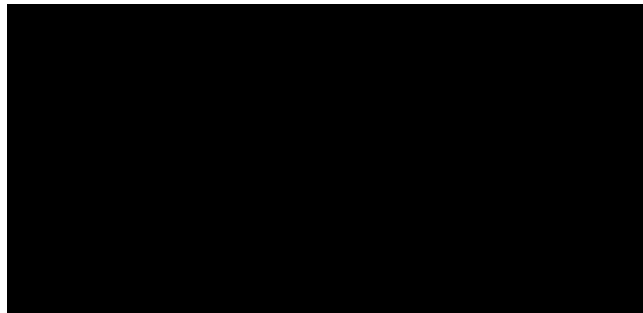


TABELA 4

Dados de morte ou sobrevivência de camundongos inoculados com as diluições da amostra de toxina botulínica tipo D, sem a reação com o anticorpo específico



Os resultados obtidos foram capazes de confirmar capacidade da cepa de *C. botulinum* tipo C, obtida no Banco de Trabalho, de produzir a toxina botulínica tipo C. Isso fica evidenciado pois a cepa, quando cultivada em meio de ativação LTV a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias, foi capaz de produzir uma toxina capaz de se ligar a antitoxina tipo C padrão, como pode-se perceber ao se analisar as tabelas acima. Os dados de morte dos camundongos com as amostras inoculadas após a reação com o anticorpo mostram que a mistura foi capaz de matar os camundongos até a diluição 1/100. Por sua vez, sem a reação com o anticorpo, a amostra foi capaz de matar os camundongos até a diluição 1/100000. Fica clara, portanto, a ação neutralizante do anticorpo no ensaio em que houve reação com a toxina da amostra, fato que fornece um indício bastante forte de que a cepa presente no Banco de Trabalho é realmente uma cepa de *Clostridium botulinum* tipo C, capaz de produzir a toxina botulínica análoga.

Os resultados obtidos para o *Clostridium botulinum* tipo D também indicam a capacidade da cepa em produzir uma toxina capaz de se ligar a antitoxina tipo D padrão. Os dados de morte dos camundongos com as amostras inoculadas após a reação com o anticorpo mostram que a mistura foi capaz de matar os camundongos até a diluição 1/1000. Por sua vez, sem a reação com o anticorpo, a amostra foi capaz de matar os camundongos até a diluição 1/100000. Percebe-se, então, que o anticorpo específico foi capaz de se ligar a toxina produzida pela bactéria.

Sabe-se que os sete sorotipos de neurotoxinas botulínicas, incluindo os sorotipos tipo C e tipo D, possuem certa homologia em suas cadeias de aminoácidos, pois diversos trabalhos presentes na literatura descrevem reações cruzadas entre diferentes sorotipos, em que antitoxinas de um certo sorotipo são capazes de se ligar a toxinas de diferentes sorotipos. Ou seja, os diferentes sorotipos de toxinas podem compartilhar um ou mais epítomos entre si (DERTZBAUGH; WEST, 1996; OGUMA *et al.*, 1980; OGUMA *et al.*, 1981; TORATANI *et al.*, 1989).

Entretanto, os resultados dos testes de capacidade de produção das toxinas específicas pelas cepas selecionadas de *C. botulinum* tipo C e tipo D fornecem evidências suficientes de que essas cepas possuem os genes específicos que codificam a produção dessas toxinas, pois o anticorpo padrão, fornecido pelo LANAGRO – MG/MAPA foi capaz de se ligar e neutralizá-las, fazendo com que as amostras mais diluídas perdessem significativamente sua capacidade toxigênica quando inoculadas em camundongos.

3.3 Produção e obtenção dos toxoides botulínicos tipos C e D

3.3.1 Cultivo de *Clostridium botulinum* tipo C e tipo D

3.3.1.1 Crescimento celular

No GRAF. 1 são apresentados os dados de crescimento celular obtido nos três ensaios de cultivo da bactéria *C. botulinum* tipo C. Por sua vez, no GRAF. 2 são mostrados os dados obtidos nos cultivos da bactéria *C. botulinum* tipo D. Os dados são apresentados em DO₆₀₀.

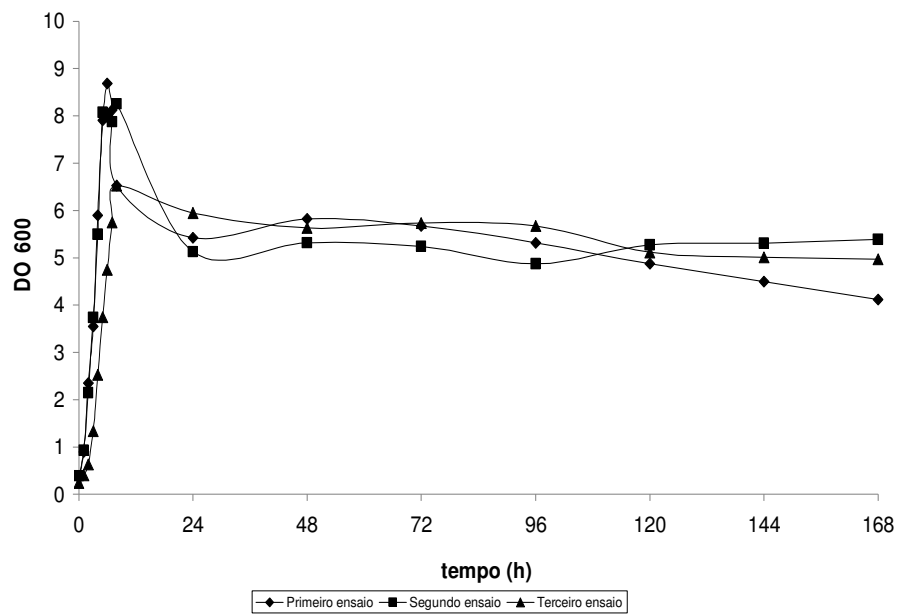


GRÁFICO 1 - Dados de densidade óptica a 600 nm obtidos nos três ensaios de *C. botulinum* tipo C, mostrando o perfil de crescimento bacteriano ao longo do tempo

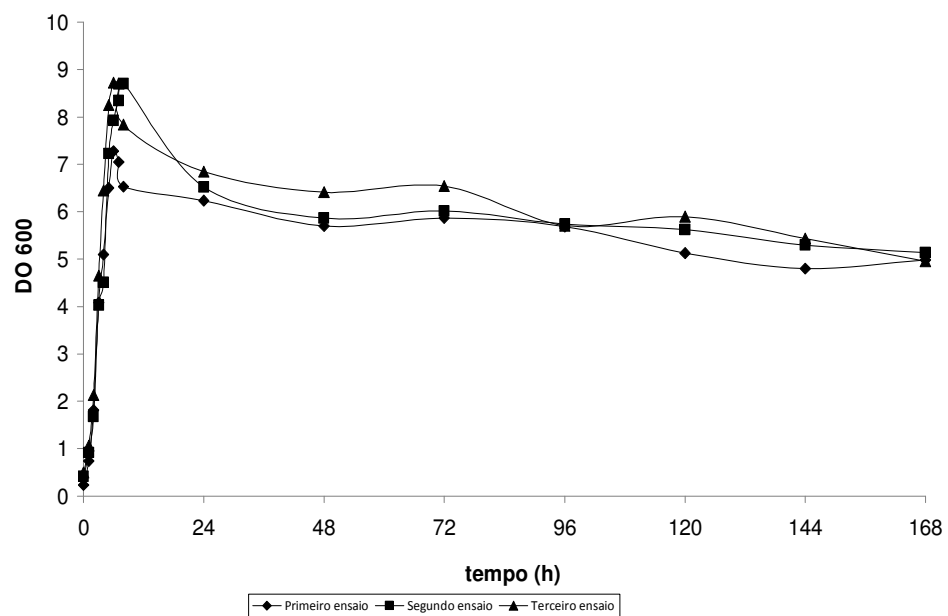


GRÁFICO 2 - Dados de densidade óptica a 600 nm obtidos nos três ensaios de *C. botulinum* tipo D, mostrando o perfil de crescimento bacteriano ao longo do tempo

Através da análise dos GRAF. 1 e 2, é possível perceber que o perfil de crescimento das bactérias *C. botulinum* tipo C e *C. botulinum* tipo D, respectivamente, foi bastante parecido nos três ensaios, inclusive entre si, com valores de densidade óptica máxima por volta das 8 horas de cultivo. Após, ocorre a morte celular e os valores de densidade óptica permanecem relativamente constantes até o tempo de 168 horas (7 dias).

Como relatado por Bowers *et al.* (1963) e por Schantz e Johnson (1992), a expressão dos genes relacionados à produção das neurotoxinas botulínicas tem relação direta com a disponibilidade de nitrogênio no meio externo.

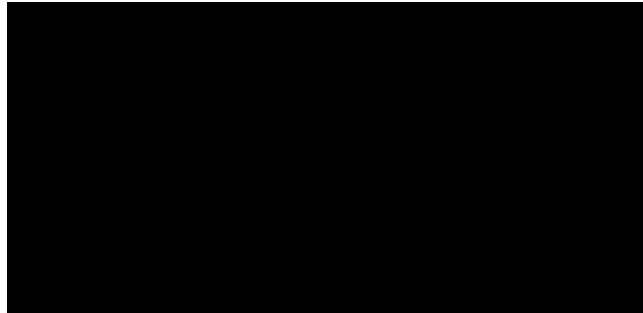
Observando o gráfico acima, percebe-se que a fase de morte celular acontece aproximadamente após as 8 horas de cultivo, e um dos motivos para o acontecimento disso é a escassez de nutrientes, possivelmente o nitrogênio, o que torna o ambiente externo bastante adverso. Portanto, o microrganismo provavelmente começa a expressar o gene que codifica a toxina após a fase de crescimento, por isso a importância de cultivar o *Clostridium botulinum* por tempos bastante superiores ao da fase de crescimento celular somente, no sentido de se obter altos títulos de toxina, a ser processada e utilizada como antígeno vacinal.

3.3.2 Produção de toxina

Na TAB. 5 mostram-se os dados obtidos com a inoculação das amostras coletadas ao final de cada cultivo de *C. botulinum* tipo C e das suas respectivas diluições, em camundongos. Os três cultivos apresentaram os mesmos resultados, que foram, portanto, apresentados em apenas uma tabela.

TABELA 5

Dados de sobrevivência ou morte dos camundongos inoculados com 0,2 mL das diluições da amostra obtida ao final dos três ensaios de *C. botulinum* tipo C, via endovenosa



Fator de diluição utilizado: 10.

Através da interpolação matemática proposta por Reed e Muench (1938), pôde-se calcular a toxicidade das amostras ao final do cultivo, em log DL₅₀/mL, seguindo as equações de 1 a 6:

$$I = \frac{\% \text{ infectados na diluição acima de } 50\% - 50\%}{\% \text{ infectados na diluição acima de } 50\% - \% \text{ infectados na diluição abaixo de } 50\%} \quad (1)$$

$$I = \frac{100\% + 50\%}{100\% - 0\%} = \frac{50\%}{100\%} = 50\% = 0,5. \quad (2)$$

A partir do cálculo de I, podemos calcular o valor de log DL50:

$$\log DL50 = - \log \text{ diluição acima de } 50\% + (1 * \log \text{ fator de diluição}) \quad (3)$$

$$\log DL50 = - \log \frac{1}{10000} + (0,5 * \log 10) \quad (4)$$

$$\log DL50 = 4 + 0,5 = 4,5. \quad (5)$$

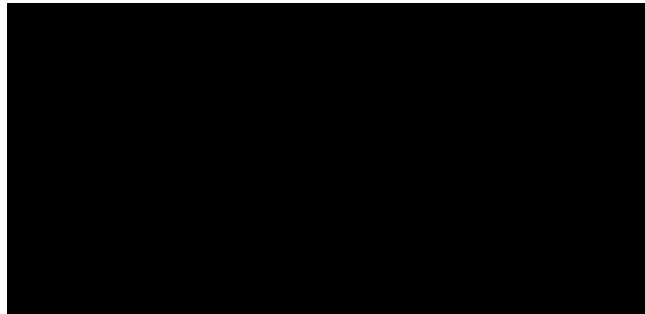
E, finalmente, determina-se o valor de log DL50/mL, sabendo que o fator de correção é igual a 5, pois inoculamos 0,2 mL nos camundongos e, para saber o valor de log DL50/mL, multiplica-se por 5:

$$\log \frac{DL50}{ml} = \log DL50 + \log \text{ fator de correção} = 4,5 + \log 5 = 5,20. \quad (6)$$

Por sua vez, nas TAB. 6 e 7 são apresentados os dados de sobrevivência dos camundongos inoculados com as amostras (e suas respectivas diluições) obtidas a partir dos três cultivos de *Clostridium botulinum* tipo D. A TAB. 6 se refere ao primeiro cultivo e na TAB. 7 são resumidos os resultados dos dois últimos (que apresentaram o mesmo resultado).

TABELA 6

Dados de sobrevivência ou morte dos camundongos inoculados com 0,2 mL das diluições da amostra obtida ao final do primeiro ensaio de *C. botulinum* tipo D, via endovenosa



O fator de diluição utilizado :10.

Através da interpolação matemática proposta por Reed e Muench (1938), pôde-se calcular a toxicidade das amostras ao final do primeiro cultivo, em log DL50/mL, seguindo as equações de 1 a 6:

$$I = \frac{\% \text{ infectados na diluição acima de } 50\% - 50\%}{\% \text{ infectados na diluição acima de } 50\% - \% \text{ infectados na diluição abaixo de } 50\%} \quad (1)$$

$$I = \frac{100\% + 50\%}{100\% - 0\%} = \frac{50\%}{100\%} = 50\% = 0,5. \quad (2)$$

A partir do cálculo de I, podemos calcular o valor de log DL50:

$$\text{Log } DL50 = - \log \text{ diluição acima de } 50\% + (1 * \log \text{ fator de diluição}) \quad (3)$$

$$\text{Log } DL50 = - \log \frac{1}{10000} + (0,5 * \log 10) \quad (4)$$

$$\text{Log } DL50 = 4 + 0,5 = 4,5. \quad (5)$$

E, finalmente, determinamos o valor de log DL50/mL, sabendo que o fator de correção é igual a 5, pois inoculamos 0,2 mL nos camundongos e, para saber o valor de log DL50/mL, multiplicamos por 5:

$$\log \frac{DL50}{ml} = \log DL50 + \log \text{ fator de correção} = 4,5 + \log 5 = 5,20. \quad (6)$$

TABELA 7

Dados de sobrevivência ou morte dos camundongos inoculados com 0,2 mL das diluições da amostra obtida ao final do segundo e terceiro ensaios de *C. botulinum* tipo D, via endovenosa



O fator de diluição utilizado foi 10

Através da interpolação matemática proposta por Reed e Muench (1938), pôde-se calcular a toxicidade das amostras ao final do primeiro cultivo, em log DL50/mL, de acordo com as equações 1 a 6:

$$I = \frac{\% \text{ infectados na diluição acima de } 50\% - 50\%}{\% \text{ infectados na diluição acima de } 50\% - \% \text{ infectados na diluição abaixo de } 50\%} \quad (1)$$

$$I = \frac{100\% + 50\%}{100\% - 0\%} = \frac{50\%}{100\%} = 50\% = 0,5. \quad (2)$$

A partir do cálculo de I, podemos calcular o valor de log DL50:

$$\text{Log } DL50 = - \log \text{ diluição acima de } 50\% + (I * \log \text{ fator de diluição}) \quad (3)$$

$$\text{Log } DL50 = - \log \frac{1}{100000} + (0,5 * \log 10) \quad (4)$$

$$\text{Log } DL50 = 5 + 5,5 = 5,5. \quad (5)$$

E, finalmente, determinamos o valor de log DL50/mL, sabendo que o fator de correção é igual a 5, pois inoculamos 0,2 mL nos camundongos e, para saber o valor de log DL50/mL, multiplicamos por 5:

$$\log \frac{DL50}{ml} = \log DL50 + \log \text{ fator de correção} = 5,5 + \log 5 = 6,20. (6)$$

Dessa forma, resumindo, os três cultivos de *C. botulinum* tipo C geraram títulos de toxina iguais a $10^{5,2}$ DL₅₀/mL ao final do cultivo. Com relação ao *C. botulinum* tipo D, o primeiro cultivo resultou em $10^{5,2}$ DL₅₀/mL e os dois últimos $10^{6,2}$ DL₅₀/mL.

3.3.3 Pureza do cultivo

As análises de pureza dos três cultivos de *Clostridium botulinum* tipo C e dos três cultivos de *C. botulinum* tipo D revelaram cultivos puros, sendo que todos os cultivos apresentaram exatamente o mesmo perfil de crescimento nos meios de cultura inoculados.

Os resultados mostraram que o *C. botulinum* tipo C e o tipo D foram capazes de crescer nos meios em que realmente era esperado o seu crescimento, PYGA, meio de ativação LTV e Thioglicolato, não sendo capaz de crescer em meio TSA, em função das condições aeróbias em que é exposto quando inoculado e incubado nesse meio de cultura. As análises de coloração de Gram confirmaram a pureza das amostras testadas com relação à pureza.

3.3.4 Clarificação do caldo fermentado

3.3.4.1 Análise de toxicidade do caldo clarificado

Após o processo de centrifugação do caldo fermentado para obtenção do sobrenadante, foram realizadas análises de toxicidade (DL₅₀/mL) para os três cultivos realizados de cada bactéria. A partir da fórmula de Reed ; Muench (1938), foi possível calcular o valor de log DL₅₀/mL, conforme

descrito em 2.9. O valor encontrado para o sobrenadante dos três cultivos de *C. botulinum* tipo C foi igual a $10^{5,2}$ DL₅₀/mL, deixando claro que o processo de clarificação através de centrifugação refrigerada não compromete a atividade da toxina botulínica tipo C. Da mesma forma, para o *C. botulinum* tipo D não houve perda após o processo de centrifugação, pois o sobrenadante do primeiro cultivo resultou $10^{5,2}$ DL₅₀/mL e os dos dois últimos resultaram $10^{6,2}$ DL₅₀/mL.

A manutenção da integridade da toxina após o processo de centrifugação, utilizado para obtenção do sobrenadante do cultivo, já era esperada, pois alguns pesquisadores utilizaram a técnica como uma das etapas de purificação das toxinas botulínicas tipo C e tipo D (MORIISHI *et al.*, 1991).

3.3.5 Purificação parcial das toxinas botulínicas

3.3.5.1 Resultados de toxicidade da toxina parcialmente purificada

Após a purificação parcial por diálise em fibra oca, o produto obtido não perdeu sua toxicidade. Os dados obtidos, mais uma vez, evidenciaram toxicidade igual a $10^{5,2}$ DL₅₀/mL para o *C. botulinum* tipo C e $10^{5,2}$ DL₅₀/mL (primeiro cultivo) e $10^{6,2}$ DL₅₀/mL (dois últimos cultivos) para o *C. botulinum* tipo D, o que confirma que não houve perda de toxicidade após o processo de purificação parcial em sistema de diálise.

A utilização de processos de filtração tangencial em membranas *hollow fiber* como etapa de pré-purificação das neurotoxinas botulínicas tipo C e tipo D já foi descrita na literatura (GESSLER; BÖHNEL, 1999). O trabalho relata a utilização de uma primeira membrana, de microfiltração, para obtenção do sobrenadante do cultivo e uma segunda membrana, de ultrafiltração, para concentrar a toxina presente no caldo clarificado e eliminar dele proteínas de menor tamanho.

3.3.6 Inativação das toxinas botulínicas

3.3.6.1 Cinética de inativação

Nas TAB. 8 e 9 são mostrados os dados da cinética de inativação obtidos com as diferentes concentrações de formalina testadas, para inativação da toxina do *C. botulinum* tipo C. Nas TAB. 10 e 11, por sua vez, são mostrados os dados da cinética de inativação com as diferentes concentrações de formalina testadas, para inativar a toxina botulínica tipo D.

TABELA 8

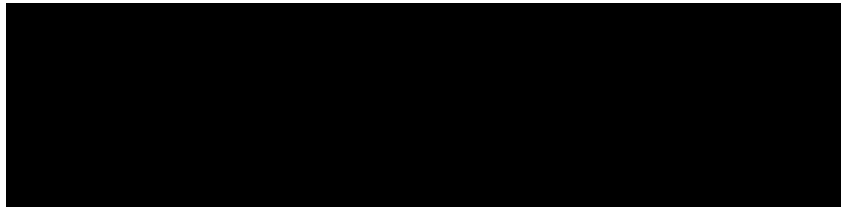
Dados de sobrevivência dos cobaios ao longo dos 14 dias de teste, inoculados com toxina botulínica tipo C submetida a inativação com 0,6% de formalina, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 100 rpm, durante 7 dias



V = vivo; D = doente; M=morto; - = observação desnecessária em função da morte do animal.

TABELA 9

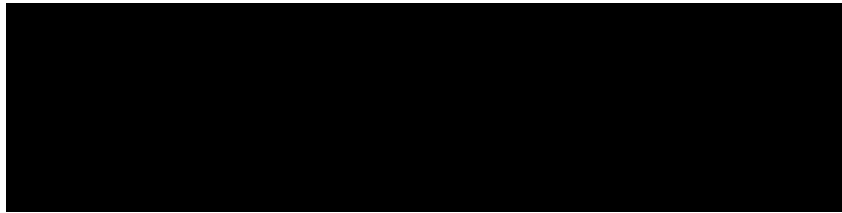
Dados de sobrevivência dos cobaios ao longo dos 14 dias de teste, inoculados com toxina botulínica tipo C submetida a inativação com 0,8; 1; 1,2 e 1,5% de formalina, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 100 rpm, durante 7 dias



V = vivo.

TABELA 10

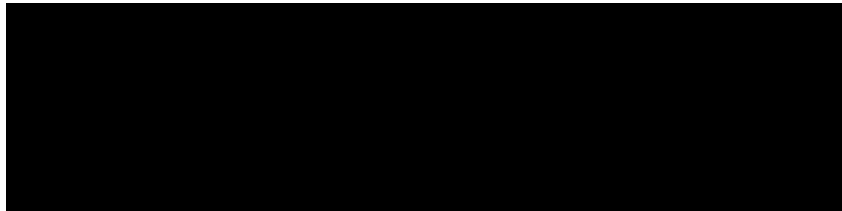
Dados de sobrevivência dos cobaios ao longo dos 14 dias de teste, inoculados com toxina botulínica tipo D submetida à inativação com 0,6% de formalina, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 100 rpm, durante 7 dias



V = vivo; D = doente; M=morto; - = observação desnecessária em função da morte do animal.

TABELA 11

Dados de sobrevivência dos cobaios ao longo dos 14 dias de teste, inoculados com toxina botulínica tipo D submetida a inativação com 0,8; 1; 1,2 e 1,5% de formalina, a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 100 rpm, por 7 dias. V = vivo



Os resultados mostram que a melhor concentração de inativação de ambas as toxinas botulínica tipo C e tipo D é 0,8%, nas condições testadas, pois nessa concentração as toxinas foram inativadas e os produtos não foram capazes de afetar nenhum dos animais inoculados. O aumento da concentração, a partir deste ponto, torna-se desnecessário. Além disso, sabe-se que quando grandes quantidades de formalina são utilizadas para a inativação, corre-se o risco de que haja perda de imunogenicidade do antígeno (toxóide) obtido (KELLER, 2008).

3.4 Teste de esterilidade dos toxóides botulínicos tipo C e tipo D

Nenhuma das amostras de toxóides botulínicos tipo C e tipo D, submetidas ao teste de esterilidade, apresentaram crescimento nos meios de cultura e foram, portanto, consideradas estéreis e aptas para uso como antígenos vacinais.

4 CONSIDERAÇÃO FINAL

Os resultados obtidos permitem concluir que a etapa de obtenção das toxinas botulínicas tipo C e tipo D, a serem posteriormente utilizadas como antígenos na formulação de vacinas, foi um sucesso. As cepas cedidas pelo Laboratório de Tecnologia de Vacinas da Vallée S.A. mostraram-se altamente capazes de produzir as toxinas, quando cultivadas em meios de cultura específicos. Os títulos de toxicidade em camundongos em DL_{50}/mL alcançaram $10^{5,2}$ para o *Clostridium botulinum* tipo C e $10^{6,2}$ para o *Clostridium botulinum* tipo D, evidenciando os elevados níveis de produção de toxinas pelas cepas selecionadas.

Os processos de purificação parcial da toxina produzida após o cultivo mostraram-se inofensivos em relação à manutenção do poder toxinogênico da amostra ao longo dos processos de centrifugação e ultrafiltração/diálise.

A formalina a 0,8%, a $37 \pm 2^\circ C$, por cinco dias mostrou-se eficiente na inativação das toxinas botulínicas tipo C e tipo D, o que foi confirmado através da inoculação em cobaias da espécie *Cavia porcellus*.

CAPÍTULO 3 - UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA ENCAPSULAMENTO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE COACERVAÇÃO SIMPLES

RESUMO

Parâmetros de trabalho com o polímero de quitosana, utilizando a técnica de coacervação simples, foram estabelecidos, de modo a padronizar a utilização desse polímero como matriz de encapsulamento protéico, em processos de formulação de vacinas. Primeiramente, foi avaliada a interferência do agente tensoativo sobre a metodologia de quantificação de proteínas totais, que posteriormente foi utilizada na medida da eficiência de encapsulamento de proteínas através do método proposto. Depois, foi determinada a quantidade de agente precipitante para completa precipitação do polímero de quitosana e formação de microesferas. Finalmente, foi determinada a eficiência de encapsulamento de proteínas com a técnica estabelecida. Verificou-se que o tensoativo Polisorbato 80 possui significativa interferência na leitura de amostras protéicas pelo método de Bradford, a 595 nm em espectrofotômetro, enquanto que o tensoativo Poloxamer não apresentou interferência. A quantidade de agente precipitante, a solução de sulfato de sódio a 20% (m/v), foi estabelecida em 1,5 mL, para uma solução de 50mL de quitosana a 0,25% (m/v), na presença de 1,25% (m/v) de tensoativo Poloxamer. A eficiência de encapsulamento pela metodologia proposta variou de 32,55% a 40,37% para a faixa de concentração inicial de 0,5 a 3,0 mg/mL de BSA (soroalbumina bovina), e de 41,03% para o toxóide botulínico tipo C (concentração inicial igual a 1,94 mg/mL) e 32,30% para o toxóide botulínico tipo D (concentração inicial igual a 1,82 mg/mL). A metodologia proposta se mostrou aplicável para a formulação de vacinas de liberação controlada contra o botulismo em animais.

Palavras-chave: Quitosana. Coacervação simples. Liberação controlada de antígenos.

CHAPTER 3 - CHITOSAN UTILIZATION FOR PROTEIN ENCAPSULATION THROUGH THE SIMPLE COACERVATION TECHNIQUE

ABSTRACT

In order to standardize the use of the chitosan polymer as a proteic encapsulation matrix during vaccine formulations, work parameters were established through the simple coacervation technique. First, the interference of the surfactant upon the total protein quantification methodology, which was later used in the protein encapsulation efficiency measurement step, was evaluated through the proposed method. Then, the amount of precipitating agent necessary to achieve the complete precipitation of the chitosan polymer and formation of microspheres was determined. Finally, the protein encapsulation efficiency of the proposed technique was assessed. It was verified that the Polisorbato 80 surfactant had strong interference upon the protein samples reading through the Bradford's method at 595 nm in spectrophotometry, while the Poloxamer surfactant did not have any interference. The amount of precipitating agent, sodium sulphate 20% (m/v) solution, was established in 1.5 mL to 50 mL of chitosan (0,25% m/v) in the presence of 1,25% (m/v) of Poloxamer surfactant. Encapsulation efficiency ranged from 32.55% to 40.37% for BSA (bovine serum albumin) concentration varying from 0.5 to 3.0mg/mL, and 41.03% for botulinic toxoid type C (initial concentration = 1.94mg/mL) and 32.30% for botulinic toxoid type D (initial concentration = 1.82mg/mL). The proposed methodology has shown to be applicable for controlled release vaccines formulation against botulism in animals.

Keywords: Chitosan. Simple coacervation. Antigen controlled release.

1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta das vacinas, na época de Edward Jenner e o vírus da varíola, muitos avanços têm sido obtidos no sentido de desenvolver novos produtos com o objetivo de prevenir um número cada vez maior de doenças, tanto humanas quanto animais, através do estímulo prévio do sistema imunológico (imunização ativa).

Os avanços na área da Vacinologia, atualmente, estão intimamente relacionados com a tecnologia do DNA recombinante, que permite o desenvolvimento de vacinas eficazes e seguras. Porém, as vacinas derivadas da tecnologia do DNA recombinante, ou vacinas recombinantes, por utilizarem, em sua maioria, como antígenos de imunização apenas alguns epítomos do agente etiológico causador da doença, requerem adjuvantes poderosos, para serem capazes de estimular suficientemente o sistema imunológico e gerarem proteção efetiva.

Nesse contexto, paralelamente ao desenvolvimento das vacinas recombinantes, está a busca por novos adjuvantes de vacinas, mais eficazes e biocompatíveis, auxiliando no aumento da resposta imunológica sem causar reações adversas no organismo receptor. Diversas macromoléculas têm sido estudadas dentro desse propósito, dentre as quais se destaca a quitosana, polissacarídeo aminado derivado da quitina, abundantemente presente na natureza, principalmente no exoesqueleto de crustáceos e insetos.

Vários estudos descrevem a utilização da quitosana como adjuvante de vacinas, preparando-a através de diferentes técnicas, além de relatarem também a utilização deste polímero como matriz de liberação controlada de fármacos. Em algumas pesquisas, a quitosana mostrou-se mais eficiente que adjuvantes a base de alumínio, que são os mais amplamente utilizados em vacinas humanas e veterinárias.

1.1 Objetivo geral

Padronizar a utilização do polímero de quitosana como matriz de encapsulamento de proteínas, utilizando a técnica de coacervação simples, e estabelecer parâmetros de trabalho a serem utilizados na posterior etapa de formulação de vacinas.

1.2 Objetivos específicos

Avaliar a interferência do agente tensoativo sobre a metodologia de quantificação de proteínas totais de Bradford, a ser utilizada na etapa de medida da eficiência de encapsulamento proteico.

Determinar a quantidade de agente precipitante necessária para a precipitação do polímero de quitosana e formação de microesferas.

Determinar a eficiência de encapsulamento de proteínas com a técnica estabelecida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Testes preliminares de trabalho com o polímero de quitosana

Os testes preliminares de trabalho com o polímero de quitosana foram baseados na metodologia descrita por Lourenço (2006), que utiliza a técnica de coacervação simples para a formação de micropartículas de quitosana.

2.1.1 Preparo da solução base de quitosana

Para se obter 50 mL de solução base de quitosana, foram utilizados 0,125 g do polímero de quitosana em pó (COGNIS). O polímero primeiramente foi solubilizado em 10 mL solução de ácido acético (VETEC) 0,5% (v/v). Então, adicionou-se 10 mL da solução de tensoativo a 6,25% e completou-se com água purificada até o volume final de 50 mL. Paralelamente, preparou-se a solução base de quitosana contendo as proteínas a serem posteriormente encapsuladas, substituindo-se total ou parcialmente o volume de água purificada pelo volume ocupado pela solução proteica.

2.1.2 Precipitação da quitosana

A quitosana foi precipitada formando a estrutura de micropartícula através da elevação do pH da solução base. Para isso, adicionou-se à solução base, solução de sulfato de sódio a 20% (m/v), em um fluxo aproximado de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, até a percepção visual da formação de um precipitado.

2.2 Determinação de parâmetros de trabalho com o polímero de quitosana

2.2.1 Teste de interferência do agente tensoativo

Para mensurar a eficiência de encapsulamento antigênico pelo método de coacervação simples, foi preciso utilizar uma metodologia de quantificação de proteínas, capaz de medir eficazmente a quantidade de proteínas encapsuladas e não-encapsuladas, após o processo de precipitação da solução base de quitosana misturada com a solução de proteínas antigênicas.

A metodologia de quantificação de proteínas totais descrita por Bradford (1976) é um método simples, rápido e eficaz, muito utilizado na rotina dos laboratórios da Vallée S.A. Porém, sabe-se que o método de Bradford sofre interferência quando na amostra estão presentes detergentes como o SDS e o octil fenol etoxilato. Por isso, foi preciso avaliar se havia interferência dos possíveis tensoativos a serem utilizados, polisorbato 80 ou poloxamer (BASF) na quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford.

Para isso, realizou-se o teste de interferência do agente tensoativo, primeiramente obtendo-se uma curva padrão de proteína (BSA – *bovine serum albumin*), em seguida verificando a detecção de diferentes concentrações de polisorbato 80 e poloxamer pelo método de Bradford (1976) adaptado, na ausência de proteínas e, finalmente, avaliando a interferência do polisorbato 80 e poloxamer sobre a quantificação de proteínas em diferentes soluções de concentrações conhecidas de BSA.

2.2.1.1 Curva padrão de soroalbumina bovina

A partir de uma solução de BSA (*bovine serum albumin*) a uma concentração de 1 mg/mL, prepararam-se seis amostras de diferentes concentrações protéicas, conforme TAB.1. Tomou-se 20 µL de cada uma dessas soluções e adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford. Após

homogeneização das misturas obtidas, incubou-se as mesmas durante 20 minutos e, em seguida, fez-se a leitura da absorbância obtida a 595 nm em espectrofotômetro, em triplicata (PHARMACIA, INC.). Depois, através de uma regressão linear, obteve-se, a curva padrão de mg/mL (BSA) X Absorbância (595 nm).

TABELA 1

Concentrações de soroalbumina bovina presentes nas amostras utilizadas para a construção da curva padrão, utilizada para posterior determinação de concentração protéica pelo método de Bradford (1976)

Amostra	Concentração (mg/mL)
1	0,075
2	0,150
3	0,200
4	0,250
5	0,500
6	0,750

2.2.1.2 Quantificação do polisorbato 80 e do poloxamer

Foram preparadas sete amostras de polisorbato 80 e poloxamer com diferentes porcentagens, conforme TAB. 2 e 3. A 20 µL de cada uma dessas soluções, adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford e, após homogeneização e incubação por 20 minutos, fez-se a leitura da absorbância obtida a 595 nm em espectrofotômetro (PHARMACIA, INC.).

TABELA 2

Concentração de polisorbato 80 presentes nas amostras , preparadas para verificação de leitura pelo método de Bradford (1976) a 595 nm

Amostra	% Polisorbato 80
1	0,30
2	0,50
3	0,70
4	0,90
5	1,10
6	1,25
7	1,50

TABELA 3

Concentração de poloxamer presentes nas amostras, preparadas para verificação de leitura pelo método de Bradford (1976) a 595 nm

Amostra	% Poloxamer
1	0,30
2	0,50
3	0,70
4	0,90
5	1,10
6	1,25
7	1,50

2.2.1.3 Quantificação proteica na presença de polisorbato 80 e poloxamer

Foram preparadas sete soluções de BSA de diferentes concentrações, conforme TAB. 4, na presença de 1,25% de polisorbato 80 ou poloxamer. A 20 µL de cada uma dessas soluções, adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford e, após homogeneização e incubação por 20 minutos, fez-se a leitura da absorbância obtida a 595 nm em espectrofotômetro (PHARMACIA, INC.).

TABELA 4

Concentrações das amostras de BSA preparadas, na presença de 1,25% de Polisorbato 80 ou Poloxamer, para verificação da interferência sobre a quantificação proteica pelo método de Bradford

Amostra	Concentração adicionada (mg/mL)
1	0,2
2	0,5
3	0,8
4	1,1
5	1,4
6	1,7
7	2

2.2.2 Volume de agente precipitante para precipitação do polímero

Para avaliar o volume da solução de sulfato de sódio 20% (m/v) a ser adicionado à solução base de quitosana de modo a provocar a precipitação do polímero e a formação de micropartículas, preparou-se nove recipientes contendo, cada um, 50 mL de solução base de quitosana, na ausência de antígenos. Além disso, preparou-se 20 mL de uma solução de sulfato de sódio a 20% (m/v). Em seguida, realizou-se a precipitação da quitosana, utilizando-se diferentes volumes de sulfato de sódio, para cada recipiente. A análise de formação de precipitado foi realizada através da leitura da absorbância da solução precipitada a 500 nm, em triplicata, conforme Lourenço, 2006. Na TAB. 5 o experimento realizado é resumido.

TABELA 5

Volume de solução de sulfato de sódio 20% (m/v) adicionada a cada recipiente contendo 50 mL de solução base de quitosana, para avaliação da precipitação do polímero

Recipiente	Na ₂ (SO) ₄ 20% (mL)
1	0,3
2	0,4
3	0,5
4	0,6
5	0,9
6	1,2
7	1,5
8	1,8
9	2,1

2.2.3 Medida da eficiência de encapsulamento de proteína

2.2.3.1 Curva padrão de soroalbumina bovina

A partir de uma solução de BSA (*bovine serum albumin*) a uma concentração de 1 mg/mL, preparou-se seis soluções, de concentrações iguais a 0,075, 0,150, 0,200, 0,250, 0,500 e 0,750 mg/mL, da mesma forma que em 3.2.2.1. Tomou-se 20 µL de cada uma dessas soluções e adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford. Após homogeneização das misturas obtidas, incubou-se as mesmas durante 20 minutos e, em seguida, fez-se a leitura da absorbância obtida a 595 nm em espectrofotômetro (PHARMACIA, INC.). Depois, calculou-se a equação obtida através de uma regressão linear, obtendo-se, então, a curva padrão de mg/mL (BSA) X Absorbância (595 nm).

2.2.3.2 Testes de encapsulamento

Primeiramente, prepararam-se seis soluções base de quitosana contendo em suas composições diferentes concentrações finais de BSA, de acordo com a TAB. 6. Efetuou-se a precipitação dessas soluções com sulfato de sódio a 20 % (m/v).

Para verificar a taxa de encapsulamento da proteína (BSA), efetuou-se a centrifugação da suspensão de micropartículas obtida a 8000 rpm, a 4°C, durante 30 minutos (Il'na *et al.*, 2008). Sabendo a concentração de proteínas livres no sobrenadante, foi possível determinar a concentração encapsulada nas micropartículas, por simples diferença entre a concentração inicial e a concentração presente no sobrenadante. Feito isso, calculou-se a eficiência de encapsulamento.

TABELA 6

Concentração proteica final das seis soluções base de quitosana preparadas, posteriormente submetidas aos testes de encapsulamento

Amostra	Concentração BSA (mg/mL)
1	0,5
2	1,0
3	1,5
4	2,0
5	2,5
6	3,0

Após o teste com BSA, tomou-se uma solução de toxoide botulínico tipo C e uma solução de toxoide botulínico tipo D, de concentrações iguais a 1,94 e 1,82 mg/mL, respectivamente, e prepararam-se duas soluções base de quitosana contendo esses antígenos. A concentração proteica final da solução base de quitosana contendo toxoide botulínico tipo C foi de 0,50 mg/mL e da solução base contendo toxoide tipo D foi de 0,46 mg/mL. Da mesma forma, efetuou-se a precipitação dessas duas soluções base com sulfato de sódio a 20% (m/v) e calculou-se a eficiência de encapsulamento para os antígenos vacinais, por dosagem simples de proteína presente no sobrenadante, individualmente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes preliminares de trabalho com o polímero de quitosana

Os testes preliminares de trabalho com a quitosana mostraram a sua baixa solubilidade em água, o que é melhorado com a presença de ácido acético, devido à adição de prótons aos grupos amino da cadeia polimérica. O ânion sulfato diminui sua solubilidade, causando sua precipitação. A presença de um tensoativo diminui a presença de aglomerados de micropartículas após a precipitação, o que é facilmente visualizado a olho nu. Esses testes preliminares estão de acordo com os descritos por Lourenço (2006).

3.2 Teste de interferência do agente tensoativo

3.2.1 Curva padrão de soroalbumina bovina

No GRAF. 1 é apresentado o resultado obtido na construção da curva padrão pelo método de Bradford adaptado, utilizando BSA (soroalbumina bovina) como proteína padrão.

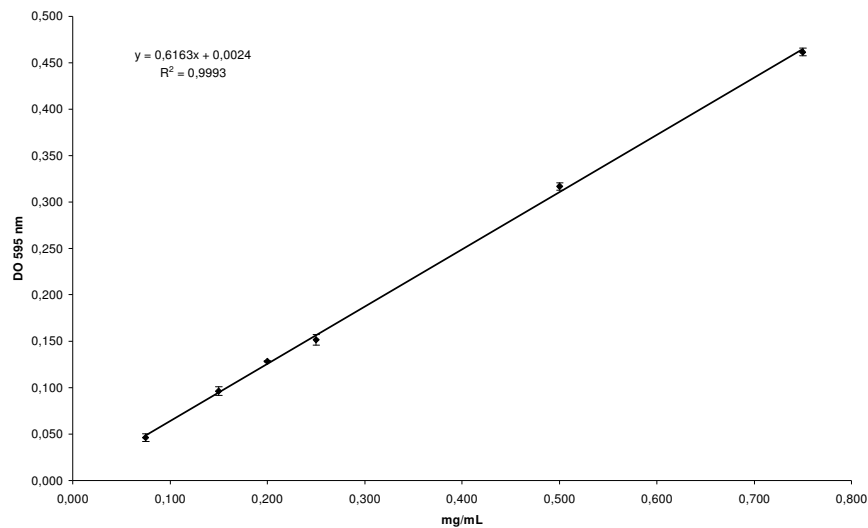


GRÁFICO 1 - Curva padrão de BSA utilizando a metodologia proposta por Bradford (1976), adaptada conforme os procedimentos internos da Vallée S.A.

Percebe-se, através do resultado obtido, uma boa correlação linear entre a densidade óptica a 595 nm e a concentração de BSA em mg/mL, com $R^2 = 0,9993$.

3.2.2 Quantificação do Polisorbato 80 e do Poloxamer

Nos GRAF. 2 e 3 são apresentados os resultados de absorvância a 595 nm obtidos da leitura de amostras de Polisorbato 80 e Poloxamer, utilizando o reagente de Bradford.

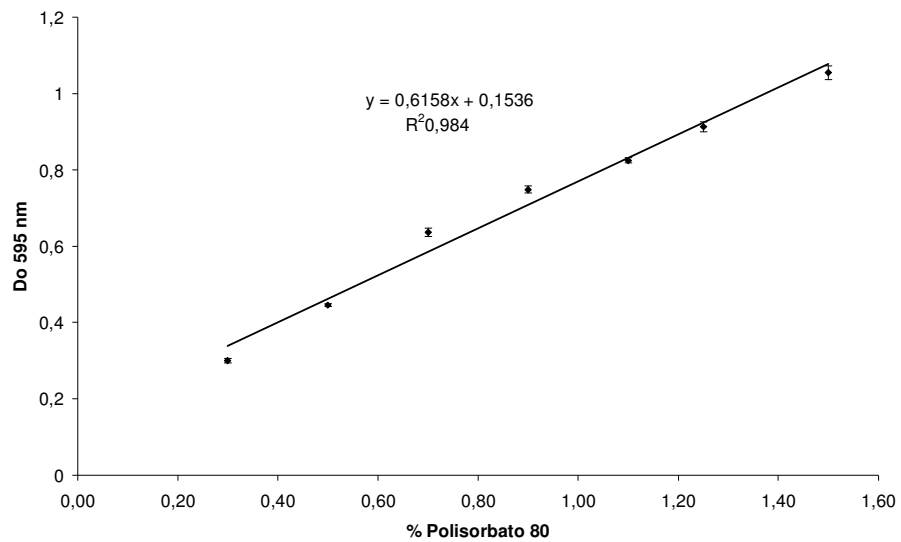


GRÁFICO 2 - Gráfico de % de Polisorbato 80 x Absorbância a 595 nm, utilizando a metodologia de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), adaptada

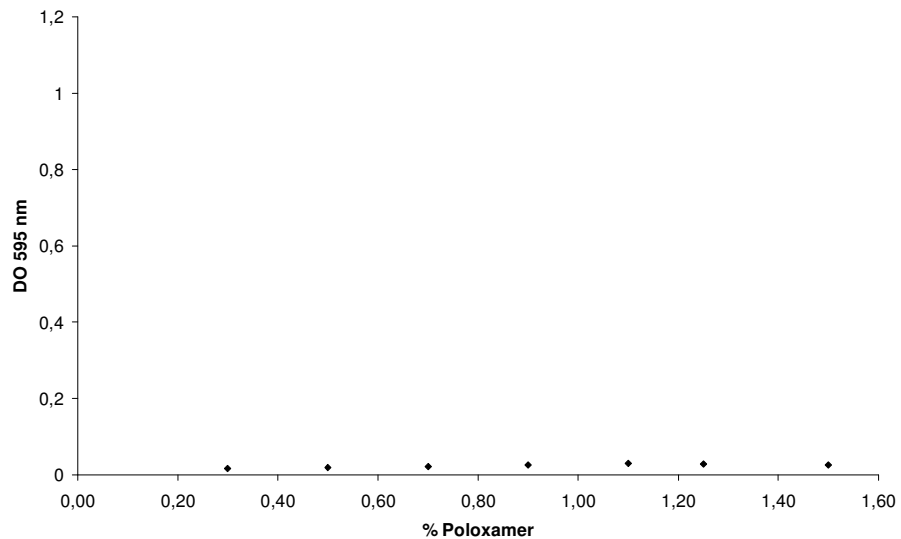


GRÁFICO 3 - Gráfico de % de Poloxamer X Absorbância a 595 nm, utilizando a metodologia de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), adaptada

Observando-se os gráficos obtidos pela leitura espectrofotométrica a 595 nm de amostras com diferentes concentrações de Polisorbato 80 e Poloxamer, utilizando a técnica de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford adaptada, percebe-se claramente que, ao contrário das amostras de Poloxamer, as amostras de Polisorbato 80 são fortemente detectadas nas leituras de absorbância, chegando a descrever uma correlação linear forte entre a % do tensoativo e a densidade óptica a 595 nm, com R^2 igual a 0,984. Isso corrobora com o descrito por Bradford (1976), que afirmava que o método poderia sofrer interferência em decorrência da presença de certos detergentes na amostra.

As amostras de Poloxamer, por sua vez, são fracamente detectadas, não havendo nenhuma correlação com a concentração da amostra, pois à medida que cresce a concentração, o valor da absorbância a 595 nm permanece praticamente constante, em um valor próximo de zero.

3.2.3 Quantificação proteica na presença de Polisorbato 80 e Poloxamer

Nas TAB. 7 e 8 e nos GRAF. 4 e 5 são apresentados os resultados da quantificação de diferentes soluções de BSA na presença de 1,25% de Poloxamer e Polisorbato 80, respectivamente.

TABELA 7

Teste de quantificação de diferentes concentrações de BSA na presença de 1,25% de Poloxamer, através da metodologia de Bradford (1976)

Am.	DO 1	DO 2	DO 3	Média	Dil.	C. (mg/mL)	CT (mg/mL)
1	0,125	0,129	0,132	0,125	1	0,199	0,2
2	0,318	0,329	0,331	0,322	1	0,519	0,5
3	0,480	0,479	0,474	0,474	1	0,766	0,8
4	0,329	0,339	0,340	0,332	2	1,071	1,1
5	0,405	0,418	0,418	0,410	2	1,323	1,4
6	0,335	0,346	0,351	0,340	3	1,646	1,7
7	0,303	0,310	0,297	0,299	4	1,930	2

Am.: amostra. DO: densidade óptica a 595nm. Dil.: diluição. C.: concentração proteica encontrada pelo método. CT.: concentração proteica adicionada. A média foi calculada aritmeticamente.

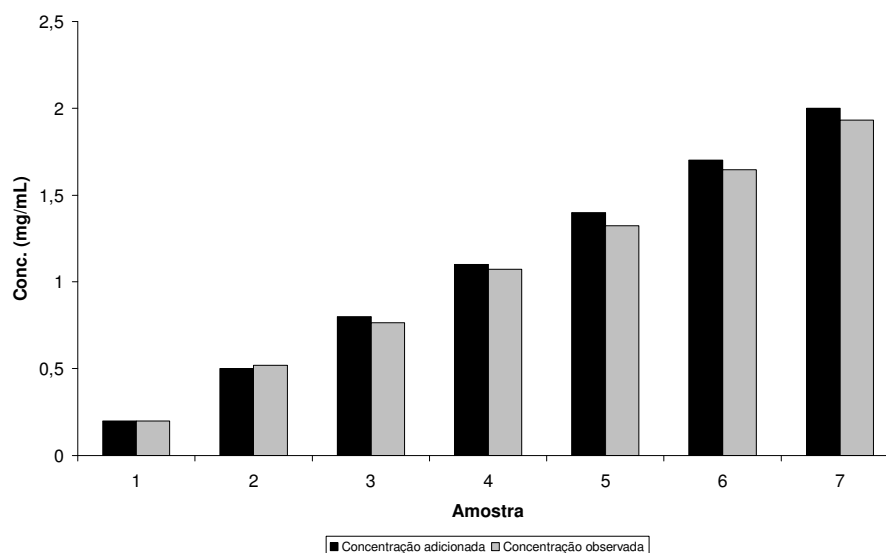


GRÁFICO 4 - Comparação entre as concentrações teóricas de BSA na amostra e as concentrações observadas pela técnica de Bradford na presença de 1,25% de Poloxamer

TABELA 8

Teste de quantificação de diferentes concentrações de BSA na presença de 1,25% de Polisorbato 80, através da metodologia de Bradford (1976)

Am.	DO 1	DO 2	DO 3	Média	Dil.	C. (mg/mL)	CT (mg/mL)
1	0,049	0,088	0,066	0,068	1	0,108	0,2
2	0,160	0,139	0,121	0,140	1	0,226	0,5
3	0,218	0,200	0,239	0,219	1	0,356	0,8
4	0,301	0,281	0,241	0,274	1	0,447	1,1
5	0,320	0,357	0,379	0,352	1	0,574	1,4
6	0,409	0,377	0,392	0,393	1	0,641	1,7
7	0,519	0,475	0,469	0,488	1	0,797	2

Am.: amostra. DO: densidade óptica a 595nm. Dil.: diluição. C.: concentração proteica encontrada pelo método. CT.: concentração proteica adicionada. A média foi calculada aritmeticamente.

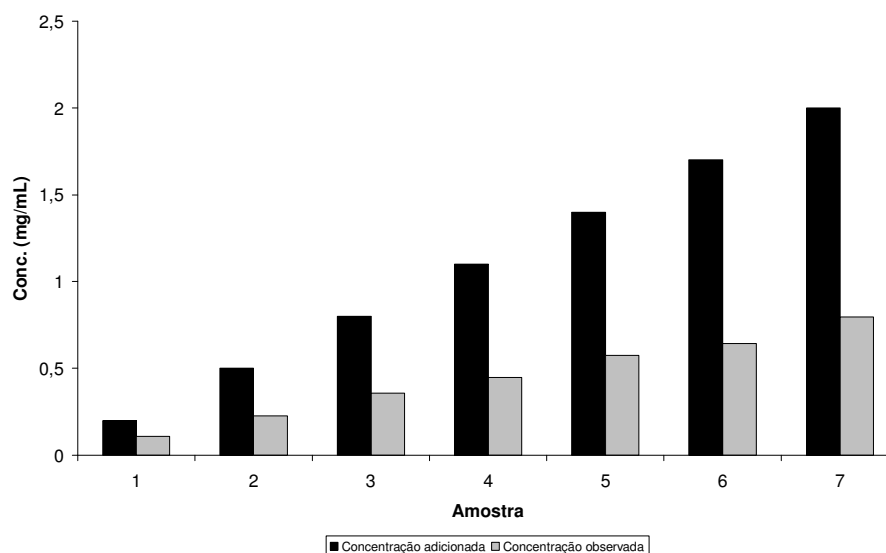


GRÁFICO 5 - Comparação entre as concentrações teóricas de BSA na amostra e as concentrações observadas pela técnica de Bradford na presença de 1,25% de Polisorbato 80

A análise tabelas e gráficos acima confirma os resultados obtidos no item 3.2.2. Na presença de Poloxamer, 1,25%, foi possível chegar a valores bem próximos dos esperados para as diferentes concentrações de BSA, enquanto que, na presença de Polisorbato 80, percebe-se uma clara interferência, que impacta sobre a quantificação real de proteínas presentes na amostra.

Dessa forma, conclui-se que não existe interferência do Poloxamer na quantificação de proteínas pelo método de Bradford, ou que sua interferência é mínima e pode ser desconsiderada. Isso torna possível a realização da etapa de eficiência de encapsulamento protéico, descrita posteriormente.

O método de Bradford é uma técnica de quantificação de proteínas totais presentes em uma amostra, utilizando o corante Comassie Blue. A técnica se baseia na interação do referido corante com grupamentos básicos ou aromáticos presentes em aminoácidos, componentes de proteínas de alto peso molecular. No pH da reação, essa interação entre o corante e a proteína provoca um deslocamento do equilíbrio químico do corante para a sua forma aniônica, que, por sua vez, é capaz de absorver fortemente ondas de comprimento igual a 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998).

A interferência do Polisorbato 80 e a não interferência do Poloxamer sobre a execução da técnica de Bradford pode ser explicada pela diferença química entre os dois compostos. O Polisorbato 80 é o polioxietileno sorbitana monooleato, e o Poloxamer é o polioxietileno polioxipropileno. Nas FIG. 1 e 2 são apresentadas as estruturas moleculares do Polisorbato 80 e do Poloxamer.

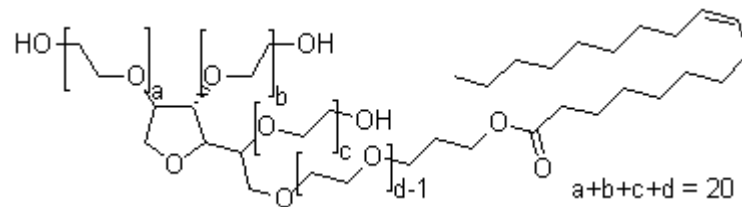


FIGURA 1 - Estrutura molecular do Polisorbato 80. Percebe-se na estrutura a presença de vários radicais oxietileno, dispostos nas cadeias a, b, c e d, ligadas a uma molécula de sorbitol, e finalizadas com um grupo hidroxila, com exceção da cadeia d, que leva um ácido graxo monoinsaturado ao final de sua cadeia

Fonte: Online Database of Chemicals from Around the World, 2011¹

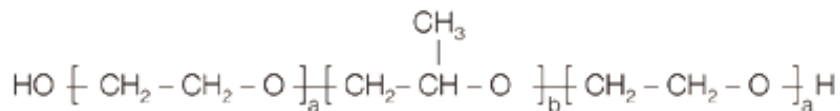


FIGURA 2 - Estrutura molecular do Poloxamer. Precebe-se na estrutura a presença de vários radicais oxietileno (a) intercalados com radicais oxipropileno (b)

Fonte: BASF- THE CHEMICAL COMPANY, [2011?]².

Como mostram as figuras, o Poloxamer possui uma estrutura molecular bem diferente da estrutura do Polisorbato 80, o que provavelmente é determinante para a interferência na quantificação de proteínas pela técnica de Bradford (1976). A estrutura mais complexa com um ácido graxo em sua composição pode favorecer a interação do corante Comassie Blue, que

¹ <http://www.chemblink.com/products/9005-65-6.htm>

² <http://www.pharma-ingredients.basf.com/product.aspx?PRD=30035120>

passa, então, a absorver o comprimento de onda de 595 nm, interferindo, dessa forma, nas leituras.

Uma vez que o polisorbato 80 interfere na quantificação proteica através do método de Bradford e o poloxamer não, a solução para esse problema é utilizar o poloxamer como agente tensoativo na preparação de microesferas de quitosana para encapsulamento de proteínas.

3.3 Volume de agente precipitante para precipitação do polímero

No GRAF. 6 são apresentados os resultados de absorbância obtidos na precipitação das nove soluções base de quitosana precipitadas com diferentes volumes da solução de sulfato de sódio 20%:

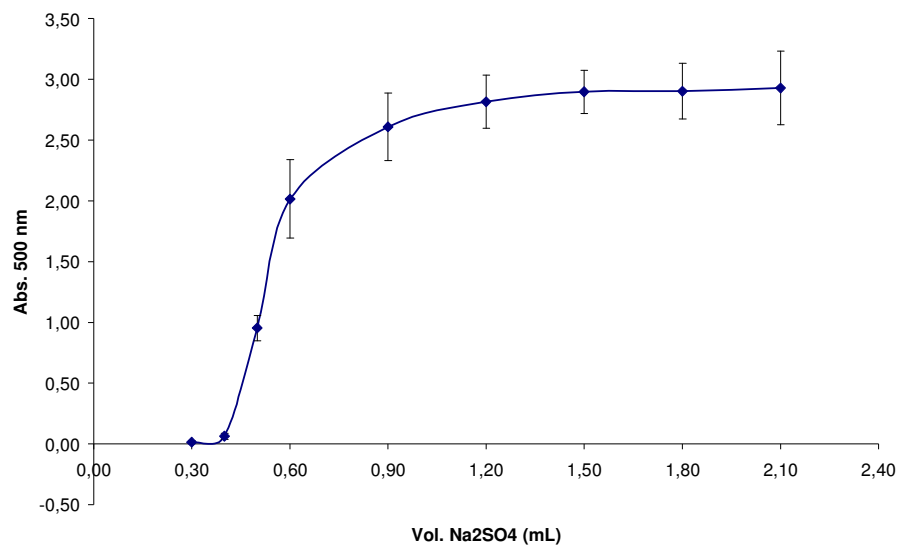


GRÁFICO 6 - Curva de precipitação da quitosana em função do volume de adição da solução de sulfato de sódio 20%

Percebe-se que os valores de absorbância das soluções precipitadas começam a se estabilizar com 1,2 mL de solução de sulfato de sódio adicionada, e se tornam praticamente constantes a partir dos 1,5 mL. Dessa forma, definiu-se, como volume padrão de adição da solução de sulfato de

sódio 20%, para precipitação da quitosana, 1,5 mL para 50 mL de solução base de quitosana.

Por sua vez, Lourenço (2006) determinou uma concentração de 0,8% de sulfato de sódio para a precipitação do polímero de quitosana em seus experimentos, o que equivaleria a 2,0 mL de solução de sulfato de sódio 20% para 50 mL de solução base de quitosana. Em seus experimentos, Lourenço (2006) utilizou uma margem de segurança maior para a precipitação, pois com 1,5 mL de sulfato (0,6%) a precipitação da quitosana já havia ocorrido. De qualquer maneira, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os obtidos por Lourenço (2006).

3.4 Medida da eficiência de encapsulamento de proteína

3.4.1 Curva padrão de soroalbumina bovina

No GRAF. 7 é apresentado o resultado obtido na construção da curva padrão pelo método de Bradford adaptado, utilizando BSA (soroalbumina bovina) como proteína padrão.

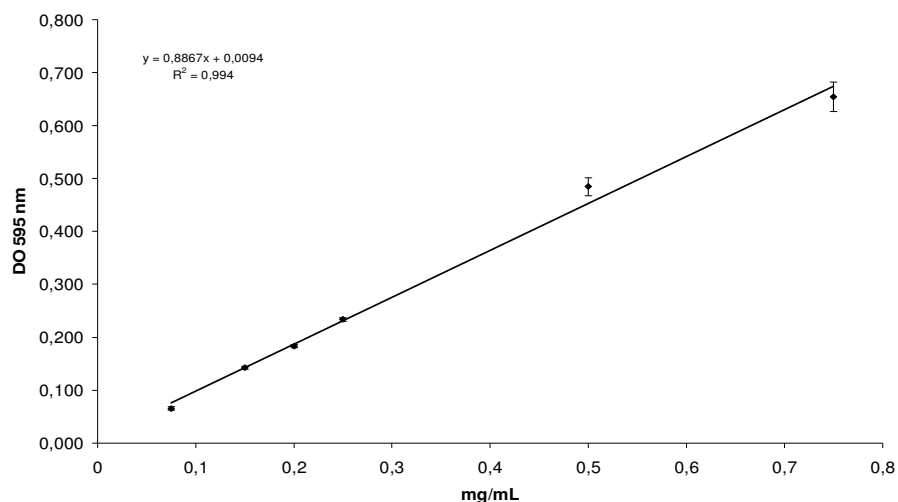


GRÁFICO 7 - Curva padrão de BSA utilizando a metodologia proposta por Bradford (1976), adaptada conforme os procedimentos internos da Vallée S.A.

Novamente, através dos resultados obtidos, obteve-se correlação linear entre a densidade óptica a 595 nm e a concentração de BSA em mg/mL, com coeficiente de determinação R^2 igual a 0,994.

3.4.2 Testes de encapsulamento

Na TAB. 9 são mostrados os dados de eficiência de encapsulamento da técnica de coacervação simples do polímero de quitosana, utilizando a soroalbumina bovina como proteína de teste.

TABELA 9

Teste de porcentagem de encapsulamento de BSA depois da precipitação da quitosana, para avaliação da eficiência de encapsulamento da metodologia proposta

Am.	DO 1	DO 2	DO 3	Média	Dil.	DOr	C (mg/mL)	I (mg/mL)	A (mg/mL)	% A
1	0,275	0,282	0,291	0,200	1,5	0,3	0,327	0,5	0,173	34,66
2	0,290	0,286	0,282	0,203	3,0	0,6	0,674	1,0	0,326	32,55
3	0,262	0,257	0,256	0,175	5,0	0,9	0,975	1,5	0,525	34,98
4	0,257	0,263	0,264	0,178	6,0	1,1	1,193	2,0	0,807	40,37
5	0,262	0,263	0,262	0,179	8,0	1,4	1,602	2,5	0,898	35,90
6	0,257	0,247	0,258	0,171	10,0	1,7	1,912	3,0	1,088	36,27

Am. = Amostra; DO = Densidade óptica a 595 nm; Dil. = Fator de diluição da amostra; Dor: densidade óptica real; C. = concentração proteica do sobrenadante obtida após o procedimento de centrifugação da amostra precipitada; I. = concentração proteica inicial na solução base; A. = Quantidade proteica adsorvida (Inic. – Conc.).

Os resultados acima mostram que, para a faixa de concentração testada, que foi de 0,5 a 3,0 mg/mL de BSA, a porcentagem de proteína encapsulada ou adsorvida às micropartículas de quitosana após o procedimento de coacervação simples está na faixa de 32,55 a 40,37%.

Na TAB. 10 são apresentados os resultados de eficiência de encapsulamento para os toxóides botulínicos tipos C e D.

TABELA 10

Resultados de eficiência dos testes de encapsulamento dos toxóides botulínicos tipos C e D, utilizando a metodologia proposta

Amostra	DO 1	DO 2	DO 3	DO Média	C (mg/mL)	CSB (mg/mL)	% Ads.
SBN <i>C. bot.</i> C	0,321	0,336	0,332	0,330	0,30	0,50	41,03
SBN <i>C. bot.</i> D	0,343	0,335	0,351	0,343	0,31	0,46	32,30

SBN *C. bot.* C = sobrenadante do toxíde tipo C encapsulado; SBN *C. bot.* D = sobrenadante do toxíde tipo D encapsulado DO = densidade óptica a 595 nm; C = concentração protéica da amostra; CSB = concentração da amostra na solução base de quitosana % Ads. = % proteína adsorvida/encapsulada.

Na Tabela são mostrados valores de eficiência de encapsulamento de 41,03% para o toxoide botulínico tipo C e de 32,30% para o toxoide botulínico tipo D, o que está dentro do esperado se considerarmos os resultados de encapsulamento obtidos com a soroalbumina bovina (32,55 a 40, 37%). As diferenças podem ser justificadas pela variação da metodologia de quantificação utilizada.

A eficiência do encapsulamento descrita por Lourenço (2006), para o DMAE base livre foi de 63,6% em média, utilizando a coacervação simples. Porém, a metodologia de preparo das micropartículas de quitosana contendo DMAE seguiu procedimentos específicos diferentes dos utilizados neste trabalho, o que pode ter influenciado nos resultados. Por sua vez, Il'ina *et al.* (2008) descreveram eficiências de encapsulamento variando de 47 a 88% de eficiência para moléculas de interferon alfa. Porém, mais uma vez, as condições de trabalho foram diferentes, pois esses pesquisadores utilizaram uma variação da metodologia de coacervação simples no preparo das partículas de quitosana, em que a adsorção é feita após a precipitação. Além disso, a % de quitosana na solução base descrita foi de 1%, enquanto que nesse trabalho foi utilizada 0,25% (0,125g para 50mL de solução base). Além disso, a proporção de interferon submetida a adsorção foi da ordem de 0,003 a 0,015% de interferon para 1% de quitosana, enquanto que neste trabalho foi de 0,1-0,2% (1 a 2 mg/mL) em 0,25% de quitosana, portanto uma proporção bem menor, o que também pode facilitar o encapsulamento.

Utilizando a coacervação simples para encapsular moléculas de ovalbumina, Van der Lubben *et al.* (2001) determinaram a eficiência de encapsulamento avaliando a proteína remanescente no sobrenadante após o

processo de adsorção, utilizando a quantificação de proteínas proposta por Lowry. Dependendo das condições de teste, os resultados de eficiência oscilaram de 32 a 85%, estando de acordo, portanto, com os resultados obtidos neste trabalho. Os dados relatados por Van der Lubben *et al.* (2001) sugerem, ainda, que o processo de encapsulamento utilizado neste trabalho pode ser otimizado, alterando-se parâmetros como a quantidade de proteína submetida ao encapsulamento e a concentração de polímero de quitosana na solução.

Outros pesquisadores avaliaram a capacidade de encapsulamento de microesferas de quitosana utilizando como modelo a proteína BSA com uma metodologia muito parecida com a utilizada neste trabalho, centrifugando as microesferas e avaliando a concentração de proteínas livres no sobrenadante. Os resultados indicaram uma eficiência de 60% de encapsulamento, porém utilizando uma técnica de preparo das microesferas diferente da coacervação simples, a gelificação ionotrópica. Além disso, as microesferas foram previamente cobertas com alginato, na tentativa de otimizar a sua função de encapsulamento (LI *et al.* 2008).

Estudos relatam, ainda, o encapsulamento do toxoide tetânico em micropartículas de quitosana, através da técnica de ligação cruzada em emulsão, avaliando a quantidade de proteína adsorvida ao polímero pela técnica de limite de floculação. Os resultados obtidos variaram de 70 a 84%, revelando uma ótima eficiência, porém utilizando técnicas de encapsulamento e avaliação de eficiência bem diferentes das utilizadas neste trabalho (MANIVANNAN *et al.*, 2008).

Ainda, outros trabalhos descrevem a adsorção de fármacos, como o glicirizinato de amônio, poderoso anti-inflamatório, antitumoral e antihepatóxico (WU *et al.*, 2005) e o antibiótico ampicilina (ANAL *et al.*, 2006), utilizando diferentes técnicas de preparo das microesferas, como gelificação ionotrópica e *spray drying*. Esses estudos relatam eficiências de encapsulamento de 68 a 82% para o glicirizinato de amônio e de 65,2 a 89,3% para a ampicilina.

Os resultados de eficiência de encapsulamento obtidos neste trabalho, de 32,30% para o toxoide tipo D e 41,03% para o tipo C e de 32,55 a 40,37%

para a BSA, dependendo da concentração, são resultados obtidos a partir da adaptação da metodologia proposta por Lourenço (2006). É importante ressaltar que a eficiência de encapsulamento pode depender de diversos fatores, como o método utilizado na produção das micropartículas, o tipo de polímero utilizado (no caso da quitosana, parâmetros como massa molecular, grau de desacetilação) e características da substância encapsulada, como tamanho, hidrofobicidade e concentração. Dessa forma, os resultados de outros trabalhos presentes na literature servem como ilustração, não como comparação.

5 CONSIDERAÇÃO FINAL

Após os resultados obtidos, pode-se concluir que o método de coacervação simples, para obtenção de micropartículas de quitosana, a serem utilizadas como matrizes de encapsulamento e liberação controlada de antígenos, é simples e de fácil de execução.

A metodologia de quantificação de proteínas totais pode ser utilizada para avaliar a eficiência de encapsulamento, através da leitura das proteínas restantes no sobrenadante após a precipitação da quitosana no processo de encapsulamento. Porém, o tensoativo a ser utilizado deve ser o Poloxamer, que mostrou não interferir nas leituras de absorvância a 595 nm, ao contrário do Polisorbato 80 (polisorbato 80), que mostrou possuir forte interferência sobre a quantificação proteica pelo método de Bradford.

Pôde-se também determinar a quantidade de agente precipitante, sulfato de sódio a 20% (m/v), para precipitar a quitosana (0,125g em 50mL) na presença de um tensoativo para evitar a aglomeração das micropartículas. Concluiu-se que a quantidade ideal é de 1,5mL de solução de sulfato de sódio a 20% (m/v) para 50 mL de solução base de quitosana.

A metodologia adotada mostrou eficiência no encapsulamento de soroalbumina bovina e dos toxoides botulínicos tipos C e D, utilizados para formulação de vacinas contra o botulismo em animais, portanto é uma técnica promissora para liberação controlada de antígenos botulínicos em vacinas veterinárias. Os valores de encapsulamento de BSA obtidos variaram de 32,55 a 40,37%. Os valores de encapsulamento dos toxóides botulínicos tipo C e tipo D foram de 41,03% e 32,30%, respectivamente.

CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE UMA VACINA DE DOSE ÚNICA CONTRA O BOTULISMO ANIMAL, FORMULADA UTILIZANDO O POLÍMERO DE QUITOSANA COMO ADJUVANTE

RESUMO

Foram formuladas vacinas de dose única contra o botulismo em animais, utilizando microesferas de quitosana como matriz de liberação controlada e vacinas controle, adjuvantadas com hidróxido de alumínio, todas contendo os toxóides botulínicos tipos C e D em suas composições. As vacinas controle e de dose única foram comparadas quanto a sua eficiência e inocuidade em cobaias. Primeiramente, foram formuladas três vacinas controle e cobaias foram vacinados e revacinados 21 dias após a primovacinação. A sangria foi feita 42 dias após a primeira administração de vacinas e os anticorpos titulados através de soroneutralização em camundongos. Posteriormente, foram realizados dois testes com as vacinas de dose única, formulando-se três vacinas em cada teste variando-se as concentrações de toxóides botulínicos tipos C e D em suas formulações. As vacinas controle foram aprovadas de acordo com os requisitos de eficiência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), apresentando títulos de antitoxinas tipo C variando de 10 a >20UI/mL e títulos de antitoxinas D variando de 2 a 5UI/mL, sendo que os requisitos oficiais são de 5 e 2 UI/mL, para os toxóides tipos C e D, respectivamente. Duas das três vacinas de dose única foram aprovadas para ambas as antitoxinas, com títulos de 10UI/mL para antitoxinas tipo C e 2UI/mL para antitoxinas tipo D. A terceira vacina aprovou somente títulos de antitoxinas tipo C (10UI/mL), apresentando valores <1UI/mL para antitoxinas tipo D. Todas as vacinas, controle e de dose única, foram aprovadas nos testes de inocuidade, não apresentando reações locais significativas decorrentes da vacinação nem toxicidade residual. Os resultados mostram que a utilização do sistema de liberação controlada com microesferas de quitosana em vacinas contra o botulismo é eficiente para gerar anticorpos neutralizantes contra os toxóides botulínicos tipos C e D, além de representar um sistema seguro com relação à inocuidade.

Palavras-chave: Botulismo em animais. Vacinação. Eficiência. Inocuidade.

CHAPTER 4 - POTENCY EVALUATION OF A SINGLE SHOT VACCINE AGAINST ANIMAL BOTULISM, FORMULATED USING A CHITOSAN POLYMER AS ADJUVANT

ABSTRACT

Single shot vaccines against botulism in animals were formulated, using chitosan microspheres as controlled release matrix as well as control vaccines, adjuvanted with aluminium hydroxide, all containing toxoids types C and D in their compositions. Control vaccines and single shot vaccines were compared in relation to their efficiency and safety in guinea pigs. First, three control vaccines were formulated, guinea pigs were vaccinated and revaccinated 21 days after the primovaccination. Blood samples were collected 42 days after the first vaccination and antibody titers determined through serumneutralization test in mice. Afterwards, two tests with single shot vaccines were carried out and three vaccines formulated per test, varying the types C and D toxoids concentrations in their compositions. Control vaccines were approved according to the potency requirements of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), presenting type C antitoxin titers ranging from 10 to >20UI/mL and type D antitoxins titers ranging from 2 to 5UI/mL, considering that the official requirements are 5UI/mL and 2UI/mL for type C and D toxoids respectively. Two of three single shot vaccines were approved for both types C and D antitoxins, with 10UI/mL for type C antibody titers and 2UI/mL for type D antibody titers. The third vaccine was approved only for type C antibody titers (10UI/mL), presenting <1UI/mL for type D antibody titers. All the vaccines, control and single shot, were approved in safety tests, because they did not show significant local reactions caused by vaccination and residual toxicity. Results show that the use of chitosan microparticles as a controlled release system to formulate vaccines against botulism in animals is capable to generate neutralizing antibodies against botulinic toxoids types C and D in guinea pigs, besides showing positive results in relation to safety tests.

Keywords: Botulism in animals. Vaccination. Potency. Safety.

1 INTRODUÇÃO

Para prevenir a ocorrência do botulismo no rebanho, boas medidas de manejo sanitário são necessárias, mantendo sempre os animais em bons níveis de higiene e fornecendo-lhes alimentos e água de boa qualidade. Porém, a principal medida profilática para o botulismo é a vacinação, devido ao caráter ubiquitário do agente etiológico da doença.

Uma boa vacina deve fornecer um alto nível de proteção ao animal vacinado, através de uma eficiente estimulação da resposta humoral ou celular (ou ambas), que devem ser longas e duradouras. Além disso, devem gerar no animal vacinado o mínimo de reações adversas, a fim de se evitar possíveis perdas de produtividade e consequente prejuízo ao produtor. Mais, o esquema de vacinação deve possuir um número mínimo de aplicações para que se atinja uma boa resposta imunológica, pois o manejo necessário à administração das vacinas estressa o rebanho, física e psicologicamente, podendo, da mesma forma, trazer prejuízos em termos de produtividade.

Na atualidade, as vacinas disponíveis no mercado contra o botulismo animal possuem um esquema de vacinação com duas doses para animais não vacinados, normalmente com um intervalo de quatro a seis semanas entre as doses, seguidas de um esquema anual de revacinação. O adjuvante mais comumente utilizado é o hidróxido de alumínio.

Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina adjuvantada com uma matriz de liberação controlada de antígenos (como a quitosana), de dose única, para imunização do rebanho contra o botulismo é uma excelente alternativa às vacinas disponíveis atualmente. Paralelamente, pode ser capaz de minimizar os efeitos do *stress* nos animais, decorrente do manejo excessivo durante os períodos de vacinação e as reações adversas que resultam da ação dos adjuvantes (hidróxido de alumínio ou óleo mineral) no organismo do animal, resultando em uma maior produtividade e qualidade de carcaça.

1.1 Objetivo geral

Formular vacinas de dose única (*single-shot*) contra o botulismo em animais, utilizando quitosana como matriz de liberação controlada e comparar sua eficiência e inocuidade com vacinas formuladas de maneira convencional, utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante.

1.2 Objetivos específicos

Formular vacinas controles bivalentes contendo hidróxido de alumínio como adjuvante.

Avaliar a potência e inocuidade das vacinas controle em cobaios.

Formular vacinas bivalentes (contendo ambos toxoides), utilizando micropartículas de quitosana (matriz de liberação controlada) como adjuvante.

Avaliar a potência e inocuidade das vacinas *single shot* em cobaios.

Comparar as vacinas controle com as vacinas de dose única (*single shot*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Formulação de vacinas

A formulação das vacinas descritas a seguir seguiu procedimentos internos da Vallée S/A. A quantidade de antígeno adicionada em cada formulação tomou como base uma quantidade padrão utilizada pela Vallée S.A., quantidade essa que foi omitida deste trabalho por questões de sigilo. Essa quantidade padrão foi denominada X. A quantidade de antígeno escolhida para as formulações vacinais levou em consideração os resultados dos testes de eficiência de encapsulamento de proteína, realizados no Capítulo 3.

2.2 Formulação das vacinas controles

2.2.1 Preparo do gel de hidróxido de alumínio

O gel de hidróxido de alumínio (VALLÉE) foi obtido da produção biológica da Vallée S.A. Em seguida foi autoclavado a 121 °C durante 1 hora.

2.2.2 Preparo do diluente da vacina

O diluente utilizado na vacina foi uma solução salina 0,85%, preparada com NaCl (VETEC) e água purificada, sendo posteriormente esterilizado por filtração em membrana (MILLIPORE) 0,22 micra.

2.2.3 Antígenos

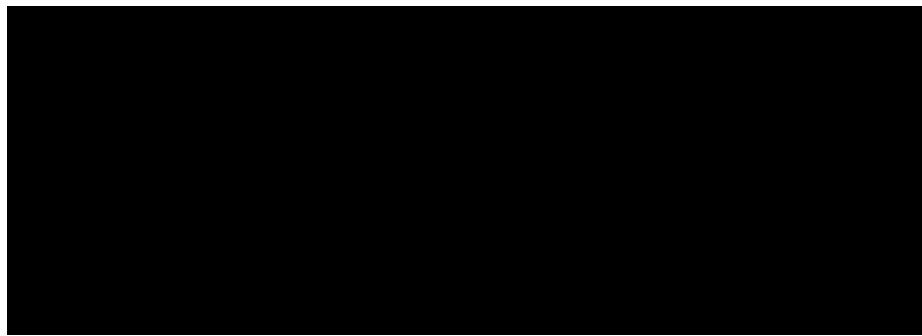
Os antígenos utilizados foram soluções de antígenos inativados, toxoides botulínicos tipos C e D, obtidos conforme descrito no Capítulo 2.

2.2.4 Preparo das vacinas

Foram formuladas três vacinas, contendo diferentes quantidades de antígeno (toxoides botulínicos tipos C e D) em unidades X. Todas foram adjuvadas com 25% de hidróxido de alumínio estéril. O volume final de cada vacina foi de 200 mL. O pH final da vacina foi ajustado para 6,3, com auxílio de uma solução de hidróxido de sódio 2N. O diluente utilizado foi uma solução salina 0,85%. Na TAB. 1 são mostradas as informações de cada vacina. Todas as etapas de formulação foram realizadas assepticamente, em cabine de segurança biológica, de forma a garantir a esterilidade das vacinas.

TABELA 1

Vacinas controle formuladas com diferentes quantidades de toxoides botulínicos tipo C e tipo D, utilizando como adjuvante o hidróxido de alumínio, elaboradas para avaliação da eficácia e inocuidade e comparação com as vacinas *single shot*



V.= vacina. Vac.= concentração do antígeno na vacina. Ag.= Volume de antígeno na vacina. Dil.= volume de diluente (salina 0,85%) na vacina.

2.2.5 Vacinas de liberação controlada

2.2.5.1 Preparo da solução base de quitosana

A solução base de quitosana foi preparada, deixando-se livre o volume para a adição dos antígenos (toxoides tipo C e tipo D) e diluente, cujas quantidades foram pré-calculadas, e esterilizadas por autoclavação a 121 °C.

2.2.5.2 Preparo do gel de quitosana

Para preparar o gel de quitosana, dissolveu-se 0,5% (m/v) de polímero de quitosana em pH ácido (5,0), com auxílio da solução de ácido acético 0,5% (v/v) e elevou-se este pH até 7, utilizando uma solução de NaOH 0,17 M, sob agitação de 600 rpm em agitador magnético (IKA) . Em seguida, o gel de quitosana preparado foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, o gel estéril foi submetido a uma homogeneização utilizando o equipamento LR4T (SILVERSON), a 6000 rpm durante 5 minutos, para completa formação do gel, sob condições assépticas.

2.2.5.3 Preparo da solução de sulfato de sódio 20%

A solução de sulfato de sódio foi preparada e filtrada em membrana de 0,22 micra (MILLIPORE). Essa solução foi preparada no momento do uso.

2.2.5.4 Preparo da vacina – Primeiro teste

2.2.5.4.1 Antígenos

Para formular a vacina single shot utilizada no primeiro teste, foi utilizado toxoide botulínico tipo C com título igual a 105,2 DL₅₀/mL e toxoide botulínico tipo D com título igual a 105,2 DL₅₀/mL concentrado 4,5 vezes em Amicon (MILLIPORE) utilizando membrana de 10 kDa.

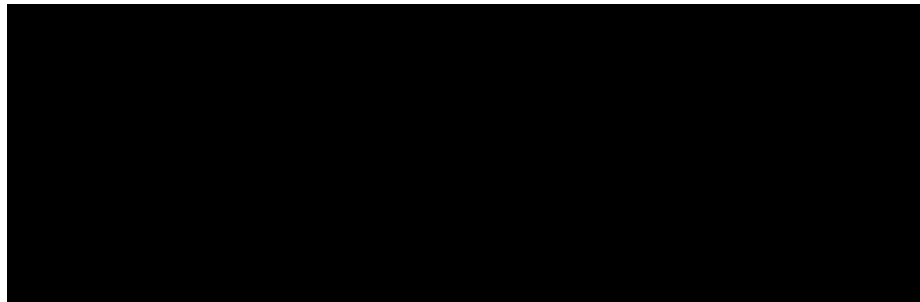
2.2.5.4.2 Formulação

No primeiro teste de liberação controlada, foram formuladas três vacinas, contendo em suas composições diferentes quantidades de antígeno, em DL₅₀/mL. Para cada antígeno, foi utilizada uma solução base de quitosana de 50 mL. Portanto, para esse primeiro teste, foram utilizados seis soluções base. Cada antígeno foi adicionado à solução base, lentamente, sob agitação e mantido sob essas condições durante uma hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, fez-se a precipitação das seis soluções base contendo

antígenos, através da adição de 1,5 mL de sulfato de sódio 20% (m/v) e manteve-se sob agitação branda por mais uma hora. Para preparar cada uma das três vacinas, tomaram-se duas soluções base, uma contendo toxóide botulínico tipo C e a outra tipo D, e fez-se a mistura das duas, sempre em condições assépticas de trabalho. Depois da união das duas frações, por fim ainda adicionou-se 25% de gel de quitosana, mantendo-se sob agitação por mais 30 minutos. Ao final, ajustou-se o pH da vacina para 6,3, com o auxílio de solução de hidróxido de sódio 2N. Na TAB. 2 são apresentadas as composições das três vacinas.

TABELA 2

Composição das vacinas experimentais de dose única com quitosana, elaboradas na primeira etapa, a serem avaliadas em comparação com as vacinas controle



V. = vacina; Ag. = antígeno; Vac. = quantidade de antígeno utilizada na formulação; FC = fator de concentração do antígeno; D = diluente salina 0,85%; SB = solução base quitosana; SN = sulfato de sódio 20%; GQ = gel de quitosana; T. = Volume total.

2.2.5.5 Preparo da vacina – Segundo teste

2.2.5.5.1 Antígenos

Para formular a vacina *single shot* utilizada no segundo teste, foi utilizado toxoide botulínico tipo C com título igual a 5,2 log DL50/mL e toxoide botulínico tipo D com título igual a 6,2 log DL50/mL.

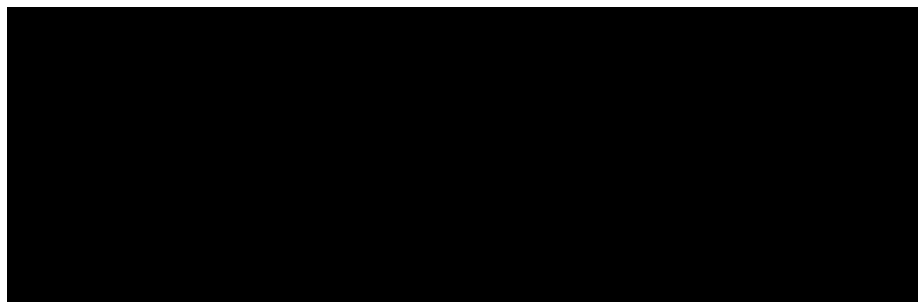
2.2.5.5.2 Formulação

No segundo teste de liberação controlada, foram formuladas três

vacinas, contendo em suas composições diferentes quantidades de antígeno, em DL50/mL. Para cada antígeno, foi utilizada uma solução base de quitosana de 50 mL. Portanto, também para o segundo teste, foram utilizados seis soluções base. Cada antígeno foi adicionado à solução base, lentamente, sob agitação e mantido sob essas condições durante uma hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, fez-se a precipitação das seis soluções base contendo antígenos, através da adição de 1,5 mL de sulfato de sódio 20% (m/v) e manteve-se sob agitação branda por mais uma hora. Para preparar cada uma das três vacinas, tomou-se duas soluções base, uma contendo toxoide botulínico tipo C e a outra tipo D, e fez-se a mistura das duas, sempre em condições assépticas de trabalho. Depois da união das duas frações, por fim ainda adicionou-se 25% de gel de quitosana, mantendo-se sob agitação por mais 30 minutos. Ao final, acertou-se o pH da vacina para 6,3, com o auxílio de solução de hidróxido de sódio 2N. Na TAB. 3 são mostradas as composições das três vacinas.

TABELA 3

Composição das vacinas experimentais de dose única com quitosana, elaboradas na segunda etapa, a serem avaliadas em comparação com as vacinas controle



V. = vacina; Ag. = antígeno; Vac. = quantidade de antígeno utilizada na formulação; FC = fator de concentração do antígeno; D = diluente salina 0,85%; SB = solução base quitosana; SN = sulfato de sódio 20%; GQ = gel de quitosana; T. = Volume total.

2.2.6 Testes de esterilidade

Após a formulação das vacinas controle e teste, todas foram submetidas a teste de esterilidade, de acordo com procedimentos internos da Vallée S.A., antes da inoculação em animais durante os testes clínicos.

Amostras das vacinas foram coletadas e inoculadas nos seguintes meios de cultura: Thioglicolato – 1mL e TSA – 1 mL, em triplicata. Os meios de cultura foram, então, incubados à $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ e à $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 14 dias, com o monitoramento diário de avaliação de crescimento microbiano.

2.2.7 Interpretação da prova de esterilidade

Foi considerada estéril a amostra de vacina que não gerou crescimento de microrganismos em nenhum dos meios inoculados, em nenhuma das temperaturas de incubação.

2.2.8 Testes clínicos

Os testes clínicos realizados seguiram a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para testes de potência de vacinas contra o botulismo em animais (BRASIL, 2002). O método somente sofreu adaptações para os testes da vacina de liberação controlada, por não haver dose de reforço no procedimento de vacinação. Os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo CETEA/UFMG, protocolo número 233/2010.

2.2.8.1 Animais

Para os testes de eficiência e inocuidade realizados, os seguintes animais foram utilizados:

Cobaios: *Cavia porcellus*, peso entre 350 e 450 g.

Camundongos: linhagem *Swiss webster*, peso entre 18 e 22 g.

Os cobaios foram adquiridos do biotério de Igarapé, da Universidade Federal de Minas Gerais. Por sua vez, os camundongos provêm de cria própria do biotério experimental da Vallée S.A.

2.2.8.2. Teste das vacinas controle

2.2.8.2.1 Vacinação

Doze cobaios foram vacinados com cada uma das vacinas controle formuladas, totalizando 36 animais vacinados para esse teste. A dose de vacinação foi de 5 mL, via subcutânea. Foi administrada uma dose de reforço, de 5 mL, 21 dias após a primovacinação. A sangria dos animais foi realizada 42 dias após a primeira vacinação, através de punção cardíaca, coletando-se cerca de 8 mL de sangue por animal. Após a sangria, os animais seguiram para eutanásia, em câmara de CO₂.

O sangue obtido foi centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos, a 4°C, para obtenção dos soros contendo antitoxinas, conforme procedimentos internos da Vallée S.A. Cada vacina gerou 12 soros, totalizando 36, que foram unificados em 3 *pools* (1 *pool* para cada vacina). Cada *pool*, posteriormente, seguiu para o teste de soroneutralização em camundongos.

2.2.8.2.2 Soroneutralização em camundongos

Os soros obtidos na etapa de vacinação foram titulados, quanto aos seus níveis de antitoxina botulínica tipo C e tipo D. Primeiramente, realizou-se a diluição do *pool* de cada vacina obtido na etapa de vacinação, conforme tabela abaixo, com solução salina 0,85%, e colocou-se para reagir com toxina botulínica padrão, tipo C ou tipo D, padronizada para conter 10 L+/10/mL, a 37°C por 60 minutos. Foram 5 diluições por antígeno. Na TAB. 4 são apresentadas as diluições realizadas.

TABELA 4

Diluições do *pool* de soros obtidos para cada vacina e reação com a toxina padrão, para o teste das vacinas controle

UI/mL	20	10	5	2	1
Soro (<i>pool</i>)	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00
Salina (mL)	0,95	0,90	0,80	0,50	-
Toxina (10L+/10/mL)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Depois, cada diluição foi inoculada em 2 camundongos, 0,2 mL via endovenosa (cauda), totalizando 10 camundongos por antígeno. Como foi testada a potência da vacina contra os toxoides botulínicos tipos C e D, foram utilizados 20 camundongos por *pool* de soros obtido. Os animais foram monitorados durante 72 horas. O resultado foi interpretado da seguinte maneira: o título em UI/mL da vacina contra o antígeno testado corresponde a última diluição da tabela acima na qual ambos os camundongos morreram.

Para validar a prova, foi realizado o mesmo teste de soroneutralização, porém utilizando antitoxinas padrões tipo C e tipo D ao nível de 5 UI/mL e colocando-se para reagir com as respectivas toxinas padrões, somente nas diluições 5 e 2, conforme tabela acima. Em seguida as duas diluições foram inoculadas em dois camundongos via endovenosa (totalizando 4 animais para esta etapa, por antígeno, portanto 8 animais para os dois antígenos vacinais), 0,5 mL, e animais observados por 72 horas. Para validar a prova, o resultado deve ser 5 UI/mL, para os tipos C e D.

Dessa forma, os testes de soroneutralização das vacinas controles utilizaram um total de 68 animais.

2.2.8.3 Testes das vacinas de liberação controlada

2.2.8.3.1 Vacinação

Doze cobaias foram vacinados com cada uma das vacinas *single shot* formuladas, totalizando 36 animais vacinados para esse teste. A dose de vacinação foi de 5 mL, via subcutânea. A sangria dos animais foi realizada 42 dias após a primeira vacinação, através de punção cardíaca, coletando-se cerca de 8 mL de sangue por animal. Após a sangria, os animais seguiram para eutanásia, em câmara de CO₂.

Os sangues obtidos foram centrifugados a 3000 rpm durante 30 minutos, a 4°C, para obtenção dos soros contendo antitoxinas, conforme procedimentos internos da Vallée S.A. Cada vacina gerou 12 soros, totalizando 36, que foram unificados em 3 *pools* (1 *pool* para cada vacina).

Cada *pool*, posteriormente, seguiu para o teste de soroneutralização em camundongos.

2.2.8.3.2 Soroneutralização em camundongos

Os soros obtidos na etapa de vacinação foram titulados, quanto aos seus níveis de antitoxina botulínica tipo C e tipo D. Primeiramente, realizou-se a diluição do *pool* de cada vacina obtido na etapa de vacinação, conforme tabela abaixo, com solução salina 0,85%, e colocou-se para reagir com toxina botulínica padrão, tipo C ou tipo D, padronizada para conter 10 L+/10/mL, a 37°C por 60 minutos. Foram 5 diluições por antígeno. Na TAB. 5 são mostradas as diluições realizadas.

TABELA 5

Diluições do *pool* de soros obtidos para cada vacina e reação com a toxina padrão, para o teste das vacinas de liberação controlada

UI/mL	20	10	5	2	1
Soro (<i>pool</i>)	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00
Salina (mL)	0,95	0,90	0,80	0,50	-
Toxina (10L+/10/mL)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Depois, cada diluição foi inoculada em 2 camundongos, 0,2 mL via endovenosa (cauda), totalizando 10 camundongos por antígeno. Como foi testada a potência da vacina contra os toxoides botulínicos tipos C e D, foram utilizados 20 camundongos por *pool*, o que totalizou 60 animais. Os animais foram monitorados durante 72 horas. O resultado foi interpretado da seguinte maneira: o título em UI/mL da vacina contra o antígeno testado corresponde a última diluição da Tabela acima na qual ambos os camundongos morreram.

Para validar a prova, foi realizada o mesmo teste de soroneutralização, porém utilizando antitoxinas padrões tipo C e tipo D ao nível de 5 UI/mL e colocando-se para reagir com as respectivas toxinas padrões, somente nas diluições 5 e 2, conforme Tabela acima. Em seguida as diluições foram inoculadas em dois camundongos via endovenosa (totalizando 4 animais por antígeno, portanto 8 animais para os dois antígenos presentes na vacina), 0,5

mL, e animais observados por 72 horas. Para validar a prova, o resultado deve ser 5 UI/mL, para os tipos C e D.

Dessa forma, os testes de soroneutralização, para três vacinas *single shot*, utilizaram um total de 68 camundongos.

2.2.8.4 Testes de inocuidade

As vacinas também foram avaliadas quanto à sua inocuidade, de acordo com a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002). Foram observadas reações locais macroscópicas à administração das vacinas e reações de toxicidade residual. Para a averiguação das reações locais, os cobaios vacinados foram observados por um período 7 dias, quanto a presença de inchaços, fístulas e outras reações. Com relação à toxicidade residual, os cobaios vacinados foram observados quanto a possíveis sinais de doença e morte em decorrência da vacinação. De acordo com a metodologia, se nenhuma alteração e sinais de doença ou morte forem observados, a vacina é considerada inócua. Caso ocorram reações indesejáveis, a vacina deverá ser testada em dois animais da espécie a que se destina, inoculados com o dobro da dose recomendada, para a referida espécie. Não deverá ocorrer nenhuma reação local ou geral atribuída à vacina por um período de 21 dias.

2.2.9 Análise dos dados

Os resultados de potência e inocuidade obtidos foram comparados com os padrões recomendados pela legislação vigente, quanto a capacidade de indução da produção de anticorpos pelos toxoides botulínicos tipo C e tipo D e quanto ao surgimento de reações adversas decorrentes da vacinação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes de esterilidade

Todas as vacinas formuladas neste trabalho foram submetidas ao teste de esterilidade, e todas elas foram aprovadas nesse sentido, pois, após a inoculação das amostras nos meios de cultura específicos e tempo de observação, nenhum indício de crescimento bacteriano foi observado.

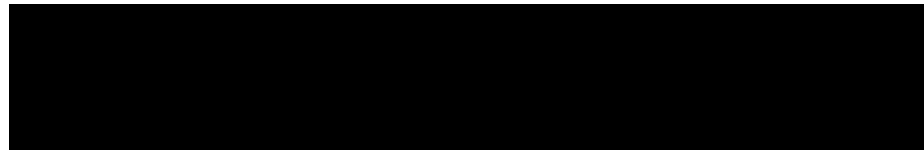
3.2 Testes de potência

3.2.1 Vacinas controle

Na TAB. 6 são apresentados os resultados obtidos com as vacinas controle.

TABELA 6

Resultado do teste de potência das vacinas controle obtido através da técnica de soroneutralização em camundongos, em U.I./mL



Através da tabela, percebe-se que as três vacinas formuladas atenderam aos requisitos de UI/mL pré-estabelecidos pelo MAPA, sendo a vacina 3 menos potente que as vacinas 1 e 2, tanto para o toxoide botulínico tipo C quanto para o tipo D.

Os resultados demonstram que as quantidades colocadas de antígenos botulínicos tipos C e D foram suficientes para incitar proteção em cobaias, quando adjuvados com 25% de hidróxido de alumínio gel. Dessa forma, optou-se por realizar o primeiro teste com as vacinas de liberação controlada contendo as mesmas quantidades dos antígenos vacinais supracitados.

Esses resultados não estão de acordo com os resultados obtidos por Lobato *et al.* (1998), em que as vacinas testadas não se mostraram eficientes na capacidade de incitarem respostas imunológicas mínimas que atendessem aos pré-requisitos exigidos em legislação. Na ocasião, nenhum dos produtos foi capaz de gerar títulos mínimos de antitoxinas tipo C e tipo D em cobaios, e em bovinos, o outro modelo animal utilizado, as vacinas foram capazes de gerar apenas 0,1UI/mL de antitoxinas tipo C e 0,5UI/mL de antitoxinas tipo D, valores bastante aquém dos títulos mínimos preconizados pelo MAPA.

Com relação aos resultados obtidos por Jansen *et al.* (1976), os presentes resultados mostram que as vacinas controle são mais eficientes para o toxoide tipo C e menos eficientes para o toxoide tipo D, quando comparadas com a vacina aquosa utilizada por aqueles autores, que obtiveram valores de 2UI/mL para o tipo C e 10UI/mL para o tipo D, enquanto que neste trabalho foram obtidos valores de 10 a >20UI/mL para o tipo C e de 2 a 5UI/mL para o tipo D.

Fonseca (2001) descreve resultados de títulos de antitoxinas C variando de 2UI/mL a >20UI/mL e de títulos de antitoxinas D variando de 5UI/mL a >20UI/mL. Percebe-se, através da TAB. 6, que as vacinas 1 e 2 estão sempre dentro das faixas descritas por Fonseca (2001), tanto para os títulos de anticorpos gerados contra o toxoide botulínico tipo C quanto contra o toxoide botulínico tipo D. A vacina 3 não está de acordo com as faixas de títulos obtidas por Fonseca (2001), provavelmente por conter em sua composição uma carga menor de antígeno quando comparada com as vacinas 1 e 2, porém a vacina 3 seria aprovada para comercialização caso fosse testada pelo MAPA.

Lobato *et al.* (1999), descreveram respostas imunológicas de 6 e 7UI/mL contra os toxoides botulínicos tipo C e tipo D, respectivamente, em cobaios vacinados com vacinas antibotulínicas bivalentes, que diferem dos resultados obtidos neste trabalho. Porém provavelmente essas diferenças podem ser explicadas por uma diferença metodológica, pois com a técnica de soroneutralização preconizada pelo MAPA (BRASIL, 2002), utilizada nesse trabalho, não há como se obter resultados de 6 e 7UI/mL como obtiveram

Lobato *et al.* (1999). Esses pesquisadores provavelmente realizaram mais diluições na prova de soroneutralização, para obter resultados mais acurados de potência em seus testes. De qualquer maneira, as vacinas mostraram-se eficientes e estariam aprovadas para comercialização no Brasil.

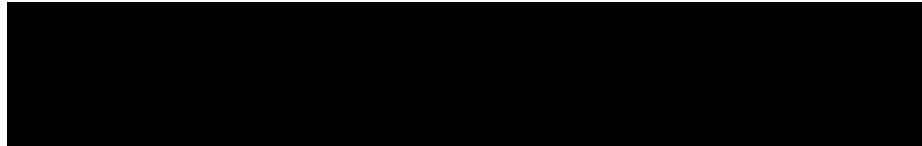
3.2.2 Vacinas de liberação controlada

3.2.2.1 Primeiro teste

Na TAB. 7 os resultados obtidos com as vacinas de liberação controlada *single shot*, primeiro teste, são apresentados.

TABELA 7

Resultado do teste de potência das vacinas *single shot*, primeiro teste, obtido através da técnica de soroneutralização em camundongos, em U.I./mL



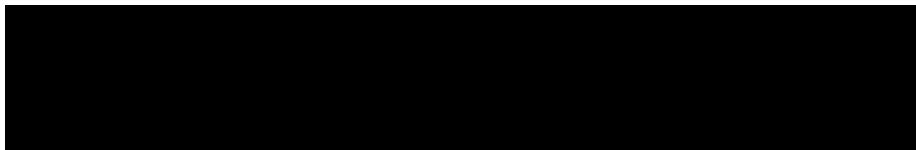
Como mostrado na tabela, as três vacinas geraram resposta imunológica satisfatória contra o toxoide botulínico tipo C, porém insatisfatórios para o toxóide tipo D.

3.2.2.2 Segundo teste

Na TAB. 8 são mostrados os resultados de eficiência para as vacinas referentes ao segundo teste de liberação controlada (*single shot*).

TABELA 8

Resultado do teste de potência das vacinas *single shot*, segundo teste, obtido através da técnica de soroneutralização em camundongos, em U.I./mL



Os dados da tabela mostram que, mais uma vez, todas as vacinas geraram títulos de antitoxinas tipo C satisfatórios, acima do requisito MAPA, o que representa a confirmação de uma boa resposta imunológica gerada contra o toxoide botulínico tipo C, utilizando o sistema de liberação controlada em micropartículas de quitosana.

Com relação aos títulos de antitoxinas contra o toxoide botulínico tipo D, as vacina 1 e a vacina 3 geraram níveis satisfatórios, atendendo ao requisito do MAPA, sendo que a vacina 2 não foi capaz de gerar anticorpos nos cobaios vacinados de modo a atender a legislação vigente. Percebe-se que, portanto, a presença de uma maior quantidade de antígeno em relação ao primeiro teste foi o diferencial, pois desta vez duas das três vacinas atenderam ao requisito e foram aprovadas, utilizando-se um esquema de vacinação *single shot*, ou de dose única, com micropartículas de quitosana como matrizes de liberação controlada.

Os resultados obtidos com as vacinas de dose única são condizentes com os resultados obtidos por Mathews (1976), que obteve sucesso utilizando um esquema de dose única para vacinar cobaios com vacinas bivalentes, alcançando títulos de 8UI/mL de anticorpos contra o toxóide tipo C e 5UI/mL de anticorpos contra o toxoide tipo D, apesar dos diferentes valores de títulos obtidos.

Dutra e Döbereiner (1996) também obtiveram sucesso com uma vacina de dose única, testada a campo através da análise de morte de animais vacinados e não vacinados, por um período de um ano. A vacina se mostrou estatisticamente eficiente em relação ao controle, comprovando sua eficácia na espécie-alvo.

Deve-se ressaltar que as vacinas testadas se mostraram eficientes e atendem aos requisitos do MAPA para títulos de antitoxinas tipo C e tipo D, com exceção da vacina 2, e diferem de resultados obtidos por Lobato *et al.* (1998), que testaram vacinas comerciais que se mostraram ineficientes quanto aos títulos de anticorpos gerados (0,1UI/mL para antitoxinas tipo C e 0,5UI/mL para antitoxinas tipo D).

Os resultados obtidos nos dois testes das vacinas de liberação controlada mostram que o sistema de micropartículas de quitosana utilizado para formulação de vacinas de dose única contra o botulismo em animais foi eficiente no sentido de incitar a produção de anticorpos neutralizantes contra o toxoide botulínico tipo C, e também contra o toxoide botulínico tipo D. Ao se observar a carga antigênica das vacinas de liberação controlada em relação às vacinas controle, percebe-se a necessidade de uma carga antigênica de toxoide botulínico tipo D 10 vezes maior, para que se atenda o requisito mínimo preconizado pelo MAPA (BRASIL, 2002), entretanto a técnica se mostrou viável e capaz de atender aos pré-requisitos do órgão regulamentador.

Vários trabalhos presentes na literatura descrevem o sucesso do uso da quitosana para a formulação de vacinas, contra as mais diversas enfermidades. Jiang *et al.* (2004) utilizaram microesferas de quitosana, preparadas através da técnica de gelificação ionotrópica, para formular vacinas contra a rinite atrófica dos suínos. Para tanto, encapsularam a toxina dermonecrótica produzida por um dos agentes etiológicos da doença, a bactéria *Bordetella bronchiseptica*. Os resultados mostraram a ativação do sistema imunológico em função da vacinação, através da secreção de fator de necrose tumoral alfa, indicando a liberação gradual da toxina no animal.

Outros pesquisadores relatam o efeito adjuvante da quitosana em vacinas formuladas contra a doença de Newcastle, em que, quando comparadas com as vacinas controle, a vacina formulada com quitosana se mostrou mais eficiente no sentido de incitar a resposta celular de células TH1, gerando uma resposta mais forte e mais rápida (RAUW *et al.*, 2010).

Alguns estudos descrevem o potencial da quitosana na geração de resposta imune humoral, quando usada como adjuvante de vacinas contra

algumas doenças. Illum *et al.* (2001) relataram a resposta imune de vacinas formuladas com quitosana contra a influenza, pertussis e difteria, sendo capazes de incitar a produção de altos títulos de IgA e IgG pelo sistema imune. Por sua vez, Ravichandran *et al.* (2007) descreveram o efeito potencializador da quitosana no sentido de reforçar a resposta imunológica de uma vacina trivalente contra o botulismo, formulada com antígenos recombinantes correspondentes às regiões carbóxi-terminais das toxinas nativas. A quitosana mostrou ter um papel fundamental na proteção dos animais quando estes eram desafiados com doses de toxina nativa após a imunização.

Ainda, outros estudos relatam a utilização da quitosana em formulações de vacinas contra o anthrax (KLAS *et al.*, 2008) e contra a influenza animal, comparada outro carboidrato, a gelana (BACON *et al.*, 2000). Ambos descrevem muitas características positivas da quitosana no sentido de estimular o sistema imunológico, através da detecção de anticorpos neutralizantes ou da proteção dos animais contra o desafio.

Sabe-se que a toxina botulínica é uma das substâncias mais letais conhecida em todo o mundo, pois doses de 1 ng.kg^{-1} podem ser fatais ao homem e a alguns animais (FRANZ *et al.*, 1993). A toxina botulínica tipo D parece possuir uma capacidade toxigênica muito grande, em camundongos. Porém, quando a neurotoxina botulínica passa por um processo de inativação com formalina, dependendo das condições em que a reação ocorre, sua antigenicidade pode ser bastante diminuída, o que pode provocar baixa imunogenicidade em procedimentos de imunização, como é comum observar em alguns toxoides botulínicos disponíveis comercialmente (KELLER, 2008).

Além disso, sabe-se que a inativação de toxinas botulínicas envolve reações químicas de natureza bastante complexa, em que as moléculas estão sujeitas à formação de diversas ligações químicas entre diferentes grupamentos, como a formação de pontes de metileno com anéis indol, fenol ou imidazol, com grupamentos amida ou guanidina, inclusive com aminoácidos lisina realizando reações cruzadas entre si (SATHYAMOORTHY; DASGUPTA, 1988; PETRE *et al.*, 1996). Além disso, os toxoides gerados após o processo de inativação também podem gerar um

número elevado de ligações cruzadas entre si (TORII *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2005).

Isso tudo acaba fazendo com que o toxoide obtido através de inativação com formalina acabe perdendo alguns epítomos quando comparado com a toxina nativa, fato comprovado quando se observa que o toxoide possui boa capacidade de ligação com anticorpos antitoxoides, porém perde a capacidade de ligação com antitoxinas específicas (NENCIONI *et al.*, 1991; HEIMSCH *et al.*, 1970).

Uma menor imunogenicidade de um antígeno é normalmente corrigida pela presença de adjuvantes e ou pela administração de doses de reforço, conforme é feito para a grande maioria de vacinas, tanto humanas quanto animais (PARHAM, 2001). Dessa forma, o fato da vacina ser *single shot*, sem a presença de um adjuvante mineral potente, pode ter provocado uma baixa resposta imunológica contra o toxoide botulínico tipo D em cobaios.

Na etapa de formulação, podem ocorrer variações, pois os toxoides botulínicos utilizados não estão purificados, estão em forma de solução contendo diversas proteínas indesejáveis. Durante o processo de encapsulamento, se a suspensão por ventura não estiver completamente homogênea, pode ser que as proteínas encapsuladas sejam, em sua maioria, outras proteínas que não os antígenos, ficando estes livres no sobrenadante e, conseqüentemente, gerando uma menor resposta imunológica. A literatura descreve extensamente trabalhos de encapsulamento utilizando o polímero de quitosana, sempre com moléculas puras de fármacos ou de antígenos vacinais.

Por sua vez, na etapa de vacinação, animais diferentes podem reagir diferentemente à vacinação, o que pode prejudicar um pouco o resultado. Além disso, a técnica de soroneutralização usa apenas dois animais por diluição, o que pode ser um número baixo para se ter um teste realmente conclusivo. Porém, deve-se ressaltar novamente que os procedimentos seguiram a legislação vigente (BRASIL, 2002).

3.3 Testes de inocuidade

Todas as vacinas formuladas, tanto as vacinas controle quanto as vacinas de liberação controlada, apresentaram nenhuma ou pouca reação local em virtude da vacinação, nem tampouco reações de toxicidade residual, sendo consideradas, portanto, aprovadas quanto à sua inocuidade. Não ocorreu nenhuma morte de cobaias em decorrência da vacinação, como é comum ocorrer com vacinas contendo componentes muito agressivos ao organismo animal em sua composição.

Não eram esperadas fortes reações locais nas vacinas formuladas com polímeros de quitosana, pois a quitosana é um polissacarídeo biodegradável, portanto menos agressivo que um adjuvante mineral como o hidróxido de alumínio. Vários estudos relatam a inocuidade do polímero de quitosana para utilização em vacinas. Jayakumar *et al.*, 2010 afirmam que a quitosana é um polímero natural não tóxico, biodegradável e biocompatível, sendo bastante aplicável em engenharia de tecidos e liberação controlada de drogas. Além disso, a quitosana é capaz de potencializar respostas imunes celular e humoral, sendo que, em alguns estudos, se mostrou mais eficiente e segura quando comparada ao adjuvante incompleto de Freund e ao hidróxido de alumínio (ZAHAROFF *et al.* 2007).

Além disso, estudos comprovam a biocompatibilidade e a não citotoxicidade da quitosana, quando colocada em contato com fibroblastos de origem humana e animal (CHEN *et al.* 2006). Essas características tem impulsionado os estudos de formulações farmacêuticas e de bioprodutos com o polímero (ALPAR; GROVES, 2006). Alguns testes clínicos em humanos não foram capazes de detectar reação alérgica ou inflamatória após procedimentos de implantação, injeção, administração tópica e oral de quitosana. Isso pode ser explicado pelo fato de que a quitosana, uma vez presente no organismo, é degradada por lisozimas, o que resulta em liberação de carboidratos aminados, facilmente incorporados às vias metabólicas (CHATELET *et al.*, 2001).

Sabe-se também que, a vacina controle, formulada com hidróxido de alumínio, não apresentou problema nos testes de inocuidade, fato comprovado pela rotina de testes no biotério experimental da Vallée S.A.

Pequenas reações locais nos sítios de inoculação das vacinas são considerados normais, pois são reações naturais do organismo à entrada de um corpo estranho. Além disso, a resposta inflamatória é requerida para que o corpo possa desencadear a resposta imunológica, que irá garantir a proteção posterior do organismo em um eventual contato com o agente infeccioso (PARHAM, 2001).

Os resultados obtidos são de suma importância e são diferentes daqueles descritos por Jansen *et al.* (1976), que relataram problemas de inocuidade na vacina oleosa contra o botulismo, testada quanto à sua eficiência.

Sabe-se que, atualmente, as vacinas podem ocasionar reações adversas indesejáveis, após o procedimento de vacinação, reações que são muitas vezes atribuídas à presença de adjuvantes em suas composições (JUNQUEIRA *et al.*, 2000). Dentre essas reações adversas, destaca-se a formação de abscessos, que comprometem, muitas vezes, a qualidade da carne produzida em um rebanho, o que pode ocasionar sérios prejuízos econômicos ao produtor. Assim, as reações inflamatórias oriundas da utilização de vacinas são causas de preocupação entre os criadores e empresários do ramo de carne e derivados (FRANÇA FILHO *et al.*, 2006).

Dessa forma, os resultados de inocuidade obtidos no presente trabalho são de extrema importância, pois indicam que as vacinas formuladas, tanto as vacinas controle quanto as de liberação controlada, não provocam reações adversas nos animais vacinados, portanto não gerariam perdas econômicas em rebanhos vacinados com essas vacinas, ao mesmo tempo que são vacinas eficientes no que se refere à proteção contra o botulismo em animais.

4 CONSIDERAÇÃO FINAL

Os resultados mostraram que as três vacinas controle formuladas foram eficientes na incitação de resposta imunológica em cobaias, pois os títulos obtidos contra os toxoides botulínicos tipos C e D, de todas as vacinas testadas, atenderam aos requisitos mínimos exigidos pelo órgão regulamentador, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que são de 5UI/mL para antitoxinas botulínicas tipo C e de 2UI/mL para antitoxinas botulínicas tipo D, pois obtiveram valores de 10 a >20UI/mL para antitoxinas tipo C e de 2 a 5UI/mL para as antitoxinas tipo D. Da mesma forma, as vacinas controle se mostraram seguras, pois foram aprovadas nos testes de inocuidade preconizados pelo MAPA.

Por sua vez, as vacinas de liberação controlada, de dose única, formuladas com micropartículas de quitosana, foram capazes de atender aos requisitos mínimos exigidos pelo MAPA, com valores de 10UI/mL para antitoxinas tipo C e 2UI/mL para antitoxinas tipo D. Além disso, se mostraram seguras, pois foram também aprovadas nos testes de inocuidade preconizados, sendo, portanto, consideradas vacinas eficientes e inócuas. Isso aponta a viabilidade técnica de uma vacina *single shot* contra o botulismo animal, formulada utilizando microesferas de quitosana preparadas pela técnica de coacervação simples. Portanto, são vacinas que, se presentes no mercado, estariam aptas à distribuição e comercialização no Brasil.

REFERÊNCIAS

ALEXAKIS, T.; BOADI, D. K.; QUONG, D.; GROBOILLOT, A.; O'NEILL, I.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. 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, Jan. 1995.

ALPAR, H. O.; GROVES, M. J. Vaccines: ancient medicines to modern therapeutics. In: GROVES, M. J. **Pharmaceutical biotechnology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. Cap. 12, p. 307-332.

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

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.

BACON, A.; MAKIN, J.; SIZER, P. J.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; ILLUM, L.; CHATFIELD, S.; ROBERTS, M. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5764-5770, Oct. 2000.

BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. S.; LEMOS R. A. A. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Agns Gráfica, 2006. 207 p.

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

BINZ, T.; KURAZONO, H.; POPOFF, M. R.; EKLUND, M. W.; SAKAGUSHI, G.; KOZAKI, S.; KRIEGLSTEIN, K.; HENSCHEN, A.; GILL, D. M.; NIEMANN, H. Nucleotide sequence of the gene encoding Clostridium botulinum neurotoxin type D. **Nucleic Acid Research**, v. 18, n. 18, p. 5556, Aug. 1990.

BISPO, D. L. N.; PEREIRA, O. C. M. Importância do conhecimento das alterações induzidas pelo estresse, em animais domésticos. **Interciência**, v. 19, n. 2, p. 72-74, 1994.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. N. **Clínica veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

BOWERS, L. E.; WILLIAMS, O. B. Effect of arginine on the growth and lysis of Clostridium botulinum. **Journal of Bacteriology**, v. 85, n. 5; p. 1175-76, May, 1963.

BOWERSOCK, T. L.; MARTIN, S. Controlled release vaccines in veterinary medicine. In: RATHBONE, M. J.; GURNY, R. (Eds.). **Controlled release veterinary drug delivery**. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 2000. Cap. 10, p. 269-310.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGGION, M.; SILVA, R. A. M. S. Quantificações de Lesões em carcaças de bovinos abatidos em frigoríficos no pantanal Sul-Mato-Grossense. **Comunicado Técnico**, Corumbá, n. 45, p. 1-4, dez. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – DAS. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Divisão de Normas Técnicas – DNT. Decreto Lei n. 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos n. 1.255, de 25 de junho de 1962, n. 1.236, de 2 de setembro de 1994, n. 1.812, de 18 de fevereiro de 1996, n. 2.244 de 4 de junho de 1997. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, DF, 1997. 241 p.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 23, de 18 de março de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 mar. 2002. n. 55, Seção 1.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 64, de 18 de dezembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 dez. 2008. Seção 1, p. 21.

BREAZILE, J. E. The physiology of stress and its relationship to mechanism of disease and therapeutics. In: HOWARD, J. L. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**. Philadelphia, v. 4, n. 3, p. 441-480, Nov. 1988.

BROWN, A. T.; GREGORY, A. R.; ELLIS, T. M.; HEARNDEN, M. N. Comparative immunogenicity of two bivalent botulinum vaccines. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 6, p. 388-391, June, 1999.

BYRNE, M. P.; SMITH, L. A. Development of vaccines for prevention of botulism. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 955-966, Set./Oct. 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, Apr./Jun. 2007.

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, Fev. 2001.

CHEN, X. G.; LIU, C. S.; LIU, C. G.; MENG, X. H.; LEE, C. M.; PARK, H. J. Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3. p. 269-274, Fev. 2006.

CHENG, L. W.; ONISKO, B.; JONHSON, E. A. READER, J. R., GRIFFEY, S. M.; LARSON, A. E.; TEPP, W. H. STANKER, L. H.; BRANDON, D. L.; CARTER, J. M. Effects of purification on the bioavailability of botulinum neurotoxin type A. **Toxicology**, v. 249, p.123-129, July, 2008.

CURCI, V. C. L. M. **Resposta humoral de bovinos para os toxóides botulínicos C e D**. 2008. 52 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, 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, July, 2006.

DANTZER, R.; MORMÈDE, P. Stress in farm animals: a need for reevaluation. **Journal of Animal Science**, v. 57, n.1, p. 6-18, 1983.

DELTZBAUGH, M. T.; WEST, M. W. Mapping of protective and cross reactive domains of the type A neurotoxin of Clostridium botulinum. **Vaccine**, v. 14, n. 16, p. 1538-1544, Nov. 1996.

DUMITRIU, S.; CHORNET, E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide based polyion complex. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3-4, p. 223-246, May, 1998.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J. Eficácia da Vaxall® vacina botulínica bivalente na prevenção do botulismo em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 93, p.22-26, 1996.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I. V.; SOUZA, L. A. A.; NONATO, M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 43-48, abr./jun. 2001.

EKLUND, M. W.; POYSKY, F. T.; HABIG, W. H. Bacteriophages and plasmids in Clostridium botulinum and Clostridium tetani and their relationships to production of toxins. In: SIMPSON, L. L. **Botulinum neurotoxin and tetanus toxin**. San Diego: Academic Press, 1989. p. 26-52.

FATTAL, E.; Quaglia F.; GUPTA, P.; BRAZEAU, G. Biodegradable micro-particles 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.

FONSECA, F. S. **Comparação da resposta humoral de bovinos e cobaias vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D.** 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, Jaboticabal, 2001.

FRANÇA FILHO, A. T. ALVES, G. G.; MESQUITA, A. J.; CARLOS EDUARDO CHIQUETTO, C. E.; BUENO, C. P. ; OLIVEIRA, A. S. C. Perdas econômicas por abscessos vacinais e/ou medicamentosos em carcaças de bovinos abatidos no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 1, p. 93-96, jan./mar. 2006.

FRANZ, D. R.; PITT, L. M.; CLAYTON, M. A. Efficacy of prophylactic and therapeutic administration of antitoxin for inhalation botulism. In: DASGUPTA, B. R. (Ed.). **Botulinum and tetanus neurotoxin: neurotransmission and biomedical aspects.** New York: Plenum, 1993. p. 473-476.

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

GILL, M. D. Bacterial toxins: a table of lethal amount. **Microbiological Reviews**, v. 46, n. 1, p. 86-94, Mar. 1982.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 249-257, 1997.

HALPERN, J. L.; SMITH, L. A.; SEAMON, K. B.; GROOVER, K. A.; HABIG, W. H. Sequence homology between tetanus and botulinum toxins detected by an antipeptide antibody. **Infection Immunity**, v. 57, n. 1, p. 18-22, Jan. 1989.
HENDERSON, I.; DAVIS, T.; ELMORE, M.; MINTON, N. The genetic basis of toxin production in Clostridium botulinum and Clostridium tetani. In: ROOD, J. I. (Ed.). **The Clostridia: molecular biology and pathogenesis.** San Diego: Academic, 1997.

HATHEWAY, C. L.; Botulism: the present status of the disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 195, p. 55-75, 1995.

HAUSER, D.; EKLUND, M. W.; KURAZONO, H.; BINZ, T.; NIEMANN, H.; GILL, D. M.; BOQUET, P.; POPOFF, M.R. Nucleotide sequence of Clostridium botulinum C1 neurotoxin. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 16, p. 4924, Aug. 1990.

HEIMSCH, R. C.; CHAMPION, L. A.; SUGIYAMA, H. Botulinum toxin and toxoid as antigens. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 135, n. 1, p.151-154, Oct. 1970.

IL'INA, A. V.; GUBAIDULLINA, A. A.; MELENT'EV, A. I.; VARLAMOV, V. P. Preparation of Chitosan Microparticles and Study of Their Interaction with Interferon. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 226-230, 2008.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, n. 1-3, p. 81-96, Sep. 2001.

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, Spring. 2005.

IWASAKI, M.; SAKAGUCHI, G. Acid precipitation of Clostridium botulinum type C and D toxins from whole culture by addition of ribonucleic acid as a precipitation aid. **Infection and Immunity**, v. 19, n. 2, p. 749-751, Feb. 1978.

JAGANATHAN, K. S.; RAO, Y. U.; SINGH, P. PRABAKARAN, D.; GUPTA, S.; JAIN, A.; VYAS, S. P. 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, Apr. 2005.

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

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; NAIR, S. V.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; SELAVAMURUGAN, N. Novel carboximethy derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, n. 55, p. 675-709, 2010.

JIANG, H. L.; PARK, I. K.; SHIN, N. R.; YOO, H. S.; AKAIKE, T.; CHO, C. S. Controlled release of Bordetella bronchiseptica dermonecrototoxin (BBD) vaccine from BBD-loaded chitosan microspheres in vitro. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 3, p. 346-350, Mar. 2004.

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

JUNQUEIRA, J. O. B.; MORO, E.; BARBARINI, O. J.; MATSUMOTO, T.; FADIL, P.; UMEHARA, O. Reações vacinais em bovinos: reações nos locais de aplicação de vacinas contra clostridioses. **A Hora Veterinária**, v. 19, n. 113, p. 23-28, jan./fev. 2000.

KANG, M. L.; KANG, S. G.; JIANG, H. L.; SHIN, S. W.; LEE, D.Y. AHN, J.; RAYAMAHJI, N, PARK, I. K; SHIN, S. J; CHO, C. S; YOO, H. S. 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, Jun. 2006.

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

KELLER, J. E. Characterization of new formalin-detoxified botulinum neurotoxin toxoids. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1374-1379, Sep. 2008.

KLAS, S. D.; PETRIE, C. R.; WARWOOD, S. J.; WILLIAMS, M. S.; OLDS, C. L.; STENZ, J. P.; CHEFF, A. M.; HINCHCLIFFE, M.; RICHARDSON, C.; WIMER, S. A single immunization with a dry powder anthrax vaccine protects rabbits against lethal aerosol challenge. **Vaccine**, v. 26, n. 43, p. 5494-5502, Oct. 2008.

KOBAYASHI, R.; KOHDA, T.; KATAOKA, K.; IHARA, H.; KOZAKI, S.; PASCUAL, D. W.; STAATS, H. F.; KIYONO, H.; MCCGHEE, J. R.; FUJIHASHI, K. A novel neurotoxoid vaccine prevents mucosal botulism. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 4, p. 2190, Feb. 2005.

KOSAKA, T.; KANEKO, Y.; NAKADA, Y. 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, Oct. 1996.

KOUSSOULAKOS, S. Botulinum neurotoxin: the ugly duckling. **European Neurology**, v. 61, n. 6, p. 331-342, 2009.

LI, X.; KONG, X.; SHI, S.; ZHENG, X.; GUO, G.; WEI, Y.; QIAN, Z. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. **BMC biotechnology**, v. 8, p. 89, 2008.

LI, G.; LIU, Z.; LIAO, B.; ZHONG, N. Induction of Th1-type immune response by chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen der p 2 for oral vaccination in mice. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 6, n. 1, p. 45-50, Feb. 2009.

LOBATO, F. C. F. SILVA, N.; ALMEIDA, A. C.; ABREU, V. L. V.; MAIA, J. D. Potência de toxóides botulínicos bivalentes tipos C e D produzidos e comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 35-38, 1998.

LOBATO, F. C. F.; ALMEIDA, A. C.; ABREU, V. L. V.; SILVA, N.; NASCIMENTO, R. A.; MARTINS, N. E. Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóides botulínicos monovalentes e bivalentes tipos C e D, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 25-27, 1999.

LOURENÇO, V. A. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetiletanol (DMAE) na pele**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 2006.

MANIVANNAN, R.; DHANARAJ, S. A.; RAO, Y. U. B.; BALASUBRAMANIAM, A.; GOWRISHANKAR, N. M.; JAWAHAR, N.; JUBIE, S. In vivo evaluation of single dose tetanus toxoid vaccine formulation with chitosan microspheres. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n.1, p. 11-15, 2008.

MATHEWS, A. G. Antotoxin responses to Clostridium botulinum vaccines types C and D in guinea pigs. **Developments in Biological Standardization**, v. 32, p. 193-201, 1976.

MITCHELL, W. J. Biology and physiology. In: BAHL, H.; DÜRRE, P. **Clostridia - Biology and Magical Applications**. Germany: Wiley-VCH Verlag, 2001.

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

MOBERG, G. P. J. How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. **Dairy Science**, v. 74, n. 1, p. 304-311, Jan. 1991.

MORIISHI, K.; SYUTO, B.; YOKOSAWA, N.; OGUMA, K.; SAITO, M. Purification and characterization of ADP-Ribosyltransferases (exoenzyme C3) of Clostridium botulinum type C and D strains. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 19, p. 6025-6029, Oct. 1991.

MOURA, E. S. **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.

MURPHY, D.; CORNER, L. A. L.; GORMLEY, E. Adverse reactions to Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination against tuberculosis in humans, veterinary animals and wildlife species. **Tuberculosis**, v. 88, n. 4, p. 344-357, Jul. 2008.

NISHIMURA, K.; NISHIMURA, S.; NISHI, N. SAIKI, I; TOKURA, S.; AZUMA, I. Immunological activity of chitin and its derivatives. **Vaccine**, v. 2, n. 1, p.93-99, Mar. 1984.

NÓBREGA, F. L. C. **Resposta humoral de ovinos vacinados com toxóides botulínicos C e D**. 2007. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba, 2007.

OCHANDA, J. O.; SYUTO, B.; OGUMA, K.; IIDA, H.; KUBO, S. Comparison of antigenicity of toxins produced by Clostridium botulinum type C and D strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1319-1322, Jun. 1984.

OGUMA, K.; SYUTO, B.; IIDA, H.; KUBO, S. Antigenic similarity of toxins produced by Clostridium botulinum type C and D strains. **Infection and Immunity**, v. 30, n.3, p. 656-660, Dec. 1980.

OGUMA, K.; SYUTO, B.; AGUI, T.; IIDA, H.; KUBO, S. Homogeneity and heterogeneity of toxins produced by Clostridium botulinum type C and D strains. **Infection and Immunity**, v. 34, n. 2, p. 382-388, Nov. 1981.

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, Unicamp, Campinas, 2004.

NENCIONI, L.; VOLPINI, G.; PEPPOLONI, S.; BUGNOLI, M.; DE, M. T.; MARSILI, I.; RAPPUOLI, R. Properties of pertussis toxin mutant PT-9K/129G after formaldehyde treatment. **Infection Immunology**, v. 59, n. 2, p. 625, Fev. 1991.

PADGETT, D. A.; GLASER, R. How stress influences the immune response. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 8, p. 444-448, Aug. 2003.

PARHAM, P. **O Sistema imune**. Porto Alegre: Artmed, 2001. 404 p.

PATTERSON-CURTIS, S. I.; JOHNSON, E. A. Regulation of neurotoxin and protease formation in Clostridium botulinum Okra B and Hall A by arginine. **Applied Environment Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1544-48, June, 1989.

PENNA, P.; KESSLICK, M. Botulism neurotoxin therapy: overview of seriotypes a and b. **Farmacy and therapeutics P&T**, Sep. 2002. Supplement.

PETRE, J.; PIZZA, M.; NENCIONI, L.; PODDA, A.; DE MAGISTRIS, M. T.; RAPPUOLI, R. The reaction of bacterial toxins with formaldehyde and its se for antigen stabilization. **Developments in Biological Standardization**, v. 87, n. 87, p. 125, 1996.

PRABAHARAN, M. Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 23, n. 1, p. 5-36, July, 2008.

QUEIROZ, R. A. **Desenvolvimento de teste de imunoadsorção 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.

CARTER, M. E; MARKEY, B; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p.

QUINN, C. P.; MINTON, N. P. Clostridial neurotoxins. In: _____. _____. **Clostridia**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. Cap. 7, p. 211-250.

RAUW, F.; GARDIN, Y.; PALYA, V.; ANBARI, S.; GONZE, M.; LEMAIRE, S.; VAN DER BERG, T.; LAMBRECHT, B. The positive adjuvant effect of chitosan on antigen-specific cell-mediated immunity after chickens vaccination with live Newcastle disease vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 134, n. 15, p. 249-258, Apr. 2010.

RAVICHANDRAN, E.; AL-SALEEM, F. H.; ANCHARSKI, D. M.; ELIAS, M. D.; SINGH, A. K.; SHAMIM, M.; GONG, Y.; SIMPSON, L. L. Trivalent vaccine against botulinum toxin types A, B and E that can be administered by the mucosal route. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, p. 3043-3054, Jun, 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, Aug. 2008.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, May 1938.

SALAK-JOHNSON, J. L.; MCGLONE, J. J. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 81-88, Nov. 2007.

SATHYAMOORTHY, V.; DASGUPTA, B. R. Reductive methylation of lysine residues of botulinum neurotoxin types A and B. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 65, Sep. 1988.

SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. **Microbiology Reviews**, v. 56, n. 1, p. 80-99, Mar. 1992.

SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potencial applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467-1480, June. 2004.

SIEGRIST, C. A. Mechanisms underlying adverse reactions to vaccines. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 46-50, July, 2007. Supplement 1.

SINHA, B. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, Apr. 2004.

SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. Structure and action of botulinum and tetanus toxins. In: ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. (Eds.). **The Clostridia: molecular biology and pathogenesis**. New York: Academic Press, 1997. p. 295-322.

SMITH, L. D. S.; SUGIYAMA, H. **Botulism: the organism, its toxins, the disease**. 2 ed. Illinois: Charles Thomas Springfield, 1998.

SONGER, J. G. Clostridial diseases of animals. In: ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. (Eds.). **The Clostridia: molecular biology and pathogenesis**. New York: Academic Press, 1997. p. 153-182.

TERAJIMA, J.; SYUTO, B.; OCHANDA, J. O.; KUBO, S. Purification and characterization of neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* type C 6813. **Infection and Immunity**, v. 48, n. 2, p. 312-317, May. 1985.

TORATANI, S.; YOKOSAWA, N.; YOKOSAWA, H.; ISHII, S.; OGUMA, K. Immuno-crossreactivity between botulinum neurotoxin type C1 or D and exoenzyme C3. **FEBS Letters**, v. 252, n. 1-2, p. 83-87, July, 1989.

TORII, Y.; TOKUMARU, Y.; KAWAGUSHI, S.; IZUMI, N.; MARUYAMA, S.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S.; TAKAHASHI, M. Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F) toxoid. **Vaccine**, v. 20, n. 19-20, p. 2556, June, 2002.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros**, São Carlos, v. 15, n. 4, p. 306-312, Oct./Nov. 2005.

VAN DER LUBBEN, I. M.; VERHOEF, J. C.; BORCHARD, G. Chitosan for mucosal vaccination. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 139-144, Nov. 2001.

VAN DER LUBBEN, I. M.; VERHOEF, J. C.; VAN AELST, A. C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. **Biomaterials**, v. 22, n. 7, p. 687-694, Apr. 2001.

VU, THI LAN AN. **Incidence of clostridium botulinum spores in honey and infant food samples collected from Vietnam and Germany**. 2006. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrícolas) - Faculty of Agricultural Sciences, Georg-August-University Göttingen, Göttingen, 2006.

WICTOME, M.; SHONE, C. C. Botulinum neurotoxins: mode of action and detection. **Journal of Applied Microbiology Symposium**, v. 84, n. 27, p. 87-97, 1998. Supplement.

WANG, L. Y.; GU, Y. H.; SU, Z. G. Preparation and improvement of release behaviour of chitosan microspheres containing insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1-2, p. 187-195, Mar. 2006.

WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J.; FU, S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International journal of pharmaceutics**, v. 295, n. 1-2, p. 235-245, May, 2005.

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, Jun. 2006.

XUE, Z. X.; YANG, G. P.; ZHANG, Z. P. Application of chitosan microspheres as carries of LH-RH analogue TX46. **Reactive Functional Polymers**, v. 66, n. 9, p. 893-901, Sep. 2006.

ZAHAROFF, D. A.; ROGERS, C. J.; HANCE, K. W.; SCHLOM, J.; GREINER, J. W. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. **Vaccine**, v. 25, n. 11, p. 2085-2094, Dec. 2007.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, nov./dez. 1998.

ANEXO A – Certificado do CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 233/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Desenvolvimento de vacina de dose única contra o botulismo bovino**", que tem como responsável(is) **Anna Christina de Almeida**, 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 **7/04/2010**.

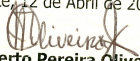
Este certificado expira-se em **7/04/2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 233/2009**, related to the project entitled "**Development of a single shot vaccine against bovine botulism**", under the supervisors of **Anna Christina de Almeida**, 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 7, 2010**.

This certificate expires in **April 7, 2015**.

Belo Horizonte, 12 de Abril 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 - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)