

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

JOCIMARA AMBROSIO DE MORAES NAMUR

**Toxoide diftérico: nova roupagem para
uma vacina tradicional**

Orientadora

Prof. Dra. Maria Helena Bueno da Costa

São Paulo

01/ 10/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOCIMARA AMBROSIO DE MORAES NAMUR

**Toxoide diftérico: nova roupagem para
uma vacina tradicional**

**Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)**

Orientadora: Prof. Dra. Maria Helena Bueno da Costa

**São Paulo
2007**

Jocimara Ambrosio de Moraes Namur

Toxoide diftérico: nova roupagem para uma vacina tradicional.

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a vida que tanto me deu e me capacitou. E por ter colocado no meu caminho tantas pessoas que possibilitaram que eu realizasse essa tese.

E nesse caminhar, agradeço primeiro a meus pais, José e Margarida que me deram tudo para que eu pudesse ser quem eu sou e que sempre me apoiaram a dar passos mais largos na vida.

Agradeço ao Guilherme, por seu companheirismo, apoio, carinho e paciência. Sua presença foi esteio e remanso no caminho.

À Prof. Dra. Maria Helena Bueno da Costa (Lelena), agradeço por sua dedicação (quase incansável), ensinamentos, exemplo de ética e seriedade. A lembrança de nossa convivência, e tudo que aprendi nesses anos, ficarão com carinho e para sempre.

À amiga e colega de laboratório Raffaella Campana (sorella) pela ajuda no dia a dia do trabalho e pela amizade.

Aos colegas Elaine Magalhães e Wagner Quintilio por sua amizade e colaboração nos preparos das microesferas.

Do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, agradeço à Dra. Mickie Takagi por sua generosidade e ajuda com o HPLC, à Dra. Ana Moro por realizar as microscopias e fotos de nossas primeiras microesferas e a Dra. Maria Izabel Esteves, por suas colaborações principalmente no início, me ensinando as técnicas e segredos do ELISA.

Dr. Osvaldo A. Sant'Anna que colaborou no desenho e realização dos experimentos *in vivo*.

À Dra. Hisako Gondo Higashi e Dra. Célia Takata por gentilmente fornecerem o toxoide diftérico utilizado nessa tese.

Agradeço aos professores do Instituto de Química: Dra. Shirley Schreier, Dra. Iolanda Midea Cuccovia, Dr. Mario José Politi, Dr. Pedro Soares de Araújo e Dra. Adelaide Faljoni Alario, os ensinamentos e empréstimos de equipamentos que foram essenciais para a realização dessa tese.

Agradeço a da Dra. Maria Helena Andrade Santana da UNICAMP por sua colaboração racional e “engenheira” nos nossos experimentos.

Agradeço também ao departamento de metalurgia do IPT que gentilmente permitiu a utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Agradeço ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo e ao Instituto Butantan a oportunidade de ter desenvolvido essa tese; ao CNPq o suporte financeiro recebido e à FAPESP pelo financiamento do projeto do qual minha tese também fez parte.

RESUMO

(Namur, JAM) **Toxoide diftérico: nova roupagem para uma vacina tradicional. 2007.167p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.**

O processo de micrencapsulação de proteínas em microesferas (MS) de PLGA [poli (ácido lactico-co-glicólico)] é fácil de fazer e é uma ferramenta útil para melhorar tanto uma formulação quanto para aumentar a atividade imunológica de vacinas de novas gerações. A MS-PLGA têm caráter adjuvante porque é um sistema particulado e, além disto, controla a liberação do antígeno. O escopo desta tese foi o de dar uma nova roupagem para um antígeno vacinal tradicional e muito bem estudado- o toxoide diftérico (Dtxd). Estudaram-se a produção de MS de tamanho desejado; os mecanismos que controlam danos nas proteínas durante o processo de micrencapsulação; a produção de microesferas com características de liberações em tempos distintos e ensaios biológicos.

O tamanho de MS é um determinante fundamental para controlar a velocidade de liberação de um soluto. Para se produzir MS com tamanhos controlados usou-se um desenho fatorial experimental com três fatores distintos e três pontos centrais, para se determinar a influência das variáveis (concentração de poli álcool vinílico; velocidade de agitação e relação fase dispersa/fase contínua) na determinação do tamanho das MS. Foram obtidas MS esféricas e lisas de 4- 15 μm de diâmetro. Estes resultados abrem a possibilidade de se formular PLGA-MS com tamanhos planejados através de um mínimo de experimentos.

O mecanismo de danos conformacionais nas proteínas nas várias fases do processo de produção de PLGA-MS é ainda uma questão em aberto. Usaram-se várias técnicas biofísicas (HPLC, espectroscopias no uv, fluorescência e CD) além de ELISA para se testar a interferência dos sais da série de Hofmeister sobre a solubilidade e estabilidade da proteína durante a emulsificação e do contacto com a interface água/cloreto de metileno (primeira etapa do processo de preparação de MS). Estudaram-se também a influência de oligômeros de PLGA e SDS sobre a estrutura da proteína no meio de liberação (etapa de liberação do soluto). A emulsificação de Dtxd na presença de Mg^{2+} induziu agregação protéica, com exposição de resíduos hidrofóbicos para o meio; variações no ângulo diédrico do S-S

proteico e perda de identidade imunológica. Esta agregação foi quase abolida pelo caotrópico SCN^- (toxicidade = 30 g/ homem adulto de 70 kg). A conformação “nativa” do Dtxd e sua atividade biológica foram protegidas pelo KSCN. Os oligômeros de PLGA e o SDS induziram uma conformação de Dtxd nova. A adição de KSCN na fase aquosa aumentou a eficiência de encapsulação de Dtxd pela PLGA-MS em 20 %. Esta foi a solução mais simples quando comparada com aquelas descritas na literatura. Produziram-se seis formulações diferentes (diferentes massas molares e carboximetilações do PLGA) com pelo menos três cinéticas de liberações distintas. Imunizaram-se camundongos com 5 μg de Dtxd encapsulado em MS-PLGA usando-se dois polímeros de 12 kDa (-COOH livre ou metilado) e um outro de 63 kDa (metilado). O padrão de resposta e a maturidade imunológicas foram medidos por titulações de IgG1 e IgG2a. Mantiveram-se os mesmos padrões de resposta humoral (desejável). Menores quantidades de antígenos foram necessárias para se obter os mesmos benefícios gerados pela vacina tradicional de Dtxd. Aumentaram-se a produção e a seletividade de anticorpos através de duas manipulações simples: a formulação e o tempo da aplicação da dose de reforço. Estes resultados colocam estas formulações na área de vacinas de sucesso uma vez que também foram obtidas memórias imunológicas.

Palavras chave: Polímeros biodegradáveis, Microesferas de PLGA, Liberação controlada de drogas, Nanotecnologia, Encapsulação de vacinas, Adjuvantes particulados.

ABSTRACT

(Namur, JAM) **Diphtheric toxoid: new clothes for a traditional vaccine**. 2007. 167p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The protein microencapsulation within microspheres (MS) of PLGA (Poly-lactide-co-glycolide) is easy to do and, it is a useful tool to enhance formulation and immunologic performances for new generation vaccines. MS-PLGA has adjuvant character because it is a particulate system and can control the antigen release. The question addressed in this thesis was to give this new dress for the traditional and well studied vaccine antigen - the diphtheria toxoid (Dtxd). The steps of MS control size production; mechanism to control protein damages; MS production with different polymers and biological assay were addressed here.

MS size is a primary determinant of solute release velocity. A full factorial experimental design 2^3 with triplicate at the central point was used to determine the influence of variables (polyvinyl alcohol concentration, stirring velocity and the relationship between dispersed /continuous phase) on MS size. Uniformly spherical and smooth microspheres (4 - 15 μm of diameter) were obtained. These results open the possibility of formulating PLGA microspheres with custom sizes performing a minimum of experiments as required for specific applications.

It stills an open question to detail the conformational mechanism of protein damages during the various steps of the PLGA microencapsulation process. Various techniques (HPLC gel filtration, ELISA, Fluorescence, UV and Circular dichroism spectroscopies) were tested on the interference of the Hofmeister ion series over protein solubility and stability during the emulsification and contact with the interface water/ CH_2Cl_2 interface (First step on MS preparation). The interference of SDS and PLGA oligomers over protein structure in the liberation media was also studied (solute liberation step). The Dtxd emulsification in the presence of Mg^{2+} was followed by protein aggregation, with exposition of hydrophobic residues and changes on the dihedral S-S protein angle and loses on immunological identity. This aggregation is 95% avoided by the chaotropic and little toxic salt KSCN (30g/ adult human of 70 kg). All the "native" Dtxd conformation and biological properties were maintained by KSCN. MS with different liberation kinetics profile and different

erosion characteristics were obtained by using six different polymers. The SDS and PLGA oligomers exerted a generation of new Dtxd molecular organization. The KSCN increased Dtxd encapsulation within PLGA-MS in more than 20 %. This was the simplest solution used to solve protein aggregation compared with others solutions used in the literature. The six different formulations produced (differing in molar mass and carboxymethylation) produced, at least, three different Dtxd liberation profiles.

Mice were primed with 5 μ g of Dtxd microencapsulated within MS prepared with 12 kDa (ended carboxymethylated or free PLGA) and with 63 kDa (methylated) PLGA. The response patterns and the immune maturity were measured by IgG1 and IgG2_a titrations. The humoral pattern was maintained, but fewer antigens were needed to obtain the same traditional Dtxd vaccine benefits. The simple change on Dtxd-PLGA formulation and timing of the booster enhanced both, antibody production and selectivity. An immunological memory was also obtained, putting so, these formulations in the field of successful vaccine.

Keywords: Biodegradable Polymers, PLGA microspheres, Drug controlled release, Nanotechnology, Vaccines encapsulation, Particulate adjuvants.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS.

FIGURAS

FIGURA		Página
Figura 1.	Espectro de absorção de uma solução de Timerosal® 24 µM.	48
Figura 2	Espectro de absorção de Dtxd 19 mM em PBS pH 7,2.	49
Figura 3	Espectro de fluorescência de Dtxd .	50
Figura 4	Elipticidade molar em função do comprimento de onda do Dtxd 86 µM	51
Figura 5	Perfil de eluição de Dtxd em sistema de HPLC.	52
Figura 6	Comparação entre os métodos de Lowry (absorbância a 690nm) e absorbância a 280 nm para dosagem de Dtxd.	53
Figura 7	Curva padrão dosagem de Dtxd através da medida de abs a 269 nm.	53
Figura 8	Log de Massa molar contra tempo de retenção.	55
Figura 9	Curvas padrão das espécies moleculares do Dtxd.	56
Figura 10	Micrografia por de inversão de fase de microesferas de PLGA 50:50 (45 - 75 KDa) contendo Dtxd.	57
Figura 11	Curva padrão para dosagem de lactato.	59
Figura 12	Adaptação de método de dosagem de lactato para <i>microdosagens</i> em leitor automático de ELISA.	59
Figura 13	Curva padrão de lactato realizada em sistema de HPLC.	60
Figura 14	Curva padrão de Ponceau S.	61
Figura 15	Espectro de absorção no ultravioleta das diversas amostras obtidas no processo de ultraconcentração de Dtxd.	62
Figura 16	Perfil de PAGE-SDS das amostras obtidas nas diversas etapas de ultraconcentração. Gel de acrilamida a 05 %. (Padrões de massa molar de 220, 170, 116, 76 e 53 kDa).	62
Figura 17	Perfil de PAGE-SDS das amostras obtidas nas diversas etapas de ultraconcentração. Gel de acrilamida a 12 %.	63
Figura 18	Elipticidade molar em função do comprimento de onda das amostras obtidas nas diversas etapas de ultrafiltração.	64
Figura 19	Identidade imunológica do Dtxd em função da fração da ultraconcentração.	64
Figura 20	Efeitos da concentração de PVA e da velocidade de agitação da segunda emulsão e no tamanho das partículas de microesferas de PLGA.	65
Figura 21	Superfície de resposta sobre o tamanho das microesferas de PLGA.	67
Figura 22	Comparação entre os diâmetros das partículas calculados e os diâmetros obtidos experimentalmente.	69
Figura 23	Micrografia eletrônica de varredura de microesferas produzidas nos pontos experimentais 2 e 7.	70
Figura 24	Efeito de MS-PLGA sobre o meio de incubação. Mediram-se o lactato liberado no meio (A) e os pHs dos sobrenadantes (B).	71
Figura 25	Efeito do meio de incubação na integridade de Dtxd em função do tempo.	72
Figura 26	Efeito de MS-PLGA e de SDS 1 % sobre o meio de incubação contendo Dtxd.	73

FIGURA		Página
Figura 27	Efeito do meio de incubação na estrutura de Dtxd em função do tempo.	74
Figura 28	Espectro de CD de Dtxd em função do tempo de incubação.	75
Figura 29	Espectro de CD de Dtxd em função do tempo de incubação e da presença de MS-PLGA.	76
Figura 30	Efeito de SDS no espectro de CD de Dtxd em função do tempo de incubação.	76
Figura 31	Efeito de SDS e de microesferas de PLGA no espectro de CD de Dtxd em função do tempo de incubação.	77
Figura 32	Influência do meio de incubação sobre θ_{222nm} em função do tempo.	78
Figura 33	Influência do meio de incubação sobre θ_{196nm} em função do tempo.	80
Figura 34	Efeito do meio de incubação na identidade imunológica de Dtxd.	81
Figura 35	Morfologia externa de microesferas de PLGA 50:50 (Mw 55 000).	82
Figura 36	Efeito de MS-PLGA sobre o meio de incubação.	83
Figura 37	Liberação de lactato das MS produzidas com PLGA durante 8 semanas de incubação em PBS pH 7,2.	84
Figura 38	Microscopia eletrônica de varredura das MS PLGA.	86
Figura 39	Microscopia eletrônica de varredura de uma preparação de microesferas de PLGA de 12 μ m.	88
Figura 40	Cinética de liberação do lactato e variação do pH em função do tempo.	88
Figura 41	Identidade imunológica de Dtxd monitorada por ELISA.	89
Figura 42	Cinética de interação do Dtxd IBu com microesferas de PLGA vazias.	90
Figura 43	Perfil de eluição do Dtxd IBu de uma coluna de gel filtração em sistema de HPLC.	92
Figura 44	Interação entre Timerosal [®] 9,2 μ M e ácido láctico 0,75 M. As amostras foram analisadas por HPLC.	93
Figura 45	Efeito do ácido láctico no espectro de fluorescência do Dtxd.	94
Figura 46	Efeito dos sais da série de Hofmeister na solubilidade de Dtxd.	96
Figura 47	Efeito dos sais da série de Hofmeister nas concentrações das diferentes espécies moleculares de Dtxd após a emulsificação.	97
Figura 48	Efeito dos sais da série de Hofmeister sobre a identidade imunológica de Dtxd após emulsificação.	98
Figura 49	Efeito do KSCN sobre a estrutura do Dtxd durante emulsificação em CH_2Cl_2 .	99
Figura 50	Efeito do NaCl sobre a estrutura do Dtxd durante emulsificação em CH_2Cl_2 .	100
Figura 51	Efeito do NaH_2PO_4 sobre a estrutura do Dtxd durante emulsificação em CH_2Cl_2 .	101

Figura		Página
Figura 52	Efeito do MgCl ₂ sobre a estrutura do Dtxd durante emulsificação em CH ₂ Cl ₂ .	102
Figura 53	Efeito da concentração dos sais da série de Hofmeister no [Θ] _{222nm} de Dtxd.	103
Figura 54	Efeito da concentração dos sais da série de Hofmeister no [Θ] _{260nm} .	104
Figura 55	Relação das intensidades de fluorescências a 350 e a 330 nm das amostras na fase aquosa de Dtxd após emulsificação com CH ₂ Cl ₂ na presença de sais da série de Hofmeister.	105
Figura 56	Microscopia eletrônica de varredura de MS-PLGA vários pesos moleculares e com terminações livres (-COOH) ou metilados (-COOMe) contendo Dtxd.	108
Figura 57	Microscopia eletrônica de varredura de MS-PLGA de vários pesos moleculares e com terminações livres (-COOH) ou metilados (-COOMe).	109
Figura 58	Comparação entre as eficiências de encapsulações das MS-PLGA preparadas com polímeros diferentes.	110
Figura 59	Efeito das massas molares e das terminações de polímeros de PLGA sobre a liberação de Dtxd na primeira semana de incubação a 37°C.	110
Figura 60	Efeito das massas molares e das terminações de polímeros de PLGA sobre a liberação de Dtxd durante 8 semanas de incubação a 37°C.	111
Figura 61	Identificação imunológica do Dtxd liberado de MS preparadas com diferentes PLGAs.	112
Figura 62	Formação de anticorpos contra Dtxd em função do tempo. Os camundongos foram imunizados com 50 µg de Dtxd.	113
Figura 63	Formação de anticorpos contra Dtxd em função do tempo. Os camundongos foram imunizados com 1 µg de Dtxd livre ou encapsulado em MS PLGA ou com 5 µg de Dtxd livre ou encapsulado MS-PLGA.	114
Figura 64	Efeito da massa molar do PLGA e do tempo de aplicação da dose reforço sobre a formação de anticorpos anti diftéricos IgG1 e IgG2a.	116
Figura 65	Estrutura do Poloxamer (A) e Carbopol (B).	120
Figura 66	Partes de um emulsificador usado para se obter microesferas de PLGA	138

TABELAS

TABELAS		Página
Tabela 1	Relação entre as os níveis e fatores para os diversos parâmetros do processo de produção de microesferas.	41
Tabela 2	Características físico-químicas dos polímeros.	45
Tabela 3	Comparação entre os componentes das curvas de dosagens de Dtxd.	54
Tabela 4	Comparações entre os parâmetros da curva padrão de dosagem dos componentes de Dtxd através de HPLC, monitorado por Abs a 269 nm.	56
Tabela 5	Comparação entre os conteúdos de cada componente molecular do toxoide diftérico antes e depois da concentração em membrana de 30 kDa.	63
Tabela 6	Efeito padronizado das variáveis do processo sobre os tamanhos médios das microesferas.	67
Tabela 7	Comparação entre as características obtidas nas microesferas através da variação de três fatores do processo.	68
Tabela 8	Comparação entre as quantidades totais de cada isotipo de anticorpo formado após imunizações de camundongos com Dtxd microencapsulada em MS-PLGA.	146
Tabela 9	Comparação entre os níveis dos títulos de anticorpos 138 dias após a imunização de camundongos que receberam a dose reforço 38 dias após primeira imunização.	146
Tabela 10	Comparação entre os níveis dos títulos de anticorpos 138 dias após a imunização de camundongos que receberam a dose reforço 138 dias após primeira imunização.	147
Tabela 11	Comparação entre os níveis dos títulos de anticorpos 220 dias após a imunização de camundongos que receberam a dose reforço 138 dias após primeira imunização.	148

ESQUEMAS

ESQUEMA		Página
Esquema 1	Poliéster de ácido láctico-co-glicólico.	20
Esquema 2	Etapas do processo de produção de MS de PLGA pelo método de dupla emulsão.	25
Esquema 3	Estrutura primária da Dtx (Toxina diftérica)	54
Esquema 4	Representação esquemática do Dtxd, de NAMUR e BUENO DA COSTA, 2004.	87
Esquema 5	Via proposta para a degradação de Timerosal [®] .	91
Esquema 6	Redução de Dtxd mediada por TSA formado depois da degradação de TM na presença de ácido láctico.	129
Esquema 7	Variações que a matriz polimérica de PLGA sofre durante a erosão superficial e a erosão no interior da matriz.	131
Esquema 8	Alguns efeitos dos íons da série de Hofmeister.	138

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

Abs	absorbância
BSA	albumina de soro bovino
CsA	sulfato de condroitina
DMSO	Dimetilsufóxido
CD	dicroísmo circular
DTSA	Ácido ditio-salissílico
DTT	Ditiotreitól
Dtx	toxina diftérica
Dtxd	toxóide diftérico
EtHg	Etilmercúrio
F	Fenilalanina
FA	Fragmento A
FB	Fragmento B
FC	fase contínua
FD	fase dispersa
G	ácido glicólico
IBu	Instituto Butantan
L	ácido láctico
Lf	unidade de floculação
Merthiolate [®]	Timerosal [®] nome de fantasia de Tiosalicilato de sódio etil-mercúrio.
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MS	Microesferas
MS-Dtxd	microesferas de PLGA contendo Dtxd
Mw	Massa molar
PBS	tampão fosfato-salina
PBSt	tampão fosfato-salina contendo tween 2
PC	pontos centrais
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Polí-ácido láctico
PLGA	poli-ácido lactico-co-glicólico
PVA	poli álcool vinílico
RT	Tempo de retenção
SEBA	ácido 2-sulfenobenzoico
SIBA	ácido e- sulfino benzoico
SOBA	ácido 2-sulfonobenzoico
TM	Timerosal [®]
TMB	Tetrametilbenzidina
Timerosal [®]	Merthiolate [®] nome de fantasia de Tiosalicilato de sódio etil-mercúrio.
TSA	Ácido tiosalicílico
uv	ultra-violeta
Y	Tirosina
W	Triptofano
λ	comprimento de onda
σ	título de anticorpo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS e MÉTODOS.....	32
3.1. Materiais	32
3.2. Métodos analíticos qualitativos e estruturais para caracterização do Dtxd.....	33
3.2.1. Espectroscopias de:	
a. Absorção no ultra violeta.....	33
b. Fluorescência.....	33
c. Dicroísmo circular (CD).....	33
3.2.2. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).....	34
3.2.3. Analíticos qualitativos para caracterizações das microesferas de PLGA.....	34
3.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
3.2.3.2. Microscopia óptica de inversão de fase.....	34
3.3. Analíticos quantitativos.....	35
3.3.1. Dosagens de proteína.....	35
a. Método de Lowry.....	35
b. Espectroscopia no ultravioleta.....	35
c. HPLC (cromatografia líquida de alta resolução).....	35
3.3.2. Controles de encapsulação de soluto.....	36
a. Rendimento (recuperação) da preparação de microesferas.....	36
b. Eficiência de encapsulação (%).....	36
3.3.3. Dosagem de ácido láctico.....	36
a. Método colorimétrico.....	36

b. HPLC.....	37
3.3.4. Dosagem de Ponceau S.....	37
3.3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS).....	37
3.3.6. ELISAs. (ensaios imunoenzimáticos).....	37
a. ELISA para quantificar o toxóide diftérico (Dtxd).....	37
b. ELISA para quantificar anticorpo-anti-Dtxd desenvolvido em camundongo.....	38
d. Título de anticorpo (σ).....	38
3.4. Métodos preparativos.....	39
3.4.1. Ultraconcentração de Dtxd.....	39
3.4.2. Preparo de microesferas vazias.....	39
3.4.3. Preparo de microesferas contendo Dtxd.....	39
3.4.4. Preparo de microesferas contendo Ponceau S.....	40
3.5. Ensaios <i>in vitro</i>	40
3.5.1. Mecanismo de degradação de Dtxd em meio contendo ácido láctico e timerosal.....	40
3.5.2. Efeitos dos parâmetros variáveis do processo de preparação de microesferas sobre os tamanhos das partículas formadas.....	41
3.5.3. Efeito do meio e do tempo de incubação sobre a conformação de Dtxd.....	42
3.5.4. Efeito do tempo de incubação sobre a matriz polimérica de MS-PLGA em solução.....	42
a. Cinética de degradação da matriz de MS (PLGA de 55 kDa).....	42
b. Efeito do peso molecular do PLGA (12,34 ou 63 KDa) e de sua metilação carbóxi-terminal (-COOMe).....	43
3.5.5. Variações estruturais no Dtxd após a primeira mulsificação.....	43
a. Efeito dos sais da série de Hofmeister na solubilidade de Dtxd	

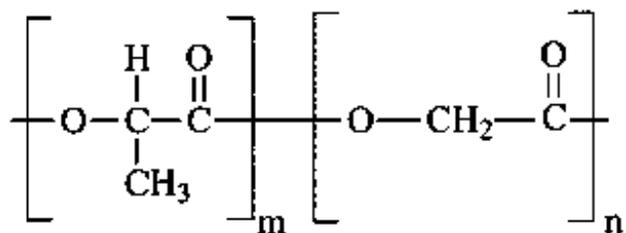
durante a <u>primeira emulsificação</u>	43
b. Efeito dos sais da série de Hofmeister na estrutura da fração solúvel de Dtxd após a primeira emulsificação.....	44
3.5.6. Efeito do KSCN na eficiência de encapsulação do Dtxd em MS de PLGA.....	44
3.5.7. Efeito das variáveis de composição dos polímeros sobre a cinética de liberação de Dtxd.....	44
a. Efeito do peso molecular do polímero sobre a cinética de Dtxd das MS.....	45
b. Efeito da metilação terminal (-COO-Me) do PLGA sobre a cinética de liberação de Dtxd das MS.....	45
3.6. Ensaio <i>in vivo</i>	46
3.6.1. Imunizações em camundongos.....	46
a. Efeito da microencapsulação do toxoide diftérico em PLGA sobre a produção de anticorpos anti-diftérico em camundongos.....	46
b. Imunização de camundongos com baixas doses de Dtxd livre e encapsulado em MS.....	46
c. Estudo do efeito da matriz polimérica e do tempo da administração da dose reforço sobre a produção de anticorpos anti-diftérico (IgG1 e IgG2a).....	46
4. RESULTADOS.	
4.1 Caracterizações do Dtxd produzido pelo IBu e usado neste trabalho.....	48
4.1.1. Espectroscopia de absorção no uv, fluorescência e CD:	
a. Espectro no uv.....	48
b. Fluorescência.....	50
c. Dicroísmo circular.....	50
4.1.2. HPLC de Dtxd, IBu.....	51
4.2. Analíticos quantitativos.....	52
4.2.1. Dosagens de proteína pelos métodos de Lowry, Absorbância no ultra violeta a 280 ou 269 nm e HPLC.....	52
4.2.2. Controles de encapsulação: rendimento e eficiência de	

encapsulação de uma preparação típica de microesferas.....	57
4.2.3. Dosagem de ácido láctico.....	58
a. Método colorimétrico.....	58
b. HPLC.....	60
4.2.4. Dosagem de Ponceau S.....	60
4.3 Ensaio Preparativos.....	61
4.3.1. Ultraconcentração de Dtxd.....	61
4.4. Ensaio <i>in vitro</i>	65
4.4.1. Efeitos dos parâmetros variáveis do processo de preparação de microesferas sobre os tamanhos das partículas formadas.....	65
4.4.2. Efeito do meio e do tempo de incubação sobre a conformação de Dtxd.....	70
a. Efeito de MS-PLGA sobre a conformação de Dtxd.....	71
b. Efeito de MS-PLGA e SDS 1 % sobre a conformação de Dtxd.....	72
4.4.3. Efeito tempo de incubação sobre a matriz polimérica de MS-PLGA em soluções.....	82
a. Cinética da degradação da matriz de PLGA 50:50 (55 kDa).....	82
b. Efeito da massa molar do PLGA e da terminação metilada do polímero.....	83
4.4.4. Mecanismo de degradação de Dtxd em meio contendo ácido láctico e Timerosal®.....	87
4.4.5. Variações estruturais no Dtxd após a primeira emulsificação.....	95
a. Efeito dos sais da série de Hofmeister na solubilidade de Dtxd após contato com CH ₂ Cl ₂	96
b. Efeito dos sais da série de Hofmeister na conformação da fração solúvel de Dtxd após a primeira emulsificação.....	96
4.4.6. Efeito do KSCN na eficiência de encapsulação do Dtxd em MS de PLGA.....	106
4.4.7. Efeito das variáveis na composição dos polímeros sobre a	

cinética de liberação de Dtxd <i>in vitro</i>	107
4.5. Ensaio <i>in vivo</i>	112
4.5.1. Imunização de camundongos. (Protocolos de imunizações e sangrias).....	112
a. Efeito da microencapsulação do toxoide diftérico em PLGA sobre a produção de anticorpos anti-diftérico em camundongos.....	112
b. Imunização de camundongos com baixas doses de Dtxd livre e encapsulado em MS.....	113
c. Estudo do efeito da matriz polimérica e do tempo da administração da dose reforço sobre a produção de anticorpos anti-diftérico (IgG1 e IgG2a).....	114
5. DISCUSSÃO.....	117
6. CONCLUSÕES.....	150
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de veiculações de drogas tais como nanopartículas ou lipossomas, produzidos com reagentes biodegradáveis, vem sendo usados para o controle, no tempo e no espaço, dos efeitos terapêuticos de fármacos nas saúdes humanas e animal. Estes objetivos podem ser atingidos controlando-se a difusão do soluto, as velocidades de degradações das partículas (microesferas), ou outros parâmetros físico-químicos através do uso de materiais controladores de velocidade de difusão como lipossomas (produzidos com fosfolipídeos naturais), quitosana (quitina desacetilada), PLGA (éster poli-lactico-co-glicólico) ou ainda manipulando-se o destino do agente para que ele vença barreiras (lipossomas contendo anticorpos monoclonais; revestidos de quitosana). Vários solutos tão diversos em estrutura como hormônios [progesterona, (WU, 2004), insulina (CUI *et al.*, 2006), estradiol (ZAGHLOUL *et al.*, 2005), hormônio humano de crescimento (WEI *et al.*, 2007)], anti-inflamatórios [budenoside, (KRISHNAMACHARI *et al.*, 2007), dexametasona, (KUPPERMANN *et al.*, 2007; THOTE e GUPTA., 2005)], quimioterápicos [paclitaxel (WANG *et al.*, 2003; MU e FENG., 2003), tamoxifeno (SEHRA e DHAKE., 2005)], ou antígenos purificados são os exemplos de sucesso de microencapsulação de drogas em PLGA (Esquema 1). O PLGA é um produto aprovado pelo FDA, há 350 companhias de veiculação de drogas e mais de 1000 companhias de fabricação de produtos médicos (como por exemplo, próteses, fios de sutura) (VERMA e GARG, 2001). Há mais de quatrocentos produtos contendo MS-PLGA (microesferas de PLGA) veiculando proteínas e peptídeos em fase clínica (SCHWENDEMAN, 2007, comunicação pessoal).



Esquema 1. Poliéster de ácido láctico-co-glicólico, onde os índices m e n representam os números de monômeros de ácido láctico e glicólico, respectivamente.

As principais vantagens de se encapsular drogas em sistemas fechados (lipossomas, microesferas, cápsulas) são: aumento da eficácia, aumento do índice terapêutico ou efeito farmacocinético (múltiplas cópias estão contidas na partícula); diminuição da toxicidade (diminuição do contacto direto com o organismo); aumento da estabilidade do agente encapsulado; liberação controlada do soluto; possibilidade do uso de implantes.

1.1. PLGA e encapsulação de vacinas.

Atualmente a OMS recomenda que se simplifiquem os esquemas de imunização seja pelo aumento do número de componentes por vacina, ou seja, pela diminuição do número de doses necessário para a imunização (FRIEDE e AGUADO, 2005; WHO, 1998). Nesta tese, optou-se por encapsular um antígeno conhecido em microesferas de PLGA.

Os maiores atrativos desta escolha na formulação de vacinas em microesferas de poliésteres biodegradáveis são:

A. Possibilidade de se desenhar uma preparação com tempo de degradação definido e conseqüentemente controlar a liberação do antígeno. Após uma simples injeção de antígeno veiculado nestas microesferas, pode ser obtida uma resposta imunológica de longa duração (FRIEDE e AGUADO, 2005; STORNI *et al.* 2005), quer sejam as partículas de liberação pulsátil quer sejam de liberação contínua no

tempo. O antígeno pode ser liberado através de difusão simples ou ser dependente da velocidade de degradação do polímero (LAGARCE *et al.*, 2002). A degradação e a erosão do polímero têm grande importância na veiculação de solutos. A **degradação** pode ser definida como um processo de cisão das cadeias do polímero quando então são formados oligômeros e depois monômeros. A **erosão** designa perda do próprio material polimérico e é quando os oligômeros abandonam a MS. Estes dois processos como um todo, são bem complexos. A entrada de água na matriz polimérica leva a um inchaço das MS. A entrada de água induz à hidrólise (degradação) do polímero, que por sua vez começa a formar poros com liberação de oligômeros e monômeros. Ao mesmo tempo, o pH dentro dos poros começa a controlar a degradação da matriz, que tipicamente tem alguma funcionalidade ácido base. Finalmente, os oligômeros são liberados levando à perda de peso (massa) da MS (GÖPFERICH e BURKERSRODA, 1997; HANES *et al.*, 1997; GÖPFERICH, 1996; PARK, 1994; VERT *et al.*, 1994).

B. O PLGA é atóxico e tem uma tradicional e longa utilização em produtos médicos (BENICEWICZ e HOPPER, 1991) que comprovam sua segurança [fios de sutura, placas e parafusos de cirurgias ortopédicas, (TIAINEN *et al.*, 2006; KYRIACOS *et al.*, 1996)]. Os produtos finais da degradação do polímero são os ácidos láctico e glicólico, ambos biocompatíveis e biodegradáveis.

As formas de se controlar a degradação do polímero.

O tempo de degradação das MS (microesferas) de PLGA depende da composição do polímero e do tamanho das partículas.

Quanto maior a relação L/G (láctico/glicólico) menor é a velocidade de degradação da partícula (DU *et al.*, 2006; SAMATI *et al.*, 2006) e quanto maior o

peso molecular do polímero utilizado, maior o tempo de degradação das MS (RAVIPARAPU *et al.*, 2000). Outra forma de controlar a degradação das MS é utilizar polímeros com terminações metiladas (-COO-Me) ou livres (-COO-H). Microesferas cujo PLGA tem a terminação metilada, apresentam menor velocidade de degradação do que MS de PLGA com terminações livres (FRIES e SCHLAPP, 2002, BLANCO e ALONSO, 1997).

Com relação ao tamanho das microesferas, quanto maior a partícula maior o tempo de degradação e conseqüentemente maior o tempo de liberação do soluto dependente de erosão do polímero (SAMATI *et al.*, 2006). O tamanho das partículas também influencia na quantidade de soluto liberado inicialmente. Microesferas maiores tem uma liberação inicial de soluto menor isso é o início da liberação ocorre mais tardiamente (BERCHANE *et al.*, 2007; DIEDERIK *et al.*, 2004).

Os métodos de preparação de microesferas.

Existem vários métodos de produção de partículas de PLGA com liberação controlada do soluto. Nos métodos convencionais de microencapsulação, uma solução do antígeno é dispersa numa fase orgânica contendo o polímero por sonicação ou homogenização (emulsão A₁/O) A emulsão A₁/O é processada posteriormente através dos métodos específicos de preparo de MS contendo a proteína, ou antígeno que são: 1. Extração ou evaporação do solvente; 2. Secagem por nebulização e 3. Separação de fases. Nos estágios finais e antes da estocagem, as MS são coletadas e lavadas com água para remoção de antígeno não encapsulado (TAMBER *et al.*, 2005).

O método de dupla emulsão (água-em-óleo)/em água tem sido amplamente usado para encapsular solutos numa matriz polimérica (GIOVAGNOLI *et al.*, 2007; MUNDARGI *et al.*, 2007; NAMUR *et al.*, 2006; DU *et al.*, 2006; GASPAR *et al.*, 1998; HETA *et al.*, 1994; LANGER, 1990; OKADA *et al.*, 1987). Neste método é criada uma emulsão primária (A₁/O) através da adição (sob agitação vigorosa) de um soluto em água a uma fase orgânica contendo PLGA (poli-láctico-co-glicólico). A emulsão primária (contendo o polímero e os solutos hidrofílicos) é adicionada, sob agitação vigorosa, a uma solução contendo um surfactante (geralmente o PVA, poli álcool vinílico) para produzir a emulsão dupla [(A₁/O)/A₂]. A evaporação do solvente e a precipitação do polímero ocorrem *in tandem* e então são formadas as microesferas. Durante esta precipitação do polímero ocorre a imobilização e a encapsulação de gotículas da fase aquosa contendo o soluto. As microesferas formadas são lavadas com água e separadas por centrifugação.

As variáveis do processo de produção das microesferas podem determinar o tamanho das partículas formadas.

Os tamanhos são afetados principalmente por:

A. Sistema de solvente usado. Quanto maior a solubilidade do solvente em água, maior será o tamanho das partículas (RUAN *et al.*, 2002).

B. Velocidades de emulsificação primária ou secundária: quanto maior a agitação, menores são as partículas (NAMUR *et al.*, 2006; KEMPEN *et al.*, 2004; RUAN *et al.*, 2002).

C. Razão entre volume da fase aquosa interna ou externa: maior volume da fase aquosa interna da primeira emulsão produz MS de maior tamanho (CUI *et al.*, 2005; SIPOS *et al.*, 2005; PARIKH *et al.*, 2003). Em contrapartida, menor volume

da fase aquosa externa da segunda emulsão, produz MS de tamanho menor (SIPOS *et al.*, 2005; POUESSEL *et al.*, 2004).

D. Concentração do agente emulsificante da segunda emulsão: a concentração do estabilizador da segunda emulsão, como por exemplo, o PVA, influencia no tamanho das MS. Quanto maior a concentração do PVA menor tamanho de partículas formadas (KEMPEN *et al.*, 2004; RUAN *et al.*, 2002).

E. A razão polímero/solvente orgânico: uma solução polimérica mais concentrada produz partículas maiores do que as partículas produzidas com solução polimérica mais diluída (RAMAN *et al.*, 2005).

Do ponto de vista do método de encapsulação, não há mais nenhum obstáculo técnico para se encapsular proteínas em microesferas de PLGA com cinéticas de liberações diferentes. Entretanto alguns problemas ainda estão em aberto:

- conhecer as etapas que envolvem a desestabilização estrutural da proteína (levando-se em consideração que cada proteína tem suas características conformacionais intrínsecas) durante e após o processo de sua microencapsulação em microesferas de PLGA.

- como diminuir ou mesmo evitar danos estruturais nas proteínas que levem à perda de sua eficácia biológica.

Para se evitar ou minimizar as degradações de proteínas durante ou após o processo de microencapsulação, podem-se usar como estratégias de melhoramentos na formulação 1. mudar os componentes da formulação de forma a se obter a estabilidade desejada ou 2. mudar o processo de microencapsulação. O quadro abaixo (**Esquema 2**) descreve cada etapa do processo de dupla emulsão

para a produção de microesferas de PLGA, para facilitar as colocações de alguns dos problemas que serão enfrentados nesta tese. De forma resumida o processo de microencapsulação de proteínas pode ser dividido em 6 etapas (de 1 a 6) (**esquema 2**) até a degradação do polímero (Etapa 6) onde ocorre a liberação do soluto.

A fase de formação da emulsão primária (etapa 1) tem sido descrita como a que causa mais desnaturações e agregações. A emulsificação submete a proteína à pressões altas; gradientes de temperaturas; forças de cisalhamento; possibilidades de oxidação e à ação de radicais livres. Com o cisalhamento da fase aquosa aumentam-se as interfaces hidrofóbicas (o que é uma grande desvantagem do método) que levam à adsorção da proteína, seguidas por desenovelamento e agregação (WEI *et al.*, 2007; PÉREZ-RODRIGUES *et al.*, 2003; CASTELLANOS *et al.*, 2002; PÉREZ *et al.*, 2002; DIWAN e PARK, 2001; WEERT *et al.*, 2000; SAH, 1999; XING *et al.*, 1996).

$\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{PLGA (O)} + \text{Proteína (A}_1) \rightarrow \text{Emulsificação} \rightarrow \text{emulsão primária (A}_1/\text{O)}$ [Etapa 1]

$(\text{A}_1/\text{O}) + \text{ácido polivinílico (PVA, que é a fase A}_2) \rightarrow \text{Emulsificação} \rightarrow \text{emulsão secundária (A}_1/\text{O})/\text{A}_2$ [Etapa 2]

$(\text{A}_1/\text{O})/\text{A}_2 \rightarrow \text{Evaporação do solvente} \rightarrow \text{precipitação do polímero} \rightarrow \text{encapsulação do soluto na matriz de PLGA}$
[Etapa 3]

Microesferas contendo o soluto e com algumas moléculas do soluto adsorvidas externamente (MS) \rightarrow lavagens
[Etapa 4]

MS livres de soluto adsorvido externamente \rightarrow congelamento \rightarrow desidratação [Etapa 5]

Degradação do polímero e erosão da matriz de PLGA \rightarrow liberação da proteína encapsulada [Etapa 6]

Esquema 2: Etapas do processo de produção de MS de PLGA pelo método de dupla emulsão.

Na etapa 2 podem ocorrer aumentos de temperatura e de possibilidades de oxidação (WEERT *et al.*, 2000). **Na etapa 3**, os fenômenos de evaporação do

solvente, precipitação do polímero e encapsulação de micro-gotículas contendo o soluto ocorrem *in tandem*. Nesta fase, parte da proteína encapsulada poderá ficar ligada à matriz polimérica (ZHU *et al.*, 2000). **Na etapa 4** a proteína adsorvida externamente às microesferas é lavada. **Na etapa 5** a proteínas podem ainda sofrer os danos de desnaturação causados por abaixamento de temperatura e desidratação(CARPENTER *et al.*, 1994).

A proteína encapsulada em microesferas de PLGA é liberada para o meio durante a degradação da matriz polimérica [**Etapa 6**]. São formados internamente microambientes ácidos por causa das liberações dos ácidos láctico e glicólico (JIANG *et al.*, 2005; NAMUR *et al.*, 2004), componentes do PLGA. A degradação da matriz polimérica ocorre durante todo o tempo, mas, a erosão só ocorre após um certo grau de degradação. Na erosão da matriz são liberados os oligômeros de PLGA que podem retardar a liberação da proteína adsorvida a ele ou mesmo impedir estéricamente a liberação do soluto.

Ao longo dos últimos 20 anos foram descritos vários agentes protetores de desnaturação de proteínas durante e após suas microencapsulações em PLGA. Entre os agentes estabilizadores sugeridos estão:

1- **Albumina co-dissolvida à proteína a ser encapsulada** na intenção de que o BSA por competição com o antígeno encapsulado fique adsorvido na interface CH_2Cl_2 . Neste tipo de hipótese presume-se que a BSA tenha maior afinidade pela superfície de PLGA e melhore os resultados de encapsulação e de liberação de Ttxd (Toxoide tetânico) e de Dtxd (JOHANSEN *et al.*, 1998; AUDRAN *et al.*, 1998).

2- **Aumento da concentração da proteína a ser encapsulada**, mantendo-se a mesma área interfacial. Observaram-se efeitos protetores com o aumento de

concentrações de anidrase carbônica e BSA (LU e PARK, 1995), lisozima de clara de ovo (PÉREZ e GRIEBENOW, 2001) e hormônio de crescimento humano (CLELAND e JONES, 1996). No caso de insulina (SINGH *et al.*, 2001) o aumento da sua concentração levou a formação de um gel, que então aumentou a sua estabilização durante a encapsulação e liberação.

3- Adição de alguns surfactantes não iônicos como o co-polímero em bloco do polioxietileno-polioxipropileno [HO(C₂H₄O)_a(C₃H₆)_b(C₂H₄O)_aH] (CARRASQUILLO *et al.*, 2001; TOBÍO *et al.*, 2000; BLANCO e ALONSO, 1998; SCHWENDEMAN *et al.*, 1998; NIHANT *et al.*, 1995; NIHANT *et al.*, 1994;) (conhecidos como poloxamer ou F-Pluronic[®]) têm sido co-dissolvidos com o PLGA (WEI *et al.*, 2007; CARRASQUILLO *et al.*, 2001; BLANCO e ALONSO, 1998) em CH₂Cl₂ para se formar microesferas ou encapsulados como um núcleo (core) contendo a proteína (TOBIO *et al.*, 2000) em cápsulas de PLGA.

4- Modificações químicas para se minimizar as desnaturações na interface água/CH₂Cl₂. Algumas dimerizações de proteínas submetidas ao estresse de emulsificação em água/CH₂Cl₂ (que parecem ser dependentes de -SH livre) (PÉREZ *et al.*, 2002). Estas reações envolvendo grupos -SH livres e grupos S-S podem ser evitadas através **carboximetilação ou redução seguida por carboximetilação** da proteína a ser encapsulada (CROTTS e PARK, 1997; COSTANTINO *et al.*, 1997), o metoxi-poli-etilenoglicol (mPEG, 5000, por ex.) tem sido usado para se derivatizar proteínas, conhecidas então como proteínas peguiladas (CASTELLANOS *et al.*, 2005; DIWAN e PARK, 2001). Lisozima-peguilada é mais estável que a enzima nativa depois de ser homogeneizada com CH₂Cl₂ e se adsorve muito pouco na superfície de PLGA (DIWAN e PARK, 2001).

5- Quando se co-encapsula PEG (polietilenoglicol) com a α -quimotripsina (evitando-se a derivatização) há uma redução de 10 % na inativação e 12 % na agregação da enzima (SÁNCHEZ *et al.*, 1999). O PEG tem um caráter anfifílico e é razoável que ele recubra a interface CH_2Cl_2 e então previna a interação da proteína com a interface orgânica (CASTELLANOS *et al.*, 2005; PÉREZ-RODRIGUES *et al.*, 2003; CASTELLANOS *et al.*, 2003; WEERT *et al.*, 2000; PEAN *et al.*, 1999).

6- Co-dissolução de polióis à fase aquosa contendo a proteína. Entre os polióis a maltose, quando co-encapsulada com proteínas, pode se ligar à sua superfície e minimizar a interação com o CH_2Cl_2 (PÉREZ-RODRIGUES *et al.*, 2003). Têm sido usados outros polióis como a sacarose, glicose, trealose, frutose, lactulose, lactose e sorbitol (SRINIVASAN *et al.*, 2005; CASTELLANOS e GRIEBENOW, 2005; DUNCAN *et al.*, 2005; JAGANATHAN *et al.*, 2004; PÉREZ-RODRIGUES *et al.*, 2003; CASTELLANOS *et al.*, 2003; CASTELLANOS *et al.*, 2002; VILA *et al.*, 2002; CARRASQUILLO *et al.*, 2001; WEERT *et al.*, 2000; SANCHES *et al.*, 1999; PEAN *et al.*, 1999; JOHANSEN *et al.*, 1999;) como aditivos protetores de proteínas no processo de microencapsulação em PLGA como um todo.

7- Adição $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (JIANG *et al.*, 2005; JAGANATHAN *et al.*, 2004; KANG e SCHWENDEMAN, 2002; ZHU e SCHWENDEMAN, 2000; SCHWENDEMAN *et al.*, 1996) à fase aquosa da primeira emulsificação a fim de evitar o abaixamento de pH que ocorre em consequência da degradação da matriz de PLGA (ZHU e SCHWENDEMAN, 2000; ZHU *et al.*, 2000; SCHWENDEMAN *et al.*, 1996; RON *et al.*, 1993). Sabe-se que quando o $\text{Mg}(\text{OH})_2$ é co-encapsulado com proteínas em MS ocorre uma grande captura de água pelo sistema. Para saber se esta captura de água exerceria um efeito sinérgico ao fenômeno de neutralização do pH exercido pelo $\text{Mg}(\text{OH})_2$ adicionaram sacarose, reconhecidamente estabilizadora de proteínas em

processos de microencapsulações (McGOFF e SCHEER, 2000; RON *et al.*, 1993). Mas, nos sistemas de microencapsulação de BSA em MS de PLGA, a neutralização de pH pelo $Mg(OH)_2$ é muito mais importante do que a captura de água que o acompanha (SCHWENDEMAN *et al.*, 1996).

8- Formação de complexos iônicos entre proteínas positivamente carregadas e mucopolissacarídeo como o sulfato de condroitina (CsA) (LEE *et al.*, 2007). O CsA neutraliza as cargas da proteína protegendo-a de interações iônicas com os produtos de degradação do PLGA e do abaixamento de pH do meio (LEE *et al.*, 2007).

Além dos agentes estabilizadores, também estão descritas algumas modificações ao método que seguem abaixo:

1- Congelamento da fase aquosa da primeira emulsificação. Para minimizar a interação do soluto na interface água/solvente orgânico, congela-se a fase aquosa da primeira emulsão, pulveriza-se o material congelado e emulsifica-se em baixa temperatura (ANDO *et al.*, 1999).

2- Substituição da primeira emulsão por uma suspensão. Para minimizar a interação da proteína com a interface água/ solvente orgânico usa-se a proteína no estado sólido, micronizada. A proteína é suspensa na solução polimérica. Essa técnica é chamada método sólido/orgânico/água (S/O/A) (CASTELLANOS *et al.*, 2002).

Entre as proteínas mais estudadas no contexto de estabilização no método de microencapsulação em MS de PLGA destacam-se a lisozima (DUNCAN *et al.*, 2005; PÉREZ *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2002; DIWAN e PARK, 2001; van de WEERT *et al.*, 2000; FU *et al.*, 1999; BLANCO e ALONSO, 1998), BSA (DUNCAN *et al.*, 2005; KANG, 2003; ZHU *et al.*, 2000; ZHU e SCHWENDEMAN, 2000; FU *et al.*, 1999;

JOHANSEN *et al.*, 1998; BLANCO e ALONSO, 1998; TAKAHATA *et al.*, 1998; CROTTS e PARK, 1997; CONSTANTINO *et al.*, 1997). Dentre estas proteínas, poucas foram as com atividade vacinal como Ttxd (TOBÍO *et al.*, 2000; SANCHES *et al.*, 1999; JOHANSEN *et al.*, 1999; JOHANSEN *et al.*, 1998; XING *et al.*, 1996; CHANG e GUPTA, 1996) e Dtxd (JOHANSEN *et al.*, 1998; PALIWAL e LONDON, 1996).

Nestes estudos têm sido usados métodos espectroscópicos como absorvância no ultra-violeta (DIWAN e PARK, 2001; SAH, 1999; JOHANSEN *et al.*, 1998), fluorescência (PÉREZ *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 1998; XING *et al.*, 1996; Paliwal e London, 1996), CD (CARRASQUILLO *et al.*, 2001; FRAGIONE-BEEBE *et al.*, 2000; VAN de WEERT *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2000; JOHANSEN *et al.*, 1998; XING *et al.*, 1996), Infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR) (CASTELLANOS *et al.*, 2003; KANG, 2003; PÉREZ *et al.*, 2002; CASTELLANOS *et al.*, 2002; CARRASQUILLO *et al.*, 2001; VAN der WEERT *et al.*, 2000;) e turbidimetria derivada de espalhamento (PÉREZ *et al.*, 2003) para se monitorar danos estruturais em proteínas nas várias etapas de seus microencapsulações em microesferas de PLGA.

Dentre estes estudos estruturais monitorados por métodos espectroscópicos poucos foram os que usaram proteínas usadas em vacinas (ZHU e SCHWENDEMAN, 2000; JOHANSEN *et al.*, 1998; XING *et al.*, 1996; PALIVAL e LONDON, 1996). Somente dois dentre eles estudaram as mudanças conformacionais do Dtxd (toxóide diftérico) associadas ao processo de microencapsulação em MS de PLGA. ***O estudo conformacional de Dtxd durante e após sua micro-encapsulação em MS de PLGA através de métodos espectroscópicos é ainda um campo em aberto e portanto de interesse nesta tese.***

2. OBJETIVOS:

O objetivo deste projeto é o de se usar métodos biofísicos no estudo da conformação estrutural do toxoide diftérico nas diversas etapas do processo de sua encapsulação em microesferas biodegradáveis de poliésteres de ácido láctico - co glicólico (PLGA) e também estudar possíveis estabilizadores da proteína durante essas etapas. Pretende-se produzir, de uma forma controlada, partículas de microesferas de tamanhos predefinidos e também microesferas com polímeros de pesos moleculares variados (com carboxi-terminais livres ou metilados).

A imunologia da formulação da vacina em Microesferas de PLGA, com formulações diferentes, será estudada em camundongos.

3. MATERIAIS e MÉTODOS.

3.1. Materiais: Dtxd (toxóide diftérico) e anti-soro diftérico padrão do IB desenvolvido em cavalo, foram gentilmente doados pela Divisão de Produção e controle de qualidade do Instituto Butantan. Tween-20, albumina de soro bovino (BSA), conjugado anti-camundongo-peroxidase, conjugado anti-cavalo-peroxidase, PLGA (poli-lático-co-glicólico) ou Lactel BP 0100[®] de razão láctico/glicólico 50:50 (Mw de 45 - 75 kDa), conjunto de reagentes para dosagem de ácido láctico, padrão de ácido láctico, padrão proteico de vários pesos moleculares, Ponceau S, Triton X-114 foram comprados da Sigma (EUA). Polímeros de PLGA com pesos moleculares diferentes com carbóxi terminais livres (12kDa-H, 34 kDa-H e 63kDa-H) ou metilados (12kDa-Me, 34 kDa-Me e 63 kDa-Me) e padrões de polímeros de vários pesos moleculares foram adquiridos da Boehringer Ingelheim (Alemanha). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi comprado da Merck; 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB, Polysciences); diclorometano (CH₂Cl₂) e Poli álcool vinílico (PVA, Mw 49 000) da Aldrich Chemical Co (USA); filtros de policarbonato de poros 0.22 µm, 0,45 µm (Millipore), sistema de filtração de solventes para o HPLC (Millipore). **Animais:** camundongos geneticamente selecionados, mantidos pelo Laboratório de Imunogenética ou camundongos BalbC, foram usados nesta tese. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Foram usados os seguintes aparelhos: espectrofotômetro Cary 3E (UV-Visible spectrophotometer Varian[®]), espectrofluorímetro HITACHI F 2000, espectropolarímetros de dicroísmo circular (CD) Jobin Yvon - (Spex CD6 Dichrograph Instrument), sistema de HPLC SHIMADZU[®] LC-10VP, equipado com detector de UV, modelo SCL-10AVP, microscópio eletrônico de varredura LEICA modelo LEO 440i e

microscópio de inversão de fases Nikon TMS com câmera acoplada Nikon Fx35WA, leitor automático de placas de ELISA Titerteck Multiskan MCC/340, emulsificador T 25 basic IKA Labortechnik (Ultra Turrax[®]), evaporador Heildolph RZR 2051 eletronic, interferômetro Image Master 1 D Prime e fonte de eletroforese EPS200 (Pharmacia Biotech), ultraconcentrador (Amicon).

3.2. Métodos analíticos qualitativos e estruturais para caracterização do Dtxd.

3.2.1. Espectroscopias de:

a. Absorção no ultra violeta: foram realizados espectros de amostras de Dtxd em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, varrendo-se entre 200 nm e 360 nm num espectrofotômetro Cary 3E (UV-Visible spectrophotometer Varian[®]). O controle de leitura continha timerosal[®] 3,7 mM em PBS (tampão fosfato contendo NaCl 150 mM). Padronizou-se um método alternativo de dosagem de Dtxd através da leitura da absorbância (Abs) a 269 nm.

Foi realizada também a medida de proteína através do método de absorbância a 280 nm para que fosse possível escolher o método mais sensível às condições experimentais desta tese. Este método será apresentado em outra seção.

b. Fluorescência: foram realizados espectros de Dtxd em um espectrofluorímetro HITACHI F 2000, usando-se cubetas de quartzo. Para as análises utilizaram-se comprimentos de onda de excitação a 269 nm para proteína ou 253 nm para timerosal[®] e a emissão da fluorescência foi medida no intervalo de 280 a 480 nm.

c. Dicroísmo circular (CD): foram realizados espectros de CD de Dtxd em um espectropolarímetro Jobin Yvon usando-se cubetas de 0,1 cm de caminho óptico.

3.2.2. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC): alíquotas de 20 µl de quantidades conhecidas de Dtxd estoque padrão foram injetadas automaticamente em coluna de QC-PAK GFC 300 (7,8 mm x 15 cm, Vt = 7,17 mL), previamente equilibrada com PBS através de sistema de HPLC SHIMADZU® LC-10VP. As eluições foram realizadas mantendo-se fluxo de 0,6 mL/minuto, temperatura da coluna de 20° C e tempo de corrida de 30 minutos. Compararam-se as eluições das diferentes frações de Dtxd com padrões de pesos moleculares conhecidos, a saber: Miosina (Mw 205 kDa) com RT (tempo de retenção) de 4,46, B-Galactosidase (116 kDa, RT = 4,65), Fosforilase B (97,4 kDa, RT = 4,82), Albumina de soro bovino (66 kDa, RT = 4,99), Albumina de clara de ovo (45 kDa, RT = 5,06) e Anidrase carbônica (29 kDa, RT = 5,32). Construiu-se uma curva padrão para dosagem de Dtxd por HPLC a partir destes dados.

3.2.3. Analíticos qualitativos para caracterizações das microesferas de PLGA.

3.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): pequenas quantidades de microesferas foram colocadas sobre uma fita adesiva de dupla face, de forma que se obtivessem superfícies planas. As amostras foram então submetidas à metalização com ouro por 10 minutos a vácuo. A seguir foram observadas em microscópio eletrônico LEICA modelo LEO 440i. Realizaram-se as microscopias eletrônicas de varredura utilizando-se voltagem de aceleração de 6 KV.

3.2.3.2. Microscopia óptica de inversão de fase: pequenas quantidades de microesferas foram ressuspensas em água e colocadas em uma lâmina de vidro. As amostras foram observadas em microscópio de inversão de fase Nikon TMS e fotografadas com máquina fotográfica Nikon FX35WA.

3.3. Analíticos quantitativos.

3.3.1. Dosagens de proteína:

a. **Método de Lowry** (LOWRY et al., 1951): o micrométodo de dosagem de proteína foi adaptado e desenvolvido em nosso laboratório. Adicionaram-se, em uma placa de ELISA, 50 µl de cada amostra a ser analisada a 100 µl de uma solução 1:1:1 dos seguintes reagentes a) Sulfato de cobre 0,1 %, tartarato de sódio e potássio 0,2 % e Carbonato de sódio 10 %; b) Dodecil sulfato de sódio 10 % e c) NaOH 1M. Incubou-se a placa à temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionaram-se 100 µl de uma solução de Folin diluído 1:1 em água. Agitou-se a placa de ELISA e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. As absorvâncias foram medidas a 690 nm em leitor automático Titertek Multiskan MCC/340. Para curva padrão utilizou-se uma solução de albumina de soro eqüino a 1mg/mL.

b. **Espectroscopia no ultra violeta:** realizou-se um espectro na região do ultravioleta para uma amostra de Dtxd padrão do IBu. Observou-se um pico de absorvância a 269 nm. A partir deste pico padronizou-se um método alternativo de dosagem de Dtxd através da Abs a 269nm, **conforme nossa publicação** (CAMPANA et al.,2004). Realizaram-se leituras a 269 nm nas amostras contendo quantidades conhecidas de Dtxd e construiu-se uma curva padrão de leitura de absorvância a 269 nm versus concentração de proteína.

c. **HPLC (cromatografia líquida de alta resolução):** alíquotas de 20 µl de quantidades conhecidas de Dtxd estoque padrão foram injetadas automaticamente no sistema de HPLC SHIMADZU® LC-10VP, usando-se coluna de QC-PAK GFC 300 (7,8mm x 15 cm, Vt = 7,17 mL), previamente equilibrada com PBS a um fluxo de 0,6 mL/minuto. As eluições foram realizadas mantendo-se o fluxo de 0,6 mL/minuto, a 20° C por 30 minutos e as absorvâncias medidas a 269 nm. Compararam-se as eluições das

diferentes frações de Dtxd com padrões de pesos moleculares conhecidos. A partir destes dados construiu-se uma curva padrão para dosagens das diferentes espécies moleculares da Dtxd por HPLC.

3.3.2. Controles de encapsulação de soluto.

a. **Rendimento (recuperação) da preparação de microesferas:** estabeleceu-se uma relação entre a massa de PLGA (poli-láctico-co-glicólico) tomada para o preparo das microesferas e a massa de microesferas recuperada. Então, a quantidade de microesferas (MS) produzida em relação a massa de PLGA inicial, expressa em porcentagem:

$$\frac{\text{massa de MS obtida}}{\text{massa de PLGA}} \times 100$$

b. **Eficiência de encapsulação:** digeriram-se 10 mg de MS contendo Dtxd com 1 mL de NaOH 0,1 M contendo 0,1 % de SDS durante 24 horas a 37°C. Findo o tempo, centrifugou-se a amostra e filtrou-se em membrana de 0,22 µm de poro.

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{Massa total de Dtxd encapsulada}}{\text{Massa Dtxd total inicial}} \times 100$$

3.3.3. Dosagem de ácido láctico.

a. **Método colorimétrico:** os sobrenadantes (100 µl) obtidos após incubações de microesferas de PLGA foram adicionados uma placa de ELISA. Em seguida adicionaram-se 100 µl de solução de reagente para lactato (Peroxidase > 10000 U/L em tampão Tris 100 mM contendo 4-aminoantipireno 1,7 mM). A reação foi desenvolvida durante 5 minutos a 37° C ao abrigo da luz, em seguida foi adicionada a oxidase láctica (1000 U/L em tampão Tris 100 mM). As absorbâncias foram lidas a 540 nm (TIETZ, 1995; WESTGARD et al., 1972) ou adaptadas em nosso laboratório para

leitura automática a 550 nm realizadas no leitor automático Titerteck Multiskan MCC/340.

b. **HPLC.** alíquotas de 20 µl de quantidades conhecidas de lactato padrão foram injetadas automaticamente no sistema de HPLC SHIMADZU® LC-10VP, usando-se coluna de Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), previamente equilibrada com H₂SO₄ 5 mM. As eluições foram realizadas mantendo-se o fluxo de 0,6 mL/minuto, por 30 minutos, com temperatura de 65° C e as absorvâncias medidas a 215 nm. Compararam-se as eluições das diferentes concentrações de lactato. A partir destes dados construiu-se uma curva padrão para dosagem de lactato por HPLC.

3.3.4. Dosagem de Ponceau S: prepararam-se amostras de concentrações conhecidas do corante Ponceau de 1 a 10 µg/mL em água e leram-se as absorvâncias em espectrofotômetro a 492 nm. Construiu-se então uma curva padrão para dosagem de Ponceau-S.

3.3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS): foram realizados de acordo com o descrito (LAEMMLI, 1970). Usaram-se mini-placas de gel a 5% ou a 12% de acrilamida, numa fonte de eletroforese EPS200 (Pharmacia Biotech).

3.3.6. ELISAs (Ensaio imunoenzimáticos).

a. **ELISA para quantificar o toxóide diftérico (Dtxd):** 100 µl de cada amostra contendo Dtxd previamente diluída em tampão carbonato pH 9,6 foram adicionados à uma placa de ELISA. Depois de 18 horas a 4° C, a placa foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05 % de tween (PBSt). A placa foi então bloqueada com 200 µl de solução de BSA a 0,1 % e depois de 1 hora a 37° C foi lavada 3 vezes com PBSt e foram

adicionados 100 µl de uma solução de anticorpos policlonais específicos (anti-soro diftérico padrão do IBu, desenvolvido em cavalo) contra Dtxd. Após 1 hora de incubação a 37° C, a placa foi lavada 3 vezes com PBSt e foram adicionados 100 µL do conjugado anti-cavalo-peroxidase diluído em PBSt. Após 1 hora de incubação à 37° C, a placa foi lavada 3 vezes com PBSt e foram adicionados 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB) como substrato. Depois de 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi parada pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 1 M. As absorbâncias foram lidas automaticamente a 450 nm em um leitor Titertek Multiskan MCC/340.

b. ELISA para quantificar anticorpo-anti-Dtxd desenvolvido em camundongo: 20 µg de Dtxd previamente dissolvidos em 100 µL de tampão carbonato pH 9,6 foram adicionados em cada poço da placa de ELISA e depois de 18 horas a 4°C, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e então bloqueada com 200 µl de BSA a 0,1%. Depois de 1 hora a 37° C, a placa foi lavada 3 vezes com PBSt e foram adicionados 100 µL dos soros dos camundongos imunizados, previamente diluídos em PBSt. Após 1 hora de incubação a 37° C, a placa foi lavada 3 vezes com PBSt e foram adicionados 100 µL do conjugado anti-mouse-peroxidase diluído em PBSt. Depois de 1 hora de incubação à 37° C, a placa foi lavada 3 vezes com PBSt e foram adicionados 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB) como substrato. Depois de 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi parada pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 1 M. As absorbâncias foram lidas automaticamente a 450 nm em um leitor Titertek Multiskan MCC/340.

c. Título de anticorpo (σ), é expresso como \log_2 título, onde título é a recíproca de um fator da diluição seriada do soro correspondente a 20 % do valor da absorbância de saturação, conforme definimos anteriormente (BUENO DA COSTA *et al.*, 1998).

3.4. Métodos Preparativos:

3.4.1. Ultraconcentração de Dtxd: foi realizada num ultraconcentrador Amicon, usando-se membrana de policarbonato (Millipore) com corte de 10 ou de 30 kDa.

3.4.2. Preparo de microesferas vazias: microesferas de PLGA foram preparadas pelo método da de dupla emulsão (O'DONNELL, 1997), onde se adicionaram 250 µl de PBS pH 7,2 contendo timerosal[®] 3,7 mM (PBS-Ti) a 400 mg de PLGA previamente dissolvidos em 4 mL de CH₂Cl₂. Esta mistura foi então submetida a um emulsificador Ultraturax[®] a 24 000 rpm durante 2 minutos. A emulsão foi imediatamente adicionada a 20 mL de solução de PVA (poli álcool vinílico) a 2% e submetida à agitação de 13 500 rpm no Ultraturax[®] por 2 minutos. O solvente foi evaporado, sob agitação suave a 1000 rpm, durante 3 horas à temperatura ambiente. As microesferas foram coletadas após centrifugação a 2000 g durante 10 min. Em seguida, as microesferas foram lavadas três vezes com água e então ressuspensas em 2 mL de solução de PVA a 1 %. Após congelamento durante uma noite, as microesferas foram liofilizadas durante 24 horas e estocadas à -20° C até a hora de uso (O'DONNELL *et al.*, 1997). As microesferas foram observadas ao microscópio óptico como controle de preparação.

3.4.3. Preparo de microesferas contendo Dtxd: foram preparadas como descrito anteriormente, sendo que se adicionou Dtxd (50 mg/mL) ao tampão de uso. Controles de produção: foram, o rendimento da preparação, a eficiência de encapsulação e visualização ao microscópio óptico.

3.4.4. Preparo de microesferas contendo Ponceau S como marcador do conteúdo aquoso interno: foram preparadas como descrito anteriormente, sendo que se adicionou corante Ponceau S 1,34 mM ao tampão de uso. Controles de produção: foram, o rendimento da preparação, a eficiência de encapsulação e visualização ao microscópio óptico.

3.5. Ensaios *in vitro*.

3.5.1. Mecanismo de degradação de Dtxd em meio contendo ácido láctico e timerosal[®]: amostras de Dtxd 9,4 mM em PBS pH 7,2 contendo 0,95 mM de timerosal[®] foram incubadas com ácido láctico 0,75 M por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação a amostra foi submetida à análise em HPLC e espectroscopia de fluorescência. Para a análise por HPLC utilizou-se coluna de gel filtração QC-PAK GFC 300 (7,8 mm x 15 cm, Vt = 7,17 mL), previamente equilibrada com PBS pH 7,2. As amostras foram injetadas a um fluxo de 0,6 mL/ minuto a 20° C. As eluições foram seguidas por medida de absorvância a 269 nm. Foram realizados também espectros de fluorescência, usando-se o comprimento de onda de 269 nm para excitação e 280 a 480 nm para emissão. Controle incubou-se por 10 minutos Timerosal[®] 9,2 µM em temperatura ambiente com ácido láctico 0,75 M. A mistura de reação foi também analisada por HPLC e por espectroscopia de fluorescência.

3.5.2. Efeitos dos parâmetros variáveis do processo de preparação de microesferas sobre os tamanhos das partículas formadas.

Este estudo foi feito de acordo com nossa publicação (NAMUR *et al.*, 2006). Desenhou-se um modelo estatístico experimental fatorial ($2^3 + 3PC$) com dois níveis de estudo (+1 e -1), três fatores variáveis do processo (2^3) com três pontos centrais (0) para se desenvolver, de uma forma controlada, microesferas com diferentes tamanhos.

Os três fatores escolhidos para se estudar foram: **a.** velocidade de agitação durante a etapa de formação da segunda emulsão; **b.** relação entre os volumes das fases dispersa (FD) e contínua (FC); **c.** concentração de PVA (poli álcool vinílico) na fase contínua. As condições experimentais deste desenho foram resumidas na tabela 1.

Tabela 1: Relação entre as os níveis e fatores para os diversos parâmetros do processo de produção de microesferas.

Ponto Experimental	PVA		Fases dispersa e contínua		Segunda emulsão	
	Níveis	Concentração (%)	Níveis	Relação FD:FC	Níveis	Velocidade de agitação
1	-1	0,5	-1	1:5	-1	13000
2	+1	3,5	-1	1:5	-1	13000
3	-1	0,5	+1	1:20	-1	13000
4	+1	3,5	+1	1:20	-1	13000
5	-1	0,5	-1	1:5	+1	19000
6	+1	3,5	-1	1:5	+1	19000
7	-1	0,5	+1	1:20	+1	19000
8	+1	3,5	+1	1:20	+1	19000
9	0	2	0	1:12,5	0	16000
10	0	2	0	1:12,5	0	16000
11	0	2	0	1:12,5	0	16000

Os dois níveis (+1 e -1) e o ponto central (0) usados para a velocidade de agitação foram: 19000 rpm, 13000 rpm e 16000 rpm, respectivamente.

Os dois níveis (+1 e -1) e o ponto central (0) usados para a relação FD/FC foram: 1:20; 1:5 e 1:12,5, respectivamente.

Os dois níveis (+1 e -1) e o ponto central (0) usados para concentração de PVA na fase contínua foram: 3,5 %; 0,5 % e 2,0 %, respectivamente.

Para a análise dos dados utilizou-se o programa STATISTICA[®] desenvolvido pelo environment software (Statsoft, Tulsa, OK). As microesferas foram produzidas como o descrito no item de seus preparos.

3.5.3. Efeito do meio e do tempo de incubação sobre a conformação de Dtxd.

Foram preparadas MS vazias de PLGA para se estudar o efeito dos monômeros de ácido láctico (L) ou glicólico (G) e oligômeros (PLG) liberados durante a degradação da matriz polimérica sobre a estrutura do Dtxd. Foram realizadas as seguintes incubações: a. MS-PLGA vazias (5 mg/mL) com Dtxd 17 μ M em PBS, pH 7,2; b. SDS a 1 % em PBS, pH 7,2 com Dtxd 17 μ M e c. MS-PLGA (5 mg/mL) e SDS a 1 % com Dtxd 17 μ M. Incubaram-se, em triplicatas, as amostras a 37 °C, sob agitação suave em banho-maria, por no mínimo 60 dias. Em intervalos de sete dias foram tomadas alíquotas que em seguida foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram tomados para se analisar a conformação do Dtxd através de CD, HPLC e a identidade imunológica por ELISA. Como controle foram incubadas 10 mL de Dtxd (17 μ M) em PBS pH 7,2 contendo Timerosal[®] durante o mesmo período de tempo.

3.5.4. Efeito do tempo incubação sobre a matriz polimérica de MS-PLGA em solução.

a. **Cinética de degradação da matriz de MS (PLGA de 55 kDa):** tomaram-se 20 mg de MS-PLGA (50/50) (Mw de 45-75 kDa) vazias e adicionou-se 1 mL de PBS, pH 7,2 contendo timerosal[®] 37 μ M como conservante. Triplicatas destas

preparações foram incubadas a 37 °C sob agitação suave, por um período de no mínimo 30 dias. Em intervalos de sete dias foram tomadas alíquotas que em seguida foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram tomados para se analisar a produção de ácido láctico no meio e a variação de pH. Os precipitados foram observados em microscópio de inversão de fase.

b. Efeito do peso molecular do PLGA (12, 34 ou 63 kDa) e de sua metilação carbóxi-terminal (-COO-Me): Tomaram-se 20 mg de microesferas de PLGA (50:50) (Mws 12, 34 ou 63 kDa) com a terminação polimérica livre (-COOH) ou metilada (-COO-Me) vazias e adicionaram-se 2 mL de PBS, pH 7,2 contendo azida 0,02 % como conservante e incubaram-se a 37°C sob agitação suave. Em intervalos de sete dias foram retiradas alíquotas, que em seguida foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram tomados para se analisar a produção de ácido láctico no meio, em sistema de HPLC (vide método para detalhes). Os precipitados foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura.

3.5.5. Variações estruturais no Dtxd após a primeira emulsificação.

a. Efeito dos sais da série de Hofmeister na solubilidade de Dtxd durante a primeira emulsificação: o Dtxd foi diluído a uma concentração final de 5 mM em KSCN, NaH₂PO₄, NaCl ou MgCl₂ em concentrações de 0 a 150 mM de sal (0, 10, 30, 50, 70, 90, 100 e 150 mM). Adicionaram-se 2 mL de cada solução de Dtxd 5 mM nas diferentes concentrações dos sais a 8 mL de CH₂Cl₂ e emulsificaram-se a 24 000 rpm por dois minutos. Após a emulsificação as amostras foram centrifugadas a 3 000 rpm por 10 minutos e as fases aquosas foram retiradas e analisadas por absorbância a 269 nm e por HPLC.

b. Efeito dos sais da série de Hofmeister na estrutura da fração solúvel de Dtxd após a primeira emulsificação. As fases aquosas obtidas após interação entre Dtxd/CH₂Cl₂ foram analisadas estruturalmente por HPLC, Fluorescência, CD e ELISA.

3.5.6. Efeito do KSCN na eficiência de encapsulação do Dtxd em MS de PLGA.

Foram produzidas duas preparações de microesferas de PLGA contendo Dtxd utilizando-se o polímero de 12 kDa com carboxi terminal livre ou metilada. As microesferas foram produzidas como descrito anteriormente sendo que na solução aquosa da primeira emulsão, contendo Dtxd (50 mg/ml), foram adicionados KSCN numa concentração final de 30 mM. Após preparo das microesferas e liofilização, calculou-se a eficiência de Dtxd.

3.5.7. Efeito das variáveis de composição dos polímeros sobre a cinética de liberação de Dtxd.

Foram produzidas seis preparações de MS de PLGA contendo Dtxd com seis diferentes tipos de polímeros cujas características estão na tabela 2. Usou-se azida 0,02% como conservante. As preparações foram analisadas quanto seu rendimento, sua eficiência de encapsulação e aspecto morfológico. A morfologia foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Tabela 2: Características físico-químicas dos polímeros.

Nome de fantasia	Monômeros (50:50)	Índice de viscosidade	Peso Molecular (kDa)	Terminação carboxi
RG 502	D,L-láctico-co-glicólico	0,16 - 0,24	12	-CH ₃
RG 502 H	D,L-láctico-co-glicólico	0,16 - 0,24	12	-H
RG 503	D,L-láctico-co-glicólico	0,32 - 0,44	34	-CH ₃
RG 503 H	D,L-láctico-co-glicólico	0,32 - 0,44	34	-H
RG 504	D,L-láctico-co-glicólico	0,45 - 0,60	63	-CH ₃
RG 504 H	D,L-láctico-co-glicólico	0,45 - 0,60	63	-H

a. Efeito do peso molecular do polímero sobre a cinética de liberação de Dtxd das MS: Tomaram-se 80 mg de microesferas de PLGA (50/50) (Mw 12, 34 ou 63 kDa) contendo Dtxd. Adicionaram-se 2 mL de PBS, pH 7 contendo azida 0,02 % como conservante. Foram preparadas triplicatas destas amostras que foram incubadas a 37° C sob agitação suave. Em intervalos de sete dias os frascos contendo as amostras eram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos e retiravam-se 2 mL do sobrenadante. Adicionavam-se 2 mL de PBS pH 7 contendo azida 0,02% ao pellet. A liberação de Dtxd foi quantificada por absorvância no uv a 269 nm e por sistema de HPLC. Para análise do reconhecimento imunológico da Dtxd liberada, as amostras foram diluídas a uma mesma concentração e então analisadas por ELISA. Mediram-se também o pH dos sobrenadantes.

b. Efeito da metilação terminal (-COO-Me) do PLGA sobre a cinética de liberação de Dtxd das MS: Tomaram-se 80 mg de microesferas de PLGA (50/50) (Mw 12, 34 ou 63 KDa) com a terminação polimérica livre (-COO-H) ou metilada (-COO-Me), contendo Dtxd. Adicionaram-se 2 mL de PBS, pH 7 contendo azida 0,02 %. Foram preparadas triplicatas destas amostras que foram incubadas a 37° C sob agitação suave. Em intervalos de sete dias os frascos contendo as amostras eram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos e retiravam-se 2 mL do sobrenadante. Adicionavam-se 2 mL

de PBS pH 7 contendo azida 0,02 % ao precipitado. A liberação de Dtxd foi quantificada por absorvância no uv e por sistema de HPLC. Para análise do reconhecimento imunológico da Dtxd liberada, as amostras foram diluídas a uma mesma concentração e então analisadas por ELISA. Mediu-se também os pHs dos sobrenadantes.

3.6. Ensaio *in vivo*

3.6.1. Imunizações de camundongos.

Foram usados camundongos Balb/C, mantidos no Biotério do Instituto Butantan.

a. Efeito da microencapsulação do toxoide diftérico em PLGA sobre a produção de anticorpos anti-diftérico em camundongos.

Dois grupos de camundongos de 6 a 8 animais foram injetados com a dose (50 µg) de Dtxd na forma livre ou encapsulado em microesferas de PLGA 50:50 (Massa molar 55 kDa). A produção de anticorpos formados foi analisada por ELISA.

b. Imunização de camundongos com baixas doses de Dtxd livre e encapsulado em MS.

Quatro grupos de camundongos foram injetados com 1 ou 5 µg de Dtxd encapsulado em microesferas de PLGA 50:50 (Massa molar 55 kDa) ou livre. A formação de anticorpos (IgG total) foi dosada por ELISA.

c. Estudo do efeito da matriz polimérica e do tempo da administração da dose reforço sobre a produção de anticorpos anti-diftérico (IgG1 e IgG2a).

Grupos de 4 a 5 animais foram imunizados com 5 µg de Dtxd encapsulado em microesferas de PLGA (50:50) Mw 12 kDa (-COOH), Mw 12 kDa (-COOMe) ou Mw 63 kDa (-COOH). Como controle um grupo de 4 animais recebeu a dose de Dtxd (5 µg) na

forma livre. As doses de reforço foram administradas após 43 ou 138 dias da primeira imunização. Foram analisadas por ELISA, as produções de IgG1 e IgG2_a.

4. RESULTADOS.

4.1 Caracterizações do Dtxd produzido pelo IBu e usado neste trabalho.

4.1.1. Espectroscopias de absorção no uv, fluorescência e CD.

A idéia central deste projeto foi a de se encapsular Dtxd nas condições em que é produzido no Instituto Butantan. Para analisar a estrutura e desenvolver métodos de dosagem da proteína do Dtxd antes, durante e após o processo de microencapsulação foram realizadas caracterizações do toxoide produzido pelo IBu através de espectroscopia no uv, fluorescência e CD.

a. **Espectro no uv.** A vacina contra difteria (ou seja, o toxoide, Dtxd) é a toxina diftérica destoxificada. A vacina contém na sua formulação final timerosal[®] a 150 ppm (37 μ M) como conservante. O timerosal[®] tem um máximo de absorção em 228 nm (**Figura 1**). A amplitude deste pico é grande, começando em λ (comprimento de onda) abaixo de 200 nm e finalizando em 300 nm. Isto causa uma séria interferência naquelas situações em que a concentração de proteína é muito baixa.

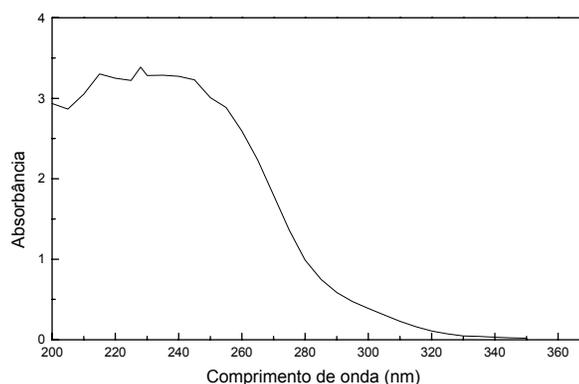


Figura 1. Espectro de absorção de uma solução de Timerosal[®] 24 μ M.

Por análise de absorbância no uv detectou-se o máximo de absorção para uma solução de Dtxd a 269 nm (**Figura 2**). Sabe-se que as cadeias laterais dos

aminoácidos aromáticos absorvem nesta região do uv (STOSCHECK, 1990). O W (triptofano), Y (tirosina) e a F (fenilalanina) absorvem a 280, 274,5 e 258 nm, respectivamente com coeficientes de extinções molares de 5600; 1400; e 206 L. mol⁻¹.cm⁻¹ (STOSCHECK, 1990). Isto significa que a contribuição na Abs 280 nm do W é a maior e que a da F a menor. Considerando que o λ e o coeficiente de absorção molar do timerosal[®] nestas condições é muito alto e amplo (vai de menos de 200 nm a 300 nm) as absorbâncias relativas a estes aminoácidos poderia ser mascarada (CAMPANA *et al.*, 2004; QUINTILIO *et al.*, 1997). Nota-se, pelo espectro de absorbância no uv do Dtxd que o máximo de absorção foi deslocado para a região do violeta (**Figura 2**). Todas estas informações foram importantes para a padronização do método por HPLC.

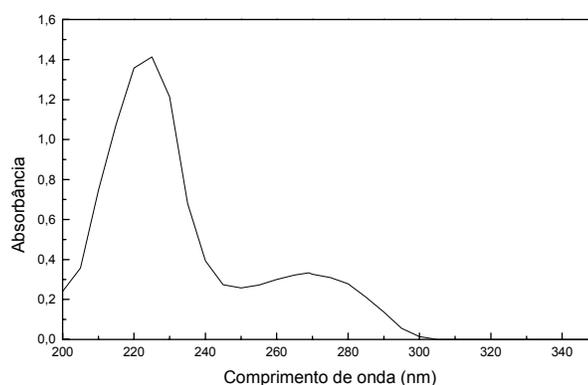


Figura 2. Espectro de absorção de Dtxd 19 mM em PBS pH 7,2 contendo timerosal[®] 37 μ M.

Este novo método de dosagem de proteína a 269 nm, junto com o método de purificação extra de Dtxd foram objetos de uma publicação nossa (CAMPANA *et al.*, 2004). Nesta tese, para a retirada de Timerosal[®] que poderia interferir nos resultados de microencapsulação (será discutido adiante), o Dtxd vindo da produção do IBu foi ultraconcentrado em sistema Amicon. O Timerosal[®] nos ensaios *in vitro* foi substituído pelo conservante NaN₃. Para experimentos *in vivo* o conservante Timerosal[®] foi mantido.

b. Fluorescência. Por análise fluorescência de uma solução de Dtxd 1,88 mM em pH 7,2 detectou-se que o máximo de emissão ocorreu a 340 nm, utilizando-se excitação a 269 nm (**Figura 3**). Essa análise é importante para verificação de mudança estrutural no Dtxd observando-se alterações de hidrofobicidade por consequência de maior ou menor exposição de aminoácidos hidrofóbicos como o W intrínscico, por exemplo.

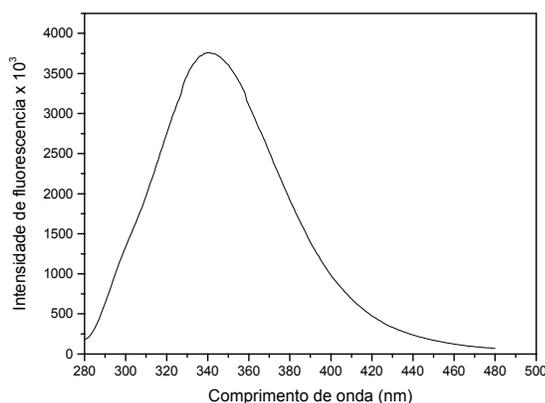


Figura 3. Espectro de fluorescência de Dtxd . A preparação IBu de Dtxd foi de 1,88 mM de Dtxd em PBS contendo 37 μ M de Timerosal[®]. Condições operacionais: excitação a 269 nm e emissão foi medida entre 280 e 480 nm.

c. Dicroísmo Circular. Por análise de CD observou-se que a Dtxd apresentou o efeito Cotton negativo a 222 nm, correspondente a porções de hélice- α e estrutura- β no Dtxd (**Figura 4**). O conteúdo em hélice- α de Dtxd foi calculado empiricamente ($[\Theta]_{222\text{nm}} + 3000/3900 \times 100$) segundo a literatura (GREENFIELD e FASMAN, 1969) e correspondeu a 76 %.

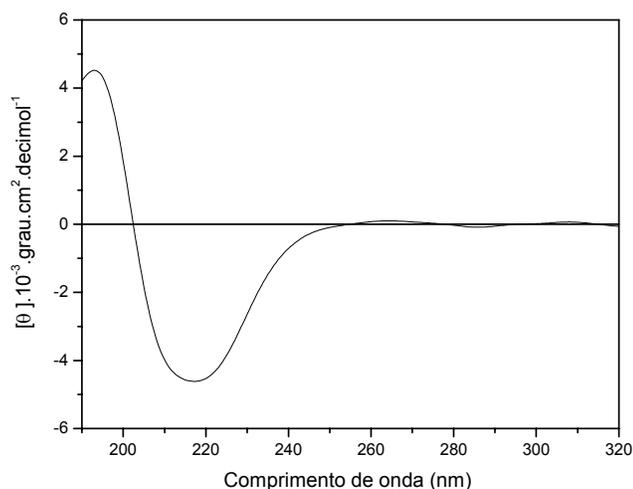


Figura 4. Elipticidade molar em função do comprimento de onda do Dtxd 86 μM em pH 7,2 contendo 37 μM de Timerosal[®]. Os espectros de CD foram realizados utilizando-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico.

4.1.2. HPLC de DTxd, IBu.

Após verificação de que o λ máximo de absorção do Dtxd foi a 269 nm (**Figura 2**) realizou-se uma filtração em gel do Dtxd IBu em sistema de HPLC (CAMPANA *et al.*, 2004). Monitorou-se a eluição de Dtxd IBu contendo 0,37 mM de Timerosal[®] em sistema de HPLC (**Figura 5**). Observaram-se 5 picos de eluições, correspondentes ao dímero do Dtxd (2 Dtxd), monômero, fragmento B (FB), fragmento A (FA) e Timerosal[®] (**Figura 5**). Os tempos de retenção foram: 2 Dtxd = 4,725 minutos, Dtxd = 7,012 minutos, FB = 9,872 minutos e o FA = 10,341 minutos (**Figura 5**). O timerosal eluiu a 11,120 minutos após injeção da amostra. Esses valores de tempos de retenções (CAMPANA *et al.*, 2004) são compatíveis com as massas molares do Dtxd, FB e FA descritos na literatura (RAPPUOLI, 1997) e com os tempos de retenção de padrões de massa molar (a serem apresentados mais à frente na figura 8).

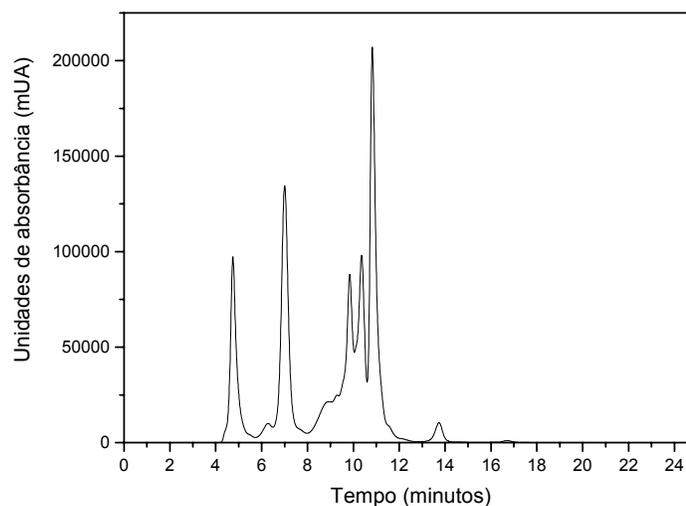


Figura 5: Perfil de eluição de Dtxd em sistema de HPLC. Foram aplicados 20 μ l da proteína em coluna de gel filtração QC-PAK GFC 300 (7,8 mm x 15 cm, Vt = 7,17 mL), previamente equilibrada com PBS pH 7,2, a um fluxo de 0,6 mL/ minuto a 20°C.

4.2. Analíticos quantitativos.

4.2.1. Dosagens de proteína pelos métodos de Lowry, Absorbância no ultra violeta a 280 nm ou a 269 nm e HPLC.

Para dosagem de proteínas escolheram-se três métodos de forma a serem compatíveis com os estudos de desenvolvimento de uma formulação de PLGA contendo Dtxd.

Adaptou-se o método de Lowry para pequenos volumes de forma a ser possível sua leitura em leitor automático de ELISA. O coeficiente de correlação entre a absorbância a 690 nm e a concentração de proteína foi de 0,99681, com uma linearidade de 0 a 1000 μ g de Dtxd. A correlação entre aumento de absorbância e aumento de concentração de Dtxd, utilizando absorbância a 280 nm, foi de 0,99987. Pode-se, portanto dosar Dtxd por ambos os métodos, uma vez que ambos são lineares e com bons coeficientes de correlação (**Tabela 3 e 2, Figura 6**). Foi interessante notar que a sensibilidade do método de Lowry para dosagens de Dtxd foi bem maior que a leitura de absorbância a 280 nm (**Figura 6**), uma vez que

a da reta ($B = 0,00841$) foi maior (compare-se com $0,00587$) (Tabela 3 dos resultados).

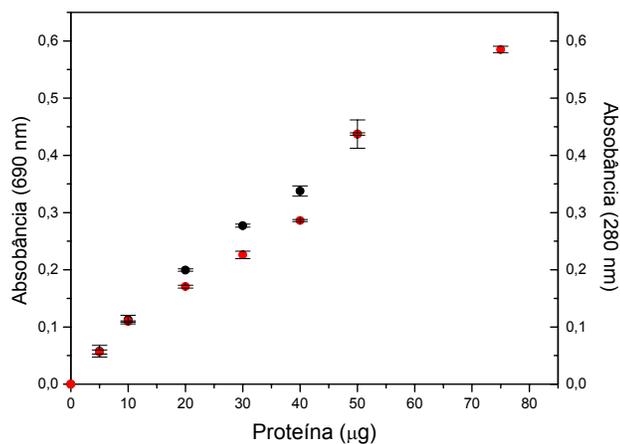


Figura 6- Comparação entre os métodos de Lowry (●) (absorbância a 690nm) e absorvância a 280 nm (●) para dosagem de Dtxd.

Já, a correlação entre Abs 269 nm para o Dtxd e aumento de concentração de proteína foi de $0,99815$, valor ligeiramente menor do que os outros métodos descritos anteriormente (Tabela 3).

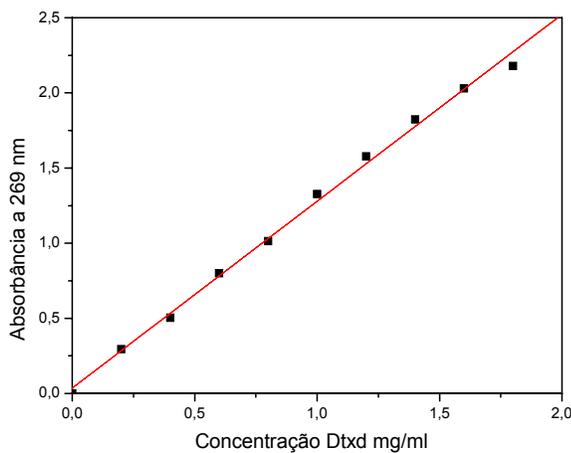


Figura 7. Curva padrão dosagem de Dtxd através da medida de abs a 269 nm. ($A = 0,03624$, $B = 1,24285$, $R = 0,99815$, $N = 10$ e $SD = 0,04861$).

Quando comparados os três métodos descritos observou-se que o de maior sensibilidade dentre eles, para a dosagem de Dtxd é o de Abs a 269 nm (Tabela 3 e CAMPANA *et al.*, 2004).

Tabela 3. Comparação entre os componentes das curvas de dosagens de Dtxd.

Parâmetro	Lowry		Abs 280 nm		Abs 269 nm	
	Valor	Desvio padrão	Valor	Desvio padrão	Valor	Desvio padrão
A	0,016971	0,00846	0,00462	0,002	0,03624	0,02857
B	0,00841	0,0003	0,00587	0,00004	1,24285	0,02676
R	0,99681		0,99987		0,99815	
SD	0,01377, N= 7		0,00347, N= 8		0,04861, N = 10	
P	1,1014 x 10 ⁻⁶		5,798 x 10 ⁻¹²			

O Dtxd contém 5 resíduos de triptofano (W) 17 resíduos de fenilalanina (F) e 29 de tirosina (T) (Esquema 3), cujos coeficientes de extinções molares são 5,33; 1,34 e 0,206 respectivamente. A região do ultravioleta onde o toxoide absorve é devida, principalmente, aos resíduos de T e F, mais abundantes do que W. Os máximos de absorção de W, F e T são 280 nm, 274,5 nm e 258 nm, respectivamente. As quantidades de F e T na Dtxd são 3,4 e 5,8 vezes maiores do que o W. A absorbitividade molar da F é 3,95 vezes menor do que a do W (STOSCHECK, 1990), mas como o Dtxd contém 3,4 vezes mais F do que W, isto fica compensado. Além disso, o meio afeta o microambiente de absorção das proteínas na região do uv e aqui, no caso do Timerosal[®] houve um deslocamento da Abs para a região do ultra-violeta.

	Aminoácidos					
1	GADDVVDSSK	SFVMENFSSY	HGKPGYVDS	IQKGIQKPKS	GTQGNYYDDDW	KGFYSTDNKY
61	DAAGYSVDNE	NPLSGKAGGV	NPLSGKAGGV	VKVTYPGLTK	TIKKELGLSL	TEPLMEQVGT
121	EEFIKRFQGDG	ASRVVLSLPF	AEGSSSVEYI	NNWEQAKALS	VELEINFETR	GKRGQDAMYE
181	YMAQACAGNR	VRRSVGSSLS	CINLDWDVIR	DKTKTKIESL	KEHGPIKNKM	SESPNKTIVSE
241	EKAKQYLEEF	HQTALEHPEL	SELKTVTGTN	PVFAAGANYAA	WAVNVAQVID	SETADNLEKT
301	TAALSILPGI	GSMGIADGA	VHHNTEEIVA	QSIALSSLMV	AQAIPLVGEL	VDIGFAAYNF
361	VESIINLFQV	VHNSYNRPAY	SPGHKTQPF	HDGYAVSWNT	VEDSIIRTFG	QGESGHDIKI
421	TAENIPLPIA	GVLLTIPGK	LDVNKSKTHI	SVNGRKIRMR	CRAIDGDVTF	CRPKSPVYVG
481	NGVHANLHVA	FHRSSSEKIH	SNEISSDSIG	VLGYQKTVDH	TKVNSKLSLF	FEIKS

Esquema 3. Estrutura primária da Dtx (Toxina diftérica)

Os resíduos dos seguintes aminoácidos estão destacados W, F e T. (RICCI *et al.*, 1998)

Concluiu-se que o Dtxd pode ser dosado por medida de absorção no uv (269 nm), num método rápido e sem necessidade de se usar reagentes (CAMPANA et al., 2004). Este dado foi útil quando aplicado no método desenvolvido no sistema de HPLC.

A partir dos dados do perfil de eluição do Dtxd em sistema de HPLC, tornou-se possível a identificação de cada espécie molecular da preparação de Dtxd-IBu. Os tempos de retenções de cada pico de eluição de Dtxd foram comparados com os tempos de retenções de padrões de pesos moleculares conhecidos que também foram aplicados em coluna de HPLC (**Figura 8**), nas mesmas condições que o Dtxd.

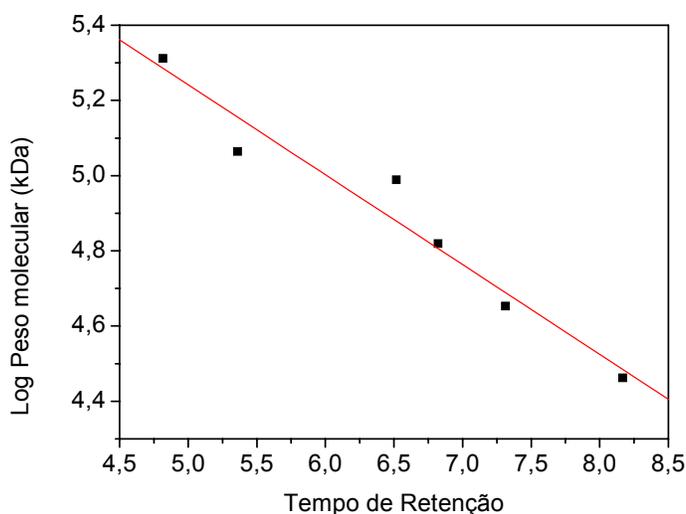


Figura 8. Log de Massa molar contra tempo de retenção. Foram aplicados 20 μ l de uma solução padrão de massa molar em coluna de gel filtração QC-PAK GFC 300 (7,8 mm x 15 cm, $V_t = 7,17$ mL), previamente equilibrada com PBS pH 7,2, a um fluxo de 0,6 mL/ minuto a 20 °C. A solução padrão de massa molar continha as proteínas Miosina (Mw 205 kDa, RT = 4,82), B-Galactosidase (116 kDa, RT = 5,34), Fosforilase B (97,4 kDa, RT = 6,52), Albumina de soro bovino (66 kDa, RT = 6,85), Albumina de ovo (45 kDa, RT = 7,33) e Anidrase carbônica (29 kDa, RT = 8,16).

A partir dos cromatogramas obtidos com diluições conhecidas do Dtxd, construíram-se curvas padrão para cada uma das espécies moleculares existentes no Dtxd padrão (**Figura 9**).

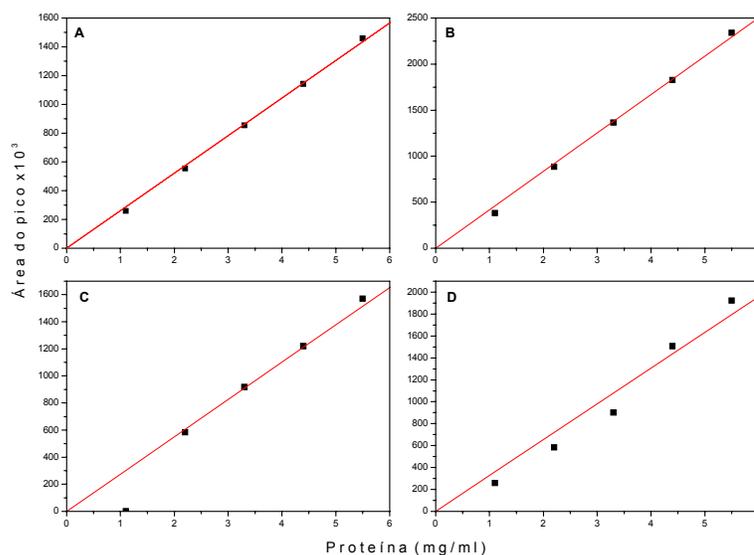


Figura 9: Curvas padrão das espécies moleculares do Dtxd: Foram aplicados 20 μ l da proteína em coluna de gel filtração QC-PAK GFC 300 (7,8 mm x 15 cm, $V_t = 7,17$ mL), previamente equilibrada com PBS pH 7,2, a um fluxo de 0,6 mL/ minuto a 20°C. A: Dímero (2 Dtxd); B: Monômero (Dtxd); C: Fragmento B e D: Fragmento A.

Observaram-se correlações entre aumento das concentrações de cada espécie molecular de Dtxd e aumento das áreas dos cromatogramas (R entre 0,9999 e 0,9908). Observou-se que a sensibilidade do método foi alta, como pode ser verificado através dos coeficientes angulares e os coeficientes de correlações obtidos (Tabela 4).

Tabela 4: Comparações entre os parâmetros da curva padrão de dosagem dos componentes de Dtxd através de HPLC, monitorado por Abs a 269 nm.

Espécies moleculares	Coefficiente de correlação (R)	B
Dímero	0,9999	261,0744
Monômero	0,9998	471,2727
Fragmento B	0,9908	275,1570
Fragmento A	0,9925	326,5950

4.2.2. Controles de encapsulação: rendimento e eficiência de encapsulação de uma preparação típica de microesferas.

A eficiência de encapsulação de Dtxd em MS de PLGA (50: 50) foi de 41,49 %, quando se usou o método de dupla emulsão com evaporação de solvente (O'DONNELL, 1997; LANGER, 1990). Uma vez que os parâmetros do processo de preparo de MS interferem no tamanho das partículas obtidas (NAMUR *et al.*, 2006) e conseqüentemente na eficiência de encapsulação (NAMUR *et al.*, 2006), é importante aqui, lembrar que as condições usadas para estas partículas obtidas nesta preparação foram: velocidade de rotação da segunda emulsão 13 000 rpm, relação FC/FD (Fase contínua/fase dispersa) de 1:5 e concentração de PVA foi de 2 %. A capacidade de encapsulação destas microesferas foi de 14,9 µg de Dtxd/mg de microesfera PLGA. Considerando as massas molares de Dtxd e de PLGA, a relação entre Dtxd/PLGA foi de 0,034. As partículas obtidas, de 5 µm, apresentaram uma superfície rugosa (**Figura 10**).

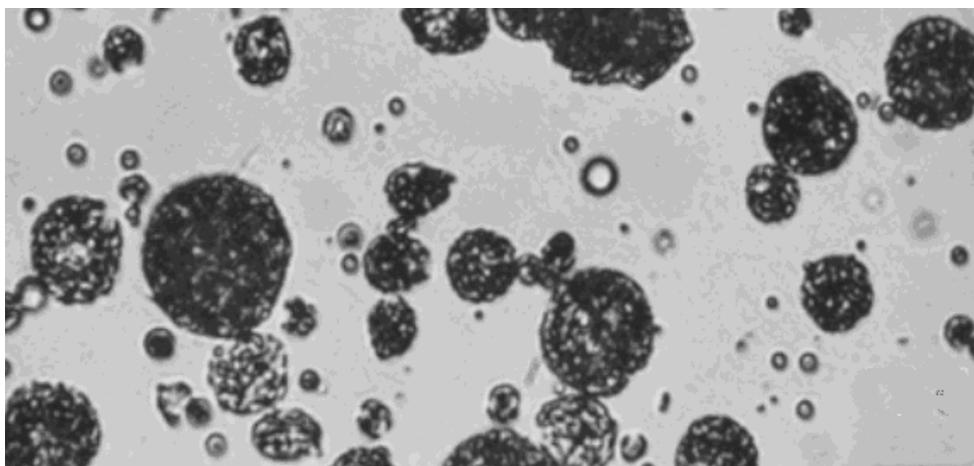


Figura 10: Micrografia por de inversão de fase de microesferas de PLGA 50:50 (45 - 75 KDa) contendo Dtxd.

4.2.3. Dosagem de ácido láctico.

Sabe-se que os produtos finais de degradação da matriz de microesferas de PLGA são o ácido láctico e o glicólico. O polímero de PLGA usado foi o composto por 50 % de lactato e 50 % de glicolato (PLGA 50:50). Dosaram-se amostras de lactato para se fazer uma curva padrão de forma a ser possível a monitoração da cinética de degradação da matriz de microesferas de PLGA, através da liberação deste ácido.

a. **Método colorimétrico:** Adaptaram-se o método descrito na literatura para dosagem de lactato (TIETZ, 1995; WESTGARD *et al.*, 1972) para microensaios em placa de ELISA. O método é baseado na conversão de ácido láctico em piruvato e H_2O_2 pela oxidase láctica. Na presença da H_2O_2 formada, a peroxidase catalisa a condensação oxidativa dos precursores do cromógeno a produzir cor com absorção máxima em 540 nm. O aumento da absorbância neste comprimento de onda é diretamente proporcional à concentração de lactato na amostra (TIETZ, 1995; WESTGARD *et al.*, 1972). O comprimento de onda mais próximo de 540 nm no leitor automático de placas de ELISA usado é a 550 nm. Comparando-se as leituras a 540 nm ($R = 0,99488$) (Figura 11) e a 550 nm ($R = 0,99965$) (Figura 12) adaptaram-se as leituras para este comprimento de onda, sem que houvesse uma distorção acentuada no coeficiente de correlação que continuou confiável. Uma vez adaptado o método de dosagem de lactato, pode-se então diminuir em 10 vezes o volume de reagentes e amostras de forma a se fazer microdosagens automáticas em placa de ELISA. *Observa-se (Figuras 11 e 12) que o método foi linear até 15 $\mu\text{g/mL}$ de lactato.*

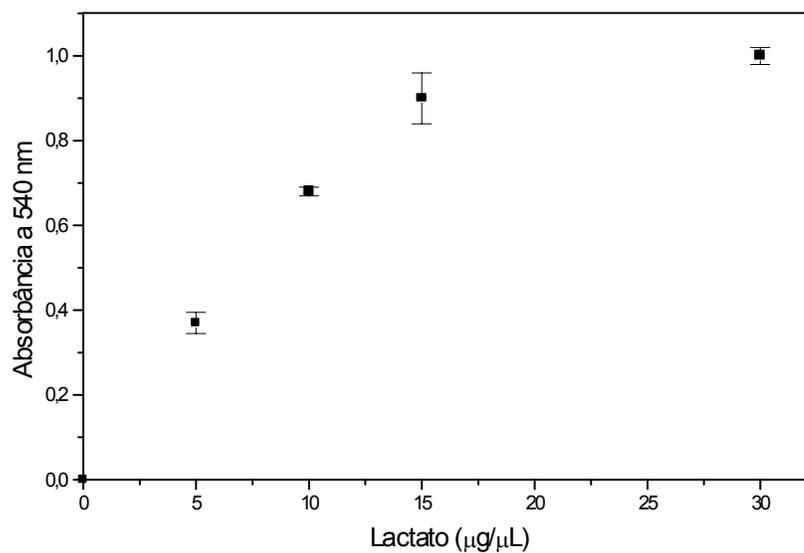


Figura 11. Curva padrão para dosagem de lactato. As amostras, num volume final de 1mL foram processadas como o descrito em materiais e métodos.

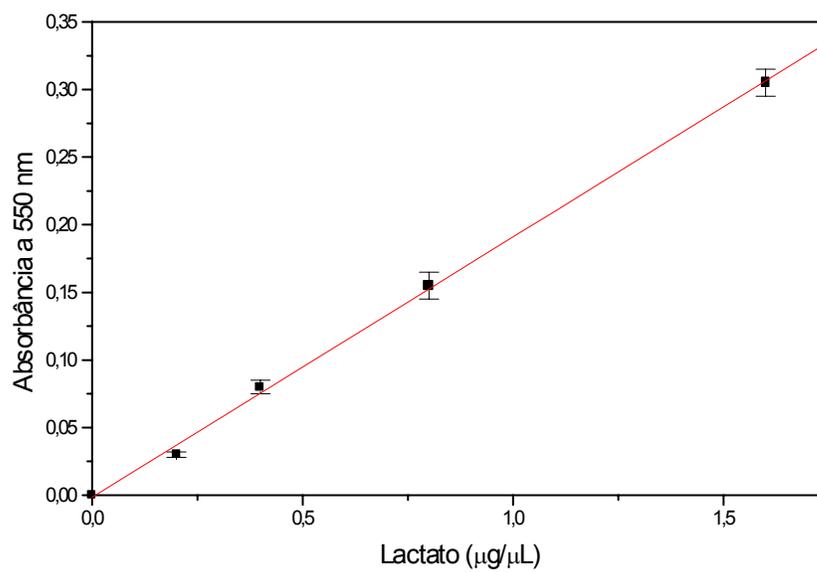


Figura 12. Adaptação de método de dosagem de lactato para *microdosagens* em leitor automático de ELISA. Os volumes finais das amostras são de 200 μL . $A = 0,00079$ e $B = 0,19354$. O coeficiente de correlação $R = 0,999965$, com desvio padrão de $0,00372$ $N = 5$, $P = 7,7204\text{E-}6$.

b. **Dosagem de ácido láctico por HPLC:** a partir dos cromatogramas obtidos com diluições conhecidas de lactato, construiu-se uma curva padrão (**Figura 13**) que apresentou um coeficiente de correlação de 0,9999. A equação da reta obtida foi:

$$y = 14,08928 \cdot X$$

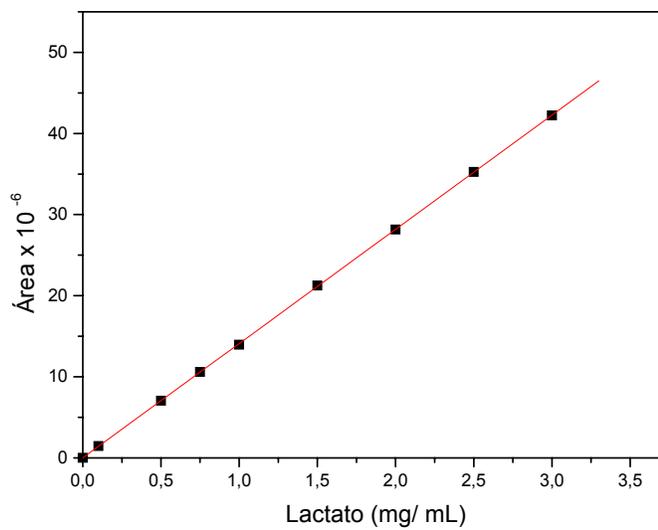


Figura 13: Curva padrão de lactato realizada em sistema de HPLC utilizando-se coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura de 65° C, Fluxo de 0,6 mL/min com detector de uv 215 nm.

4.2.4. Dosagem de Ponceau S.

Para se calcular a eficiência de encapsulação é preciso que se tenha um marcador de espaço aquoso interno. Escolheu-se o Ponceau-S, que tem coeficiente de extinção molar (ϵ) extremamente alto ($34\ 600\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$), com o máximo de absorvância a 492 nm. Preparou-se uma curva padrão de Ponceau S (**Figura 14**) com coeficiente de correlação excelente (0,99978).

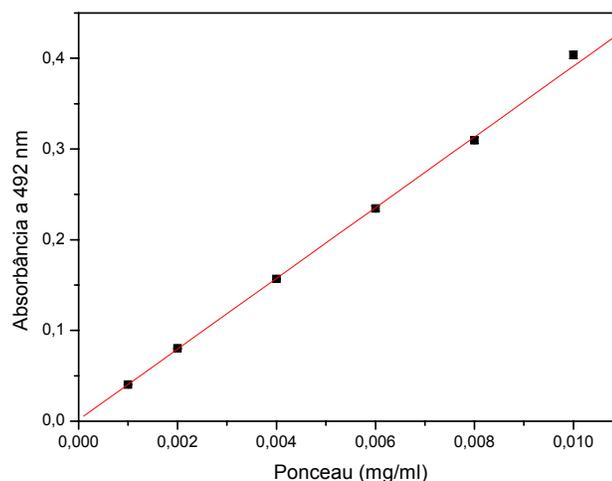


Figura 14: Curva padrão de Ponceau S. O Ponceau S foi diluído em água e a leitura da absorvância foi realizada a 492 nm, utilizando-se uma cubeta de 1 cm de caminho óptico.

A curva foi linear entre 0 e 10 µg de Ponceau S, com coeficiente de correlação entre absorvância a 492 nm e aumento de concentração de ponceau-S de 0,99978.

4.3. Ensaio Preparativos.

4.3.1. Ultraconcentração de Dtxd.

A quantidade de proteína a ser encapsulada é um ponto crítico no processo de encapsulação em microesferas de PLGA. Geralmente deve-se ter uma concentração maior que 20 mg de proteína por mL de solução. Chegou-se a uma concentração final de Dtxd de 0,9 mM (54,59 mg/mL). Não houve nenhum processo degradativo ou de agregação que pudesse ser detectado por espectroscopia no uv (Figura 15), por PAGE-SDS (Figuras 16 e 17) após a concentração de Dtxd.

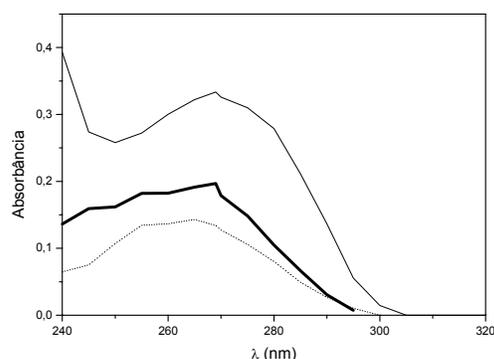


Figura 15. Espectro de absorção no ultravioleta das diversas amostras obtidas no processo de ultraconcentração de Dtxd. Dtxd concentrado (linha), Filtrado 10 kDa (negrito) e Filtrado 30 kDa (pontilhado).

Não se observou proteína de alta massa molar por PAGE-SDS (**Figura 16**). Através de interferometria calcularam-se as percentagens de cada uma das bandas referentes ao Dtxd a granel (estoque) e do retentato de Dtxd concentrado em membrana de 30 kDa (**Figura 16**).

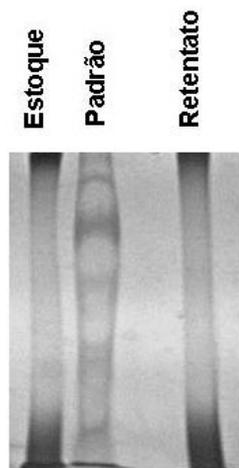


Figura 16. Perfil de PAGE-SDS das amostras obtidas nas diversas etapas de ultraconcentração. Gel de acrilamida a 05 %. (Padrões de massa molar de 220, 170, 116, 76 e 53 kDa). Não se observa nenhuma proteína de alta massa molar.

Não houve, significativamente, alteração nos conteúdos percentuais de 2 Dtxd, Dtxd, FB e FA depois da concentração do Dtxd em membrana de 30 kDa (**Figura 17 e Tabela 5**)

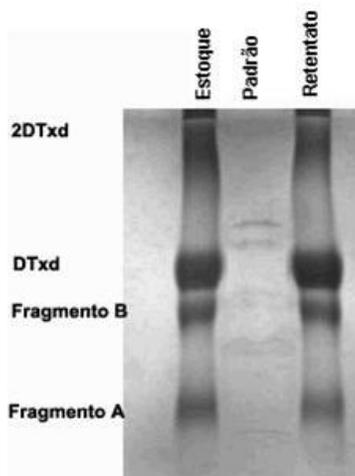


Figura 17. Perfil de PAGE-SDS das amostras obtidas nas diversas etapas de ultraconcentração. Observam-se as mesmas moléculas antes e após ultraconcentração, ou seja, 2 Dtxd, Dtxd, Fragmento B e Fragmento A. Gel de acrilamida a 12%. Padrões de 97, 66, 45, 30, 20 e 14,4 kDa.

Tabela 5. Comparação entre os conteúdos de cada componente molecular do toxoide diftérico antes e depois da concentração em membrana de 30 kDa.

Banda	Estoque (Dtxd a granel)	Retentato de 30 kDa de Dtxd
	(%)	(%)
1= Dímero de Dtxd	26,96	27,36
2 = Monômero de Dtxd	32,46	35,78
3 = Fragmento B	20,24	18,16
4 = Fragmento A	20,35	18,70

Estas amostras foram também submetidas a dicroísmo circular na região do ultravioleta para se verificar, em detalhes, se haveria alguma mudança na estrutura secundária destas preparações de Dtxd (**Figura 18**). Não houve alteração no conteúdo de hélice- α (**Figura 18**).

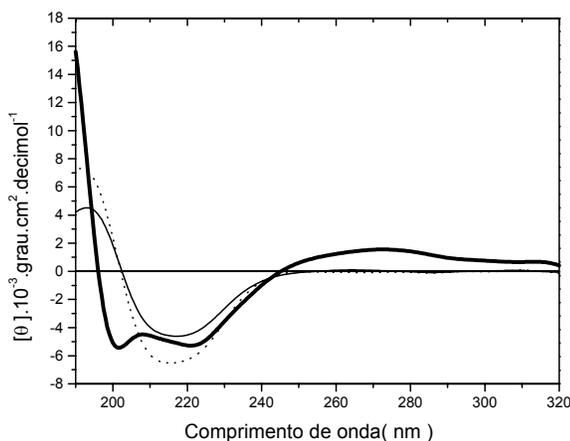


Figura 18. Elipticidade molar em função do comprimento de onda das amostras obtidas nas diversas etapas de ultrafiltração. Espectro realizado em cubetas de 0,1 cm de caminho óptico para as amostras de Dtxd estoque (produto a granel do IBu) (linha), Retentato da membrana de 30 KDa (pontilhado) e filtrado da membrana de 30 KDa (negrito).

Para se relacionar estrutura secundária de Dtxd e identidade imunológica, realizaram-se testes de ELISA com as mesmas preparações, usando-se como anticorpo anti-Dtxd, o anti-soro diftérico padrão do IBu (desenvolvido em cavalos). Todas as amostras de interesse foram reconhecidas pelo soro padrão, não houve perda da identidade imunológica durante o processo de concentração de Dtxd (**Figura 19**). Foi interessante também notar que a “identidade imunológica” do Dtxd também foi concentrada (**Figura 19**).

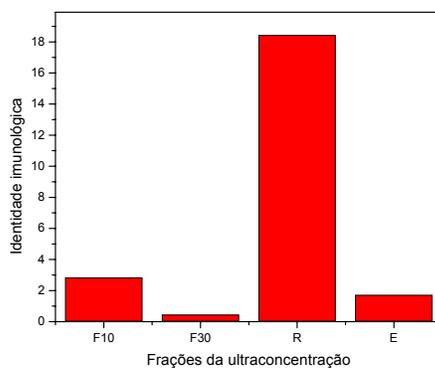


Figura 19. Identidade imunológica do Dtxd em função da fração da ultraconcentração. O Dtxd foi ultraconcentrado, seguindo-se por dosagem de proteína e realização de ELISA em cada uma das frações obtidas: F10 (Filtrado da membrana de corte de 10 kDa); F30 (Filtrado da membrana de corte de 30 kDa); R (retentato da membrana de corte de 10 kDa) e E (Dtxd padrão do IBu).

Concluiu-se que o Dtxd concentrado por ultrafiltração em membranas de policarbonato preservou suas integridades estruturais e imunológicas.

4.4. Ensaio *in vitro*.

Os objetivos dos estabelecimentos dos métodos analíticos das dosagens usadas nesta tese foram apresentados com o intuito de se demonstrar que eram confiáveis e adequados para os estudos de encapsulação que se seguiram. Uma vez demonstrado, serão apresentados agora ensaios *in vitro* e *in vivo* sobre a nova forma de apresentação da vacina contra difteria.

4.4.1. Efeitos dos parâmetros variáveis do processo de preparação de microesferas sobre os tamanhos das partículas formadas.

Resumidamente, desenhou-se um modelo estatístico experimental fatorial ($2^3 + 3PC$) com dois níveis de estudo (+1 e -1), três fatores variáveis do processo (2^3) com três pontos centrais (PC) (0) para se estudar, como produzir de uma forma controlada, microesferas com diferentes tamanhos. Os três fatores (variáveis do processo) escolhidos para se estudar foram: **a.** velocidade de agitação durante a segunda emulsificação; **b.** relação entre os volumes das fases dispersa (FD) e contínua (FC) da segunda emulsão e **c.** concentração de PVA (álcool polivinílico) na fase contínua.

Foram analisadas a importância dos efeitos das variáveis do processo e suas interações sobre os tamanhos médios das microesferas (Tabela 6). O test-*t* foi aplicado para se estimar a significância dos efeitos do processo. Para estimar o desvio padrão foram usadas triplicatas do ponto central (0). Observou-se que a velocidade de agitação (VA) e a concentração de PVA foram significantes na determinação do tamanho das microesferas. Não foi identificada nenhuma relação

entre capacidade de encapsulação da partícula e as variáveis do processo ou o diâmetro das partículas. As mesmas variáveis do processo (de duas em duas) como relação FD:FC, agitação da segunda emulsão e concentração de PVA foram analisadas também pelo gráfico de Pareto, para se avaliar como estes fatores influenciavam entre eles no tamanho das partículas obtidas. Observou-se que não há correlação entre concentração de PVA e FD:FC nos diâmetros das partículas (coeficiente de correlação = 0,30078). Em contrapartida a agitação da segunda emulsão e a concentração de PVA foram inversamente proporcionais aos diâmetros das microesferas. As análises foram feitas baseadas em 95% de intervalo de confiança (**Figura 20**).

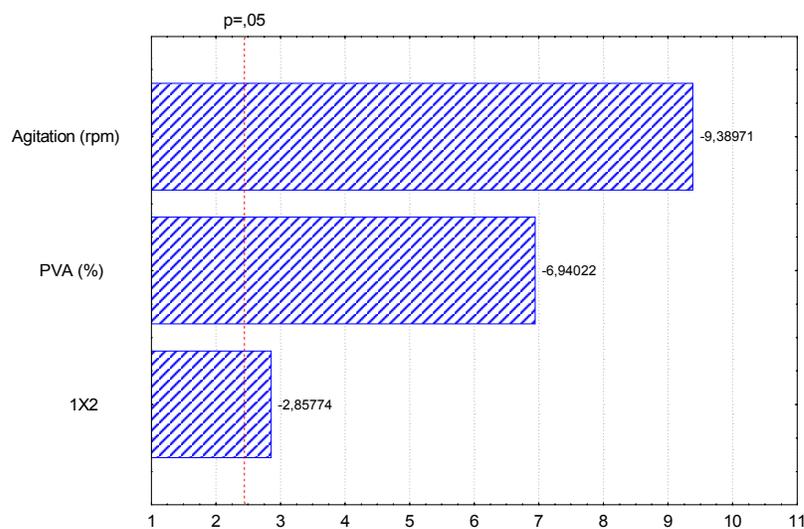


Figura 20: Efeitos da concentração de PVA e da velocidade de agitação da segunda emulsão e no tamanho das partículas de microesferas de PLGA.

Tabela 6: Efeito padronizado das variáveis do processo sobre os tamanhos médios das microesferas.

Variáveis do processo	Efeito relativo	Desvio Padrão	Valor p (nível de significância)
Ponto médio (0)	10,2273 *	0,1507*	0,0002*
PVA (%)	-4,2500*	0,3535*	0,0068*
FD:FC	1,2500	0,3535	0,0715
VA (rpm)	-5,7500*	0,3535*	0,0038*
PVA/ FD:FC	0,2500	0,3535	0,5527
PVA/VA	-1,7500*	0,3535*	0,0385*
FD:FC/ VA	0,7500	0,3535	0,1679

* Intervalo de confiança de 0,95

Obtiveram-se partículas entre 4 e 15 μm de diâmetro (Tabela 7). A maneira pela qual VA e concentração de PVA atuam sobre o tamanho das microesferas foi analisada através de superfície de resposta (Figura 21). O aumento na concentração de PVA com concomitante aumento da VA da segunda emulsão foi o que produziu microesferas de menor tamanho (4 μm). A menor concentração de PVA (0,5 %) e a menor VA usada produziu microesferas como maior tamanho (15 μm).

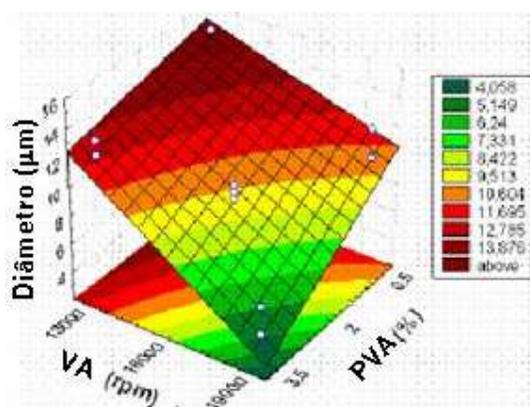


Figura 21. Superfície de resposta sobre o tamanho das microesferas de PLGA. Variáveis: velocidade de agitação e concentração de PVA. Os diâmetros 4 μm (■), 5 μm (■), 6 μm (■), 7 μm (■), 9 μm (■), 10 μm (■), 11 μm (■), 12 μm (■), 13 μm (■), 14 μm (■) and above (■).

Tabela 7: Comparação entre as características obtidas nas microesferas através da variação de três fatores do processo: concentração de PVA, relação de FD:FC e velocidade de agitação (VA).

Pontos	PVA (%)	FD:FC	VA (rpm)	Diâmetro (μm)	Eficiência de encapsulação (%)
1	0,5	1:5	13 000	15	38,08
2	3,5	1:5	13 000	12	41,92
3	0,5	1:20	13 000	15	49,9
4	3,5	1:20	13 000	13	40,9
5	0,5	1:5	19 000	10	35,5
6	3,5	1:5	19 000	4	36,5
7	0,5	1:20	19 000	12	44,8
8	3,5	1:20	19 000	6	33,6
9	2,0	1:12,5	16 000	8	44,1
10	2,0	1:12,5	16 000	8	49,3
11	2,0	1:12,5	16 000	8	38,08

O modelo linear usado para o ajuste das variáveis experimentais do processo foi o seguinte:

$$D = 10,22 - 2,12 [\text{PVA}] - 2,90 [\text{VA}] - 0,87 [\text{PVA}] [\text{VA}]$$

Onde D = diâmetro das partículas. A validade do modelo foi confirmada por análise estatística ANOVA.

Houve uma boa correlação ($R = 0,97703$) entre os diâmetros das partículas calculados e os diâmetros obtidos experimentalmente (**Figura 22**).

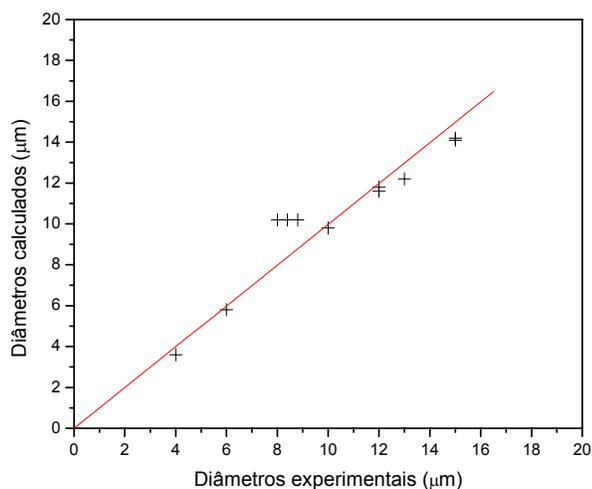


Figura 22. Comparação entre os diâmetros das partículas calculados e os diâmetros obtidos experimentalmente. Os valores da reta foram: $B = 0,99776$; $R = 0,97703$; desvio padrão= 1.02321; $N = 11$ e $p < 0,0001$.

A eficiência de encapsulação média de Ponceau pelas partículas de PLGA foi de $41,15 \pm 5,61$. Foi possível medir o conteúdo de Ponceau S após a digestão das microesferas com NaOH porque a absorbância do corante não foi modificada no meio altamente alcalino.

Partículas regulares tanto em distribuição de tamanho ou em características de superfície foram produzidas através do método de dupla emulsão. Foram observadas superfícies lisas tanto para microesferas vazias como para aquelas contendo Ponceau S (**Figura 23**).

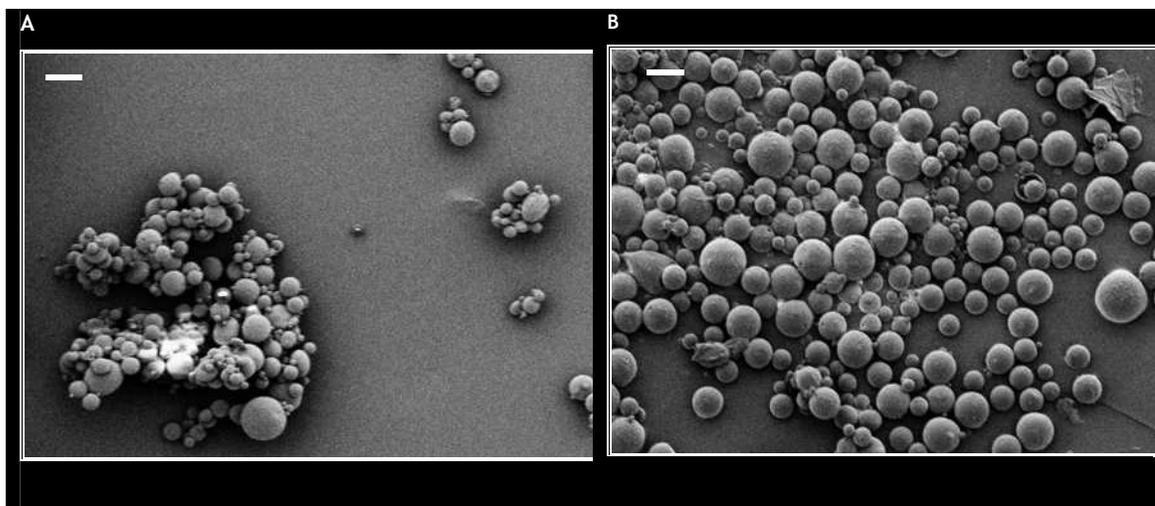


Figura 23: Micrografia eletrônica de varredura de microesferas produzidas nos pontos experimentais 2 e 7. **A.** Microesferas produzidas a 13 000 rpm, usando-se 3,5 % de PVA, relação FD:FC de 1:5, diâmetro medido de 12 μm . **B.** Microesferas produzidas a 19 000 rpm usando 0,5 % de PVA, relação FD:FC de 1:20 e de diâmetro medido de 12,2 μm (Aumento : 1000 X, $\bar{} = 15 \mu\text{m}$)

Concluiu-se que através do desenho experimental 2^3 com triplicatas no ponto central, puderam-se examinar a influência das variáveis do processo (Água₁/Óleo/Água₂, A₁/O/A₂) de obtenção de microesferas sobre o tamanho das partículas. Através da combinação das principais variáveis do processo, a saber, concentração de PVA e velocidade de agitação da segunda emulsificação obtiveram-se microesferas com uma ampla faixa de tamanhos definidos.

4.4.2. Efeito do meio e do tempo de incubação sobre a conformação de Dtxd.

Sabe-se da literatura (JIANG *et al.*, 2005) que um dos pontos críticos do sistema de microencapsulação de proteínas em PLGA é a sua estabilidade durante o tempo de residência no interior da partícula. Dentro deste contexto, estudou-se a estabilidade do Dtxd em relação aos oligômeros de PLGA e a outros componentes do meio de incubação.

a. Efeito de MS-PLGA sobre a conformação de Dtxd: Inicialmente, observaram-se os as variações do próprio meio de incubação durante o tempo. O aumento da liberação de lactato (**Figura 24 A**) no meio contendo MS-PLGA coincidiu com a diminuição de pH (**Figura 24 B**). No controle, ou seja, Dtxd em PBS na ausência de MS-PLGA, não houve variação de pH no tempo.

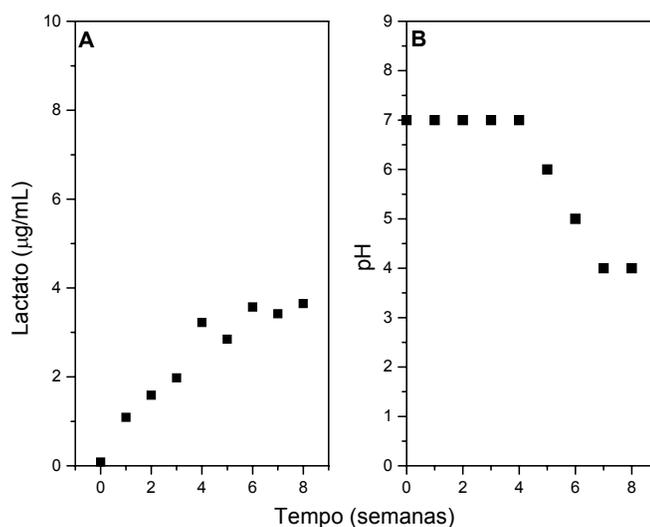


Figura 24: Efeito de MS-PLGA sobre o meio de incubação. Incubou-se Dtxd 17 μM em PBS pH 7,2 com MS-PLGA (50:50, 45- 75 kDa) 5mg/mL por 8 semanas sob suave agitação a 37°C. Como controle incubou-se o Dtxd 17 μM em PBS pH 7,2 nas mesmas condições experimentais. Mediram-se o lactato liberado no meio (A) e os pHs dos sobrenadantes (B).

Mediram-se as porcentagens relativas de cada espécie molecular da Dtxd, a saber, o (dímero de Dtxd, monômero Dtxd, fragmento B e fragmento A) (**Figura 25**) através de filtração em gel em sistema de HPLC. Nestes estudos, o que se avaliaram como degradações foram as possíveis formações ou degradações de dímeros (agregações dos monômeros de Dtxd) ou de degradação do monômero de Dtxd, que produziram FA e FB. Observaram-se 6 % de degradação espontânea do Dtxd em PBS após 8 semanas (**Figura 25 A**). Já, na presença de MS-PLGA, a degradação do Dtxd foi de 26 % (**Figura 25 B**). Este resultado de degradação do Dtxd não pode, evidentemente, ser devida a degradação causada por contaminação com

microrganismos, uma vez que o meio continha Timerosal[®] como preservante. A interferência que o Timerosal[®] poderia ter exercido neste estudo foi investigada também (será apresentada adiante, em outro item) (NAMUR *et al.*, 2004).

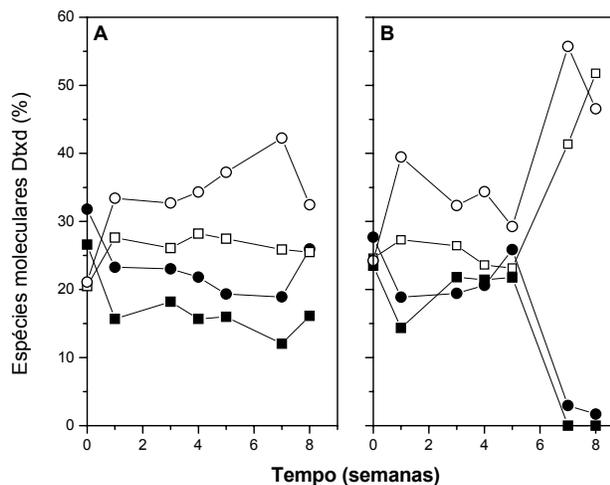


Figura 25: Efeito do meio de incubação na integridade de Dtxd em função do tempo: dímero(■), monômero (●), fragmento A(□) e fragmento B (○). A proteína Dtxd 17 μ M foi incubada por 8 semanas a 37 °C nos meios: A - PBS pH 7,2 contendo 37 μ M Timerosal[®] (controle) e B - PBS contendo 5 mg/mL de microesferas de PLGA vazias e Timerosal[®] 37 μ M.

b. Efeito de MS-PLGA e SDS 1 % sobre a conformação de Dtxd:

Para se evitar a agregação do Dtxd às superfícies das MS, adicionou-se SDS 1% ao meio de incubação. Observou-se aumento da liberação de lactato na presença de SDS (Figura 26 A e B). Entretanto a variação de pH em não foi diretamente proporcional ao aumento de lactato na presença de SDS 1 % (Figura 26 C e D).

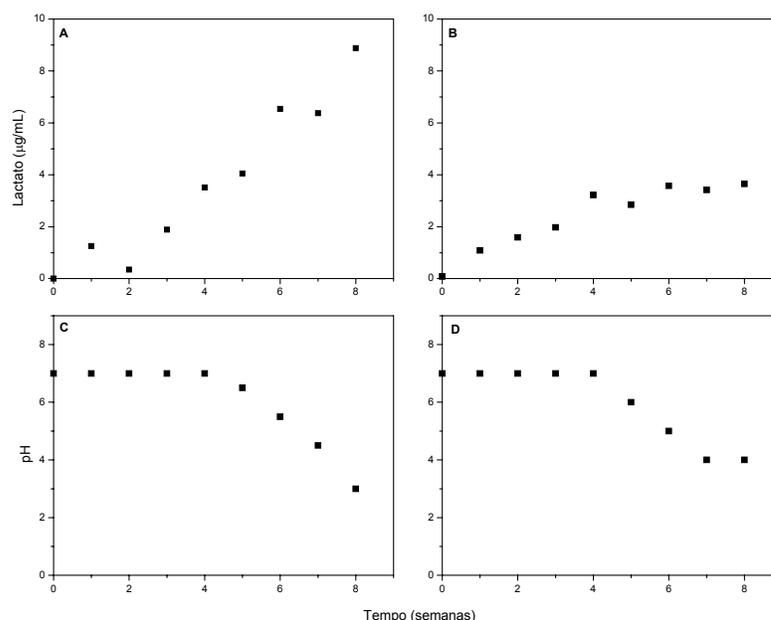


Figura 26: Efeito de MS-PLGA e de SDS 1 % sobre o meio de incubação contendo Dtxd. Incubou-se Dtxd 17 μM em PBS pH 7,2 com MS-PLGA (50:50, 45- 75 kDa) 5mg/mL contendo SDS 1 % (concentração final) e 37 μM Timerosal[®] por 8 semanas sob suave agitação a 37°C. Como controle incubou-se o Dtxd 17 μM em PBS pH 7,2 contendo SDS 1 % e 37 μM Timerosal[®] nas mesmas condições experimentais. Mediram-se o lactato liberado e pH no meio na presença de SDS 1 % (A e C) e na ausência de SDS (B e D).

Para se estudar as possíveis degradações de Dtxd em função do meio de incubação, agora na presença de SDS 1 % e de MS-PLGA, aplicaram-se as amostras em coluna de filtração em gel através de um sistema de HPLC. Mediram-se as porcentagens relativas de cada espécie molecular da Dtxd, a saber, o (dímero de Dtxd, monômero Dtxd, fragmento B e fragmento A) (Figura 27).

O conteúdo das quatro espécies moleculares da preparação inicial (Figura 5) sofreu pouca degradação naqueles meios livres de microesferas (Figura 25 A, 9 %), mas na presença de SDS as avaliações não foram conclusivas quando analisadas por HPLC (Figura 27 A e B).

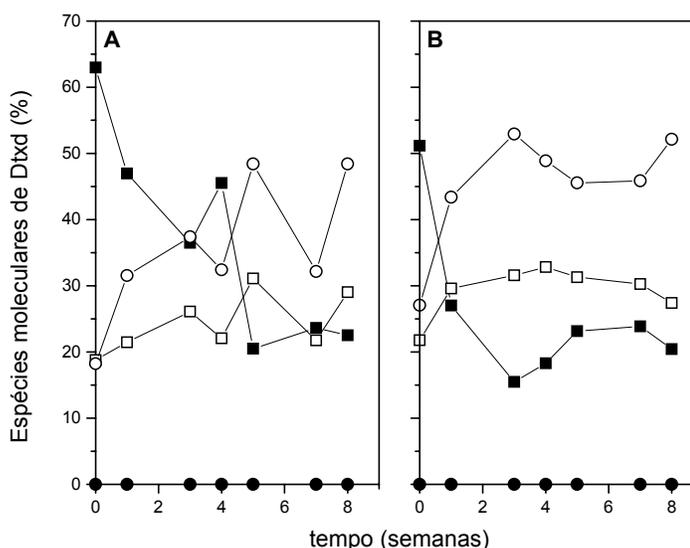


Figura 27: Efeito do meio de incubação na estrutura de Dtxd em função do tempo: dímero (■), monômero (●), fragmento A (□) e fragmento B (○). A proteína Dtxd 17 foi incubada por 8 semanas a 37 °C em: A - PBS pH 7 SDS 1% contendo 37 μ M Timerosal[®] (controle) e B - PBS pH 7 SDS 1% contendo 5 mg/mL de microesferas de PLGA vazias e 37 μ M Timerosal[®].

Para que se possa usar o CD no estudo da transição da estrutura de folha pregueada \leftrightarrow estrutura desordenada é necessário que os estados iniciais e finais exibam diferenças na elipticidade molar numa região acessível do espectro. As variações na estrutura de Dtxd em diferentes meios de incubação e em função do tempo implicaram em variações nos valores das absorptividades molares ($[\theta] \times 10^{-3} \times \text{grau} \times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$) medidas entre 190 nm e 260 nm (Figuras 28 à 31). Apesar de ter sido observada uma diminuição no valor de $[\theta_{222\text{nm}}]$ (que é relacionado ao conteúdo de hélice- α) no Dtxd ao longo do tempo, no final do experimento ele voltou ao valor inicial, quando o efeito perturbador da estrutura foi somente o tempo de incubação a 37°C (Figura 28). Os cromóforos associados a esta região espectral são, T, W e F. Sabe-se que prolina é um destabilizador de hélice- α . Ora, o Dtxd que é uma proteína com 481 aminoácidos, tem 16 P na sua seqüência primária! Portanto, o conteúdo de hélice- α não poderia mesmo ser muito elevado.

Sabe-se que um efeito Cotton positivo na região de 195-197 nm está relacionado a estrutura de folha pregueada β (TILSTRA e MATTICE, 1996) e um efeito Cotton negativo nesta mesma região, está associado à estrutura desordenada (randômica) (TILSTRA e MATTICE, 1996). Na região 217-218 nm o Efeito Cotton é negativo para a estrutura folha pregueada β (TILSTRA e MATTICE, 1996). Os cromóforos associados a esta região espectral são as ligações peptídicas (TILSTRA e MATTICE, 1996).

Observaram-se variações da conformação de Dtxd em PBS quando foi incubado a 37°C durante 8 semanas (Figura 28).

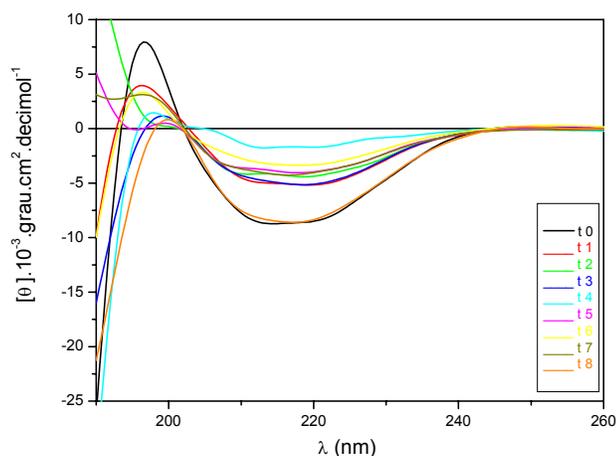


Figura 28: Espectro de CD de Dtxd em função do tempo de incubação. O Dtxd 17 μ M foi incubado por 8 semanas à 37°C em PBS. Os espectros foram realizados semanalmente utilizando-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico.

Mudando-se o meio de incubação observou-se que, no mesmo tempo e mesma temperatura, a conformação da estrutura secundária do toxoide na presença de oligômeros e monômeros de PLGA foi mais alterada (Figura 29) do que o controle (só com PBS, Figura 28).

O SDS também afetou a estrutura secundária do Dtxd, com respeito aquelas modificações conformacionais relacionadas a folha pregueada β , a 196 nm (Figura 30).

O efeito perturbador das MS-PLGA potencializou aquele associado ao SDS sobre conformação do Dtxd (**Figura 31**).

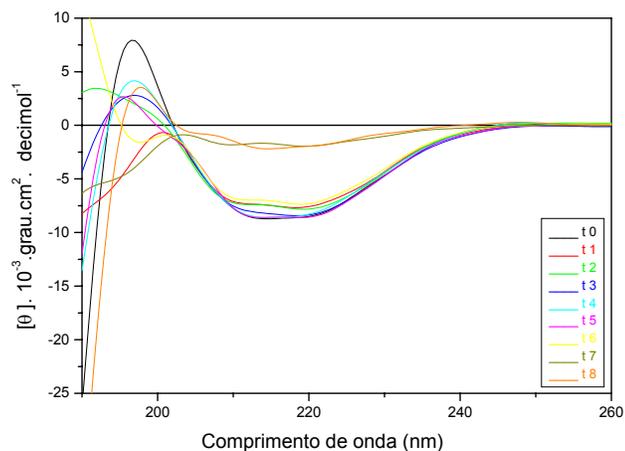


Figura 29: Espectro de CD de Dtxd em função do tempo de incubação e da presença de MS-PLGA. O Dtxd $17\mu\text{M}$ foi incubada por 8 semanas à 37°C em PBS contendo 5mg/mL de microesferas PLGA. Os espectros foram realizados semanalmente utilizando-se uma cubeta de $0,1\text{ cm}$ de caminho óptico.

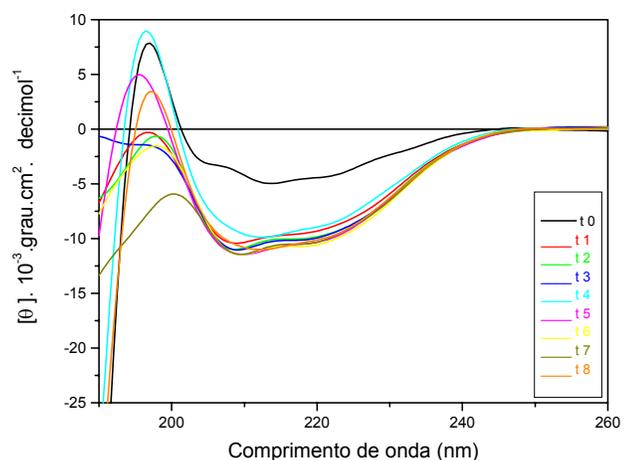


Figura 30: Efeito de SDS no espectro de CD de Dtxd em função do tempo de incubação. O Dtxd $17\mu\text{M}$ foi incubado por 8 semanas à 37°C em PBS contendo 1% de SDS. Os espectros foram realizados semanalmente utilizando-se uma cubeta de $0,1\text{ cm}$ de caminho óptico.

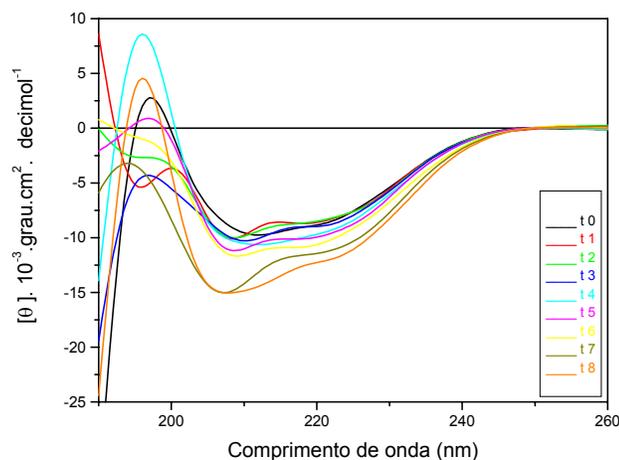


Figura 31: Efeito de SDS e de microsferas de PLGA no espectro de CD de Dtxd em função do tempo de incubação. O Dtxd $17 \mu\text{M}$ foi incubado por 8 semanas à 37°C em PBS contendo 1% de SDS e 5 mg/mL de microsferas de PLGA. Os espectros foram realizados semanalmente utilizando-se uma cubeta de $0,1 \text{ cm}$ de caminho óptico.

Em resumo, comparando-se as variações estruturais de Dtxd nos diferentes meios de incubação em função do tempo e entre si observaram-se modificações no conteúdo de hélice- α ($[\theta_{222\text{nm}}]$) (**Figura 32**). A estrutura secundária do Dtxd, no que se refere ao conteúdo de hélice- α , permanece constante ao longo do tempo (**Figura 32 A, preto**). Já, os produtos de degradação das MS-PLGA diminuíram o conteúdo de hélice- α a partir da sexta semana, passando de $-3,65[\theta_{222\text{nm}}].10^{-3} \cdot \text{grau}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}$ a $+6,11 [\theta_{222\text{nm}}].10^{-3} \cdot \text{grau}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}$. Este efeito ocorreu *in tandem* com a diminuição do pH neste mesmo meio que foi maior neste mesmo período (**Figura 26 C**). O SDS em si, não induziu alteração no conteúdo de hélice- α no Dtxd durante o tempo de incubação observado (**Figura 32 B**). Os produtos de degradação das MS-PLGA não afetaram a estrutura secundária de Dtxd, quando incubados na presença de SDS (**Figura 32 C**).

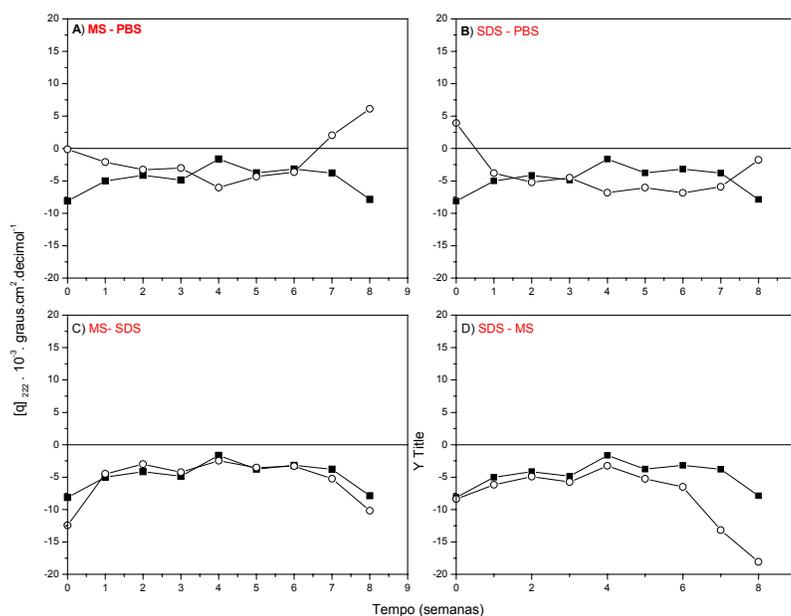


Figura 32: Influência do meio de incubação sobre θ_{222nm} em função do tempo. O Dtxd $17 \mu M$ em PBS foi incubado por 8 semanas à $37^\circ C$ (A, B, C e D (■), ou com 5 mg/mL de microesferas vazias (○)(A); ou com 1% de SDS (B) e em SDS/MS-PLGA (C e D). O efeito causado somente pelo tempo de incubação a $37^\circ C$ sobre a estrutura secundária de Dtxd foram descontados em A, B, C e D. Em todos os tempos descontaram-se os efeitos causados pelas SDS (C) e aqueles associados só com as MS-PLGA (D). Os espectros foram realizados semanalmente utilizando-se uma cubeta de $0,1 \text{ cm}$ de caminho óptico.

É importante notar que (Figura 32 C) os valores correspondentes a cada variação espectral devida ao SDS foram descontados e, portanto, o efeito que se observou foi somente aquele causado pelas MS-PLGA. Esta mesma consideração (espectro diferencial) foi aplicada ao efeito do SDS sobre a estrutura secundária de Dtxd na presença MS-PLGA. Nesta condição, surpreendentemente, observou-se um efeito indutor de hélice- α no Dtxd (Figura 32 D).

Conclui-se que o efeito desorganizador na estrutura Dtxd causado pelos produtos de degradação das microesferas de PLGA foi minimizado pelo SDS (Figura 32). O SDS, por si só foi um indutor hélice- α (Figura 32 D).

Em resumo, quando foram comparadas as transições de folha pregueada $\beta \leftrightarrow$ estrutura desordenada observou-se que:

As MS-PLGA, seus monômeros e oligômeros até a terceira semana desordenaram o Dtxd, pois houve a passagem do efeito Cotton positivo a 195 nm para um efeito Cotton negativo. Entre as semanas 4 e 6, as MS-PLGA aumentaram as folhas pregueadas β do Dtxd, passando por uma desorganização entre as semanas 6 e 7. A molécula do toxoide, após 8 semanas de incubação com as MS-PLGA ficou com praticamente o mesmo grau de folhas pregueadas β que no início do experimento (**Figura 33 A**).

A mesma cinética de mudança de conformação foi observada na presença de SDS, ou seja: o SDS até a terceira semana desordenou o Dtxd, pois houve a passagem do efeito Cotton positivo a 195 nm para um efeito Cotton negativo. Entre as semanas 4 e 6, o SDS aumentou o conteúdo em folhas pregueadas β do Dtxd, passando por uma desorganização entre as semanas 6 e 7. A molécula do toxoide, após 8 semanas de incubação com o SDS ficou com praticamente a mesma ordem de grandeza de folhas pregueadas β que no início do experimento (**Figura 33 B**).

As MS-PLGA na presença de SDS não alteraram o conteúdo de folhas pregueadas β no Dtxd (**Figura 33 C**).

O SDS na presença de MS-PLGA praticamente não alterou a estrutura secundária, no que tange ao conteúdo de folhas pregueadas β , de Dtxd (**Figura 33 D**).

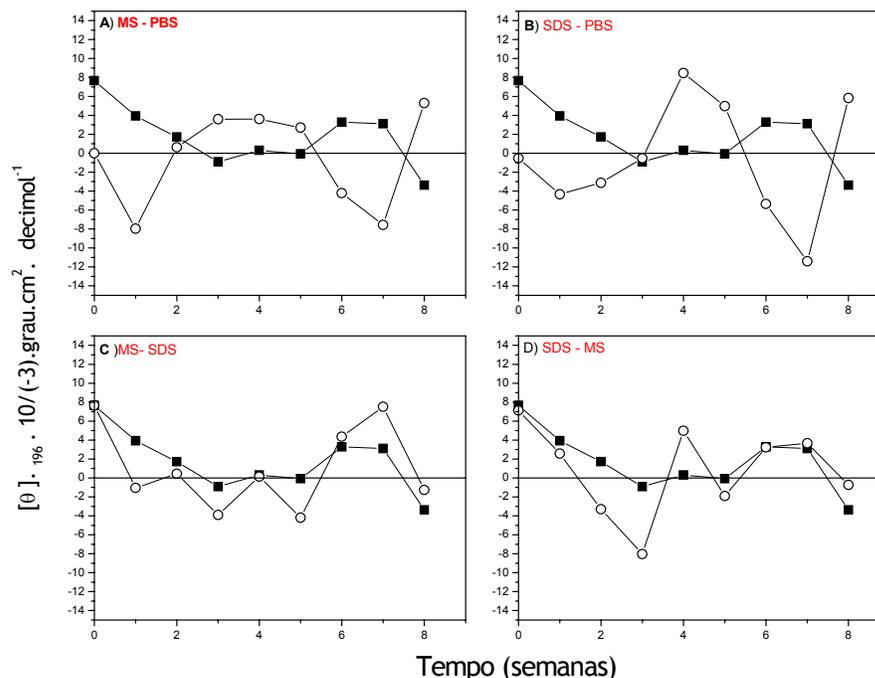


Figura 33: Influência do meio de incubação sobre θ_{196nm} em função do tempo. O Dtxd $17 \mu\text{M}$ em PBS foi incubado por 8 semanas à 37°C (A, B, C e D, ■), ou com 5 mg/mL de microesferas vazias (○) (A); ou com 1% de SDS (B) e em SDS/MS-PLGA (C e D). O efeito causado somente pelo tempo de incubação a 37°C sobre a estrutura secundária de Dtxd foram descontados em A, B, C e D. Em todos os tempos descontaram-se os efeitos causados pelas SDS (C) e aqueles associados só com as MS-PLGA (D). Os espectros foram realizados semanalmente utilizando-se uma cubeta de $0,1 \text{ cm}$ de caminho óptico.

A integridade imunológica do toxoide anti-diftérico (monitorado por ELISA) diminuiu, de um modo geral, durante o período de incubação nos diferentes meios (Figura 34). Mais uma vez, quando o Dtxd foi incubado com MS-PLGA houve uma diminuição na interação com anticorpos anti-diftéricos (desenvolvidos em cavalos) a partir da 5ª semana (Figura 34 A). Este fato ocorreu ao mesmo tempo em que houve diminuição do pH do meio (Figura 26 C); diminuição no conteúdo em hélice- α do Dtxd (Figura 32 A) e transições de folha pregueada $\beta \leftrightarrow$ estrutura desordenada (Figura 33 A). A diminuição da identidade imunológica na presença de SDS talvez seja apenas um artefato do método onde o surfactante impediu a adsorção correta do toxoide à placa (Figura 34 B).

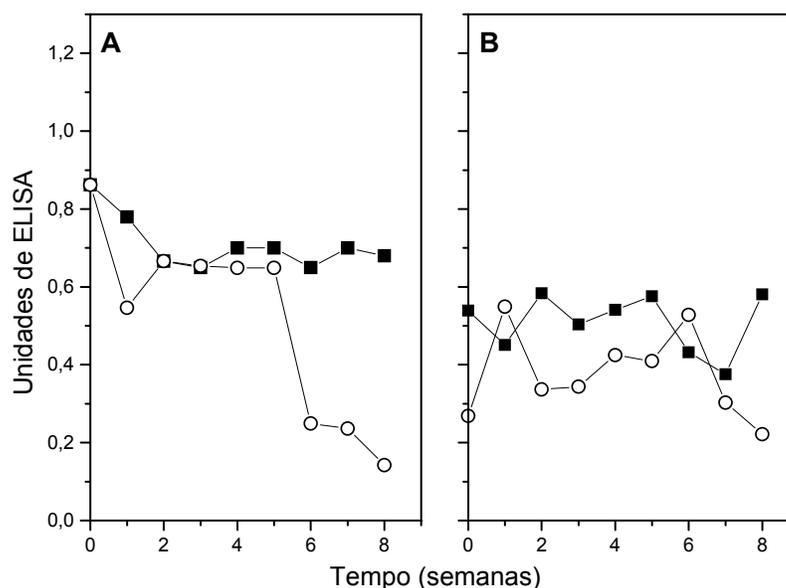


Figura 34: Efeito do meio de incubação na identidade imunológica de Dtxd. As amostras foram analisadas por ELISA. A Dtxd 17 μ M foi incubada por 8 semanas à 37 °C em **A** PBS (■) ou em PBS contendo 5 mg/mL de MS-PLGA (○) e em **B**. PBS contendo 1 % de SDS (■) ou em PBS-SDS contendo 5 mg/mL de microesferas de PLGA (○).

Em resumo, a mudança conformacional observada no Dtxd incubado com MS-PLGA implicou em diminuição do conteúdo em hélice- α com concomitante transição de folha pregueada- β \leftrightarrow estrutura desordenada. Estas mudanças conformacionais ocorreram a partir da 5^a semana de incubação e coincidem com o abaixamento do pH do meio, que por sua vez foi causado pelo aumento de oligômeros e monômeros de PLGA a medida que o tempo passou.

4.4.3. Efeito do tempo de incubação sobre a matriz polimérica de MS-PLGA em soluções.

a. Cinética da degradação da matriz de PLGA 50:50 (Mw 55 kDa).

As microesferas de PLGA vazias ou contendo Dtxd foram incubadas a 37⁰ C, durante um período de sete semanas. A variação dos tamanhos das microesferas foi acompanhada por microscopia de contraste de fase. *Observou-se uma diminuição no tamanho das microesferas em função do tempo de incubação.* Entre os tempos zero (t₀) e sete semanas de incubação (t₇) tanto para as microesferas vazias (Figura 35 A e B) quanto para as microesferas contendo Dtxd (Figura 35 C e D). Observou-se também um aumento no número de partículas pequenas (Figura 35 B e D). *Neste mesmo período houve um aumento de liberação de lactato para o meio (Figura 36 A) com concomitante diminuição de pH (Figura 36 B).*

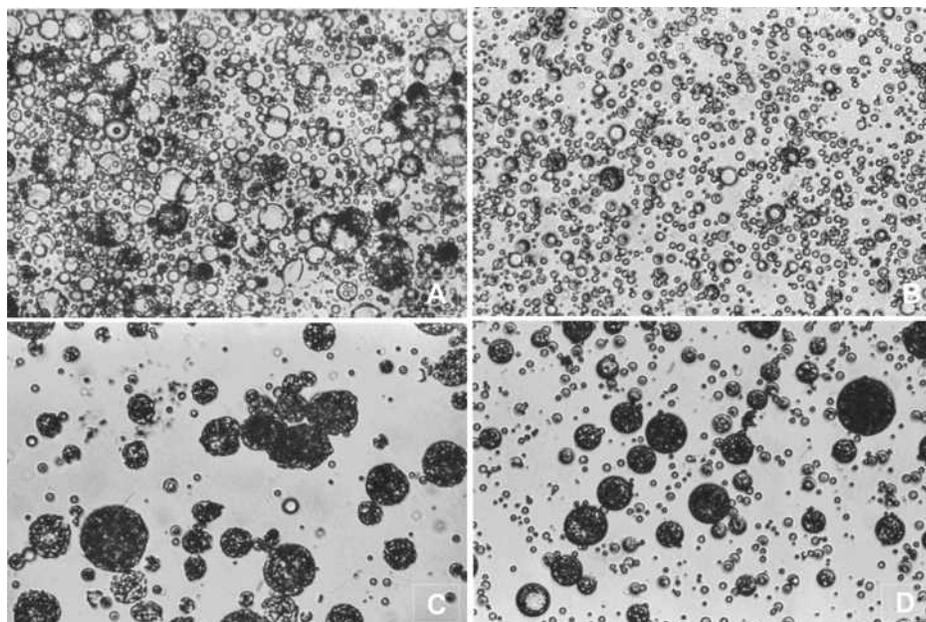


Figura 35. Morfologia externa de microesferas de PLGA 50:50 (Mw 55 000). As microesferas foram incubadas em PBS-timerosal® 0,37 mM, pH 7,2 por sete semanas a 37°C (A e B). Microesferas contendo Dtxd foram incubadas nas mesmas condições (C e D).

As microesferas liberaram lactato numa cinética bifásica (Figura 36 A). Observou-se um período de cinética lenta entre a primeira e a quinta semanas

(Figura 36 A). Neste mesmo período, observou-se uma diminuição de mais que duas unidades de pH (Figura 36 B). Observou-se que o abaixamento de pH no meio de incubação das microesferas foi coincidente com a liberação de lactato para o meio (Figura 36 A), seguindo praticamente um perfil cinético inverso. A presença de Dtxd não alterou significativamente a velocidade de degradação destas microesferas de PLGA.

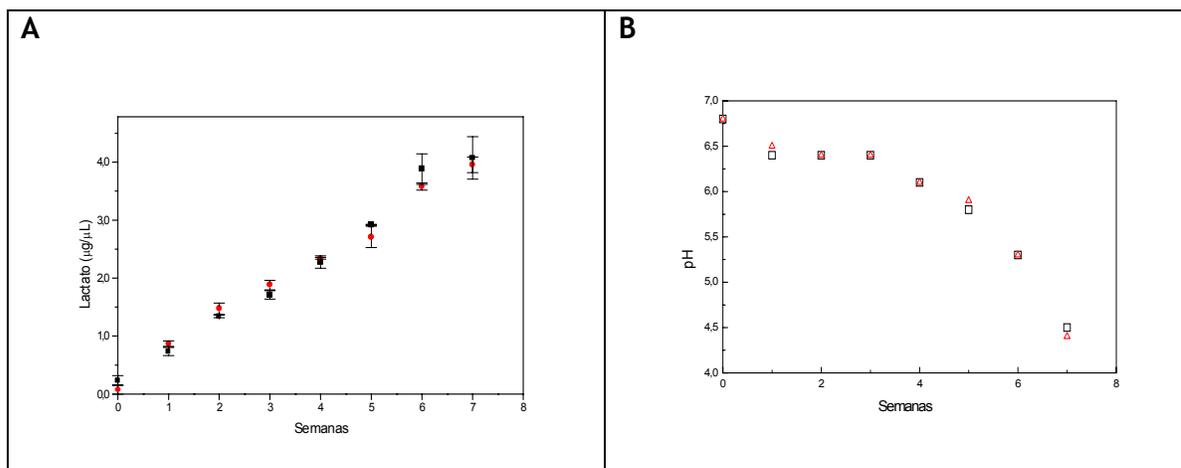


Figura 36. Efeito de MS-PLGA sobre o meio de incubação. Incubaram-se MS-PLGA vazias (■) ou contendo Dtxd (●) em PBS pH 7,2 sob suave agitação a 37 °C. Mediram-se o lactato liberado no meio (A) e os pHs dos sobrenadantes (B).

b. Efeito do massa molar do PLGA e da terminação metilada do polímero.

Microesferas (MS) vazias de PLGA preparadas com polímeros de 12, 34 ou 63 kDa com terminação polimérica livre (-COOH) ou metilada (-COOMe) foram incubadas em banho maria a 37° C sob agitação suave durante 8 semanas. Após este tempo, os sobrenadantes foram analisados quanto à liberação de ácido láctico. As amostras foram analisadas em sistema de HPLC utilizando-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) equilibrada com H₂SO₄ 5 mM, temperatura da coluna de 65° C, fluxo de 0,6 mL/min., com um detector de uv a 215 nm. **Observaram-se que as MS produzidas com PLGA-COOH (Figura 37 A, C e D), liberaram mais lactato**

que as MS produzidas com PLGA-COOME (Figura 37 B, D e F). Comparando-se as MS produzidas com PLGA-COOH, houve uma relação inversamente proporcional entre massas molares e liberações de lactato, ou seja $12 \text{ kDa} > 34 \text{ kDa} > 63 \text{ kDa}$. Entre as MS preparadas com PLGA de terminação metilada a liberação foi menor e nesse período de liberação estudado, não houve diferença significativa entre a massa molar do polímero e liberação de lactato.

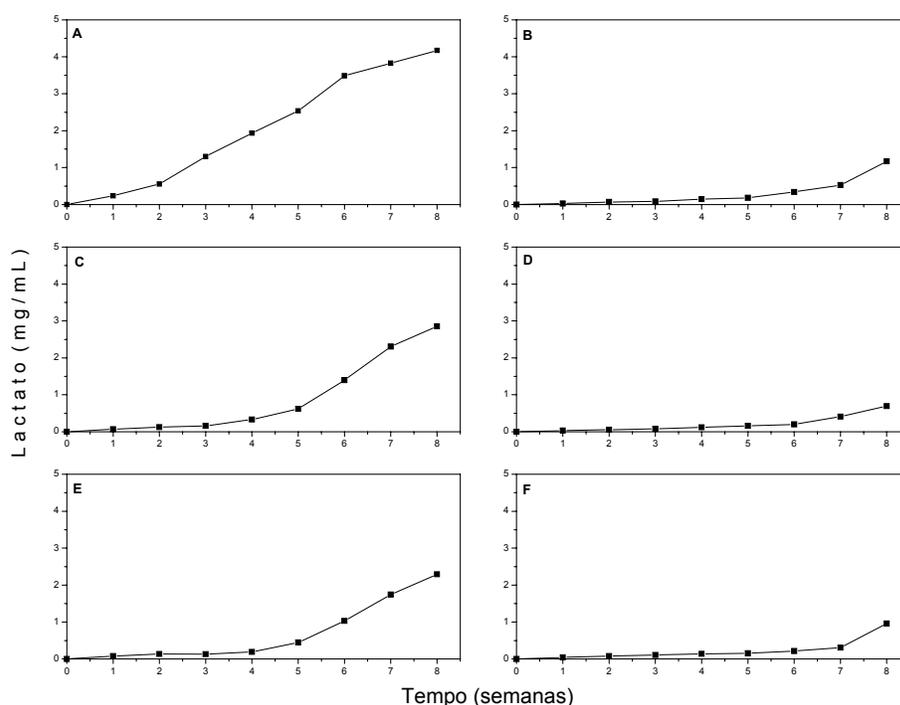


Figura 37: Liberação de lactato das MS produzidas com PLGA durante 8 semanas de incubação em PBS pH 7,2. As MS foram produzidas com A - PLGA de 12 kDa com -COOH; B- 12 kDa com -COO-Me; C - 34 kDa com -COOH; D - 34 kDa com -COO- Me; E - 63 kDa com -COOH ou F - 63 kDa com -COO- Me.

As amostras também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e observou-se que as microesferas preparadas com PLGA de 12, 34 e 63 kDa com -COOH e as microesferas preparadas com PLGA de 34 e 63 kDa com -COOME, apresentaram inicialmente (Figura 38) uma superfície porosa e as

microesferas preparadas com PLGA metilado de 12 kDa apresentaram superfície lisa.

Entre as preparações feitas com PLGA-COOH de 12, 34 ou 63 kDa, após 2, 4 e 5 semanas respectivamente (**Figura 38**), não havia MS com formato regular no meio. Observando-se as preparações de MS de PLGA-COOME e pesos moleculares de 12, 34 ou 63 kDa, após 5, 6 e 7 (**Figura 38**) semanas respectivamente também não havia MS com formato regular no meio (**Figura 38**). Comparando-se os polímeros de mesmo peso molecular, conclui-se que as preparações feitas com polímeros -COOH degradaram-se mais rapidamente que as preparações feitas com polímeros-COOME. Quanto maior o peso molecular do PLGA maior foi o tempo para degradação das microesferas.

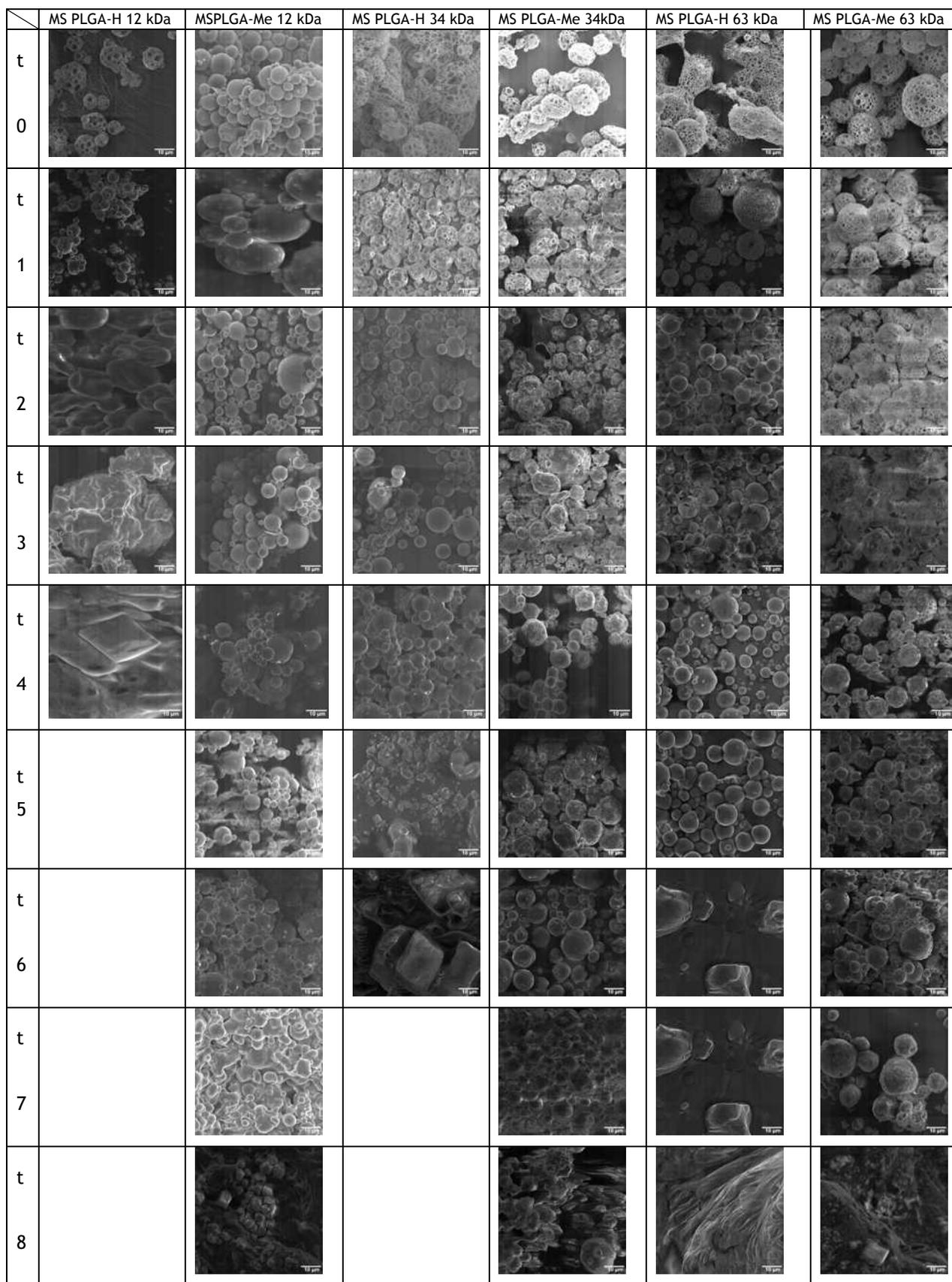


Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura das MS preparadas com PLGA de 12, 34 ou 63 kDa com terminações livres ou metiladas durante 08 semanas de incubação à 37° C sob agitação suave. Os espaços vazios na tabela acima são de amostras onde não havia mais microesferas no meio.

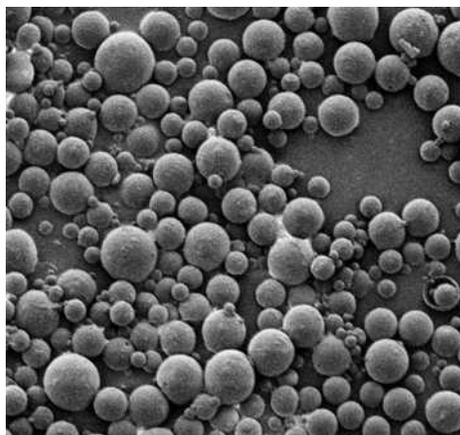


Figura 39. Microscopia eletrônica de varredura de uma preparação de microesferas de PLGA de 12 μm .

A cinética de produção de ácido láctico e as variações pH foram seguidas tomando-se alíquotas dos sobrenadantes obtidos após a centrifugação da mistura de reação. O pH diminuiu *in tandem* com o aumento de ácido láctico (**Figura 40**).

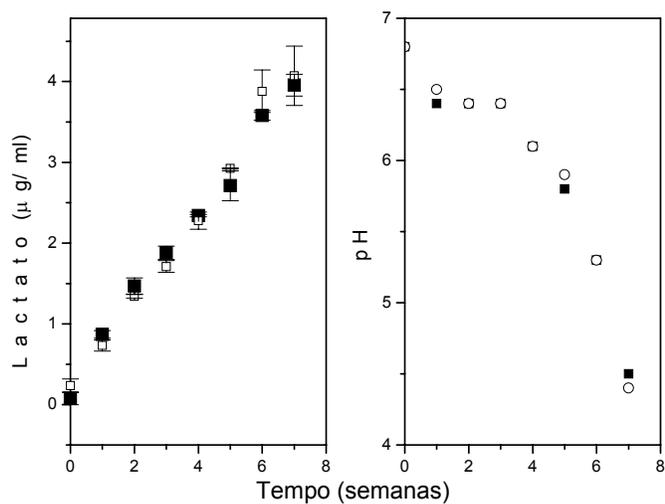


Figura 40. Cinética de liberação do lactato e variação do pH em função do tempo. O lactato e o pH foram medidos na presença (○) e na ausência de Dtxd (■), ambos na presença de TM 37 μM .

A identidade imunológica do Dtxd, medida por ELISA, diminuiu em função do tempo de incubação com MS-PLGA (**Figura 41**). A diminuição da identidade

imunológica do Dtxd na presença TM 37 μM foi maior na presença de MS-PLGA (Figura 41).

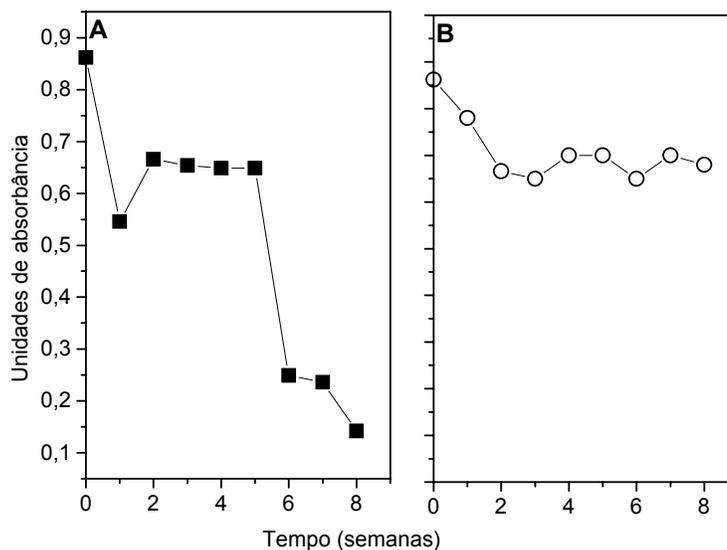


Figura 41. Identidade imunológica de Dtxd monitorada por ELISA. Em A. Uma solução de 8 mL de Dtxd 9,4 mM PBS contendo TM 37 μM foi adicionado a 40 mg de MS-PLGA vazias. A suspensão foi incubada sob agitação suave durante 8 semanas a 37°C, B. Controle: Dtxd 9,4 mM PBS contendo TM 37 μM .

Entre a quinta e a oitava semanas observaram-se aumentos de FA e FB através de HPLC (Figura 42). Os desaparecimentos do dímero e do monômero de Dtxd ocorreram *in tandem* com o aumento de FA e FB (Figura 42).

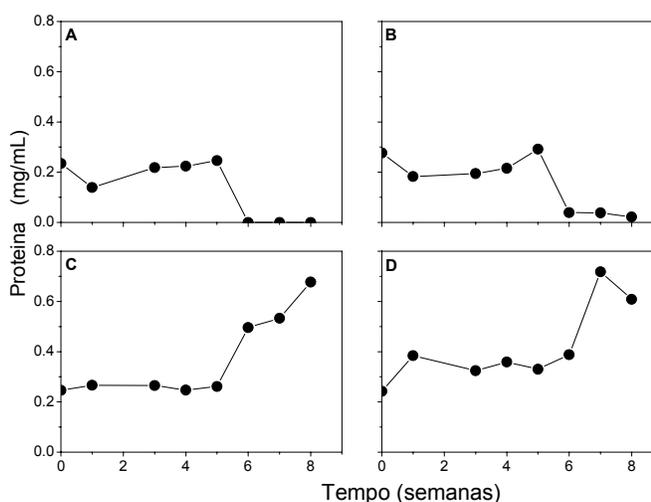
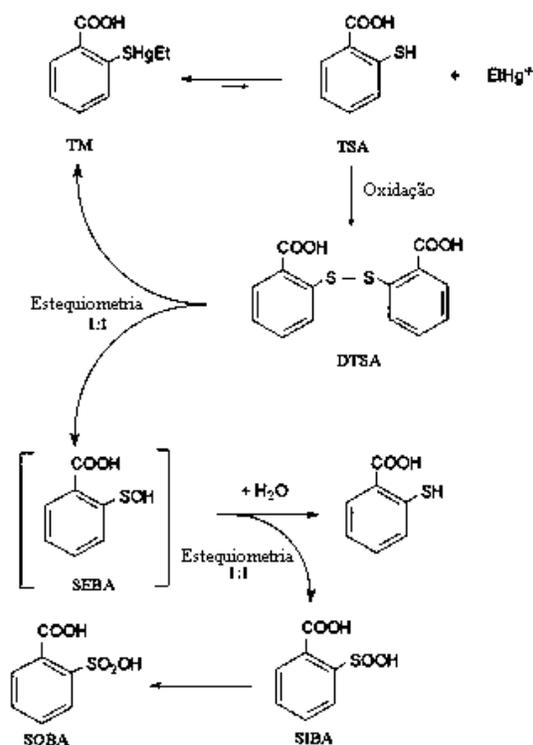


Figura 42. Cinética de interação do Dtxd IBu com microesferas de PLGA vazias. Dtxd foi incubada com MS-PLGA em PBS, pH 7,2 contendo TM 37 μ M. Os sobrenadantes foram analisados por HPLC. As quantidades das espécies moleculares presentes nos tempos correspondentes são: A. 2 X Dtxd, B. Dtxd, C. FB e D. FA.

Antes de apresentar os próximos resultados, é importante saber algumas informações sobre a degradação do Timerosal[®] (TM) para justificar o racional de se estudar a sua influência nos estudos de Dtxd em meio contendo PLGA.

Sabe-se que o TM, conhecido também como Thiomersal, Merthiolate[®], ou etilmercúrio-tiossalicilato sódico, é um complexo solúvel do ácido tiossalicílico (TSA) e tem sido usado há décadas como bactericida em vacinas parenterais e em produtos oftálmicos. Sabe-se que este preservante pode ser decomposto por oxidação em ácido 2,2'-ditiossalicílico (DTSA), íon etilmercúrico, ácido 2-sulfenobenzóico, ácido 2-sulfonobenzóico e ácido 2-sulfinobenzóico (TLEUGABULOVA e PÉREZ, 1996; TAN e PARKIN, 2000) (Esquema 5). A importância do problema está relacionada à formação de compostos desconhecidos nos estágios mais avançados da degradação do TM, que poderiam produzir reações adversas nos homens expostos a estes produtos (TAN e PARKIN, 2000). ***Como este é um produto usual de vacinas e, portanto, presente até aqui nos experimentos, questionou-***

se se o TM poderia ter alguma influência negativa nos estudos de degradação da matriz de MS-PLGA para a liberação do antígeno encapsulado.



Esquema 5. Via proposta para a degradação de Timerosal[®], adaptada da literatura (NAMUR *et al.*, 2004; TAN e PARKIN, 2000; TLEGABULOVA e PÉREZ, 1996). Os possíveis compostos originados da degradação do TM são: tiossalícico (TSA), 2,2'-ditiossalicílico (DTSA), íon etilmercúrico (EtHg⁺), ácido 2-sulfenobenzóico (SEBA), ácido 2-sulfonobenzóico (SOBA) e ácido 2-sulfino benzóico (SIBA).

A degradação do TM é extremamente influenciada de uma forma complexa pela presença de outras moléculas no meio, como por exemplo, cloreto promove a degradação e EDTA estabilização (TAN e PARKIN, 2000). TM é um reagente sulfidríla versátil, por exemplo, é um mobilizador de cálcio, que por sua vez é um importante modulador celular (DOGAR *et al.*, 2002; ELFERINK, 1999; PHILIPPE, 1995). A habilidade do TM agir como reagente sulfidríla está relacionada na literatura à presença de Hg⁺ (DOGAR *et al.*, 2002; ELFERINK, 1999). **Portanto era provável que**

o TM pudesse, no meio de liberação contendo derivados da degradação de PLGA (oligômeros de PLGA, lactato), reagir de forma a degradar o S-S contido no Dtxd.

Observou-se que a degradação de Dtxd só ocorreu na presença de ácido láctico e Timerosal[®] (TM) mas não na presença de HCl (**Figura 43**). A adição de ácido láctico ao Dtxd acelerou o efeito de sua degradação (**Figura 43**). Nestas condições, a meia vida da degradação é da ordem de segundos. Houve uma variação marcante no perfil de eluição da proteína. Imediatamente após a adição de ácido láctico, observaram-se o desaparecimento de TM (que foi consumido), 2 x Dtxd e Dtxd (**Figura 43**). O pico a 13,356 minutos (**Figura 43**) corresponde a um dos produtos de degradação do TM, a saber: SIBA, SOBA e DTSA. O espectro de absorção do TM é caracterizado por uma banda larga, indo de 238-300 nm. Conseqüentemente ele pode ser detectado a 269 nm, que é o comprimento de onda usado para se monitorar a eluição de Dtxd no HPLC, conforme publicado (CAMPANA *et al.*, 2004).

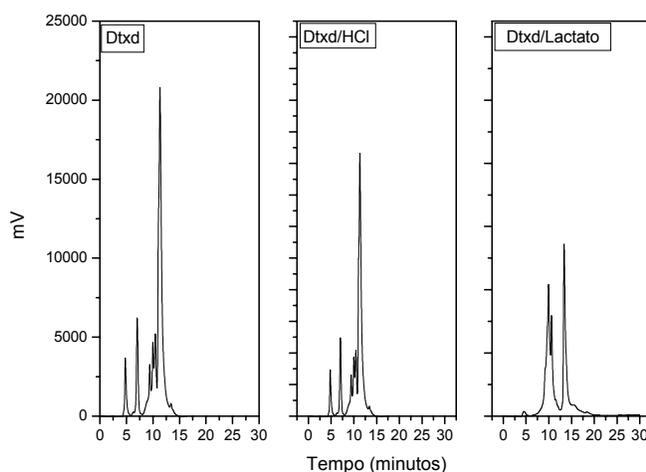


Figura 43. Perfil de eluição do Dtxd IBu de uma coluna de gel filtração em sistema de HPLC. O Dtxd foi aplicado em uma coluna de gel filtração (QC-PAK, GFC 300-7,8 mm x 15 cm) em PBS pH 7,2 ou em lactato contendo timerosal 37 μ M. Controle TM 37 μ M em HCl foi adicionado a um Dtxd IBu. O fluxo de eluição foi 0,6 mL/min, os tempos de retenções (RT) foram: TM: 11,58 min., 2xDtxd: 4,75 min., Dtxd: 7,012 min., FB: 9,872 min. E FA: 10,341 min.

Uma vez que não é possível de se fazer um balanço de massa entre os reagentes e os produtos formados nesta reação, porque os picos de absorbância dos produtos formados (FA-TS, fragmento A ligado ao ácido tiosalicílico e FB-TS) aumenta pela superposição da absorção do TS, decidiu-se evitar estes cálculos que sempre dariam um valor superestimado.

Como controle adicionou-se uma solução de ácido láctico à uma solução de TM e analisou-se a mistura de reação por filtração em gel em sistema de HPLC. O ácido láctico muda o índice de refração de uma solução e conseqüentemente, induz variações na absorbância dessa solução. Aqui, explorou-se este fenômeno no sentido de seguir a reação entre TM e ácido láctico. O pico do TM puro desapareceu e o pico do ácido láctico diminuiu (**Figura 44**), indicando que ambos reagiram.

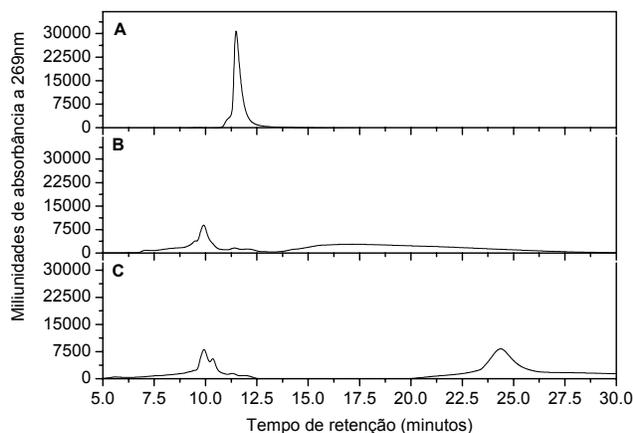


Figura 44: Interação entre Timerosal® 9,2 μ M e ácido láctico 0,75 M. As amostras foram analisadas por HPLC em coluna de gel filtração QC-PAK GFC 300 previamente equilibrada com PBS pH 7,2, a um fluxo de 0,6 mL/ minuto a 20°C. A- Eluição do TM (11,58 min.) . B- Eluição do ácido láctico (9,89 min.) e C- Eluição da mistura de incubação (TM e ácido láctico), ácido láctico (9,89 min.), TSA (10,34(9,89 min.), TSA (10,348 min.), ácido pirúvico e EtHg (24,376 min.).

TSA é o principal produto no modelo geral a ser proposto aqui para a degradação de Dtxd. Ele é o único produto que tem um grupo-SH e não pode ser detectado no sistema por ser altamente reativo, ou seja, é um intermediário de vida curta (**Esquema 5**). O TSA formado ligou-se imediatamente a FA ou FB. Os

outros produtos da degradação na presença de TM e ácido láctico foram o ácido pirúvico e o EtHg, que eluíram à 24,376 minutos (eles foram incluídos no volume interno do gel da coluna). Observou-se por análise de fluorescência que o ácido láctico diminuiu a intensidade de fluorescência de Dtxd na presença de TM (Figura 45). Isto corrobora os dados de ELISA e HPLC que indicaram danos estruturais no Dtxd (Figuras 41 e 42).

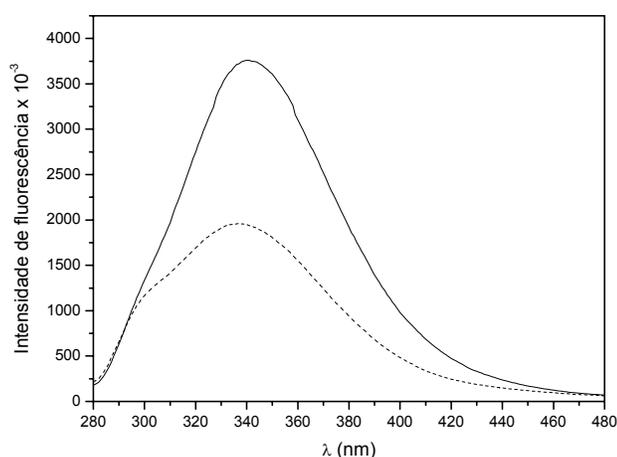


Figura 45: Efeito do ácido láctico no espectro de fluorescência do Dtxd. Amostras de Dtxd 1,88 mM em PBS contendo 37 μ M de Timerosal[®] foram submetidas a espectroscopia de fluorescência com excitação à 269 nm na ausência (linha contínua) ou na presença da de ácido láctico 0,9 M (linha pontilhada).

Concluiu-se que a presença do Timerosal[®], por tudo o que se apresentou até agora, deveria ser evitada nas formulações em todos os outros estudos de estabilidade de Dtxd em função do processo de microencapsulação em MS-PLGA.

4.4.5. Variações estruturais no Dtxd após a primeira emulsificação.

Sabe-se que a degradação dos componentes de uma vacina está relacionada à perda de sua eficácia, apesar de haver algum debate na literatura sobre até onde a estabilidade conformacional de um antígeno seja necessária ou não para se obter a resposta imunológica desejada (SCHWENDEMAN *et al.*, 1996; ALONSO *et al.*, 1994). Para se evitar ou minimizar as degradações de proteínas durante ou após o processo de microencapsulação há estratégias de melhoramentos na formulação que poderiam ser usadas: **1.** mudar os componentes da formulação de forma a se obter a estabilidade desejada ou **2.** mudar o processo de microencapsulação.

Nesta tese, optou-se por **variar os componentes da formulação** através da adição de agentes estabilizadores de proteínas a serem encapsuladas em microesferas de PLGA usando-se o método [(A₁/O)/A₂].

Objetivo desta etapa da experimental foi o de se determinar até onde a emulsificação primária (contacto com interface CH₂Cl₂) causa agregação na molécula do toxoide diftérico. Usaram-se os sais da série de Hofmeister no sentido de se minimizar ou mesmo evitar o desnovelamento e agregação.

Repetindo, o Dtxd foi diluído a uma concentração final de 5 mM em KSCN, NaH₂PO₄, NaCl ou MgCl₂ em concentrações de 0 a 150 mM de sal (0, 10, 30, 50, 70, 90, 100 e 150 mM) e emulsificaram-se as amostras a 24 000 rpm por dois minutos. Após a emulsificação as amostras foram centrifugadas a 3 000 rpm por 10 minutos e as fases aquosas foram retiradas e analisadas.

a. Efeito dos sais da série de Hofmeister na solubilidade de Dtxd após contato com CH_2Cl_2 .

A solubilidade de Dtxd após emulsificação na presença de CH_2Cl_2 e na ausência de qualquer um dos sais foi de somente 67% (Figura 46). Os sais NaH_2PO_4 e NaCl , praticamente não aumentaram a solubilidade do Dtxd após a emulsificação primária (Figura 46). O MgCl_2 , um caotrópico, foi o sal que mais prejudicou solubilidade da proteína durante o processo de emulsificação (Figura 46). Observaram-se que *as presenças de KSCN, também um caotrópico, nas concentrações de 30 a 70 mM foram as melhores condições (95 % de solubilidade) para a solubilização da Dtxd após a primeira emulsificação.*

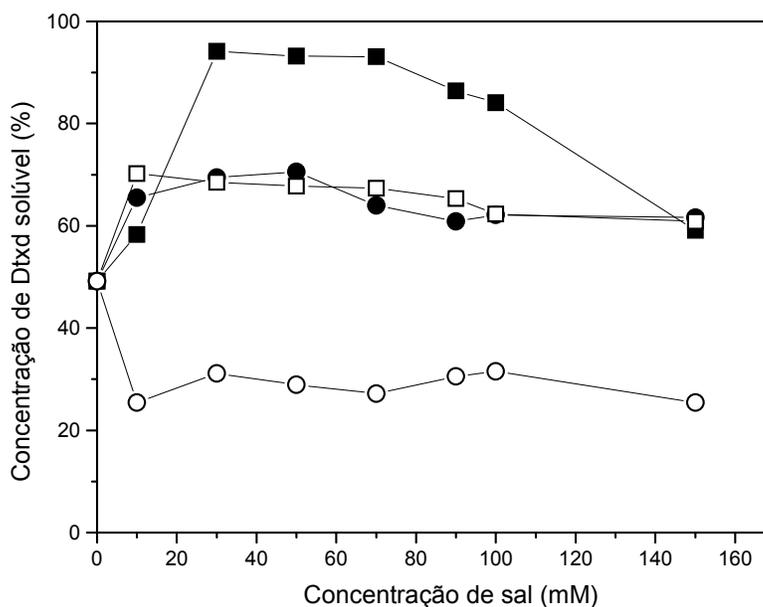


Figura 46: Efeito dos sais da série de Hofmeister na solubilidade de Dtxd. O conteúdo protéico dos sobrenadantes foi analisado nas presenças de KSCN (■), NaH_2PO_4 (●), NaCl (□) e MgCl_2 (○) após emulsificação em CH_2Cl_2 .

b. Efeito dos sais da série de Hofmeister na conformação da fração solúvel de Dtxd após a primeira emulsificação.

As amostras da fase aquosa foram diluídas para uma mesma concentração de 2 μM de seus tampões originais e submetidas a análise por gel filtração em sistema de HPLC. As concentrações de dímeros foram praticamente constantes em todos os sobrenadantes analisados (Figura 47 A). Houve uma grande diminuição de monômeros após emulsificação na presença de MgCl_2 (Figura 47 B). A diminuição de monômeros (Figura 47 B) na presença de NaCl coincide com o aumento de FA e FB (Figura 47 C). Entretanto, as diminuições de monômeros nas presenças dos sais KSCN , NaH_2PO_4 não coincidem com aumentos de dímeros ou de FA e FB (Figura 47 C). Provavelmente nestas condições houve formações de agregados insolúveis, uma vez que o dímero ainda é solúvel (Figura 47 A).

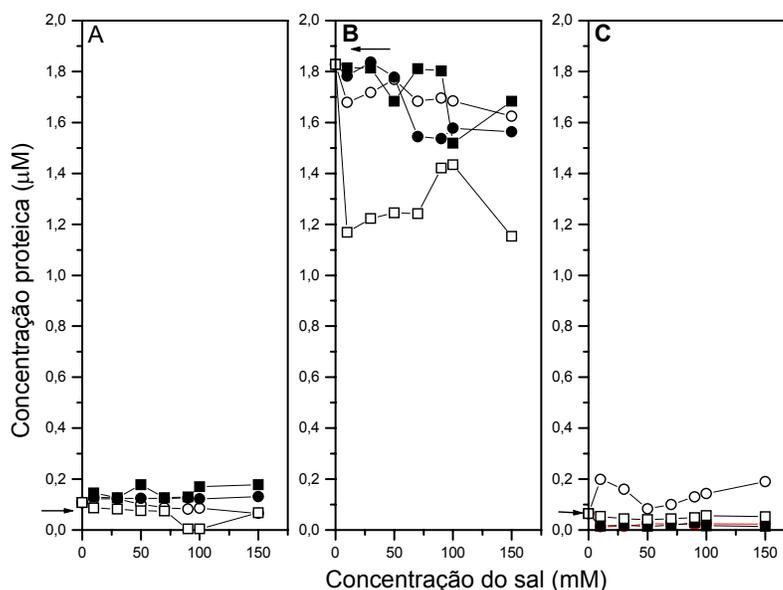


Figura 47: Efeito dos sais da série de Hofmeister nas concentrações das diferentes espécies moleculares de Dtxd após a emulsificação. O conteúdo das diversas espécies moleculares de Dtxd dos sobrenadantes foram analisado após emulsificação com CH_2Cl_2 nas presenças de KSCN (■), NaH_2PO_4 (●), NaCl (□) e MgCl_2 (○) após emulsificação em CH_2Cl_2 . Os sobrenadantes foram injetados em coluna de gel filtração QC-PAK GFC 300 (7,8 mm x 15 cm, $V_t = 7,17$ mL), previamente equilibrada com PBS pH 7,2, a um fluxo de 0,6 mL/minuto a 20 °C. A. Concentração de dímero, B. concentração de monômero e C. Concentração de fragmentos A e B. Como controle: Dtxd antes da emulsificação, indicado nos gráficos através da seta.

Estes mesmos sobrenadantes foram analisados por ELISA para se verificar o reconhecimento imunológico do Dtxd através soro anti-diftérico padrão (desenvolvido em cavalo pelo IBu). Através dessa análise a menor identidade imunológica foi sobre a estrutura da Dtxd também na presença de $MgCl_2$ (Figura 48). Os outros sais, praticamente não interferiram na identidade imunológica de Dtxd (Figura 48).

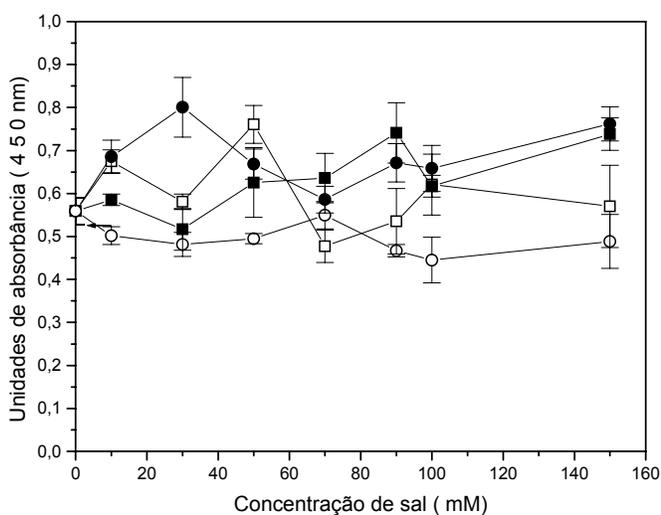


Figura 48: Efeito dos sais da série de Hofmeister sobre a identidade imunológica de Dtxd após emulsificação. As amostras KSCN (■), NaH_2PO_4 (●), NaCl (□) e $MgCl_2$ (○) após emulsificação em CH_2Cl_2 foram analisadas por ELISA .

As possíveis variações conformacionais destes sobrenadantes do Dtxd obtidos após emulsificação na presença de sais da série de Hofmeister também foram observadas por CD. Todos os espectros foram comparados com o controle que foi realizado com Dtxd $7,36 \mu M$ em água e antes de ser emulsificado com CH_2Cl_2 .

As variações observadas nos espectros de CD de cada um dos sais sobre a conformação de Dtxd (Figuras 49 a 52) serão resumidamente agrupadas em duas figuras principais (Figuras 53 e 54).

Observou-se que o KSCN não alterou os valores de $[\Theta_{222 \text{ nm}}]$ em todas as concentrações de sal estudadas (Figura 49). Os valores de $[\Theta_{260 \text{ nm}}]$ em que as solubilidades de Dtxd foram maiores (Figura 46, entre 30 e 70 mM de KSCN) corresponderam aqui a efeitos Cotttons positivo (KSCN 30 mM) ou negativos mas muito próximos ao zero (KSCN 50 - 70 mM) (Figura 54).

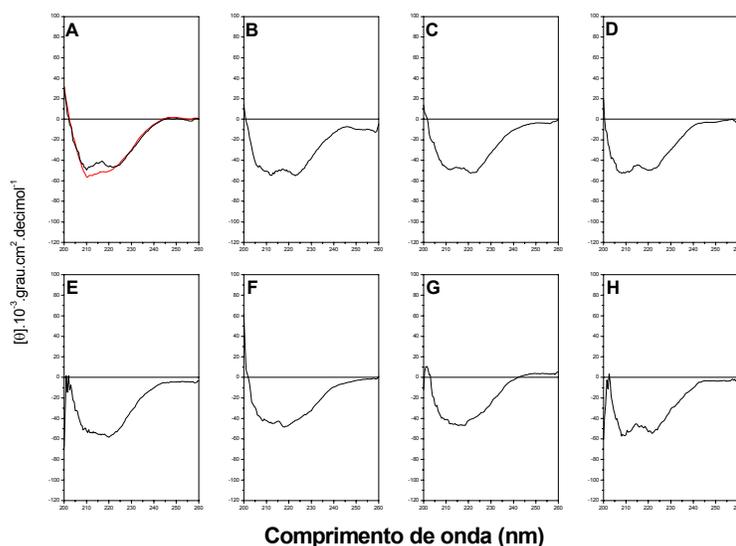


Figura 49. Efeito do KSCN sobre a estrutura do Dtxd durante emulsificação em CH_2Cl_2 . Os espectros de CD foram realizados utilizando-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Controle: A. Dtxd 7,36 μM padrão em água pH 7,2 sem emulsificar (-) e Dtxd 7,36 μM emulsificado em CH_2Cl_2 sem KSCN (-) e na presença de (B) KSCN 10 mM, (C) KSCN 30mM, (D) KSCN 50 mM, (E) KSCN 70 mM, (F) KSCN 90 mM, (G) KSCN 100mM e (H) KSCN 150 mM.

Observou-se que o NaCl alterou bastante valores de $[\Theta_{222 \text{ nm}}]$ em todas as concentrações de sal estudadas (Figura 50). Vale ressaltar que o menor valor de $[\Theta_{222 \text{ nm}}]$ correspondeu aquele observado na presença de NaCl 150 mM (Figura 50) o que correspondeu a um valor ligeiramente menor da solubilidade de Dtxd em relação ao valor inicial (Figura 46). Os valores de $[\Theta_{260 \text{ nm}}]$ foram negativos, mas próximos ao zero entre 0 e NaCl 90 mM de (Figura 54). A partir de NaCl 100 mM e até NaCl 150 mM observaram-se efeitos Cotton positivos, mas próximos de zero.

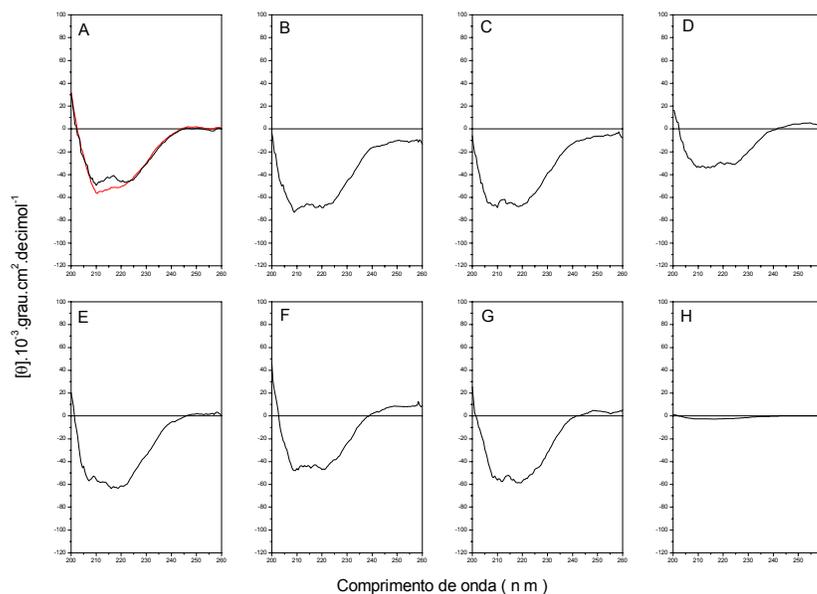


Figura 50. Efeito do NaCl sobre a estrutura do Dtxd durante emulsificação em CH_2Cl_2 . Os espectros de CD foram realizados utilizando-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Controle: A. Dtxd 7,36 μM padrão em água sem emulsificar (—) e Dtxd 7,36 μM emulsificado em CH_2Cl_2 sem NaCl (—) e na presença de (B) NaCl 10 mM, (C) NaCl 30 mM, (D) NaCl 50 mM, (E) NaCl 70 mM, (F) NaCl 90 mM, (G) NaCl 100 mM e (H) NaCl 150 mM.

Observou-se que o NaH_2PO_4 diminuiu os valores de $[\Theta_{222 \text{ nm}}]$ em todas as concentrações de sal estudadas (Figura 51). Vale ressaltar que o menor valor de $[\Theta_{222 \text{ nm}}]$ correspondeu aquele observado na presença de NaH_2PO_4 10 mM (Figura 51). Os valores de $[\Theta_{260 \text{ nm}}]$ foram negativos até NaH_2PO_4 40 mM de (Figura 54). A partir de NaH_2PO_4 50 mM e até NaCl 150 mM observaram-se efeitos Cotton positivos próximos de zero ou zero (Figura 54).

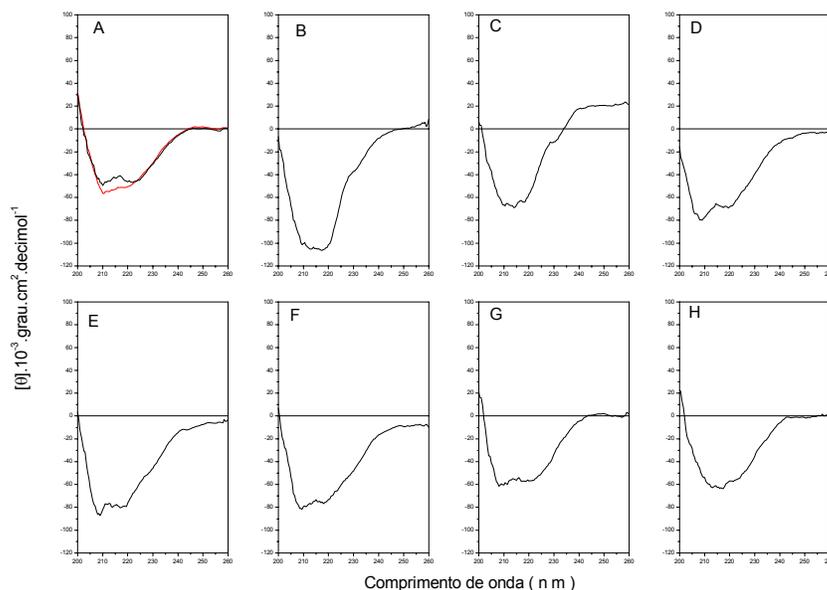


Figura 51. Efeito do NaH_2PO_4 sobre a estrutura do Dtxd durante emulsificação em CH_2Cl_2 . Os espectros de CD foram realizados utilizando-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Controle: A. Dtxd 7,36 μM padrão em água sem emulsificar (—) e Dtxd 7,36 μM emulsificado em CH_2Cl_2 sem NaH_2PO_4 (—) e na presença de (B) NaH_2PO_4 10 mM, (C) NaH_2PO_4 30mM. (D) NaH_2PO_4 50 mM, (E) NaH_2PO_4 70 mM, (F) NaH_2PO_4 90 mM, (G) NaH_2PO_4 100mM e (H) NaH_2PO_4 150 mM.

Observou-se que o MgCl_2 aumentou os valores de $[\Theta_{222 \text{ nm}}]$ em todas as concentrações de sal estudadas, exceto a MgCl_2 150 mM (Figura 52). Os valores de $[\Theta_{260 \text{ nm}}]$ foram zero ou negativos até MgCl_2 150 mM de (Figura 54). Todos estes valores negativos foram relacionados com aberturas da ligação S-S $\geq 120^\circ$.

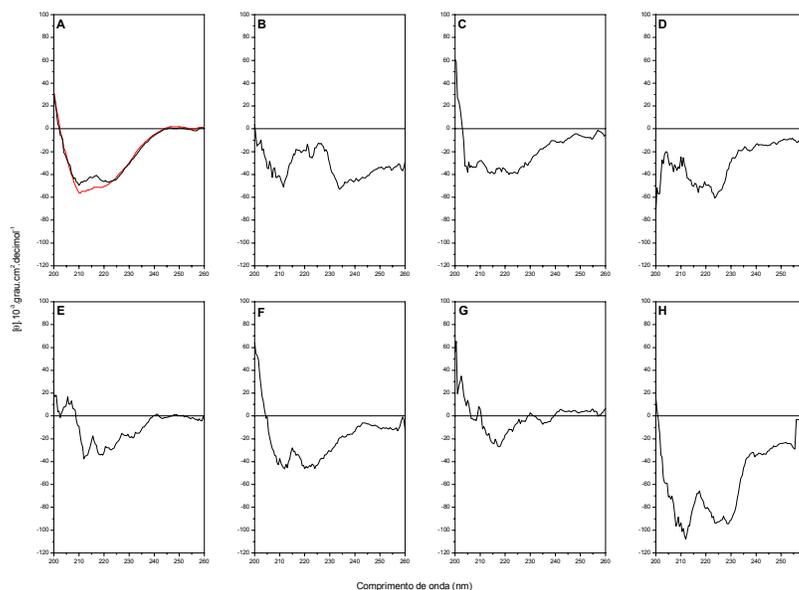


Figura 52. Efeito do $MgCl_2$ sobre a estrutura do Dtxd durante emulsificação em CH_2Cl_2 . Os espectros de CD foram realizados utilizando-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Controle: A. Dtxd 7,36 μM padrão em água sem emulsificar (—) e Dtxd 7,36 μM emulsificado em CH_2Cl_2 sem $MgCl_2$ (—) e na presença de (B) $MgCl_2$ 10 mM, (C) $MgCl_2$ 30mM, (D) $MgCl_2$ 50 mM, (E) $MgCl_2$ 70 mM, (F) $MgCl_2$ 90 mM, (G) $MgCl_2$ 100mM e (H) $MgCl_2$ 150 mM.

Resumindo, o conteúdo em hélice- α ($[\Theta]_{222nm}$) do Dtxd na presença de NaH_2PO_4 (Figura 53) aumentou em toda a faixa de concentração estudada. Na presença de $NaCl$ apareceram oscilações em torno do valor inicial (Figura 53). O efeito maior na conformação de Dtxd, com respeito ao Efeito Cotton negativo, foi observado nos sobrenadantes de Dtxd emulsificado na presença de $MgCl_2$ (Figura 53). A conformação de Dtxd na presença de $KSCN$ foi o que permaneceu estável em toda faixa de concentração estudada (Figura 53).

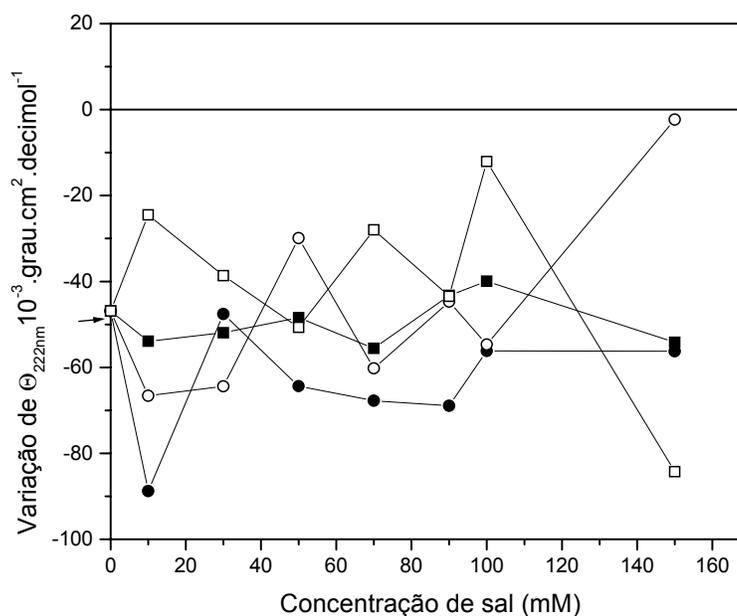


Figura 53: Efeito da concentração dos sais da série de Hofmeister no $[\Theta]_{222\text{nm}}$ de Dtxd. As amostras do Dtxd $7,36 \mu\text{M}$ obtidas nas presenças de KSCN (■), NaH_2PO_4 (●), NaCl (□) e MgCl_2 (○) após emulsificação em CH_2Cl_2 foram analisadas por CD. Dtxd antes da emulsificação, indicado nos gráfico através da seta rosa.

A conformação do ângulo diédrico da ligação S-S (que liga o fragmento B ao A) do Dtxd também sofreu alteração durante o processo de formação da primeira emulsão. É importante lembrar aqui que o Dtxd tem duas pontes S-S ($\text{C}_{186}\text{-C}_{201}$ e $\text{C}_{461}\text{-C}_{471}$). Uma destas ligações S-S é inter-cadeias (FA-FB, $\text{C}_{186}\text{-C}_{201}$) e a outra é intra-cadeia (FB $\text{C}_{461}\text{-C}_{471}$) (Esquema 2). Dentre estas duas ligações, a mais provável de sofrer mudanças conformacionais é aquela entre $\text{C}_{186}\text{-C}_{201}$ do que a $\text{C}_{461}\text{-C}_{471}$, isto por impedimentos estéricos. Sabe-se que variações angulares $\geq 120^\circ$ implicam em um efeito Cotton negativo e variações $\leq 60^\circ$ implicam em um efeito Cotton positivo.

As menores variações do ângulo diédrico $\text{C}_{186}\text{-C}_{201}$ foram aquelas referentes aos espectros obtidos na presença de NaCl (Figura 54). Até 40 mM de NaH_2PO_4 a abertura de provavelmente da ligação $\text{C}_{186}\text{-C}_{201}$ do Dtxd foi $\geq 120^\circ$ e acima de 50 mM permaneceu $\leq 60^\circ$ (Figura 54). As maiores variações notadas foram aquelas

referentes ao MgCl_2 que passou de uma conformação $\leq 60^\circ$ para uma conformação com o ângulo diédrico $\geq 120^\circ$ (Figura 54), o que implica em uma abertura da proteína. Entre 30 e 70 mM de KSCN, abertura de $\text{C}_{186}\text{-C}_{201}$ do Dtxd passou de um valor positivo para um negativo, mas, próximo de zero (Figura 54) o que correspondeu a um Dtxd com conformação fechada. Ou seja, a maior solubilidade de Dtxd correspondeu a uma conformação com abertura do ângulo diédrico S-S $\leq 60^\circ$, provavelmente o $\text{C}_{186}\text{-C}_{201}$ obtida na presença do caotrópico KSCN (Figura 54).

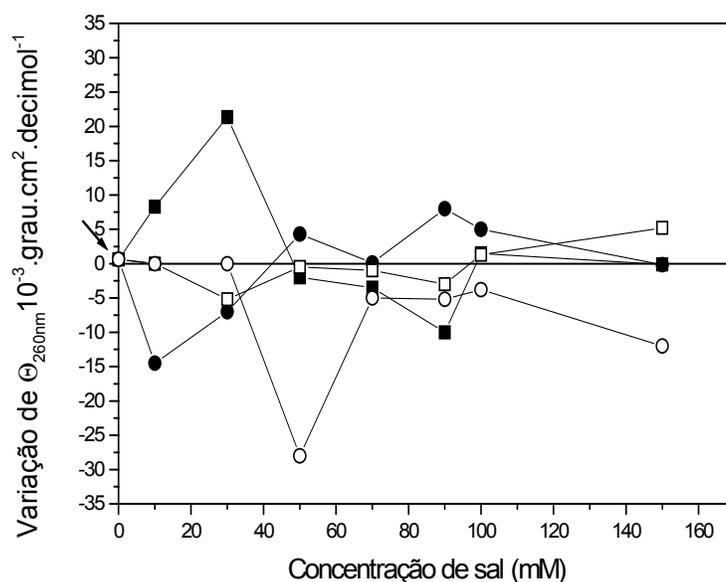


Figura 54: Efeito da concentração dos sais da série de Hofmeister no $[\Theta]_{260\text{nm}}$. As amostras do Dtxd $7,36 \mu\text{M}$ obtidas nas presenças de KSCN (■), NaH_2PO_4 (●), NaCl (□) ou MgCl_2 (○) após emulsificação em CH_2Cl_2 foram analisadas por CD. Dtxd antes da emulsificação, indicado nos gráficos através da seta rosa.

Foram analisados os espectros de fluorescências das fases aquosas de Dtxd $7,36 \mu\text{M}$ após emulsificação na presença de CH_2Cl_2 e calculou-se a razão entre as intensidades de fluorescências a 350 nm e a 330 nm (Figura 55). Sabe-se que através desta razão entre as intensidades de fluorescência podem-se verificar exposições de resíduos hidrofóbicos para um meio mais polar.

Observou-se que as presenças de $MgCl_2$ em todas as concentrações levaram a um aumento na razão F350/F330, indicando uma maior exposição de W ao meio (Figura 55). Também se observou que o KSCN e o NaH_2PO_4 nas concentrações de 30 a 150 mM aumentaram em 7 % a razão F350/F330 (Figura 55). O NaCl foi o sal onde se observou a menor exposição de Triptofano (Figura 55).

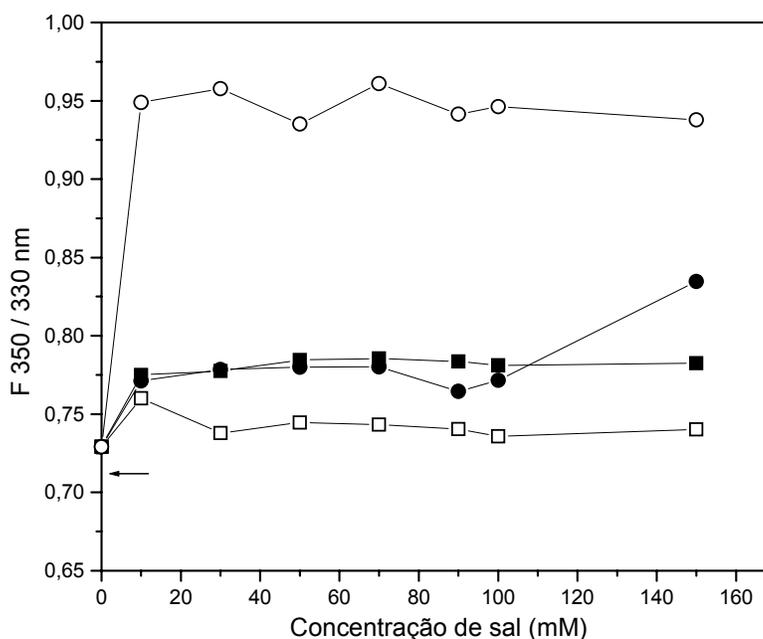


Figura 55: Relação das intensidades de fluorescências a 350 e a 330 nm das amostras na fase aquosa de Dtxd após emulsificação com CH_2Cl_2 na presença de sais da série de Hofmeister. Os sobrenadantes da proteína obtidos nas presenças de KSCN (■), NaH_2PO_4 (●), NaCl (□) ou $MgCl_2$ (○) após emulsificação em CH_2Cl_2 , foram analisados por espectroscopia de fluorescência. A seta indica a relação F350/F330 da Dtxd em H_2O sem sofrer o processo de emulsificação.

Resumindo, concluiu-se que a 35 % da solubilidade do toxoide diftérico foi perdida somente com a agitação a 24 000 rpm na presença de CH_2Cl_2 . Os sais cosmotrópicos, NaCl e NaH_2PO_4 não alteraram esta perda da solubilidade do Dtxd quer tenha sido ela causada pela agitação ou pelas forças de cisalhamento com conseqüente aumento da interface hidrofóbica do CH_2Cl_2 . A agregação do Dtxd induzida pela agitação em presença de solventes orgânicos

não foi relacionada com o aumento de dímeros de Dtxd- que permaneceram constantes em todas as situações estudadas (o dímero é solúvel (CAMPANA et al., 2004)) mas sim com um agregado envolvendo mais moléculas. O toxoide diftérico não foi hidrolisado pela agitação da primeira emulsão, pois os conteúdos em FA e FB permaneceram constantes em todas as condições experimentais. A conformação do Dtxd reconhecida imunologicamente foi perdida após emulsificação na presença de MgCl₂. Esta perda de identidade imunológica do Dtxd na presença de MgCl₂ correspondeu a uma proteína menos enovelada e mais aberta para o meio. Esta conformação mais aberta significou também uma exposição de resíduos hidrofóbicos para o meio. O KSCN protegeu o Dtxd do desenovelamento, da abertura da ligação S-S e do dano imunológico. O aumento da solubilidade para 95 % correspondeu, portanto, a uma proteína com estrutura mais próxima da nativa. Nesta fase do processo de preparo de microesferas o pH é 7,0. Neste pH, o Dtxd é hidrofílico (SILVA et al., 2006).

4.4.6. Efeito do KSCN na eficiência de encapsulação do Dtxd em Ms de PLGA.

Dentro do contexto apresentado acima, realizou-se um experimento encapsulando-se o Dtxd na presença de KSCN. A presença de KSCN 30 mM aumentou 10,42 %, passando de 53,84 para 64,26 % a eficiência de encapsulação do Dtxd (12 kDa-COOME) e em 23,2 % (passando de 46,41 % para 69,63 %) quando o PLGA foi de 12 kDa com -COOH livre. *Conclui-se que KSCN é uma solução simples e econômica para se aumentar não só percentagem de encapsulação do Dtxd em MS de PLGA como também para preservar a integridade estrutural deste antígeno. A*

toxicidade do KSCN não é alta e o sal está presente em inúmeros vegetais (dose letal para um adulto, homem de 70 kg é de 30 g).

4.4.7. Efeito das variáveis na composição dos polímeros sobre a cinética de liberação de Dtxd *in vitro*.

Vários parâmetros do processo de microencapsulação podem ser ajustados para produção de MS-PLGA com características de tempo de degradação desejadas. Controlando-se o tamanho das partículas ou a massa molar e a terminação do polímero (-COOH ou -COOMe) controla-se a liberação do soluto. Nessa tese optou-se por encapsular o Dtxd usando-se PLGAs de 12, 34 e 63 kDa com terminações livres (-COOH) ou metiladas (-COOMe) para se desenhar e otimizar uma formulação de vacina ideal, ou seja com três tempos de liberações distintos. Produziram-se microesferas com tamanhos médios de 11 μm de diâmetro (Figura 55). A MS-PLGA produzida com PLGA de 12 kDa com -COOH foi mais porosa do que aquela produzida com 12kDa com -COOMe (Figura 56 A e B, respectivamente). As MS produzidas com a série de 34 kDa (Figura 56 C e D) apresentaram as superfícies enrugadas. Os poros das MS-PLGA da série de PLGA de 12 kDa-COOH foram maiores do que aquelas MS-PLGA da série de PLGA de 34 kDa. As microesferas produzidas com polímeros da série de 63 kDa (Figura 56 E e F) foram enrugadas. Os poros foram similares aqueles apresentados pelas MS produzidas com os polímeros da série de 34 kDa.

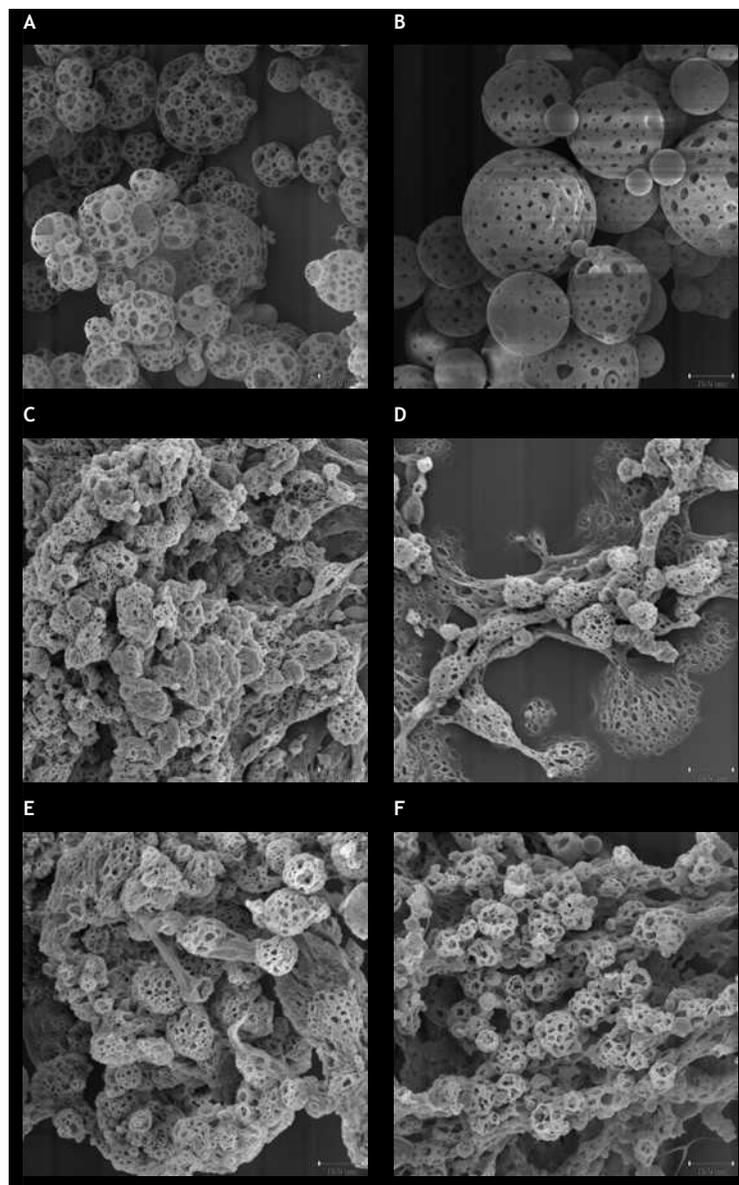


Figura 56. Microscopia eletrônica de varredura de MS-PLGA de vários pesos moleculares e com terminações livres (-COOH) ou metilados (-COOMe). Foram usados os polímeros: **A.** PLGA 12 KDa-COOH; **B.** PLGA 12 KDa-COOMe; **C.** PLGA 34 KDa-COOH; **D.** PLGA 34 KDa-COOMe; **E.** PLGA 63 KDa-COOH e **F.** PLGA 63 KDa-COOMe.

A presença de Dtxd não alterou a morfologia das MS em todos os polímeros estudados (Figura 57 A- F).

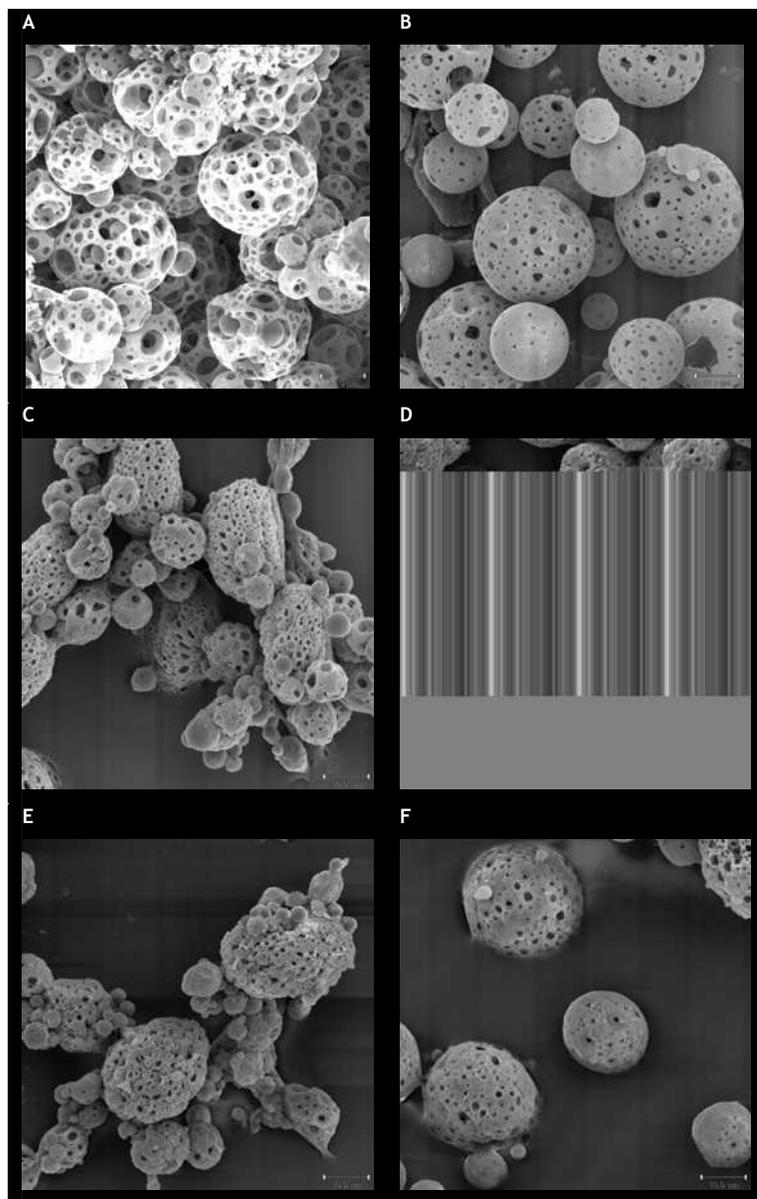


Figura 57. Microscopia eletrônica de varredura de MS-PLGA de vários pesos moleculares e com terminações livres (-COOH) ou metilados (-COOMe) contendo Dtxd. Foram usados os polímeros: A. PLGA 12 KDa-COOH; B. PLGA 12 KDa-COOMe; C. PLGA 34 KDa-COOH; D. PLGA 34 KDa-COOMe; E. PLGA 63 KDa-COOH e F. PLGA 63 KDa-COOMe.

As eficiências de encapsulações das MS-PLGA aumentaram com os aumentos das massas molares de 12, 34 e 63 kDa com terminações -COOH (**Figura 58 A**). A metilação dos PLGAs não alterou a ordem de eficiência de encapsulação, ou seja, aumentou com o aumento do peso molecular (**Figura 58 B**).

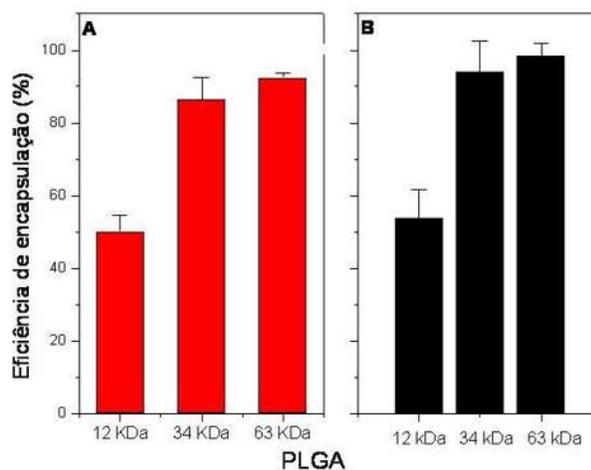


Figura 58: Comparação entre as eficiências de encapsulações das MS-PLGAs preparadas com polímeros diferentes. A: MS-PLGAs-COOH de 12, 34 e 63 kDa B: MS-PLGA-COOME de 12, 34 e 63 kDa).

Dentro da série PLGA-COOH, a liberação de Dtxd foi inversamente proporcional ao aumento da massa molar do polímero (Figura 59 A). As MS-PLGA-COOME que mais retiveram o Dtxd foram aquelas produzidas com PLGA de 12 kDa (Figura 59 B). *O mais interessante de se observar foi que foram obtidos, pelo menos, três formulações com três tempos de liberações dos solutos bem diferentes (Figura 59 A e B).*

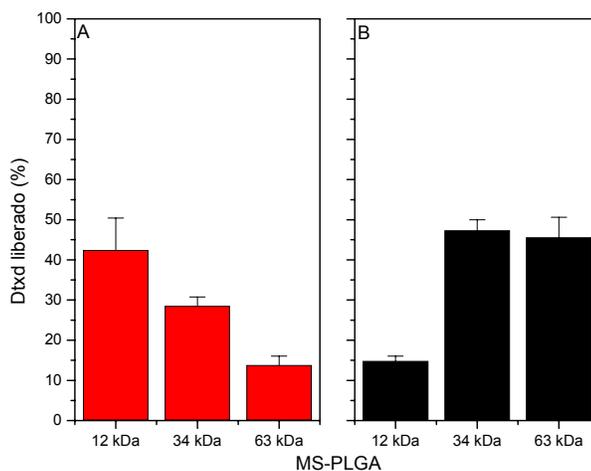


Figura 59. Efeito das massas molares e das terminações de polímeros de PLGA sobre a liberação de Dtxd na primeira semana de incubação a 37°C. O Dtxd foi encapsulado em MS-PLGAs-COOH (A) ou COOME (B). Os conteúdos de Dtxd liberados desta série de MS-PLGAs foram medidos através de leitura de absorvância a 269 nm (CAMPANA *et al.*, 2004).

O maior conteúdo de Dtxd liberado foi observado naquela formulação de MS preparada com PLGA-COOH de 34 kDa (**Figura 60 C**). O menor conteúdo de Dtxd liberado (40 % depois de 5 semanas) foi observado naquelas MS preparadas com PLGA-COOH de 63 kDa (**Figura 60 E**).

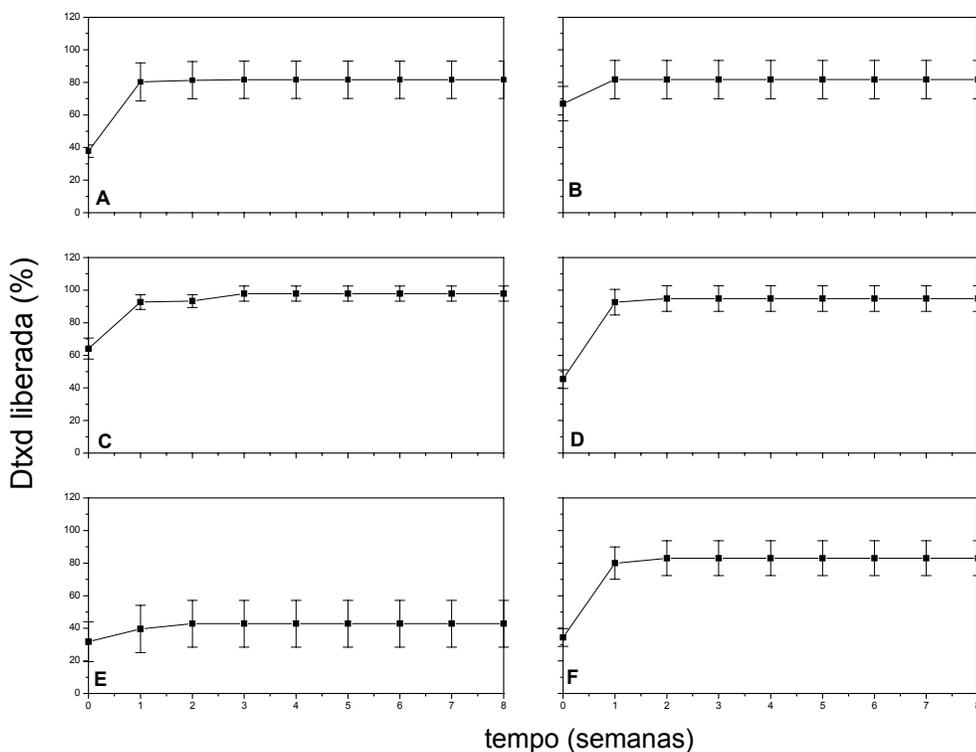


Figura 60. Efeito das massas molares e das terminações de polímeros de PLGA sobre a liberação de Dtxd durante 8 semanas de incubação a 37°C. O Dtxd foi encapsulado em MS-PLGAs-COOH 12 kDa (A) ou de 34 kDa (C) e de 64 kDa (E) ou COOMe de 12 kDa (B) ou 34 kDa (D) e de 64 kDa (F). Os conteúdos de Dtxd liberados desta série de MS-PLGAs foram medidos através de leitura de absorvância a 269 nm (CAMPANA *et al.*, 2004).

O tempo de residência de Dtxd encapsulado nestas MS com diferentes massas molares com carboxi terminais livres (**Figura 61 A**) ou metilados (**Figura 61 B**) influenciou no reconhecimento imunológico do toxoide diftérico. Até a segunda semana de incubação a 37°C houve maior proteção do Dtxd encapsulado em MS carboximetiladas (**Figura 61 B**).

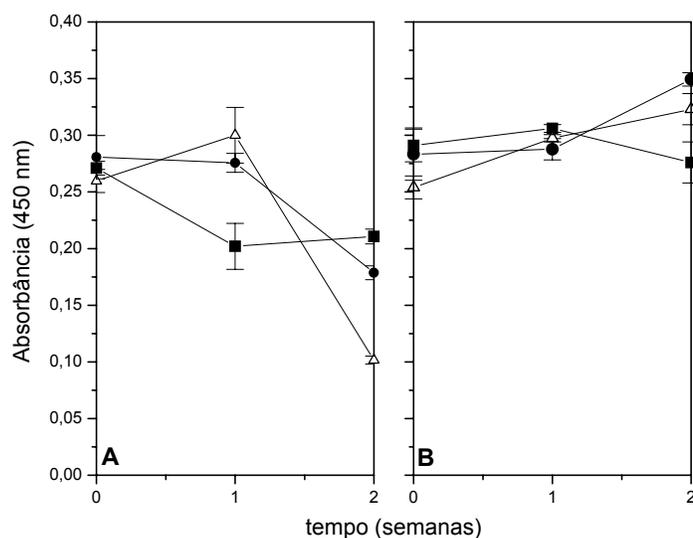


Figura 61. Identificação imunológica do Dtxd liberado de MS preparadas com diferentes PLGAs. O Dtxd foi encapsulado em MS-PLGAs -COOH (A) ou COOMe (B) de 12 kDa (-■-) 34 kDa (-●-) ou 63 kDa (-△-) . As identificações imunológicas de Dtxd liberados desta série de MS-PLGAs foram medidas através de ELISA.)

4.5. Ensaios *in vivo*

4.5.1. Imunização de camundongos. (Protocolos de imunizações e sangrias).

a. Efeito da microencapsulação do toxoide diftérico em PLGA sobre a produção de anticorpos anti-diftérico em camundongos.

Dois grupos de camundongos foram injetados com a mesma dose de Dtxd na forma livre (**Figura 62**) ou encapsulado em microesferas de PLGA (Massa molar 45-75 kDa). Observaram-se altos títulos de anticorpos tanto para os animais imunizados com Dtxd encapsulada quanto com Dtxd livre (**Figura 62**). O grupo imunizado com Dtxd encapsulado em MS foi superior ao grupo imunizado com Dtxd livre (**Figura 62**). O grupo que recebeu microesferas vazias não produziu anticorpos contra Dtxd. Houve resposta aumentada depois da segunda dose de Dtxd (injetada livre), o que indica, parcialmente, memória imunológica. Entretanto, a dose de Dtxd injetada

nos camundongos foi muito alta (50 $\mu\text{g}/\text{animal}$) e por isto decidiu-se repetir o experimento de imunização de camundongos com doses menores do antígeno.

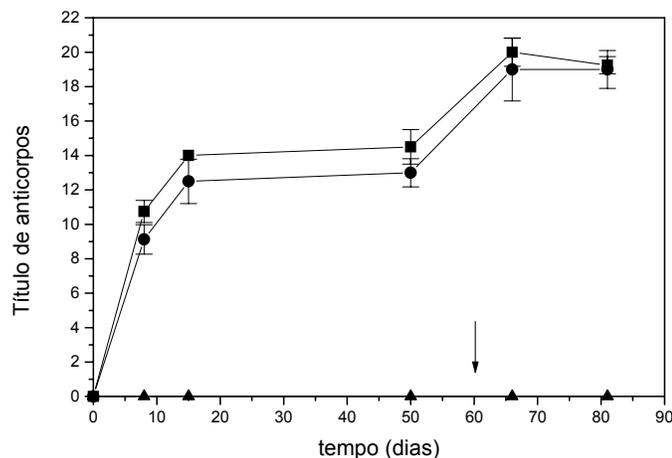


Figura 62. Formação de anticorpos contra Dtxd em função do tempo. Os camundongos foram imunizados com 50 μg de Dtxd encapsulado em microesferas (■) ou livre (●). A dose de reforço (50 μg de Dtxd livres) foi aplicada 60 dias após a primeira imunização (indicado pela seta). O grupo controle (injetados com microesferas vazias) não produziu anticorpos contra Dtxd (Δ).

b. Imunização de camundongos com baixas doses de Dtxd livre e encapsulado em MS.

Quatro grupos de camundongos foram injetados com duas quantidades diferentes de Dtxd encapsulado em microesferas de PLGA ou livre (1 e 5 μg de antígeno por animal). A formação de anticorpos (IgG total) foi dosada por ELISA. Nos animais imunizados com 1 μg ou 5 μg dose de antígeno encapsulado em microesferas de PLGA a produção de anticorpos foi maior do que a observada nos animais imunizados com 5 μg dose de antígeno livre e muito mais alta do que nos animais imunizados com 1 μg antígeno livre (**Figura 63**). Neste caso pode-se observar uma relação dose-resposta. Já quando a dose do antígeno foi muito alta (**Figura 64**) houve saturação do sistema imunológico. O grupo que recebeu microesferas vazias não produziu anticorpos contra Dtxd. As diferenças obtidas

injetando-se doses baixas de antígeno (**Figura 63**) foram mais evidentes do que aquelas obtidas com altas doses de Dtxd (**Figura 63**).

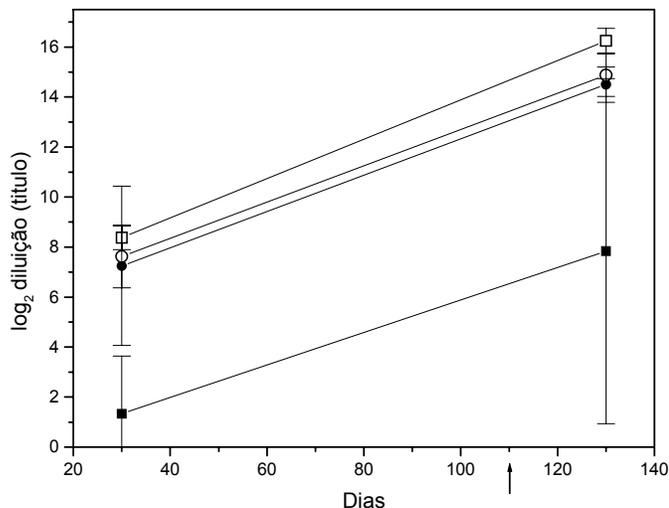


Figura 63: Formação de anticorpos contra Dtxd em função do tempo. Os camundongos foram imunizados com 1 µg de Dtxd livre (■) ou 1 µg de Dtxd encapsulado em microesferas de PLGA (○) ou com 5 µg de Dtxd livre (●) ou 5 µg de Dtxd encapsulado em microesferas de PLGA (□). A dose de reforço (5 µg de Dtxd livre) foi aplicada 110 dias após a primeira imunização. O grupo controle (injetados com microesferas vazias) não produziu anticorpos contra Dtxd.

c. Estudo do efeito da matriz polimérica e do tempo da administração da dose reforço sobre a produção de anticorpos anti-diftérico (IgG1 e IgG2a).

Foram realizados experimentos biológicos com três das formulações descritas, a saber, MS de PLGA-COOH de 12 kDa, MS de PLGA-COOMe de 12 kDa e a terceira com MS de PLGA-COOMe de 63 kDa. Todos os camundongos foram imunizados com 5 µg de Dtxd encapsulados nestas MS/PLGA. Os soros foram analisados quanto à formação de IgG1 e IgG2_a anti-diftéricos. Além disso, foram analisados os efeitos do tempo da administração da segunda dose de vacina (reforço, ou booster, com 5 µg de Dtxd livre). Os reforços foram injetados após 36 dias ou 138 dias da primeira imunização. Para se comparar os resultados obtidos,

integraram-se as áreas sob as curvas de anticorpos formados dos gráficos da figura 65.

Após o reforço (dado no 36^o dia), os animais imunizados com Dtxd/MS/PLGA de 63 kDa -COO-Me apresentaram uma formação de IgG₁ 12 % superior ao controle (**Figura 64 A**). Os animais imunizados com os PLGAs de 12 kDa tanto livre como metilado não apresentaram diferenças significativas na produções de anticorpos em relação ao controle (**Figura 64 A**). Ainda analisando-se a formação de IgG₁, os grupos que receberam o reforço após 138 dias os títulos foram maiores do que o grupo controle. Comparando-se os três polímeros utilizados 12 kDa -COOH, 12 kDa-COOMe ou 63 kDa-COOMe, os aumentos foram respectivamente de 37 %, 47 % e 30 % em relação ao controle (**Figura 64 B**).

Para a formação de IgG_{2a}, observou-se que o grupo que recebeu microesferas vazias não produziu anticorpos contra Dtxd. Os camundongos imunizados com MS contendo Dtxd e que receberam a dose reforço após 36 dias, produziram maior quantidade de anticorpos do que o grupo controle (**Figura 64 C**). Comparando-se os três polímeros utilizados 12 kDa-COOH, 12 kDa-COOMe ou 63 kDa-COOMe, os aumentos foram respectivamente de 26 %, 12 % e 55 % (**Figura 64 C**). Ainda analisando-se a formação de IgG_{2a}, os grupos de animais que receberam o reforço após 138 dias da primeira imunização, produziram maior quantidade de anticorpos do que o grupo controle (**Figura 64 D**). Comparando-se os três polímeros utilizados 12 kDa-COO-H, 12 kDa-COOMe ou 63 kDa-COO-Me, os aumentos foram respectivamente de 185 %, 129 % e 143 % (**Figura 64 D**).

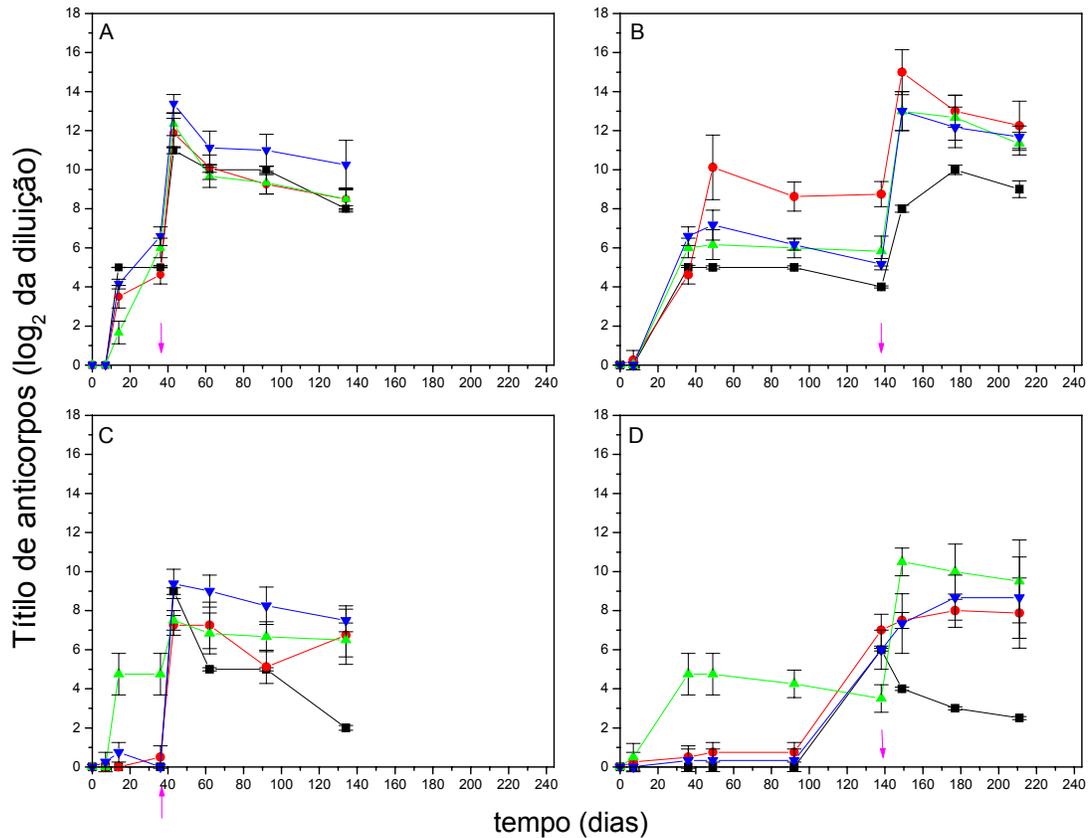


Figura 64: Efeito da massa molar do PLGA e do tempo de aplicação da dose reforço sobre a formação de anticorpos anti diftéricos. O IgG1 A e B; IgG2a C e D foram dosados por ELISA. Os camundongos foram imunizados com 5 µg de Dtxd encapsulado em: PLGA 12kDa-COOH (-▲-) ou PLGA 12 kDa-COOme (-●-) ou PLGA 64 kDa-COOme (-▼-). Como controle, camundongos foram imunizados com 5 µg de Dtxd livre (-□-). As setas rosa indicam os tempos das aplicações das doses de reforços.

Conclui-se que além do efeito adjuvante das MS-PLGA, houve não só a formação de anticorpos em quantidade (IgG₁) mas também em maturidade (IgG_{2a}). A variação do tempo da injeção de reforço também foi muito importante no desenvolvimento de anticorpos específicos (Figura 64).

5. DISCUSSÃO

Os métodos analíticos e preparativos usados para os controles de qualidade das preparações de proteína e microesferas foram certificados pelas razões que se seguem. O Dtxd pode ser dosado por medida de absorção no uv (269 nm), num método rápido e sem necessidade de se usar reagentes (CAMPANA *et al.*, 2004). Este dado foi útil quando aplicado ao método desenvolvido no sistema de HPLC. Nos processos biotecnológicos e farmacêuticos é interessante sempre pensar em custos e, portanto, um método analítico preciso, medido por variações de absorbância na região do uv, sem o uso de reagentes pode ser um fator econômico considerável no processo como um todo (QUINTILIO *et al.*, 1997; SATO e COSTA, 1996). Estes resultados só foram possíveis por se conhecer bem a estrutura do Dtxd.

Observaram-se, por HPLC, correlações entre aumento das concentrações de cada espécie molecular de Dtxd e aumento das áreas dos cromatogramas (**R**, coeficiente de correlação entre 0,9999 e 0,9908). Observou-se que a sensibilidade do método foi alta, como pode ser verificado através dos coeficientes angulares e os coeficientes de correlações obtidos (CAMPANA *et al.*, 2004, QUINTILIO *et al.*, 1997).

No micrométodo de dosagem de lactato observaram-se as leituras a 540 nm (**R** = 0,99488) e a 550 nm (**R** = **0,99965**). Uma vez adaptado o método de dosagem de lactato, pode-se então, diminuir em 10 vezes o volume de reagentes e amostras de forma a se fazer microdosagens automáticas em placa de ELISA. O método foi linear até 15 µg/mL de lactato. Por HPLC, observou-se um coeficiente de correlação de 0,9999 para dosagem de lactato através de coluna de troca iônica monitorada por absorbância a 215 nm. Em ambos os métodos tomaram-se em

consideração, além da sensibilidade desejada, a análise de custos (QUINTILIO *et al.*, 1997; SATO e COSTA, 1996).

O Dtxd concentrado por ultrafiltração em membranas de policarbonato preservou suas integridades estruturais e imunológicas. O Ponceau-S foi um excelente marcador de conteúdo aquoso interno das microesferas, evitando-se corantes fluorescentes ou radioativos, também pensando em sensibilidade do método e custos operacionais. Pelo método, já tradicional, de dupla emulsão (GIOVAGNOLI *et al.*, 2007; MUNDARGI *et al.*, 2007; NAMUR *et al.*, 2006; DU *et al.*, 2006; GASPAR *et al.*, 1998; HETA *et al.*, 1994; LANGER, 1990; OKADA *et al.*, 1987) usando-se velocidade de rotação da segunda emulsão de 13 000 rpm, relação FC/FD (Fase contínua/fase dispersa) de 1:5 e concentração de PVA de 2 %, encapsulou-se 14,9 µg de Dtxd/mg de microesfera PLGA, numa relação de massas de 0,034 (Dtxd/PLGA). As partículas obtidas, de 5 µm, apresentaram uma superfície rugosa (NAMUR *et al.*, 2006).

De um modo geral o tamanho das microesferas depende de variáveis que estão inerentemente ligadas ao processo de produção. Resumindo, os tamanhos das MS são afetados principalmente pelo sistema usado; pelas velocidades de emulsificações (primária e secundária); pelos volumes da fase interna da emulsão primária; (PARIKH *et al.*, 2003; JEFFERY, DAVIS e O'HAGAN, 1993) volume da fase externa da segunda emulsão (PARIKH *et al.*, 2003; CASTELLANOS *et al.*, 2001). Indiretamente a concentração de estabilizadores como PVA, por exemplo, na fase externa tem um efeito negativo no tamanho da partícula (VANDERVOORT e LUDWIG, 2002); a liofilização tem efeito positivo, ou um efeito de diminuição da partícula não significativo (VANDERVOORT e LUDWIG, 2002). O diâmetro da partícula tende a diminuir com o aumento na velocidade de agitação para a formação da emulsão dupla. A redução na velocidade de agitação, provavelmente, produz um aumento no tamanho das gotículas da emulsão, que subseqüentemente

resulta na formação de microesferas grandes (NAMUR *et al.*, 2006; FREIBERG e ZHU, 2004; COUVREUR *et al.*, 1997). O tamanho da gotícula na emulsão primária pode aumentar com o aumento do volume da fase interna da emulsão primária que por sua vez pode ser responsável no aumento do tamanho das MS (PARIKH *et al.*, 2003; JEFFERY, DAVIS e O'HAGAN, 1993). O tamanho da gotícula na emulsão secundária deve diminuir por causa da diminuição na frequência de colisão das gotículas com um aumento do volume externo da fase da emulsão secundária. A diminuição nos tamanhos das partículas das MS associado com o aumento do volume da fase externa da emulsão secundária pode ser atribuída à diminuição do tamanho da gotícula da emulsão secundária (PARIKH *et al.*, 2003; CASTELLANOS *et al.*, 2001). O efeito negativo relacionado aos estabilizadores significa que um aumento de suas concentrações pode induzir a formação de uma emulsão mais estável visto que leva a formação de partículas menores (NAMUR *et al.*, 2006). Adicionando-se PVA à formulação causa um aumento da viscosidade da fase externa e resulta em gotículas da emulsão maiores e, portanto, partículas maiores, isto contribui para controlar que as gotículas da segunda emulsão colidam. É lógico pensar que quanto maior a concentração de PVA maior seja sua eficiência em controlar que as gotículas colabem após uma colisão (NAMUR *et al.*, 2006). Outra explicação do efeito negativo no tamanho das partículas causada pelos estabilizadores são suas habilidades de diminuir a tensão superficial ou as suas estruturas tridimensionais na interface (COUVREUR *et al.*, 1997). Era de se esperar que os tamanhos das partículas aumentassem depois de sua liofilização, porque as partículas tendem a se agregar durante esse processo. Polímeros com propriedades crioprotetoras como Poloxamer (**Figura 65, A**) e o Carbopol (**Figura 65, B**)

deveriam, quando presentes na superfície, protegê-las da agregação (VANDERVOORT e LUDWIG, 2002; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

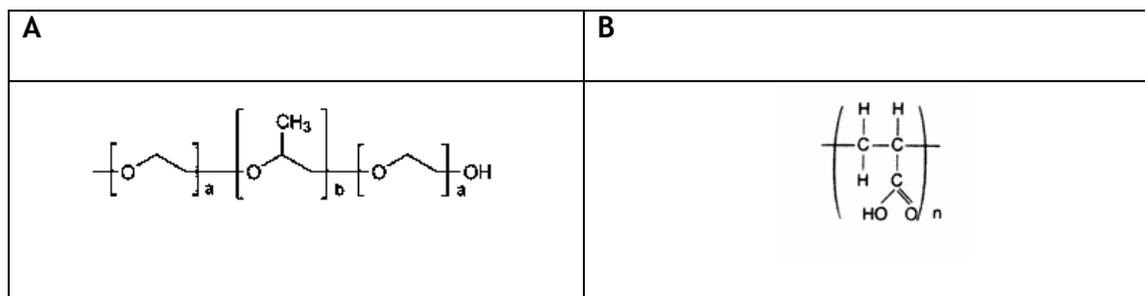


Figura 65: Estrutura do Poloxamer (A) e Carbopol (B).

Nesta tese, decidiu-se estudar as variáveis de agitação, a concentração do estabilizador e a relação FD: FC (relembrando, fase dispersa: fase contínua) porque seus efeitos nos tamanhos das partículas são facilmente manipuláveis de uma forma controlável. Primeiro, as velocidades de agitações são facilmente fixáveis através do aparelho usado para se produzir as microesferas. Segundo, os estabilizadores usados podem afetar o tamanho das MS e então, era importante de se verificar de uma forma sistemática como que tudo isto ocorreria dentro de uma região experimental.

Mas, o tamanho das partículas não foi tão influenciado pelo volume da fase contínua uma vez que a velocidade de agitação é fixa e constante (NAMUR *et al.*, 2006) e o tempo de emulsificação é pequeno (2 minutos). Além disto, o volume ou a geometria do recipiente usado para se fazer a segunda emulsificação pode ser ajustado para permitir uma agitação uniforme. Então, aqui, não houve correlação entre o diâmetro das MS e a relação FD:FC (NAMUR *et al.*, 2006).

Sabe-se (FREIBERG e ZHU, 2004; PARIKH *et al.*, 2003; VANDERVOORT e LUDWIG, 2002; CASTELLANOS *et al.*, 2001; JEFFERY, DAVIS e O'HAGAN, 1993;

QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; COUVREUR *et al.*, 1997) que quando a concentração dos estabilizadores na fase externa (contínua) aumenta, há uma redução no tamanho das MS. Em concentrações altas dos estabilizadores, a velocidade com que as moléculas do estabilizador se difundem nas interfaces das gotículas da emulsão pode aumentar, resultando numa presença grande do estabilizador na superfície das gotículas da emulsão (VANDERVOORT e LUDWIG, 2002; COUVREUR *et al.*, 1997). Isto induz a uma melhoria na proteção das gotículas contra coalescência, resultando na formação de gotículas da emulsão pequenas em altas concentrações do surfactante. Quando o solvente evapora do sistema, estas gotículas se endurecem, precipitam e formam as MS (VANDERVOORT e LUDWIG, 2002; COUVREUR *et al.*, 1997). Portanto, o tamanho das MS assim obtidas é dependente do tamanho e da estabilidade das gotículas da emulsão formadas durante o processo de agitação. Na verdade, se somente a concentração de PVA na fase contínua for analisada observa-se que com o aumento da sua concentração, foram formadas MS de tamanho menores (4 μm). Na menor concentração de PVA usada (0,5 %), produziram-se as maiores MS (15 μm , Tabela 7). Mas um efeito somatório no tamanho das MS foi observado, quando a concentração de PVA na fase contínua e a velocidade de agitação da segunda emulsão foram analisadas de forma combinada (Figura 21). *Este fato corroborou nossas expectativas de que através de um desenho fatorial de estudo estatístico e através da correlação dos dados obtidos seria possível a obtenção de maiores informações sobre o sistema do que a simples análise dos parâmetros do processo, um por um.*

O tamanho das partículas é uma propriedade importante que pode influenciar as propriedades biofarmacêuticas de uma formulação. Por exemplo, formulações com partículas menores têm uma área superficial livre grande, o que

pode levar a uma liberação mais rápida da droga incorporada (GABOR *et al.*, 1999). Em vacinologia, partículas pequenas são necessárias para a produção de vacinas administradas por via nasal, além da necessidade (naturalmente) do fato de serem mucoadesivas. Resumindo, em vacinologia, a biodistribuição, uma possível endocitose e a interação com a membrana mucosa são dependentes dos tamanhos das partículas (VANDERVOORT e LUDWIG, 2002; TAKEUCHI, YAMAMOTO e KAWASHIMA, 2001; GABOR *et al.*, 1999; JEFFERY, DAVIS e O'HAGAN, 1993). Concluiu-se que através do desenho experimental 2^3 com triplicatas no ponto central puderam-se examinar as influências das variáveis do processo (Água₁/Óleo/Água₂, A₁/O/A₂) de obtenção de microesferas sobre o tamanho das partículas. Através da combinação das principais variáveis do processo, a saber, concentração de PVA e velocidade de agitação da segunda emulsificação obtiveram-se microesferas com uma ampla faixa de tamanhos definidos. Estes resultados abrem a possibilidade de se formular vacinas em MS de PLGA com tamanhos desenhados com um mínimo de experimentos (NAMUR *et al.*, 2006).

Efeito do tempo de residência na conformação das proteínas encapsuladas em MS de PLGA.

Uma proteína quando encapsulada em MS de PLGA pode ser degradada por várias razões, como o que discutido na introdução (**Esquema 2**). Nesta fase desta tese, estudaram-se os efeitos que os oligômeros de PLGA liberados para o meio, o pH e surfactantes poderiam ter sobre a estrutura de Dtxd. Se bem que, o surfactante seja um aditivo artificial (ele não existe *in vivo*), o SDS foi usado com o

intuito de impedir, ou minimizar a interação do Dtxd com as MS ou com os oligômeros. Foi usado como conservante o Timerosal[®], ou Thiomersal[®].

O abaixamento de pH ocorre em consequência da degradação da matriz de PLGA (NAMUR et al, 2004; NAMUR e BUENO DA COSTA, 2004; ZHU, MALLERY e SCHWENDEMAN, 2000; ZHU e SCHWENDEMAN, 2000; SCHWENDEMAN *et al.*, 1996; RON *et al.*, 1993). Muito se tem feito no sentido de se proteger a proteína encapsulada do microambiente ácido. Nesta tese, não se usou nenhum aditivo alcalinizante para a manutenção do pH (**Figura 24**). Mas, dos aditivos estudados o que mais preservou a estabilidade de BSA, fibroblasto (bFGF) e proteína de morfogênese óssea (BMP-2) do efeito de baixo pH foi o Mg(OH)₂ (KANG e SCHWENDEMAN, 2002; ZHU e SCHWENDEMAN, 2000; SCHWENDEMAN *et al.*, 1996). Sabe-se que quando o Mg(OH)₂ é co-encapsulado com proteínas em MS ocorre uma grande captura de água pelo sistema. Para saber se esta captura de água exerceria um efeito sinérgico ao fenômeno de neutralização do pH exercido pelo Mg(OH)₂ adicionaram sacarose, reconhecidamente estabilizadora de proteínas em processos de microencapsulações (MCGOFF e SCHEER, 2000; RON *et al.*, 1993). Mas, nos sistemas de microencapsulação de BSA em MS de PLGA, a neutralização de pH pelo Mg(OH)₂ é muito mais importante do que a captura de água que o acompanha (SCHWENDEMAN *et al.*, 1996). Sabe-se que a BSA a baixos pHs sofre uma mudança de conformação reversível - com exposição de resíduos hidrofóbicos - conhecida como transição N→F (PALIWAL e LONDON, 1996). Durante a degradação da matriz de PLGA o pH é abaixado e, portanto no caso de BSA os agregados não covalentes que são formados talvez sejam consequência de interações hidrofóbicas entre as moléculas da proteína. No processo de agregação como um todo, devemos considerar os agregados covalentes formados após exposição de grupos -SH (PÉREZ

et al., 2002; CROTTS e PARK, 1997; CONSTANTINO *et al.*, 1997; PETERS, 1985). No caso do Dtxd não há nenhum grupo -SH livre que pudesse levar a formação de agregados covalentes (Esquema 4).



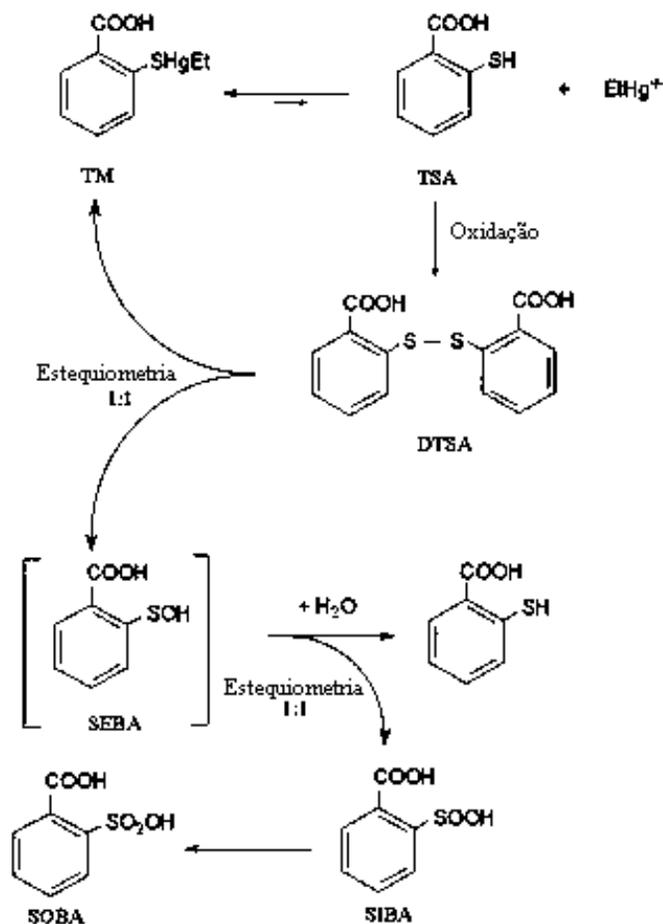
Esquema 4. Representação esquemática do Dtxd, de NAMUR e BUENO DA COSTA, 2004.

Não há dados na literatura que detalhem esta etapa do processo de interação. O que foi observado aqui é que: a mudança conformacional observada no Dtxd incubado com MS-PLGA implicou em diminuição do conteúdo em hélice- α com concomitante transição de folha pregueada- β \rightarrow estrutura desordenada. Estas mudanças conformacionais ocorreram a partir da 5ª semana de incubação e coincidem com o ponto de inflexão do abaixamento do pH do meio, que por sua vez foi causado pelo aumento de oligômeros e monômeros de PLGA a medida que o tempo passou. O que mais chamou atenção, entretanto, foi a formação de fragmentos A e B, a partir da molécula de Dtxd. Resolveu-se estudar, a fundo, qual seria o agente presente no meio que pudesse causar tal dano, uma vez que isto não

poderia ser causado pelos oligômeros em si, nem pelos monômeros dos ácidos láctico e glicólico e muito menos pelo SDS.

Como a vacina anti-diftérica do IB contém Timerosal[®] e como se sabe pela literatura o Timerosal[®] é um reagente de sulfidrina, decidiu-se verificar se havia influência deste agente bactericida na estrutura de Dtxd durante o processo de encapsulação em microesferas de PLGA. Além disto, ambos, Timerosal[®] e ácido láctico (produzido em fases adiantadas da degradação do PLGA), poderiam ter algum outro efeito sinérgico e deletério na estrutura do Dtxd, uma vez que esta proteína tem duas pontes S-S, sabidamente estruturas lábeis.

O Timerosal[®] (TM) também chamado tiomersal, mertiolate ou tiosalicilato sódico de etilmercúrio é um derivado solúvel do ácido tiosalisílico (TSA). Tem sido usado como bactericida de vacinas parenterais e produtos oftálmicos há décadas. Sabe-se, pela literatura, que esse preservante pode se degradar por oxidação formando 2,2' - ácido ditiosalisílico (DTSA), EtHg (íon etil mercúrico), SEBA (ácido 2-sulfenobenzoico), SIBA (ácido e- sulfinobenzoico) e SOBA (ácido 2-sulfonobenzoico) (TAN and PARKIN, 2000; TLEUGABULOVA and PÉREZ, 1996) (**Esquema 5**).



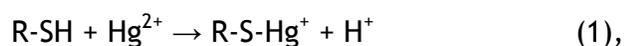
Esquema 5: Rotas possíveis para a degradação de Timerosal[®] (adaptado de Namur et al., 2004 ; Tleugabulova and Pérez, 1996 and Tan and Parkin, 2000) Os compostos originados da degradação de TM são TSA, EtHg (íon etil mercúrico), D TSA (ácido 2, 2'-ditiosalicílico), SEBA (ácido 2-sulfenobenzoico), SIBA (ácido e-sulfinobenzoico) e SOBA (ácido 2-sulfonobenzoico).

O complexo mecanismo de degradação do Timerosal[®] ainda não foi muito estudado em vacinas (TLEUGABULOVA e PÉREZ, 1996). A importância do problema é a formação de compostos desconhecidos nos estágios mais avançados de degradação que possam causar reações adversas em humanos expostos a medicamentos e vacinas contendo TM degradado (TAN e PARKIN, 2000).

Vários compostos influenciam fortemente a degradação do Timerosal[®], como por exemplos o cloreto promove degradação e o EDTA estabiliza (TAN e PARKIN, 2000). O TM é um reativo sulfidrílico versátil, é um mobilizador de cálcio e modulador da função celular (ELFERINK, 1999; DOGAR *et al.*, 2002; PHILIPPE, 1995). A capacidade do TM agir no grupo sulfidrílico está relacionado na literatura à presença de Hg (ELFERINK, 1999; DOGAR *et al.*, 2002).

O que foi proposto nesta parte da tese foi que, *in vitro*, o ácido salicílico-produzido depois da redução do TM pelo ácido láctico, reduziria as pontes S-S do Dtxd, produzindo Fragmento A (FA) e FB (Fragmento B).

Sabe-se, que o TM é um reagente sulfidrílico, mas, surpreendentemente, deu-se pouca atenção ao mecanismo da reação entre TM e compostos sulfidrílicos. A observação, por diversos investigadores, de que o efeito deletérico do TM poderia ser prevenido pelos compostos sulfidrílicos como DTT (ditiotreitól), reforça a idéia da ação de TM através da reação com grupos sulfidrílicos (ELFERINK, 1999). Sabe-se que o Hg²⁺ (presente na molécula de TM) pode atuar como um reagente sulfidrílico e como um reagente oxidante através de reações como:



ou



A reação do timerosal com o grupo sulfidrílico do tipo R-SH é provavelmente uma reação de troca do tipo:

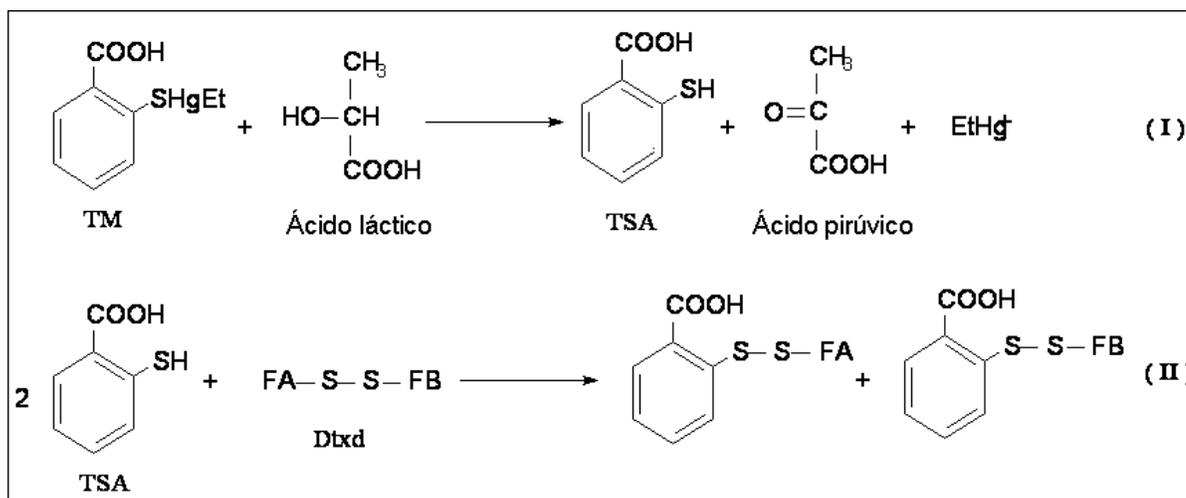


As propriedades reativas do TM são devido à presença de Hg^{2+} , porque, como outros metais pesados, este grupo tem alta afinidade pelo grupo sulfidril (ELFERINK, 1999). O Dtxd não tem grupo -SH livre, mas duas ligações S-S entre as Cys-186-Cys-201 e a Cys-461-Cys-471 (RAPPUOLI, 1997). Portanto, o TM íntegro não pode reagir com o Dtxd. A formulação de Dtxd contendo TM em PBS, pH 7,2 foi estável por mais de 18 meses na geladeira. Isto é corroborado pelo fato de que o TM não reage com Dtxd *in vitro* (PINTADO *et al.*, 1995). Conseqüentemente a instabilidade de Dtxd (ou outra proteína contendo ligação S-S) com o TM nos ensaios realizados deve ser relacionada à presença de ácido láctico no meio.

Está descrito na literatura que durante a degradação de TM são formados, transientemente, TSA e DTSA porque estão ausentes em amostras degradadas de TM (CARABALLO *et al.*, 1993). O DTSA, que deveria ter uma boa estabilidade, reage com outros componentes da mistura, principalmente o íon $EtHg$ (KANG e SCHWENDEMAN, 2002) (Esquema 5). Observou-se, por HPLC, que o pico de TM (11,58 minutos) desapareceu após a reação com o ácido láctico (Figura 43).

A degradação de Dtxd (Figura 27 B) coincidiu com diminuição da identidade imunológica, medida por ELISA (Figura 34). O Dtxd (que contem 2 grupos S-S), depois da interação com os produtos de degradação das MS de PLGA, é clivado em dois fragmentos, a saber A e B (Figuras 27 B), o que explica os dados de ELISA (Figura 34). A degradação ocorreu depois de, pelo menos, cinco semanas de incubação (NAMUR *et al.*, 2004, NAMUR e BUENO DA COSTA, 2004). Este comportamento é paralelo a curva de liberação de ácido láctico (5ª semana) e a diminuição de pH (Figura 24) (NAMUR *et al.*, 2004, NAMUR e BUENO DA COSTA, 2004). Como o meio dos ensaios de incubação de Dtxd com MS continha TM, é proposto nesta tese que a redução de Dtxd, seguida por oxidação é mediada pelo

TSA (**Esquema 6**), formado pela degradação do TM. Não se observaram aumentos de formação de FA ou FB quando o ensaio foi realizado incubando-se Dtxd com TM na presença de HCl. Aqui, nesta tese, a degradação de TM (**Esquema 5**) observada foi mediada pelo ácido láctico. O TSA produzido durante esta sequência de reações reduziu as pontes S-S do Dtxd. O TSA é formado transientemente, como descrito em outros sistemas (KANG e SCHWENDEMAN, 2002; TAN e PARKIN, 2000 e CARABALLO *et al.*, 1993) e não foi detectável por HPLC.



Esquema 6. Redução de Dtxd mediada por TSA formado depois da degradação de TM na presença de ácido láctico (Adaptado de NAMUR *et al.*, 2004).

Sabe-se que o análogo do íon Et-Hg, o íon metil-Hg não se associa significativamente com o grupo disulfeto da cistina (CARTY e MALONE, 1979) e então, não há publicações de íons tanto Et-HG quanto Me-Hg reagindo com compostos disulfetos.

Concluiu-se que (NAMUR *et al.*, 2004) em meio aquoso e a baixo pH, na presença mandatória de ácido láctico, a degradação de TM é maior do que em meio

neutro. A acidificação do meio tem que ser promovida especialmente pelo ácido láctico. A acidificação promovida pelo HCl não altera o TM (**Figura 42**).

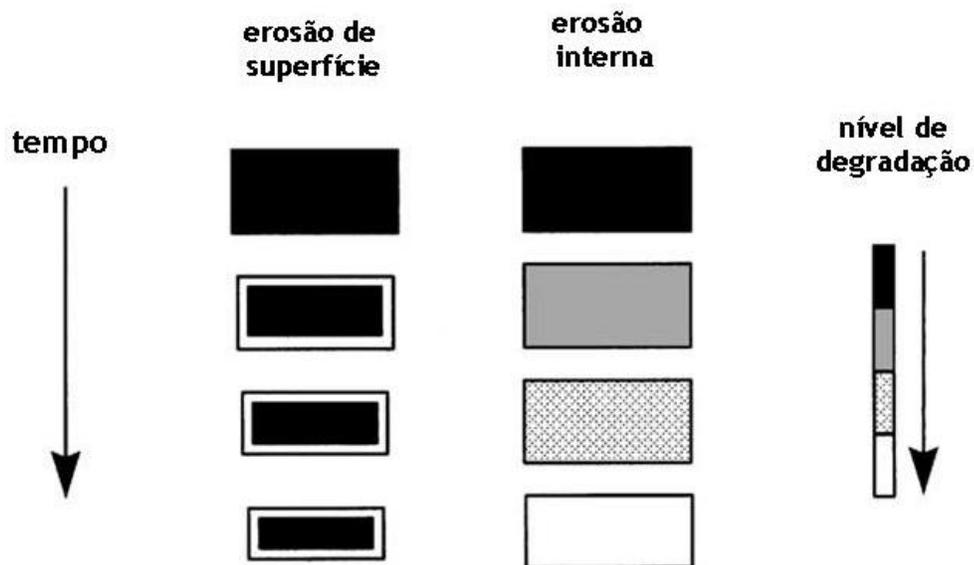
Propõe-se nesta tese que o TSA produzido após a redução de TM pelo ácido láctico, reduz as pontes S-S do Dtxd. Esta redução é imediatamente seguida pelo bloqueio dos dois -SHs formados pela mesma molécula de TSA. À luz destas conclusões (NAMUR *et al.*, 2004) é necessário agora re-interpretar os estudos *in vitro* de degradações-estabilizações de proteínas na presença de MS de PLGA contendo TM, principalmente para aquelas proteínas contendo S-S. Propõe-se aqui que todos os estudos de microencapsulações de proteínas e estudos conformacionais devam ser realizados na ausência de TM (NAMUR *et al.*, 2004).

A partir deste ponto, passou-se então a realizar todos os estudos na ausência de TM. Quando necessário foi usado NaN_3 como conservante.

Efeito do tempo na degradação das matrizes de MS de PLGA.

A grande maioria do conhecimento sobre erosão de MS de PLGA data dos anos 80, quando foram classificados em MS-polímeros com erosão superficial e MS-polímeros com erosão no interior da matriz (bulk) (TAMADA e LANGER, 1993). A única relação de como a erosão esteja relacionada com a estrutura polimérica é a observação de que materiais construídos com grupos funcionais que tenham meia vida de hidrólise curta tendem a ter uma erosão superficial (BURKERSRODA, SCHEDL, GÖPFERICH, 2002). No caso em que ocorre erosão polimérica superficial, isto se faz à velocidade constante durante todo o tempo (GÖPFERICH e LANGER, 1993) (Esquema 7). No caso em que a erosão se faz no seio da matriz polimérica (PLA ou PLGA), o fenômeno é mais complicado e a velocidade varia durante o tempo (GÖPFERICH,

1997). Geralmente, a erosão não ocorre espontaneamente por longos períodos. Não é claro por que um polímero segue um mecanismo ou outro. Pelo que se observa na literatura, durante a erosão superficial, há uma diminuição nítida no volume das partículas em contraste com o que ocorre quando a erosão ocorre de dentro (do seio da matriz) para fora (GÖPFERICH, 1997; BURKERSRODA, SCHEDL, GÖPFERICH, 2002; GÖPFERICH e LANGER, 1993) (Esquema 7).



Esquema 7. Variações que a matriz polimérica de em MS PLGA sofre durante a erosão superficial e a erosão no interior da matriz.

Nesta tese, observou-se (por microscopia de inversão de fase) que em MS preparadas com PLGA (50:50) de 55 kDa houve uma diminuição do tamanho das partículas em função do tempo de incubação (7 semanas). Neste caso, portanto, a erosão da matriz ocorreu de fora para dentro (**Figura 35**), ou seja, de forma superficial como o observado na literatura (GÖPFERICH, 1997; BURKERSRODA, SCHEDL, GÖPFERICH, 2002; GÖPFERICH e LANGER, 1993).

A literatura sobre degradação polimérica, onde ocorre clivagem do polímero é vasta, em contraste com a erosão polimérica (GÖPFERICH, 1997). Foram identificados vários parâmetros que afetam a velocidade de degradação. Dentre eles destacam-se: a composição do copolímero (VERT *et al.*, 1984); autocatálise pelos produtos de degradação ácida no interior da matriz (LI, GARREAU e VERT, 1990_a; LI, GARREAU e Vert, 1990_c); a presença de drogas que degradem a matriz, como a cafeína, por exemplo (LI, GIROD-HOLLAND e VERT, 1996; HELLER, 1986). Entretanto, o impacto destes parâmetros que aumentam ou diminuem a velocidade de degradação do polímero sobre o mecanismo de erosão do polímero ainda é um campo em aberto. É impossível prever como o processo de erosão do polímero é afetado quando a velocidade de degradação é alterada. Pelo que se observou na literatura, conclui-se que a degradação do polímero ocorre durante todo processo e que a erosão só ocorre após decorrido algum tempo de degradação.

Observou-se que dentro da mesma classe de **polímeros de PLGAs-COOH** a velocidade de liberação de lactato (**Figura 37**) é inversamente proporcional ao aumento do peso molecular. Isto é, a liberação de lactato se faz mais acentuadamente nas MS produzidas com PLGA (50:50) de 12 kDa. Resumindo, a velocidade de liberação de lactato se fez na seguinte ordem PLGAs 12 kDa > 34 kDa > 63 kDa. Estas diferenças de velocidades de produções de lactato, entre os polímeros de 34 kDa e 63 kDa, foram mais pronunciadas principalmente a partir da quinta semana de incubação (**Figura 37**). Pode-se deduzir que o processo que predominou nas transformações ocorridas nestas partículas de MS-PLGA (12 kDa, 34 kDa e 63 kDa com carboxiterminal livre) aqui produzidas foi **regido pela erosão no seio da matriz polimérica**, uma vez que lactato em grande quantidade só é observável depois de ocorrida autocatálise ácida da matriz (LI, GARREAU e VERT,

1990_a; LI, GARREAU e Vert, 1990c) . Estes fatos são corroborados pela ausência de variação de tamanho das partículas observáveis por MEV (microscopia eletrônica de varredura) (**Figura 38**). Infelizmente, não há dados na literatura que possam ser comparáveis com os aqui obtidos, pela total falta de um trabalho sistemático com polímeros de mesma composição (PLGA, 50:50 com carboxi terminal livres) e pesos moleculares crescentes.

Em contraste, quando comparadas as liberações de lactato destes últimos dados (com -COOH) com as MS produzidas com PLGAs de mesmos pesos moleculares (12 kDa, 34 kDa e 63 kDa) mas, com carboxi-terminais metilados (-COOMe) as diferenças entre as classes (-COOH e -COOMe) foram bem mais acentuadas (**Figura 37**). Isto vai de encontro com o que está descrito em relação à composição do copolímero (FRIES e SCHLAPP, 2002; BLANCO e ALONSO, 1997; VERT *et al.*, 1984), ou seja se a autocatálise é induzida pela formação de ácido láctico no interior da matriz, quando o polímero tem sua terminação metilada, isto leva a um atraso na degradação seguida por erosão. Os tamanhos das partículas destas preparações (-COOMe) não variaram de tamanho durante o tempo, o que é mais uma indicação de erosão do seio da matriz como o descrito na literatura (BURKERSRODA, SCHEDL e GÖPFERICH, 2002; GÖPFERICH, 1997; GÖPFERICH e LANGER, 1993). Discuti-se, que o mecanismo de erosão de PLGA depende da difusibilidade da água dentro da matriz (BURKERSRODA, SCHEDL e GÖPFERICH, 2002). Naturalmente que um PLGA carboximetilado é mais hidrofóbico do que um com carboxiterminal livre e, portanto, a erosão se faz mais lentamente, uma vez que a autocatálise ácida é dependente de água no meio.

Comportamento de Dtxd durante agitação na presença de cloreto de metileno.

A fase de formação da emulsão primária (**etapa 1, Esquema 2**) tem sido descrita como a que causa mais desnaturações e agregações às proteínas. A emulsificação submete a proteína a pressões altas; gradientes de temperaturas; forças de cisalhamento; possibilidades de oxidação e à ação de radicais livres. Com o cisalhamento da fase aquosa aumentam-se as interfaces hidrofóbicas (o que é uma grande desvantagem do método) que levam à adsorção da proteína, seguidas por desenovelamento e agregação (PÉREZ-RODRIGUES *et al.*, 2003; PÉREZ, DE JÉSUS e GRIEBENOW, 2002; MEINEL *et al.*, 2001; DIWAN e PARK, 2001; CASTELLANOS *et al.*, 2002; WEERT *et al.*, 2000; SAH, 1999a; SAH, 1999b; XING *et al.*, 1996).

Ao longo dos últimos 30 anos foram descritos vários agentes protetores de desnaturação de proteínas durante e após suas microencapsulações em PLGA. O que ocorre na literatura é a adição indiscriminada de agentes potencialmente estabilizantes sem haver uma definição com uma discussão detalhada sobre a estrutura da proteína estudada e o que se estaria estruturalmente protegendo. Naturalmente que a estrutura da proteína praticamente definiria o uso do aditivo escolhido para protegê-la de danos. As generalizações que são feitas ficam então prejudicadas.

A BSA, ainda, têm sido até hoje estudada como proteína modelo de soluto encapsulado (FAISANT, SIEPMANN e BENOIT, 2002; RAVIVARAPU, K BURTON e DELUCA, 2000) ou como **estabilizadora de outras proteínas** (JOHANSEN *et al.*, 1998; AUDRAN, *et al.*, 1998; JOHANSEN, MERKLE e GANDER, 1998; KRIEGLSTEIN, 1990; MANNING, K.PATCL e BORCHARDT, 1989)! O uso de BSA para melhorar os resultados de encapsulação e de liberação de Ttxd (Toxoide tetânico) e de Dtxd

(JOHANSEN *et al.*, 1998; AUDRAN, *et al.*, 1998; JOHANSEN, MERKLE e GANDER, 1998) é completamente sem sentido! Se o que se deseja é produzir uma formulação de antígenos microencapsulados em MS de PLGA, não se podem adicionar outras proteínas heterólogas. A hipótese, nestes casos de proteínas heterólogas à formulação seria que, haveria uma competição entre antígeno encapsulado e a molécula “protetora” pela adsorção na interface CH_2Cl_2 . Neste tipo de hipótese presume-se que a BSA tenha maior afinidade pela superfície de PLGA. Além disto, várias questões podem ser postas ao se usar o método de ELISA para monitorar ganhos em manutenção de uma conformação imunogênica de Ttxd ou numa formulação de MS contendo Ttxd/BSA (ou Dtxd/BSA) co-encapsulados (JOHANSEN *et al.*, 1998; AUDRAN, *et al.*, 1998; JOHANSEN, MERKLE e GANDER, 1998). Podem ocorrer interações não específicas e a BSA ser reconhecida pelo anticorpo anti-Ttxd. O método de ELISA não permite que se diferencie se a ligação do anticorpo específico contra determinada molécula pode ocorrer só com a molécula íntegra ou se também ocorre com seus fragmentos peptídicos, produtos de uma hidrólise ácida. Mesmo que se use um anticorpo monoclonal, se o fragmento da molécula de proteína hidrolisada contiver a seqüência reconhecida pelo este anticorpo, a interpretação do resultado de integridade proteica também será prejudicado. Um resultado de ELISA sem ser acompanhado por um resultado monitorado por HPLC ou, pelo menos, por uma PAGE na ausência de SDS é, portanto, questionável. Mesmo em um resultado de CD destas mesmas moléculas o que se monitora é a soma de todas as “espécies moleculares” contidas na amostra não se identificando uma hidrólise, por exemplo. O Ttxd contém sete ligações Asp-Pro (KRIEGLSTEIN *et al.*, 1990) e sabe-se que as ligações Asp-Pro são especialmente lábeis (MANNING, K.PATCL e BORCHARDT, 1989). Portanto é bem provável que em meio muito ácido a

molécula de Ttxd tenha sofrido hidrólises. Outro fator de vulnerabilidade é que as moléculas tanto de Ttxd (KRIEGLSTEIN *et al.*, 1990) quanto de Dtxd (BLEWITT, CHUNG e LONDON, 1985) contém cadeias peptídicas mantidas por ligações S-S que são susceptíveis de sofrerem reduções nos meios de liberação. Tiomersal[®], citado na literatura farmacêutica como conservante, não pode ser usado, por ser um forte redutor de S-S, como se demonstrou nesta tese e recentemente em publicação deste laboratório (NAMUR *et al.*, 2004).

Outra estratégia de estabilização é de se **umentar a concentração da proteína** a ser encapsulada, mantendo-se a mesma área interfacial (SING *et al.*, 2001; PÉREZ e GRIEBENOW, 2001; CLELAND e JONES, 1996; LU e PARK, 1995). Entretanto, sabe-se que a BSA, por exemplo, em altas concentrações forma agregados e, portanto o fato de se diminuir agregação na interface CH₂Cl₂ não significa ausência de agregação em outras regiões do espaço aquoso interno das microesferas de PLGA. Além disto, vale reforçar que nem sempre é possível de se trabalhar com concentrações na ordem de 60 mg/mL de proteína! A maior parte das proteínas forma agregados em altas concentrações, além disto, o aumento da concentração destas moléculas pode não levar, necessariamente, à diminuição de agregação ou de danos conformacionais. **Alguns surfactantes não iônicos** também foram usados, sem muito sucesso, para estabilização de proteínas. Dentre eles, aqueles do tipo “tweens” que causam agregação em algumas proteínas (CLELAND e JONES, 1996). Uma possível explicação para este fato pode derivar da estrutura química dos “tweens”. As suas atividades de superfície estão baseadas na presença de cadeias polietilenoglicol (PEG) e uma cadeia hidrofóbica de ácido graxo inseridas no sorbitan. Sabe-se que o PEG comporta-se de maneira anômala no sistema água/CH₂Cl₂, ficando distribuído, preferencialmente, na fase orgânica donde a

baixa eficiência dos tweens na prevenção de desenovelamento de proteínas (WEERT *et al.*, 2000; HARRIS, 1992).

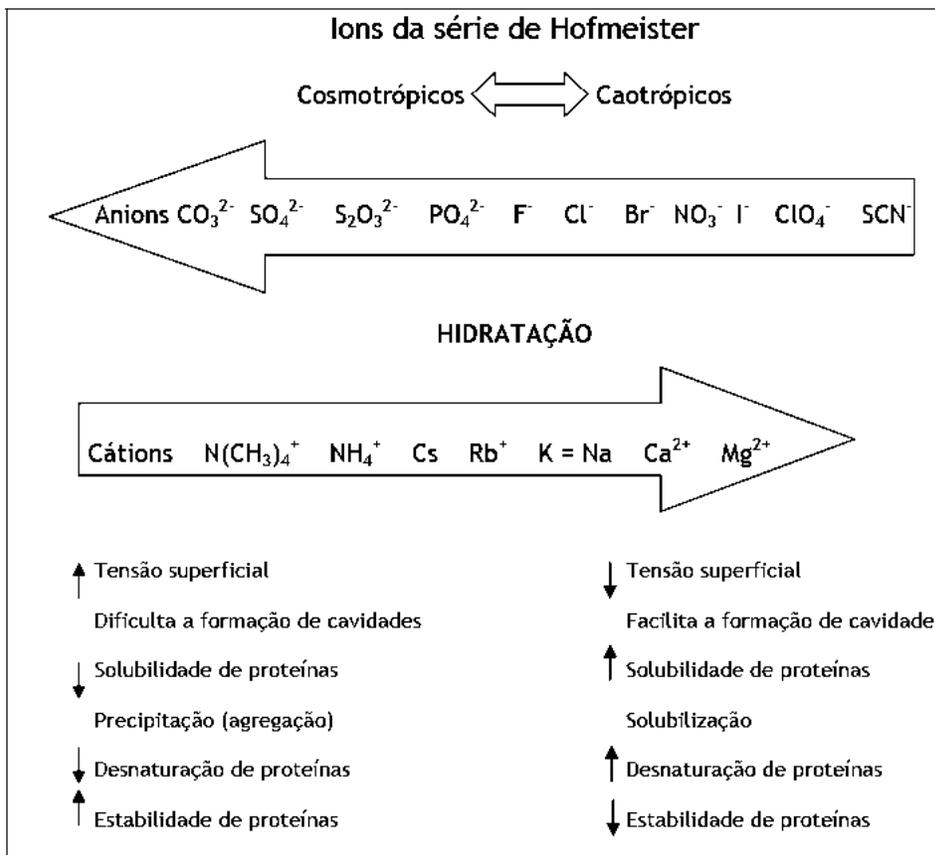
Para se evitar repetições, resumidamente, o que se observa na literatura é a ausência de um estabilizador que seja usado de forma racional tendo-se em mente que o produto final tem que ser biodegradável, biocompatível, não pode ser imunogênico (caso de proteínas heterólogas, por exemplo) e nem pode competir com o antígeno a ser encapsulado.

Admitiu-se que o mais simples então, seria o uso moléculas mais simples como os sais da série de Hofmeister, de longo uso na literatura. Vale ressaltar, que uma discussão profunda do efeito destes sais em nível molecular ainda é um campo em aberto, foge do escopo desta tese, uma vez que existem várias teorias (ZHANG e CREMER, 2006; DÉR *et al.*, 2007; BOSTRÖM, WILLIAMS e NINHAM, 2003). Geralmente sabe-se que certos sais, chamados de caotrópicos, desestabilizam muitas proteínas quando adicionados às suas soluções e contrariamente, os cosmotrópicos as estabiliza (DÉR *et al.*, 2007) (**Esquema 8**). De um modo geral o efeito dos sais da série de Hofmeister é mais acentuado pelos anions do que pelos cátions (ZHANG e CREMER, 2006).

O problema que tinha que ser enfrentado nesta tese não era simples e nem trivial: um sistema ternário, a saber, a proteína, a água e um solvente orgânico onde seria adicionado um quarto elemento, o sal e todos sob agitação de 24 000 rpm. O próprio aparelho emulsificador, também não era comum (**Figura 66**).

Seria simplismo nesta tese, usar só “uma das teorias” da atualidade (DÉR *et al.*, 2007; ZHANG e CREMER, 2006; ZHOU, 2005; BOSTROM, WILLIAMS e NINHAM, 2003; LEBERMAN, 1991) para explicar os fenômenos que se observaram durante a

emulsificação do Dtxd na presença de sais da série de Hofmeister e de cloreto de metileno.



Esquema 8. Alguns efeitos dos ions da série de Hofmeister, adaptado da literatura (ZHANG e CREMER, 2006; BIRESAW *et al.*, 1985)

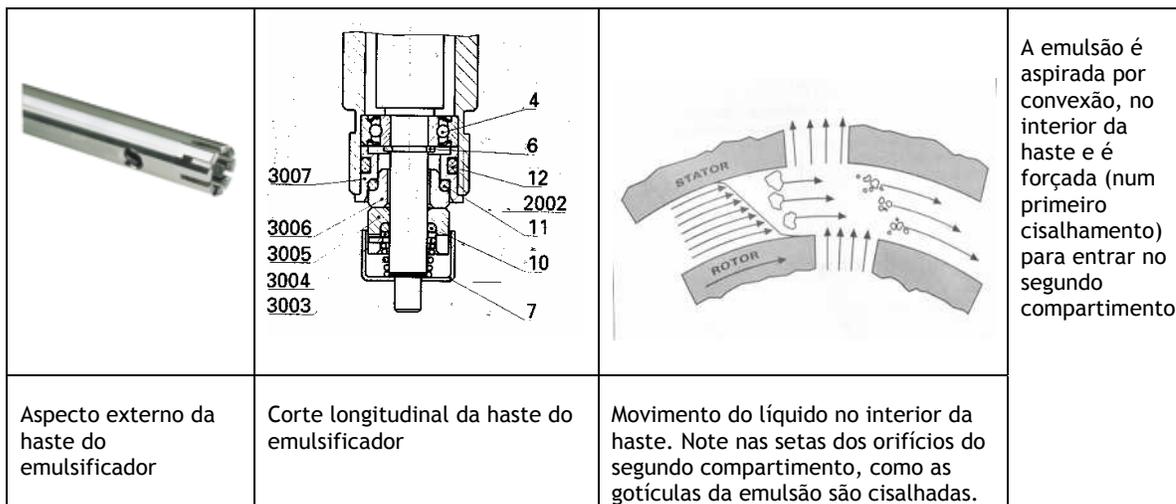


Figura 66. Partes de um emulsificador usado para se obter microesferas de PLGA

O que se pretendia resolver, foi alcançado, que era obter o máximo de solubilidade de Dtxd, depois da emulsificação com CH_2Cl_2 para começar uma preparação de microencapsulação em condições ideais. Como já foi reforçado na introdução, as moléculas mais estudadas na interação de proteínas/solventes orgânicos ou superfícies hidrofóbicas dentro do contexto de microencapsulação destacam-se a lisozima (PÉREZ, JESÚS e GRIEBENOW, 2002; DIWAN e PARK, 2001; WEERT et al, 2000; SAH, 1999a; SAH, 1999b), BSA nativa ou carboxilada (CARRASQUILLLO *et al.*, 2001; SAH_b, 1999) Ttxd (TOBIO et al, 2000; SANCHES et al, 1999; JOHANSEN et al, 1999; JOHANSEN et al, 1998; XING et al., 1996; CHANG e GUPTA, 1996) e Dtxd (JOHANSEN et al, 1998; PALIWAL e LONDON, 1996).

Observou-se que 35 % da solubilidade do toxoide diftérico foi perdida somente com a agitação a 24 000 rpm na presença de CH_2Cl_2 . As adições de KSCN, caotrópico, nas concentrações de 30 a 70 mM foram as melhores condições (95 % de recuperação, **Figura 46**) para a solubilização da Dtxd após a primeira emulsificação. Entretanto, o Mg^{2+} , também um caotrópico, precipitou 80 % do Dtxd (**Figura 46**). Não há na literatura específica (contacto proteína/solvente orgânico/sais) outros autores que tenham estudado os sais como mantenedores da solubilidade da proteína nesta etapa do processo (formação da primeira emulsão). Fica difícil explicar qual seria o mecanismo de solubilização exercida pelos sais, dada a complexidade do sistema. Entretanto, sabe-se que os avanços mais recentes da compreensão dos mecanismos de ação dos íons da série de Hofmeister forneceram elementos para vários dos fenômenos íons-específicos (ZHANG e CREMER, 2006). Existem evidências experimentais que mostram claramente que variações na estrutura da água pela adição de sais não podem explicar o efeito específico dos íons (ZHANG e CREMER, 2006; BIRESAW *et al.*, 1985). Nesta tese,

usaram-se dois íons caotrópicos, a saber, SCN^- e Mg^{2+} . Além da evidente diferença de carga entre eles, sabe-se que o SCN^- é fracamente hidratado e Mg^{2+} é fortemente hidratado (ZHANG e CREMER, 2006; BIRESAW *et al.*, 1985). O Dtxd estava em água, contendo o sal, a pH 6,5 que corresponde a aproximadamente duas unidades de pH acima de seu pI (CAMPANA *et al.*, 2004), portanto com carga líquida negativa. Portanto é razoável supor que uma interação iônica entre o Dtxd, carregado negativamente com o Mg^{2+} , desfavoreceria a solubilidade, ou seja, precipitaria a proteína após o contacto com a interface orgânica, maximizada pela agitação a 24 000 rpm que aumenta enormemente a área de contacto. Portanto, o fenômeno de Hofmeister precisa ser entendido em termos de interações entre íons e as macromoléculas (NAMUR *et al.*, 2007; ZHANG e CREMER, 2006). Os sais cosmotrópicos, NaCl e NaH_2PO_4 não alteraram a agregação do Dtxd quer tenha sido ela causada pela agitação ou pelas forças de cisalhamento e conseqüente aumento da interface hidrofóbica do CH_2Cl_2 . A agregação do Dtxd induzida pela agitação em presença de solventes orgânicos não foi relacionada com o aumento de dímeros de Dtxd- que permaneceram constantes em todas as situações estudadas (o dímero é solúvel), mas sim com um agregado envolvendo mais moléculas (NAMUR *et al.*, 2007).

Estruturalmente, o toxoide diftérico não foi hidrolisado pela agitação da primeira emulsão, pois os conteúdos em FA e FB permaneceram constantes em todas as condições experimentais. A conformação da fração solúvel, do Dtxd reconhecida imunologicamente (**Figura 48**) foi perdida após emulsificação na presença de MgCl_2 . Esta perda de identidade imunológica do Dtxd (fração solúvel) na presença de MgCl_2 correspondeu a uma proteína menos enovelada (**Figura 52 e 53**) e mais aberta para o meio (**Figura 54 e 55**). Esta conformação mais aberta

significou também uma exposição de resíduos hidrofóbicos (W) para o meio (**Figura 55**). Isto corrobora a idéia exposta acima de que o Mg^{2+} realmente interage com o Dtxd (NAMUR et al., 2007).

O KSCN protegeu o Dtxd do desenovelamento, da abertura da ligação S-S e do dano imunológico. O aumento da solubilidade para 95 % correspondeu, portanto, a uma proteína com estrutura mais próxima da nativa. Nesta fase do processo de preparo de microesferas o pH é 7,0, 2,8 unidades de pH acima do pI do Dtxd (CAMPANA et al, 2004).

Para se efetivar os dados de solubilidade obtidos, preparou-se uma formulação de Dtxd em MS-PLGA na presença de KSCN. A presença de KSCN 30 mM aumentou 10,42 %, passando de 53,84 para 64,26 % a eficiência de encapsulação do Dtxd (12 kDa-COOMe) e em 23,2 % (passando de 46,41 % para 69,63 %) quando o PLGA foi de 12 kDa com -COOH livre. Conclui-se que KSCN é uma solução simples e econômica para se aumentar não só percentagem de encapsulação do Dtxd em MS de PLGA como também para preservar a integridade estrutural deste antígeno. A toxicidade do KSCN não é alta e o sal está presente em inúmeros vegetais (dose letal para um adulto, homem de 70 kg é de 30 g).

A liberação de Dtxd de polímeros de massas molares diferentes (12 kDa, 34 kDa e 63 kDa) com carboxiterminais livres ou metiladas.

Naturalmente que, liberação controlada é uma característica desejável para todos os sistemas de veiculação. Os fatores que afetam a velocidade de liberação da droga estão relacionados com a matriz onde a droga está contida e as propriedades químicas associadas com ambos: droga e polímero (FREIBERG e ZHU, 2004). As drogas convencionais veiculadas em sistemas de administração oral, por exemplo, não têm suas velocidades de liberação controladas. As drogas

encapsuladas em matriz de degradação lenta levam a um efeito de liberação lenta. Mas, a degradação do polímero não é o único mecanismo que controla a liberação do soluto. Não se observaram diferenças nas liberações de Dtxd das diferentes partículas de MS preparadas com -COOMe (**Figura 60 B, D e F**). A liberação do soluto se faz, também, por difusão e a droga pode percorrer através dos poros formados durante o endurecimento da matriz (etapa 3, vide esquema 2, do processo de microencapsulação, quando o polímero se precipita formando as esferas e encapsulando a droga) (FREIBERG e ZHU, 2004; YANG *et al.*, 2000). Logo depois de uma incubação de MS-PLGA, antígenos (ou proteínas de um modo geral) localizados na ou perto da superfície das partículas são dissolvidos pela penetração da água (ou tampão) e então se difundem para o meio num espaço de tempo muito curto (chamado de efeito burst) como observado nesta tese (**Figura 60**) e descrito na literatura (TAMBER *et al.*, 2005). A liberação do soluto, logo após o “burst” depende da porosidade das microsferas usadas; da hidrofiliicidade; bem como da interação entre o polímero e o antígeno (TAMBER *et al.*, 2005), que foi o observado nesta tese (**Figuras 56, 57 e 60**). Por exemplo, com as MS-PLGA preparadas com polímero -COOH de 63 kDa, a liberação do Dtxd foi a mais lenta (**Figura 60**). Interpretou-se com sendo consequência de um tempo de residência maior do Dtxd dentro destas partículas de MS-PLGA. É provável que tenha ocorrido uma interação maior com os oligômeros produzidos pela matriz polimérica, uma vez que era a que tinha a maior massa molar (**compare Figuras 60 E e 37 E**). Se as MS são porosas e hidrofílicas (como as obtidas com os polímeros da classe -COOH, nesta tese) ou se há pouca afinidade entre o antígeno e polímero ficam facilitados os eventos de penetração de água na matriz das MS e a dissolução e difusão do antígeno (TAMBER *et al.*, 2005; GANDER *et al.*, 1996; BODMEIER e MCGINITY, 1988). Neste caso, pode

acontecer uma segunda fase de liberação do antígeno logo após o “burst” (**Figura 60, A, C e E**) como o observado na literatura (TAMBER *et al.*, 2005). Isto significa que o antígeno foi liberado antes de haver erosão em estado mais avançado das partículas de MS, caracterizando uma formulação com liberação em duas fases (TAMBER *et al.*, 2005) (**Figura 60, A, C e E**). O que se obteve, ao final, foram pelo menos três formulações com três perfis de liberações diferentes (**Figura 60**). Os antígenos liberados permaneceram com atividade biológica, *in vitro*, o que se caracteriza como formulação de sucesso (FREIBERG e ZHU, 2004; TAMBER *et al.*, 2005) (**Figura 61**).

Estas formulações foram usadas para um ensaio biológico com o intuito de se observar se haveria diferença entre elas nos anticorpos formados, ou seja, se haveria uma correlação do obtido *in vitro* com o obtido *in vivo*.

O efeito adjuvante das MS de PLGA

Adjuvantes e sistemas de veiculação de antígenos são essenciais na modificação de forma controlada (entenda-se por manipulação do sistema imunológico) das respostas imunológicas. Sabe-se pouco sobre o mecanismo de ação dos adjuvantes, apesar da inúmera quantidade de matérias diferentes que têm sido usadas ao longo do tempo (STORNI *et al.*, 2005). A liberação contínua de antígeno dos sistemas de veiculação (por exemplo, liposomas e microesferas) não é suficiente para explicar sua ação adjuvante (LOFTHOUSE, 2002). O denominador comum para estes sistemas de veiculação de antígenos é a sua natureza particulada e a ação de depósito que eles todos têm (STORNI *et al.*, 2005). O aumento da

imunogenicidade exercida pelos adjuvantes particulados não é uma surpresa, pois afinal, a natureza dos patógenos naturais é particulada e o sistema imunológico evoluiu com esta característica em relação a estes últimos (BUENO DA COSTA, 2006). Outra vantagem destes adjuvantes particulados é o fato de que apresentam múltiplas cópias do antígeno de uma só vez às células imunocompetentes (BUENO DA COSTA, 2006). O aumento da pesquisa dentro desta área de adjuvantes cresceu devido ao aumento no mercado de proteínas e peptídeos purificados (naturais ou recombinantes), naturalmente menos tóxicos e mais seguros, mas, menos ativos imunologicamente (O'HAGAN e VALIENTE, 2003). Uma proteína ou peptídeo injetado isoladamente é rapidamente opsonizado e destruído. O $\text{Al}(\text{OH})_3$, vastamente usado desde o começo do século passado, induz uma indesejada dermatite de contacto (COX e FORSITH, 1988); granulomas (BERGFORS, JÖRKELUND e TROLLFORS, 2005; KAABER, NIELSEN e VEIEN, 1992) aumento de IgE (MANCINO e OVARY, 1980). As MS-PLGA têm a vantagem de serem atóxicas e também de protegerem a degradação do antígeno pelo meio, fato não exercido pelo $\text{Al}(\text{OH})_3$.

As MS-PLGA de tamanhos entre 10 e 100 μm são eficientemente capturadas pelos macrófagos e também pelas células dendríticas de camundongo e humanas (WALTER *et al.*, 2001; MEN *et al.*, 1995). Dentro das células dendríticas são hidrolizadas lentamente de forma que a apresentação prolongada do antígeno é garantida (WAECKERLE-MEN e GROETTRUP, 2005). É interessante lembrar que as proteínas encapsuladas nas MS-PLGA seguem, após liberação, as vias de processamento de antígenos das classes I e II de forma que ocorrem estímulos específicos de células CTL (Linfócitos T citotóxicos) e "T-helper" (WAECKERLE-MEN e GROETTRUP, 2005). Obtem-se os mesmos títulos dos isotipos IgG1 e IgG_{2a} quando camundongos são imunizados com Ttxd (Toxoide tetânico) encapsulado em MS-PLGA

quando comparados com aqueles produzidos pelo antígeno adsorvido em $Al(OH)_3$, o que indica que as formações dos anticorpos foram realmente induzidos após a imunização (WAECKERLE-MEN e GROETTRUP, 2005).

Sabe-se que a produção de IgGs se faz na seguinte ordem: $IgG1 > IgG3 > IgG2_a$. Os anticorpos neutralizantes são mais relacionados ao $IgG1$ (mais abundante) mas, o $IgG2_a$ é mais específico e está relacionado ao grau de maturação imunológica. O $IgG2_a$ está relacionado à resposta imunológica do tipo TH_1 (Linfócito T helper 1, que corresponde a uma resposta celular) e o $IgG1$ a uma resposta $TH2$ (humoral) (YADAV e KHULER, 2001). Nesta tese calculou-se o total de anticorpos para cada subtipo e cada subgrupo através de integrações das áreas debaixo do perfil da curva de produção de anticorpos. O que se observou, no grupo que recebeu a dose de reforço 38 dias após a primeira imunização, foi um grande aumento de produção de $IgG2_a$ (55 %) nos camundongos imunizados com Dtxd encapsulado em MS-PLGA -COOMe de 63 kDa (**Tabela 8**). Isto significa maturidade imunológica mesmo com a dose de reforço tendo sido feita tão prematuramente. Isto significa um ganho tecnológico e imunológico de grande importância. Os resultados mais notáveis nas produções de $IgG2_a$ foram aqueles obtidos através das imunizações com todas as formulações em MS-PLGA desta tese quando os camundongos receberam a dose de reforço tardiamente (138 dias após a primeira imunização). Os aumentos de $IgG2_a$ nos animais imunizados com Dtxd contidas em MS-PLGA-COOH de 12 kDa; 12 kDa com -COOMe e 63 kDa com -COOMe foram, respectivamente de 185 %, 129 % e 143 % em relação ao controle (**Tabela 8**).

Tabela 8: Comparação entre as quantidades totais de cada isotipo de anticorpo formado após imunizações de camundongos com Dtxd microencapsulada em MS-PLGA e Dtxd na forma livre (controle).

Tipo de anticorpo	Grupo de animais que receberam a dose reforço 38 dias após a primeira imunização			Grupo de animais que receberam a dose reforço 138 dias após a primeira imunização		
	MS 12 kDa -COOH	MS 12 kDa -COOMe	MS 63 kDa -COOMe	MS 12 kDa -COOH	MS 12 kDa -COOMe	MS 63 kDa -COOMe
IgG1	Não houve diferença	Não houve diferença	12 %	37 %	47 %	30 %
IgG2 _a	26 %	12 %	55 %	185 %	129 %	143 %

Quando se observaram as relações entre os isotipos IgG_{2a}/IgG₁, os resultados foram muito interessantes.

Não houve mudança do padrão de respostas nos camundongos injetados com todas as formulações (com o reforço sendo realizado 38 dias após a primeira imunização), ou seja, todas elas continuaram sendo do tipo humoral porque as relações foram menores do que 1 (Tabela 9). Sendo a doença difteria, causada pela toxina diftérica, foi, realmente, interessante que a resposta humoral e a que produz anticorpos neutralizantes (IgG1) tenha sido mantida. Entretanto, vale ressaltar que a grande diferença entre os títulos de IgG_{2a} produzidos pelos camundongos imunizados com as formulações em MS em relação ao controle implicam em uma maturidade imunológica adquirida mesmo tendo sido feita a segunda dose em tempo tão prematuro (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação entre os níveis dos títulos de anticorpos 138 dias após a imunização de camundongos que receberam a dose reforço 38 dias após primeira imunização.

Tipo de anticorpo	Título de anticorpos após 138 dias			
	Dtxd livre	MS 12 kDa -COOH	MS 12 kDa -COOMe	MS 63 kDa -COOMe
IgG1	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁹	2 ¹⁰
IgG2 _a	2 ²	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁸
Relação Log ₂ IgG2 _a /IgG1	0,3	0,8	0,8	0,8

Os animais, mesmo antes de receberem a segunda dose de vacina (sangria foi tomada antes da injeção de reforço do 138º dia) mudaram completamente os padrões de respostas. As relações IgG_{2a}/IgG₁ dos animais que receberam formulação de Dtxd em MS de PLGA de 63 kDa -COOMe foram do tipo celular, como o controle (Tabela 10). Entretanto, *in vitro*, a liberação de antígeno desta formulação foi da mesma ordem de grandeza do que as outras formulações com os polímeros também metilados. Em todos eles houve um “burst” inicial de liberação de Dtxd e depois de oito semanas 80-90 % do antígeno já tinha sido liberado (Figura 62). Este foi o único ponto do experimento em que houve uma mudança de padrão de formação dos isotipos IgG₁ e IgG_{2a}. *Não se concluiu que ele tenha um significado no total do experimento, uma vez que os animais estavam imunizados com uma formulação de liberação lenta do antígeno, mas, ainda não haviam recebido uma segunda dose de vacina (com o antígeno livre) para se verificar se haveria memória imunológica.*

Tabela 10: Comparação entre os níveis dos títulos de anticorpos 138 dias após a imunização de camundongos que receberam a dose reforço 138 dias após primeira imunização.

Tipo de anticorpo	Título de anticorpos após 138 dias			
	Dtxd livre	MS 12 kDa -COOH	MS 12 kDa -COOMe	MS 63 kDa -COOMe
IgG ₁	2 ⁴	2 ⁶	2 ⁹	2 ⁵
IgG _{2a}	2 ⁶	2 ⁴	2 ⁷	2 ⁶
Log ₂ IgG _{2a} /IgG ₁	1,5	0,7	0,8	1,2

As diferenças obtidas nas produções de anticorpos de animais imunizados com as formulações de Dtxd veiculadas em MS-PLGA foram aumentadas após 220 dias após a primeira imunização e 82 dias após a dose de reforço. Vale repetir que as quantidades e anticorpos neutralizantes, IgG₁, foi bem alta (Tabela 11).

11: Comparação entre os níveis dos títulos de anticorpos 220 dias após a imunização de camundongos que receberam a dose reforço 138 dias após primeira imunização.

Tipo de anticorpo	Título de anticorpos após 220 dias			
	Dtxd livre	MS 12 kDa -COOH	MS 12 kDa -COOMe	MS 63 kDa -COOMe
IgG1	2^9	2^{12}	2^{13}	2^{12}
IgG2 _a	2^3	2^{10}	2^8	2^9
Relação Log_2 IgG2 _a /IgG1	0,3	0,8	0,6	0,8

O padrão de resposta humoral foi mantido, a memória imunológica foi adquirida e a maturidade imunológica também. Uma vacina de sucesso tem que induzir memória imunológica e, portanto, o objetivo da tese foi alcançado.

Perspectivas futuras

O uso de polímeros com uma relação láctico/glicólico da ordem de 85:15 poderia aumentar mais o tempo de liberação do antígeno. Uma vacina de dose única com três tempos de liberação distintos poderia conter: a. MS-PLGA 12 kDa (50:50) com COOH; b. MS-PLGA de 63 kDa (50:50) com -COOH e c. MS-PLGA de 130 kDa (85:15) -COOH. As partículas poderiam ser de 10-15 μm . As doses de Dtxd seriam de 1 a 5 μg de antígeno injetadas no primeiro dia. A dose de reforço seria 150 dias após a primeira imunização e seriam constituídas de 1 a 5 μg de Dtxd livre. Além das sangrias dos dias 7, 15, 38, 45, 60, 90, 150, 180 e 220, seriam realizadas

outras nos dias 250, 300 e 360. Um teste de desafio, *in vivo*, seria interessante para a validação desta formulação aqui desenhada.

Escrever e submeter os seguintes artigos:

1. Jocimara Ambrosio de Moraes Namur, Célia S Takata, Pedro Soares de Araujo and Maria Helena Bueno da Costa. Hofmeister íons serie solubilize protein and protects it from conformational damages on CH₂Cl₂/water interface contact. Submetido ao Journal of Controlled Release.

2. Jocimara Ambrosio de Moraes Namur, Célia S Takata, Pedro Soares de Araujo and Maria Helena Bueno da Costa. Controlling Dtxd release using PLGA carboxymethylated or carboxyterminal free with different molar mass. Em preparação, será submetido ao International Journal of Pharmaceutics.

3. Jocimara Ambrosio de Moraes Namur, Célia S Takata, Osvaldo A. Sant' Anna, Pedro Soares de Araujo and Maria Helena Bueno da Costa. Enhanced MS-PLGA Dtxd vaccine formulation and performance: simple physicochemical and immunological approaches. Em preparação, será submetido ao The Open Drug Metabolism Journal.

6. CONCLUSÕES.

1. Todos os métodos analíticos desenvolvidos nos estudos de pré-formulação de Dtxd em MS-PLGA foram compatíveis e validados para os estudos que se seguiram.
2. Concluiu-se que através do desenho experimental 2^3 com triplicatas no ponto central puderam-se examinar as influências das variáveis do processo (Água₁/Óleo/Água₂, A₁/O/A₂) de obtenção de microesferas sobre o tamanho das partículas. Através da combinação das principais variáveis do processo, a saber, concentração de PVA e velocidade de agitação da segunda emulsificação obtiveram-se microesferas com uma ampla faixa de tamanhos definidos. Estes resultados abrem a possibilidade de se formular vacinas em MS de PLGA com tamanhos desenhados, com um mínimo de experimentos.
3. As mudanças conformacionais observadas no Dtxd incubado com MS-PLGA implicaram em diminuição do conteúdo em hélice- α com concomitante transição de folha pregueada- β \rightarrow estrutura desordenada. Estas mudanças conformacionais ocorreram a partir da 5^a semana de incubação e coincidem com o abaixamento do pH do meio, que por sua vez foi causado pelo aumento de oligômeros e monômeros de PLGA a medida que o tempo passou.
4. Em estudos realizados na presença de TM, concluiu-se que em meio aquoso e a baixo pH, na presença mandatória de ácido láctico, a degradação de TM é maior do que em meio neutro. A acidificação do meio tem que ser promovida exclusivamente pelo ácido láctico. A acidificação promovida pelo HCl não altera o TM. Propõe-se nesta tese que o TSA produzido após a redução de TM pelo ácido láctico, reduz as pontes S-S do Dtxd. Esta redução é imediatamente seguida pelo bloqueio dos dois -SH formados pela mesma molécula de TSA. Á luz destas conclusões é necessário agora re-interpretar os estudos *in vitro* de degradações-estabilizações de proteínas

na presença de MS de PLGA contendo TM, principalmente para aquelas proteínas contendo S-S. Propõe-se aqui que todos os estudos de microencapsulações de proteínas e estudos conformacionais devam ser realizados na ausência de TM.

5. Quando MS foram fabricadas com polímeros de 55 kDa, com -COOH livre, a erosão da matriz se fez de fora para dentro, ou seja, à partir da superfície da matriz das MS (Polímero de origem A). O tamanho destas MS diminuiu em função do tempo de incubação.
6. A erosão do seio da matriz polimérica de PLGA foi inversamente proporcional com o aumento da massa molar em polímeros com carboxi-terminais livres (Polímeros de origem B). As MS produzidas com PLGAs-COOH sofreram erosão do seio da matriz numa velocidade maior do que aquelas produzidas com polímeros -COOMe. O tamanho destas partículas (Polímeros de origem B) não variou com o tempo. Propõe-se que a erosão menor das partículas obtidas com PLGA-COOMe seja devido a maior hidrofobicidade deste polímero em relação ao -COOH. Naturalmente que um PLGA carboximetilado é mais hidrofóbico do que um com carboxiterminal livre e, portanto, a erosão se faz mais lentamente, uma vez que a autocatálise ácida é dependente de água no meio.
7. Em estudos de pré-formulações de Dtxd em MS-PLGA, observou-se que 35 % da solubilidade do toxoide diftérico foi perdida somente com a agitação a 24 000 rpm na presença de CH₂Cl₂. As adições de KSCN, um sal caotrópico, nas concentrações de 30 a 70 mM foram as melhores condições (95 % de solubilidade) para a solubilização da Dtxd após a primeira emulsificação. O Mg²⁺, também um caotrópico, precipitou 80 % do Dtxd. O sais cosmotrópicos, NaCl e NaH₂PO₄ não alteraram a agregação do Dtxd quer tenha sido ela causada pela agitação ou pelas forças de cisalhamento e conseqüente aumento da interface hidrofóbica do CH₂Cl₂.

A agregação do Dtxd induzida pela agitação em presença de solventes orgânicos não foi relacionada com o aumento de dímeros de Dtxd- que permaneceram constantes em todas as situações estudadas (o dímero é solúvel), mas sim com um agregado envolvendo mais moléculas. O toxoide diftérico não foi hidrolisado pela agitação da primeira emulsão, pois os conteúdos em FA e FB permaneceram constantes em todas as condições experimentais. A conformação do Dtxd reconhecida imunologicamente foi perdida após emulsificação na presença de $MgCl_2$. Esta perda de identidade imunológica do Dtxd na presença de $MgCl_2$ correspondeu a uma proteína menos enovelada e mais aberta para o meio. Esta conformação mais aberta significou também uma exposição de resíduos hidrofóbicos, como o W, para o meio. O KSCN protegeu o Dtxd do desenovelamento, da abertura da ligação S-S e do dano imunológico. O aumento da solubilidade para 95 % correspondeu, portanto, a uma proteína com estrutura mais próxima da nativa. Nesta fase do processo de preparo de microesferas o pH é 7,0. A presença de KSCN 30 mM aumentou 10,42 % na eficiência de encapsulação do Dtxd (12 kDa-COOME), passando de 53,84 para 64,26 % e em 23,2 % (passando de 46,41 % para 69,63 %) quando o PLGA foi de 12 kDa com -COOH livre. Conclui-se que KSCN é uma solução simples e econômica para se aumentar não só percentagem de encapsulação do Dtxd em MS de PLGA como também para preservar a integridade estrutural deste antígeno. A toxicidade do KSCN não é alta e o sal está presente em inúmeros vegetais (dose letal para um adulto, homem de 70 kg é de 30 g).

8. Em ensaios biológicos com as formulações obtidas, concluiu-se que a encapsulação de Dtxd em MS-PLGA possibilitou a redução da dose de antígeno necessária para a produção de anticorpos. Além do efeito adjuvante das MS-PLGA, houve não só a formação de anticorpos neutralizantes em quantidade (IgG_1) mas

também em maturidade (IgG_{2a}). A variação do tempo da injeção de reforço também foi muito importante no desenvolvimento de anticorpos específicos, sendo melhorado quando a dose de reforço é feita tardiamente. O padrão de resposta humoral foi mantido, a memória imunológica foi adquirida e a maturidade imunológica também. Uma vacina de sucesso tem que induzir memória imunológica e, portanto, o objetivo da tese foi alcançado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR, Langer R. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine*. 1994;**12**:299-306.

Ando S, Putnam D, Pack DW, Langer R. PLGA Microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization. *J. Pharm. Science*. 1999;**88**:126-30.

Arshady R. Preparation of microspheres and microcapsules: 2 Polylactides and related polyesters. *J. of Control. Release*. 1991;**17**:1- 22.

Athanasίου KA, Niederauer GG. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. 1996;**17**:93-102.

Aubert-Pouëssel A, Venier-Julienne MC, Saulnier P, Sergent M, Benoît JP. Preparation of PLGA microspheres by an emulsion-extraction process using an glycofurol as polymer solvent. *Pharm Research*. 2004;**21**:2384-91.

Audran R, Men Y, Johansen P, Gander B, Corradin G. Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. *Pharm. Res*. 1998;**15**:1111-16.

Benicewicz BC, Hopper PK. Polymers for absorbable surgical sutures. *J. Bioact. Compat. Polym*. 1991;**6**(1):64-94.

Berchane NS, Carson KH, Rice-Ficht AC, Andrews MJ. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: Experimental and theory. *Int J Pharm*. 2007;**337**:118-26.

Bergfors E, Björkelund C, Trollfors B. Nineteen cases of persistent pruritic nodules and contact allergy to aluminium after injection of commonly used aluminium-adsorbed vaccines. *Eur. J. Pediatrics*. 2005;**164**:691-7.

Biresaw G, McKenzie DC, Bunton CA, Nicoli DF. Dynamic light scattering study of a micellar system of low fractional ionization: $(\text{CTA})_2\text{SO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_4$. *J. Phys Chem*. 1985;**89**:5144-46.

Blanco D, Alonso MJ. Development and characterization of protein-loaded poly(lactic/glycolic acid) nanospheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 1997;**43**:285-94.

Blanco D, Alonso MJ. Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 1998;**45**:285-94.

Bodmeier R, McGinity JW. Solvent selection in the preparation of poly(D,L-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *Int. J. Pharm*. 1988;**43**:179-86.

Boström M, Williams DRM, Ninham BW. Specific ion effects: Why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series. *Biophysical J.* 2003;**85**:686-94.

Bueno da Costa MH. A biotechnological approach to formulate vaccines within liposomes. Chapter 20. In: *Liposome Technology 3rd Edition* (eds) Gregory Gregoriadis. CRC Press. 2006. pp 387-403.

Bueno da Costa MH, San'anna AO, de Araújo OS, Sato RA, Quitilio W, Silva LVN, Matos CRT, Raw I. Conformational stability and antibody response to the 18kDa heat shock protein formulated into different vehicles. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998;**73**:19-28.

Burkersroda F, Schedl L, Göpferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials.* 2002;**23**:4221-31.

Campana RA, Namur JAM, Takata CS, de Araujo PS, Bueno da Costa MH. Ionic interfaces and diptheria toxoid interactions. *Protein Expression Purification.* 2004;**33**:161-65.

Caraballo I, Rabasco AM, Fernandez-Arevalo M. Study of Thimerosal[®] degradation mechanism. *Int. J. Pharm.* 1995;**89**:213-21.

Carpenter JF, Petrelski SJ, Anchordoguy TJ, Arakawa T. Interactions of stabilizers with proteins during freezing and drying, in: J.J. Cleland and R. Langer (Eds), *Formulation and delivery of proteins and peptides*, American Chemical Society, Washington, DC, 1994, pp 120-33.

Carrasquillo K, Stanley AM, Aponte-Carro JC, Jesús P, Costantino HR, Bosques CJ, Griebenow K. Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein. *J. Control. Rel.* 2001;**76**:199-208.

Carty, AJ, Malone SF. The chemistry of mercury in biologicals systems. In: *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*. Elsevier, Amsterdam. 1979.

Castellanos IJ, Al-Azzam W, Griebenow K. Effect of the covalent modification with poly(ethylene glycol) on α -chymotrypsin stability upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) microspheres. *J. Pharm. Sci.* 2005;**94**:327-40.

Castellanos IJ, Crespo RC, Griebenow K. Poly(ethylene glycol) as stabilizer and emulsifying agent: a novel stabilization approach preventing aggregation and inactivation of proteins upon encapsulation in bioerodible polyester microspheres, *J. Control. Rel.* 2003;**8**:135-45.

Castellanos IJ, Cruz G, Crespo RC, Griebenow K. Encapsulation-induced aggregation and loss in activity of γ -chymotrypsin and their prevention. *J. Control. Release.* 2002;**81**:307-319.

Castellanos IJ, Flores G, Griebenow K. Effect of the weight of poly(ethylene glycol) used as emulsifier on α -chymotrypsin stability upon encapsulation in PLGA microspheres, *J. Pharm. and Pharmacol.* 2005;**57**:1261-69.

Chang AC, Gupta R. Stabilization of tetanus toxoid in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *J. Pharm. Sci.* 1996;**85**:129-32.

Cleland JL, Jones AJS. Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation for encapsulation in biodegradable microspheres. *Pharm. Res.* 1996;**13**:1464-14.

Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang L, Langer R. Controlled delivery system for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres, *Pharm. Res.* 1991;**8**:713-20.

Collier RJ. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon.* 2001;**39**:1793-1803.

Costantino H, Shieh L, Klibanov AM, Langer R. Heterogeneity of serum albumin samples with respect to solid-state aggregation via thiol-disulfide interchange-Implications for sustained release from polymers. 1997.

Couvreur P, Blanco-Prieto MJ, Puisieux F, Roques B, Fattal E. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. *Adv. Drug. Rev.* 1997;**28**:85-86.

Cox NH, Moss C, Forsyth A. Allergy to non-toxoid constituents of vaccines and implications for patch testing. *Contact Dermatitis.* 1988;**18**(3):143-6.

Crotts G, Park TG. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(D,L- lactide-co-glycolide) microparticles, *J. Control. Rel.* 1997;**44**:123-4.

Crys SJ Jr, Furer E, Baron LS. Construction and characterization of a Vi-positive variant of the *Salmonella typhi* live oral vaccine strain Ty21a. *Inf. Immun.* 1989 ;**57**:3863-8.

Cui F, Cun D, Tao A, Yang M, Shi K, Zhao M, Guan Y. Preparation and characterization of melittin-loaded poly (DL-lactic acid) or poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method. *J Control Release.* 2005;**107**:310-19.

Cui F, Tao A, Cun D, Zhang L, Shi K. Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J of Pharm Sci.* 2006;**96**: 421-427.

Dér A, Kelemen L, Fábíán L, Taneva SG, Fodor E, Páli T, Cupane A, Cacace MG, Ramsden JJ. Interfacial water structure controls protein conformation. *J. Phys Chem B.* 2007;**111**:5344:50.

Diwan M, Park TG. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. *J. Control. Release.* 2001;**73**:233-244.

Dogar V, Sokhey J, Kumar S, Sood DK, Tahlan AK. Interference of thiomersal in biologicals during protein estimation. *Biologicals.* 2002;**30**:271-5.

Du L, Cheng J, Chi Q, Qie J, Liu Y, Mei X. Biodegradable PLGA Microspheres as a sustained release system for a new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist. *Chem Pharm Bull.* 2006;**54**:1259-65.

Duncan G, Jess TJ, Mohamed , Price NC, Kelly SM, van der Walle CF. The influence of protein solubilization, conformation and size on the burst release from poly (lactide-co-glycolid) microspheres. *J. Control Rel.* 2005;**110**:34-48.

Eftink MR, Ghiron CA. Dynamics of a protein matrix as revealed by fluorescence quenching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975;**72**:3290-4.

Elferink JGR. Thimerosal® a versatile sulphidryl reagent, calcium mobilizer and cell function-modulating agent. *Gen. Pharm.* 1999;**33**:1-6.

Frangione-Beebe M, Albrecht B, Dakappagari N, Rose RT, Brooks CL, Schwendeman SP, Lairmore MD, Kaumaya PTP. Enhanced immunogenicity of a conformational epitope of human T-lymphotropic virus type 1 using a novel chimeric peptide. *Vaccine*, 2000;**19**:1068-81.

Frech C, Hilbert AK, Hartmann G, Mayer K, Sauer T, Bolgiano B. Physicochemical Analysis of purified diphtheria toxoids: is toxoided then purified the same as purified the toxoided? In Brown F, Corbel M, Griffiths E (eds): Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines, *Dev. Biol.* Basel, Karger. 2000;**103**:205-15.

Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* 2004;**282**:1-18.

Friede M, Aguado MT. Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Adv Drug Del Reviews.* 2005;**57**:325-31.

Fries W and Schlapp M. Modifying the release of Gentamicin from microparticles using a PLGA blend. *Pharm Development and Technol.* 2002;**7(2)**:235-48.

Fu K, Griebenow K, Hsieh L, Klivanov AM, Langer R. FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres, *J. Control. Rel.* 1999;**58**:357-66.

Gabor F, Ertl B, Wirth M, Mallinger R. Ketoprofen-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. *J. Microencapsul.* 1999;**16**:1-12.

Galazka A. The changing epidemiology of Diphtheria in the vaccine era. *J Inf Diseases*. 2000;**181**(1):S2-9.

Galazka A, Robertson SE, Oblapenko GP. Resurgence of diphtheria. *Eu J Epidemiology*. 1995;**11**:95-105.

Gander B, Johansen P, Nam-Tran H, Merkle HP. Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spray drying. *Int. J. Pharm.* 1996;**129**:51-61.

Gaspar MM, Blanco D, Cruz MEM, Alonso MJ. Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and vitro release. *J Cont Release*. 1998;**52**:53-62.

Giovagnoli S, Blasi P, Schoubben A, Rossi C, Ricci M. Preparation of large porous biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery. *Int J Pharm*. 2007;**222**:103-11.

Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion, *Biomaterials*. 1996;**17**:103-14.

Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and elimination. In: Domb AJ, Kost J, Wiseman DM, (eds) Handbook of biodegradable polymers. Amsterdam: Harwood academic publishers, 1997.p 451-71.

Göpferich A, Burkersroda FV. Polymer bulk-erosion, In: Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 1997:128-129. Ed by Controlled Release Society, Inc.

Göpferich A, Langer R. Modeling of polymer erosion. *Macromolecules*. 1993;**26**:4105-12.

Greenfield N, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*. 1969;**8**:4108-16.

Hanes J, Hildgen P, Batycky RP, Cleland JL, Edwards DA, Langer R. Porous poly(D,L-Lactic-co-glycolic acid) microsphere degradation and release of macromolecules, In: Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 1997:1027- 28. (Eds) Controlled Release Society, Inc.

Harris JM. Introduction to biotechnical and biomedical applications of poly(ethylene glycol), in: J.M. Harris (Ed.), Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biochemical and Biomedical. 1992.

Heller J. Control of polymer surface erosion by the use of excipients. *Polym. Sci. Technol*. 1986;**34**:357-68.

Heya T, Okada H, Ogawa Y, Toguchi H. In vitro and in vivo evaluation of Thyrotrophin releasing hormone release from copoly (dl-lactic/glycolic acid) microspheres. *J Pharm Sciences*. 1994;**83**:636-40.

Hohmann EL, Oletta CA, Killen KP, Millar SI. *phoP/phoQ-deleted, Salmonella Typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine volunteers. *J. Infec. Dis.* 1996;173:1408-14.

Hora MS, Rana RK, Numberg JH, Tice TR, Gilley RM, Hudson ME. Release of human serum albumin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Pharm. J.* 1990;7:1190-4.

Jaganathan KS, Singh P, Prabakaran D, Mishra V, Vyas SP. Development of a single-dose stabilized poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres-based vaccine against hepatitis B. *J Pharm and Pharmacol.* 2004;56:1243-50.

Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT. The Preparation and Characterization of Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles. II. The Entrapment of a Model Protein Using a (Water-in-Oil)-in-Water Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Pharm Res.* 1993;10:362-8.

Jiang G, Woo BH, Kang F, Singh J, DeLuca PP. Assesment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J. Control. Rel.* 2002;79:137-45.

Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv. Drug Delivery Reviews.* 2005;57:391-410.

Johansen P, Merkle H, Gander B. Physico-chemical antigenic properties of tetanus and diphtheria toxoids and steps towards improved stability. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1425:425-36.

Johansen P, Men Y, Audran R, Corradin G, Merkle HP, Gander B. Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives, *Pharm. Res.* 1998;15:1103-10.

Johansen P, Tamber H, Merkle HP, Gander B. Diphtheria and tetanus toxoid microencapsulation into conventional and end-group alkylated PLA/PLGAs, *Eur. J. Pharm. Biophar.* 1999;47:193-201.

Kaarber K, Nielsen AO, Veien NK. Vaccination granulomas and aluminium allergy: course and prognostic factors. *Contact Dermatitis.* 1992;26(5):304-6.

Kaczorek M, Delpeyroux F, Chenciner N, Streeck RE. Nucleotide sequence and expression of the diphtheria tox228 gene in *Escherichia coli*. *Science.* 1983;221:855-8.

Kang C, Schwendeman S. Comparison of the effects of Mg(OH)₂ and sucrose on the stability of serum albumin encapsulated in injectable poly(D,L-lactide-co-glycolide) implants. *Biomaterials.* 2002;23:239-45.

Kang F. Conformational stability of a model rprotein (bovine serum albumin) during primary emulsification process of PLGA microspheres synthesis, *Int. J. Pharm.* 2003;**260**:149-56.

Kempen DHR, Lu L, Zhu X, Kim C, Jabbari E, Dhert WJA, Currier BL, Yaszemski M. Development of biodegradable poly(propylene fumarate)/ poly(lactic-co-glycolic acid) blend microspheres. II. Controlled drug release and microsphere degradation. *J Biomedical Materials Res Part A.* 2004;**70A**:283-92.

Kriegelstein K, Henschen A, Weller U, Habermann F. Arrangement of disulfide bridges and positions of sulphydryl groups in tetanus toxin, *Eur. J. Biochem.* 1990;**188**: 39-45.

Krishnamachari Y, Madan P, Lin S. Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. *Int J Pharm.* 2007;**338**:238-47.

Kuppermann BD, Blumenkranz MS, Haller JA, Williams GA, Weinberg DV, Chou C, Whitcup SM. Randomized controlled study of intravitreal dexamethasone drug delivery system in patients with persistent macular edema. *Arch Ophthalmol.* 2007;**125**:309-17.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;**227**:680-85.

Lagarce F, Cruaud O, Deuschel C, Bayssas M, Griffon-Etienne G, Benoit JP. Oxaliplatin loaded PLGA microspheres: design of specific release profiles. *Int. J. Pharm.* 2002;**242**:243-6.

Langer R. New methods of drug delivery, *Science.* 1990;**249**:1527-1533.

Leberman R. The Hofmeister series and ionic strength. *FEBS.* 1991;**284**(2):293-4.

Lee ES, Park KH, Kang D, Park IS, Min HY, Lee DH, Kim S, Kim JH, Na K. Protein complexed with chondroitin sulfate in poly(lactide-co-glicolide) microspheres, *Biomaterials.* 2007;**28**:2754-62.

Li(a) SM, Garreau H, Vert M. Structure- property relationships in the case of degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media, part 1. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1990;**1**:123-30.

Li(b) SM, Garreau H, Vert M. Structure- property relationships in the case of degradation of massive poly(α -hydroxy acid) in aqueous media. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1990;**1**:131-9.

Li(c) SM, Garreau H, Vert M. Structure- property relationships in the case of degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 3. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1990;**1**:198-206.

Li S, Girod-Holland S, Vert M. Hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in the presence of caffeine base. *J. Control. Rel.* 1996;40:41-53.

Linggood FV, Stevens MF, Fulthrope AJ, Pope CG. The toxoiding of purified diphtheria toxin. *Brit. J. Exper. Path.* 1963,44:177-88.

Lofthouse S. Immunological aspects of controlled antigen delivery. *Adv. Drug Del. Reviews.* 2002;54:863-70.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-275.

Lu W, Park TG. Protein release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: protein stability problems. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 1995; 49:13-19.

Mancino D, Ovary Z. Adjuvant effects of amorphous silica and aluminium hydroxide on IgE and IgG1 antibody production in different inbred mouse strains. *Int Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1980;61(3):253-8.

Manning MC, Patcl K, Borchardt R. Stability of protein pharmaceuticals, *Pharm. Res.* 1989;6:903-918.

McGoff P, Scheer DS. Solution formulation of proteins/peptides. In: E.J. McNally (Ed.), Protein formulation and delivery, Drugs and pharmaceutical sciences, vol. 99. New York: Marcel Dekker Inc. 2000. pp 139- 158.

Meinel I, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Merkle HP, Gander B. Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Rel.* 2001;70:193-202.

Men Y, Audran R, Thomasin C, Eberl G, Demotz S, Merkle HP, Gander B, Corradin G. MHC class I- and class II restricted processing and presentation of microencapsulated antigens, *Vaccine.* 1999;17:1047-56.

Mu L, Feng SS. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J Control Release.* 2003;86:33-48.

Mundargi RC, Sriranganrajan S, Agnihotri SA, Patil SA, Ravindra S, Setty SB, Aminabhavi TM. Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(D,L-lactide-coglycolide) and poly(ϵ -caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: *In vitro* and *in vivo* studies. *J Cont Rel.* 2007;119:59-68.

Namur JAM, Cabral-Albuquerque ECM, Quitilio W, Santana MHA, Politi MJ, de Araujo PS, Lopes AC, Bueno da Costa MH. PLGA microparticles sizes: a rational factorial design and surface response analysis. *J Nanoscience and Nanotechnol.* 2006;6:1-5.

Namur JAM, Costa, MHB. How Protein is Degradated by Poly Lactide-Co-Glycolide (PLGA) Microspheres. *Rmz Materials And Geoenvironment*.2004;**51** (1):479-83.

Namur JAM, Takata CS, Moro AM, Politi MJ, Araújo PS, Cuccovia IM, Costa MHB. Lactic acid triggers, in vitro, thiomersal to degrade protein in the presence of PLGA microspheres. *Int. J. Pharm.* 2004;**273**:1-8.

Namur JAM, Takata CS, Soares de Araújo P, Bueno da Costa MH. Hofmeister íons serie solubilize protein and protects it from conformational damages on CH₂Cl₂/water interface contact. Submetido ao Journal of Controlled Release em outubro/ 2007.

Nihant N, Schugens Ch, Granfils Ch, Jérôme R, Teyssié Ph. Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique.I. Effect of primary emulsion stability, *Pharm. Res.* 1994;**11**:1479-84.

Nihant N, Schugens Ch, Granfils Ch, Jérôme R, Teyssié Ph. Polylactide microparticles prepared by double emulsion-evaporation. II. Effect of the poly(lactide-co-glycolide) composition on the stability of the primary and secondary emulsions, *J. Colloid interface Sci.* 1995;**173**:55-65.

O'Donnell PB, McGinity JW. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;**28**:25-42.

Ogawa Y, Okada H, Yamamoto M, Shimamoto T. *In vivo* release profiles of leuprolide acetate from microcapsules prepared with polylactic acids or copoly(lactic/glycolic) acid and in vivo degradation of these polymers, *Chem. Pharm. Bull.* 1988;**36**:2576-88. (a)

Ogawa Y, Yamamoto M, Takada S, Okada H, Shimamoto T. Controlled-release of leuprolide acetatae from polylactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid microcapsules: influence of molecular weigh and copolymer ratio of polymer, *Chem. Phar. Bull.* 1988;**36**:1502-07. (b)

O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.*2003;**2**:727-35.

Okada H, Heya T, Ogawa Y, Shimamoto T. One-month release injectable microcapsules of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (leuprolide acetate) for treating experimental endometriosis in rats. *J Pharm Exp Therapeutics.* 1998; **244**:744-50.

Park TG. Degradation of poly (D, L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J. Control. Rel.* 1994;**30**:161-73.

Paliwal R, London E. Comparison of the conformation, hydrophobicity, and model membrane interactions of diphtheria toxin to those of faormaldehyde-treated toxin (Diphtheria toxoid): formaldehyde stabilization of the native conformation inhibits changes that allow membrane insertion, *Biochemistry.* 1996;**35**:2374-79.

Parikh RH, Parikh JR, Dubey RR, Soni HN, Kapadia KN. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: optimization of process parameters. *AAPS PharmSciTech*. 2003;4:1-8.

Pean JM, Boury F, Vernier-Julienne MC, Menei P, Proust JE, Benoit JP. Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres, *Pharm. Res.* 1999 ;16:1294-99.

Pérez C, Castellanos I, Costantino H, Al-Azzam W, Griebenow K. Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers, *J. Phar. Pharmacol.* 2002;54:301-13.

Pérez C, Griebenow K. Improved activity and stability of lysozyme at the water/CH₂Cl₂ interface: enzyme unfolding and aggregation and its prevention by polyols, *J. Pharm. Pharmacol.* 2001;53:1217-26.

Pérez C, De Jesús P, Griebenow K. Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-water method. *Int. J. Pharm.* 2002;248:193-206.

Pérez-Rodriguez C, Montano N, Gonzalez K, Griebenow K. Stabilization of chymotrypsin at the CH₂Cl₂/water interface and upon water-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres. *J. Control. Rel.* 2003;89:71-85.

Peters T. Serum albumin. *Adv. Prot. Chem.* 1985;37:161-245.

Philippe M. The effects of Thimerosal[®], a sulphhydryl reagent, on phasic myometrial contractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995;211:1-6.

Pintado E, Bachero-Leonis D, Conde M, Sobrino F. Effect of Thimerosal[®] and other sulphhydryl reagents on calcium permeability in thymus lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1995;49:227-32.

Pitt CG. Non-microbial degradation of polyesters: mechanisms and modifications. In: Biodegradable Polymers and Plastics, Vert M, Feijen J, Albertsson A, Scott G, Chiellini E. (Eds) Cambridge, Royal Society of Chemistry. 1992:7-19.

Pope CG, Linggood FV. Toxoids and their production. Patent GB n. 969, 772, 1961 January 5.

Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. *J. Microencapsul.* 1998;15:107-19.

Quintilio W, Sato RA, da Silveira AM, Barratt G, Fattal E, Bueno da Costa MH. Microquantification of proteins with low chromophore content. *Biotech Techniques.* 1997;11(9):697-700.

Raman C, Berkland C, Kim K, Pack DW. Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution. *J Control Release*. 2005;**103**:149-58.

Ramon G. Flocculation dans un mélange neutre de toxine-antitoxine diphtérique. *CR Soc. Biol.* 1922,**86**:661-3.

Rappuoli R. New and improved vaccines against diphtheria and tetanus in: Marcel Dekker (Eds) *New generation vaccines*, Inc. New York, Basel, 1997:417- 36.

Ravivaparuru HB, Mover KL, Dunn RL. Parameters affecting the efficacy of a sustained release polymeric implant of leuprolide. *Int J Pharm.* 2000;**25**:181-91.

Reed AM, Shindler A. Biodegradable polymers for use in surgery- poly (glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers. 2. In vitro degradation. *Polymer*. 1981;**22**:356-60.

Relyveld EH. A history of toxoids, in Plotkin S, Fantini B (eds): *Vaccinia, vaccination and vaccinology*. Paris, Elsevier. 1996:95-105.

Ricci S, Gallo E, Guarnieri V, Maganoli C, Ravenscroft N, D'Ascenzi S. Determination of protein concentration of three antigens by amino acids analysis, UV/Vis and Micro-BCA. Comparison between analytical methods. *Proteine '98* III Convegno del Gruppo Structure e Funzioni delle Proteine. Società Italiana di Biochimica Università di Genova. Centro de Biotecnologia Avanzate (CBA-ABC). 1998. Genova, Italy 31 May- 2 June.

Ron E, Turek T, Mathiovitz E, Chasin M, Hageman M, Langer R. Controlled release of polypeptides from polyanhydrides, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993;**90**: 4176- 80.

Ruan G, Feng SS, Li QT. Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process. *J Control Rel.* 2002;**84**:151-60.

Sah H.(a). Protein behavior at the water/methylene chloride interface . *J. Pharm. Sci.* 1999;**88**:1320- 1325.

Sah H.(b). Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface induced denaturation and aggregation. *J. Control. Rel.* 1999,**58**:143-151.

Samati Y, Yüksel N, Tarimci N. Preparation and characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing flurbiprofen sodium. *Drug Delivery*. 2006;**13**:105-11

Sánchez A, Villamayor B, Guo Y, McIver J, Alonso MJ. Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Int. J. Pharm.* 1999;**185**:255-66.

Sato RA, Costa MHB. Bioprocess design: study of a case. *Biotech, Lett.* 1996;**18**:275-80.

Schwendeman SP, Cardamone M, Klibanov A, Langer R. Microparticle delivery of proteins and vaccines, drugs and pharm. In: Cohen S, Bernstein H (ed) Marcel Dekker, Inc., NY. 1996,pp149.

Schwendeman SP, Costantino HR, Gupta RK, Tobío M, Chang AC, Alonso MJ, Siber GR, Langer R. Strategies for stabilizing tetanus toxoid towards the development of a single-dose tetanus vaccine, *Dev. Biol. Stand.* 1996;**87**:293-306.

Schwendeman SP, Tobío M, Joworowicz M, Alonso MJ, Langer R. New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine. *J. Microencapsul.* 1998;**15**(3):299-318.

Sehra S, Dhake AS. Formulation and evaluation of sustained release microspheres of poly-lactide-co-glycolide containing tamoxifen citrate. *J Microencapsul.* 2005;**22**:521-8.

Silva VA, Takata CS, San'anna O, Lopes AC, Soares de Araujo P, Bueno da Costa MH. Enhanced liposomal vaccine formulation and performance: simple physicochemical and immunological approaches. *J Liposome Research.* 2006;**16**:1-13.

Singh M, Shirley B, Bajwa K, Samara E, Hora M, O'Hagan D. Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles, *J. Control. Rel.* 2001;**70**:21-28.

Sipos P, Csóka I, Srcic S, Pintye-Hódi K, Erős I. Influence of preparation conditions on the properties of Eudragit microspheres produced by a double emulsion method. *Dru Dev Research.* 2005;**64**:41-54.

Srinivasan C, Katare YK, Muthukumaran T, Panda AK. Effect of additives on encapsulation efficiency, stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles. *J. Microencapsul.* 2005;**22**:127-38.

Storni T, Kündig TM, Senti G, Johansen P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Del Reviews.* 2005;**57**:333-55.

Stoscheck C. Guide to protein purification. In: Methods in Enzymology, (eds) Murray P Deutscher. New York, USA, Academic Press. 1990;**182**:50-82.

Takahata H, Lavelle EC, Coombes AGA, Davis SS. The distribution of protein associated with poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles and its degradation in simulated body fluids, *J. Control. Rel.* 1998;**50**:237-46.

Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001;**47**:39-54.

Tamada J, Langer R. Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;**90**:552-6.

Tamber H, Johanse P, Merkle HP, Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv. Drug Del. Reviews*. 2005;**57**:357-76.

Tan M, Parkin JE. Route of decomposition of thiomersal (Thimerosal[®]). *Int. J. Pharm.* 2000;**208**:23-34.

Thote AJ, Gupta RB. Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release. *Nanomedicine*. 2005;**1**:85-90.

Tiainen J, Soini Y, Suokas E, Veiranto M, Törmälä P, Waris T, Ashammakhi N. Tissue reactions to bioabsorbable ciprofloxacin-releasing polylactide-polyglycolide 80/20 screws in rabbits' cranial bone. *J Mater Sci*. 2006;**17**:1315-22.

Tietz NW. Clinical Guide to laboratory tests, 3 ed., Saunders WB Company, Philadelphia, 1995, 382-383.

Tilstra L, Mattice WL. The B sheet ↔ coil transition of polypeptides, as determined by circular dichroism. In: Fasman GD. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York and London: Plenum Press; 1996. p. 261-269.

Tleugabulova D, Pérez IG. Reversed phase high-performance liquid chromatographic study of Thimerosal[®] stability in Cuban recombinant hepatitis B vaccine. *J. Control. Release*. 1996;**729**:219-27.

Tobío M, Schwendeman SP, Guo Y, McIver J, Langer R, Alonso MJ. Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system. *Vaccine*. 2000;**18**:618-22.

Vandervoort J, Ludwig A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *Int. J. Pharm.* 2002;**238**:77-92.

Verma RK, Garg S. Current status of drug delivery technologies and future directions. *Pharmaceutical Technology on-line*. 2001;**25**(2):1-14.

Vert M, Christel P, Chabot F, Leray J. In: Hastings GW, Ducheyne P (eds) Macromolecular materials. Boca Raton, FL: CRC Press. 1984 p. 119 (Chapter 4).

Vert M, Mauduit J, Suming Li. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity, *Biomaterials*. 1994;**15**:1209-13.

Vila A, Sánchez A, Tobío M, Calvo P, Alonso MJ. Design of biodegradable particles for protein delivery, *J. Control. Rel.* 2002;**78**:15-24.

Waeckerle-Men Y, Groettrup M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv. Drug Delv. Rev.* 2005;**57**:475-82.

Walter E, Dreher D, Kok M, Thiele L, Kiama SG, Gehr P, Merkle HP. Hydrophilic poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J. Control Release*. 2001;**76**:149-68.

Wang J, Mg CW, Win KY, Shoemakers P, Lee TK, Feng SS, Wang CH. Release of paclitaxel from polylactide-co-glycolide (PLGA) microparticles and discs under irradiation. *J Microencapsul*. 2003;**20**:317-27.

Weert M, Hoehstetter J, Hennink WE, Crommelin DJA. The effect of water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme. *J. Control. Rel*. 2000;**68**:351-9.

Wei G, LuLF, Lu WY. Stabilization of recombinant human growth hormone against emulsification-induced aggregation by Pluronic surfactants during microencapsulation. *Int J Pharm*. 2007;**338**:125-32.

Westgard JO, Lahmeyer BL, Bimbaum ML. *Clin Chem*. 1972;**18**:1334-38.

WHO. Report of the technical review group meeting, 7-8 June 1998. Global programme for vaccines and immunization. Vaccine Research and development. Geneva: 1998.

Wu, XS. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2004;**32**:575-91.

Xing DKL, Cranet DT, Bolgiano B, Corbel MJ, Jones C, Sesardic D. Physico-chemical and immunological studies on the stability of free and microsphere-encapsulated tetanus toxoid *in vitro*. *Vaccine*. 1996;**14**:1205-13.

Yadav D, Khuller GK. Evaluation of the T cells and costimulatory molecules in the protective efficacy of 30 kDa secretory protein against experimental tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2001;**79**:207-12.

Yang YY, Chung TS, Bai XL, Chan WK. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chem. Eng. Sci*. 2000;**55**:2223-36.

Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion Chem. Biol*. 2006;**10**:658:63.

Zhu G, Mallery SR, Schwendeman S. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide). *Nat. Biotech*. 2000;**18**:62-67.

Zhu G, Schwendeman SP. Stabilization of proteins encapsulated in cylindrical poly(lactide-co-glycolide) implants: mechanism of stabilization by basic additives, *Pharm. Res*. 2000;**16**:241- 8.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)