

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências

VANESSA CRISTINA RESCIA

**REVs-Chi: um novo sistema particulado para encapsulação
de macromoléculas terapêuticas.**

**Orientadora
Profa. Dra. Maria Helena Bueno da Costa**

**São Paulo
30/06/2009**

VANESSA CRISTINA RESCIA

**REVs-Chi: um novo sistema particulado para encapsulação
de macromoléculas terapêuticas.**

**Tese apresentada ao Departamento de
Clínica Médica da Universidade Federal
de São Paulo para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Bueno da Costa

**São Paulo
2009**

Rescia, Vanessa Cristina

REVs-Chi: um novo sistema particulado para encapsulação de macromoléculas terapêuticas.

Vanessa Cristina Rescia. -- São Paulo, 2009.
viii, 120 f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Clínica Médica.

Título em inglês: REVs-Chi: A new particulate system for encapsulation of therapeutic macromolecules.

1. Lipossoma, 2. Quitosana, 3. PVA, 4. Toxóide diftérico, 5. Vacina.

Vanessa Cristina Rescia

**REVs-Chi: um novo sistema particulado para encapsulação
de macromoléculas terapêuticas.**

Tese apresentada a Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por me guiar, me proteger e me dar forças ao longo de minha caminhada até aqui.

Agradeço aos meus pais, Lúcia e Reinaldo pelo amor e carinho incondicionais, também pela educação e valores que puderam me passar e, além disso, por cuidarem da Laurinha enquanto eu realizava este trabalho.

Agradeço a minhas irmãs, Alessandra e Jussara, também aos meus cunhados Milton e Flávio, pelo carinho e cuidado que tiveram com a Laura em minhas ausências e, também, pela amizade e convivência.

Agradeço ao meu avô José (*in memoriam*) pelo seu amor e por cuidar de mim, até hoje, de onde quer que ele esteja... Agradeço a minha avó Antonia e a minha tia Martha por estarem presentes em minha vida.

Agradeço a Laura pelo seu amor, por estar ao meu lado e por compreender minhas ausências. “Agora, mamãe não vai mais trabalhar de manhã, de tarde e de noite”!

Agradeço ao Fernando, pelo apoio e incentivo iniciais para este trabalho e por nós termos tido nossa filha Laura, amor maior de meu coração, alicerce de minha vida e que com seu sorriso me dá forças para seguir.

Agradeço a Dona Maria, a Flávia e ao Heli, por todo amor, carinho e ajuda ao longo deste trabalho, tanto pra mim quanto para a minha filha Laura.

Agradeço a minha querida orientadora Lelena, pelos seus ensinamentos que levarei por toda minha vida, por me despertar amor à pesquisa e por chá, por ampliar meus horizontes (até a Argentina, Grécia e Holanda, por hora!), pelos “puxões de orelha” e pelos abraços carinhosos quando precisei. “Você estará sempre em meu coração, querida”! “Ah, agora sei onde estão as figuras 27, 28, 29...”!

Agradeço ao meu querido Henrique, pela sincera amizade ao longo desses anos e por me abrir uma “janela” que modificou minha vida. Você me mostrou a ciência como forma de vida e que a amizade é uma forma de amor. “Ah, obrigada pelos CDs, fluorescências, por ter me dado de presente a orientadora perfeita e por seguir ao meu lado, amigo”!

Agradeço aos meus queridos amigos JP, Bia e Mislene, pelo apoio e pelas horas de conversas que me ajudaram a crescer e a ver a vida de outra perspectiva.

Agradeço ao Hebert, meu amigo, pelas figuras da dissertação e pelo carinho.

Agradeço aos queridos colegas de laboratório, Tatiana, Tereza, Reginaldo, Sérgio, Dona Odila, Vanessa, Jocimara, Liliam, Maria del Carmen, Adriana e Leonardo, pela colaboração, carinho e amizade. Todos fizeram parte de minha história de vida e estarão sempre em meu coração.

Agradeço a todos os pesquisadores, funcionários e estudantes do Centro de Biotecnologia e de todo o Instituto Butantan por nos cederem equipamentos e, em especial, às pessoas que me presentearam com suas amizades como a Paty, a Erika, a Luana, a Tati, a Vivian e a Roberta; ao Prof. Dr. Osvaldo A. B. E. Sant' Anna, pela colaboração com os ensaios biológicos; ao Prof. Dr. Paulo Lee Ho por disponibilizar equipamentos e pessoal de seu laboratório; ao Sr. Gaspar Ferreira de Lima (Imunohistoquímica - ICB-USP) por preparar o material para o TEM com tanto carinho que me rendeu fotos maravilhosas e, também ao pessoal da Biologia Celular do Instituto Butantan pelo uso do TEM, em especial à Dra. Marta Maria Antoniazzi e ao Alexsander Seixas de Souza.

Agradeço a Profa. Dra. Iolanda Midea Cucovia e a Dra. Katia R. P. Daghasanli, do IQ-USP, por toda ajuda com os experimentos no Potencial Zeta e ao Prof. Dr. Pedro Soares de Araujo por toda a colaboração.

Agradeço a Dra. Silvia Alonso (UNQ - Argentina) e ao Dr. Jean-Marie Ruysschaert (ULB - Bélgica) por todo o carinho e incentivo.

Agradeço a CAPES, CNPQ, FAPESP e Fundação Butantan pelo apoio financeiro cedido ao laboratório durante a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES, pela minha bolsa de mestrado.

**À minha filha Laura, amor
maior de meu coração.**

**“Toda a ciência começa como filosofia e termina em arte”.
(Will Durant)**

Resumo

A quitosana (Chi), a (1-4)-amino-2-desoxi- β -glicana, é a forma desacetilada da quitina, um polissacarídeo das conchas de crustáceos. As suas características únicas como a carga positiva, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade e estrutura rígida fazem com que esta macromolécula seja ideal para uso como sistema oral de entrega de vacinas. Foram preparadas vesículas unilamelares grandes (REVs) envoltas por dentro e por fora (como um sanduiche) com quitosana (Chi) e poli-vinil álcool (PVA). Entretanto, existem alguns problemas a serem superados com relação à estabilização da proteína durante este processo. Durante a fase de formação de micelas reversas, no processo de nanoencapsulação da proteína, expandem-se as interfaces hidrofóbicas que então levam às adsorções interfaciais seguidas por desenovelamento e agregação das proteínas. Aqui, observaram-se através de técnicas espectroscópicas e imunológicas, o uso dos sais da série de Hoffmeister durante a fase de formação de micela reversa para estudar a conformação estável do toxoide diftérico (Dtxd). Foi estabelecida uma correlação entre os sais usados na fase aquosa e as variações na solubilidade e conformação de Dtxd.

Como o conteúdo em hélice- α foi praticamente estável concluiu-se que a encapsulação de Dtxd ocorreu sem agregação ou sem exposição de resíduo hidrofóbico na proteína. A agregação de Dtxd foi evitada em 98 % quando se usou o cosmotrópico PO_4^{2-} . Este íon foi usado para se preparar uma formulação de Dtxd em REVs-Chi-PVA estável e com identidade imunológica reconhecida na presença de PO_4^{2-} . Então, obteve-se uma solubilidade e estabilidade máxima de Dtxd depois de seu contacto com $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ para começar a sua nanoencapsulação em condições ideais. Este foi um avanço tecnológico importante porque uma solução simples, como é a adição de sais, evitou o uso de proteínas heterólogas (**Rescia et alii, 2009_a**). A proteína estabilizada foi então encapsulada dentro de REVs como o descrito.

Os lipossomas têm sido descritos como adjuvantes desde 1974 (Allison e Gregoriadis, 1974). A maior limitação de seu uso em vacinas orais é a sua instabilidade estrutural causada pelas atividades enzimáticas do meio. O objetivo aqui foi combinar lipossomas, que podem encapsular antígenos (Dtxd, Diphtheria toxoid) com quitosana que protege estas partículas e promove a mucoadesibilidade. Empregaram-se técnicas físicas para se entender o processo pelo qual lipossomas (SPC: Cho, 3: 1) podem ser recobertos (interna e externamente) com quitosana (Chi) e PVA (poly-vinilic-alcohol) que são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Obtiveram-se partículas de REVs-Chi (vesículas preparadas por evaporação de fase reversa recobertas interna e externamente com Chi) redondas e com as superfícies rugosas e estabilizadas ou não com PVA. As eficiências de encapsulação (Dtxd foi usada como antígeno) foram diretamente dependentes da presença de Chi e PVA na formulação. A adsorção de Chi à superfície de REVs foi acompanhada por um aumento no potencial ζ . Em contraste, a adsorção de PVA à superfície de REVs-Chi foi acompanhada por uma diminuição do potencial ζ . A presença de Dtxd aumentou a eficiência de adsorção de Chi às superfícies. A afinidade de PVA pela mucina foi 2000 vezes maior do que a observada somente com Chi e não depende se a molécula está em solução ou se está adsorvida à superfície lipossomal. A

liberação do Dtxd foi retardada por sua encapsulação dentro de REV-Chi-PVA. Concluiu-se que estas novas vesículas estabilizadas foram hábeis em se adsorverem às superfícies intestinais, resistiram às degradações e controlaram a liberação do antígeno. Assim, as partículas de REV-Chi-PVA podem ser usadas como um veículo oral com capacidade adjuvante (**Rescia *et alii*, 2009_b**).

Os lipossomas revstidos por quitosana (REV-Chi) como veículos orais para transporte de vacinas foram bem caracterizados neste laboratório. Estas partículas foram desenhadas para serem capturadas pelo muco, para interagirem com superfícies orais e para resistirem às enzimas do trânsito gástrico. Foram usadas três formulações diferentes contendo o Dtxd (toxóide diftérico) para imunizar camundongos: REVs [Vesículas unilamelares obtidas por evaporação de fase reversa produzidas com SPC: Cho (3:1)]; REV-Chi (REVs recobertas por Chi) e REV-Chi-PVA (REVs recobertas por Chi e estabilizadas por PVA). Através do teste de adesibilidade e dos experimentos com anti-toxóide diftérico observou-se que houve uma correlação direta entre a complexidade da partícula (antígeno livre < REVs < REV-Chi < REV-Chi-PVA) e a produção de anticorpos (IgA, IgG₁ and IgG_{2a}) em todos os ensaios (R= 0,91766- 0,99718). O resultado mais interessante foi a total ausência da produção de IgA nos camundongos imunizados com o antígeno livre, provando então a excelência das partículas engenheiradas. Além do aumento da produção dos anticorpos de mucosa, ambas formulações com Chi ou com Chi-PVA estimularam tanto a produção de anticorpos humorais quanto a seletividade. Demonstrou-se que é possível de se estabelecer uma correlação entre REV-Chi/Dtxd and REV-Chi-PVA/Dtxd e o aumento da imunidade de mucosa. Estas partículas podem ser usadas como veículo geral tanto para transporte de drogas quanto de vacinas (**Rescia *et alii*, 2009_c**).

Palavras chave: Série de Hoffmeister, Estabilidade de proteínas, Lipossoma, Quitosana, adjuvante particulado, adjuvante, veículo de vacina, transporte de drogas.

Abstract

Chitosan, α - (1-4)-amino-2-deoxy- β -D-glucan) is a deacetylated form of chitin, a polysaccharide from crustacean shells. Its unique characteristics such as positive charge, biodegradability, biocompatibility, non-toxicity, and rigid structure make this macromolecule ideal for oral vaccine delivery system. We prepared reverse phase evaporation vesicles (REVs) sandwiched by chitosan (Chi) and polyvinyl alcohol (PVA). However, in this method there are still some problems to be circumvented related to protein stabilization. During the inverted micelle phase of protein nanoencapsulation, hydrophobic interfaces are expanded leading to interfacial adsorption followed by protein unfolding and aggregation. Here, spectroscopic and immunological techniques were used to ascertain the effects of the Hoffmeister series ions on Diphtheria toxoid (Dtxd) stability during the inverted micelle phase. A correlation was established between the salts used in aqueous solutions and the changes in Dtxd solubility and conformation.

Dtxd α -helical content was quite stable what led us to conclude that encapsulation occurred without protein aggregation or without exposition of hydrophobic residues. Dtxd aggregation was 98 % avoided by the kosmotropic PO_4^{2-} . This ion was used to prepare a stable Dtxd and immunologically recognized REVs-Chi-PVA formulation in the presence of 50 mM PO_4^{2-} . Under these conditions the Dtxd retained its immunological identity. Therefore, we could obtain the maximum Dtxd solubility and stability after contact with $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ to begin its nanoencapsulation within ideal conditions. This was a technological breakthrough because a simple solution like salt addition avoided heterologous proteins usage (Rescia *et al.*, 2009_a). The stabilized protein was as encapsulated within REVs as described.

Liposomes have been used as adjuvants since 1974 (Allison and Gregoriadis, 1974). One major limitation for the use of liposomes in oral vaccines is the lipid structure instability caused by enzyme activities. Our goal was to combine liposomes which can encapsulate antigens (Dtxd, diphtheria toxoid) with chitosan which protects the particles and promotes mucoadhesibility. We employed physical techniques to understand the process by which liposomes (SPC: Cho, 3:1) can be sandwiched with chitosan (Chi) and stabilized by PVA (Poly-vinyl alcohol) which are biodegradable and biocompatible polymers. Round and smooth surfaced particles of REVs-Chi (Reversed phase vesicles sandwiched by Chi) stabilized by PVA were obtained. The REVs encapsulation efficiencies (Dtxd was used as the antigen) were directly dependent on the Chi and PVA present in the formulation. Chi adsorption on REVs surface was accompanied by an increase of ζ potential. In contrast, PVA adsorption on REVs-Chi surface was accompanied by a decrease of ζ potential. The presence of Dtxd increased the Chi surface adsorption efficiency. The PVA affinity by mucine was 2000 higher than that observed with Chi alone and did not depend on the molecule being in solution or adsorbed on the liposomal surface. The liberation of encapsulated Dtxd was retarded by encapsulation within REVs-Chi-PVA. These results lead us to conclude that these new and stabilized particles were able to adsorb to intestinal surfaces, resisted

degradation and controlled the antigen release. Therefore, REVs-Chi-PVA particles can be used as an oral delivery adjuvant (**Rescia *et al.*, 2009_b**).

Liposomes sandwiched by chitosan (REVs-Chi) as vehicles for oral vaccines have been well characterized in our laboratory. These particles were designed to be captured by mucus, to interact with oral surfaces and to withstand the enzymes of the gastric transit. Three different formulations containing Dtxd (diphtheria toxoid): REVs [reverse phase evaporation vesicles of SPC: Cho (3: 1)]; REVs-Chi (REVs sandwiched by chitosan) and REVs-Chi-PVA were used to immunize mice. Through adhesibility assays and antibody anti-diphtheria experiments we observed a direct correlation between particle complexity (free antigen < REVs < REVs-Chi < REVs-Chi-PVA) and antibody production (IgA, IgG₁ and IgG_{2a}) in all the assays (R= 0,91766- 0,99718). The most striking result was the absence of IgA production in those mice immunized with the free antigen, proving the excellence of the engineered particles. In addition to enhancement of mucosal antibodies production, the formulations with Chi and PVA stimulated both, humoral antibody production and selectivity. We have shown that it was possible to establish a correlation between REVs-Chi/Dtxd and REVs-Chi-PVA/Dtxd and the enhancement of mucosal immunity. These particles can be used as a general vehicle for oral drug or vaccine delivery systems (**Rescia *et al.*, 2009_c**).

Key words: Hoffmeister ions serie, protein stability, liposome, chitosan, particulate adjuvant, vaccine vehicle, drug delivery.

LISTA DAS FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
Figura 1	Formação de REVs.	40
Figura 2	Formação de REVs-Chi.	41
Figura 3	Efeito dos sais da série de Hoffmeister na solubilidade de Dtxd após sonicação na presença de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$.	42
Figura 4	Efeito dos sais da série de Hoffmeister nas concentrações das diferentes espécies moleculares de Dtxd após a sonicação.	44
Figura 5	Efeito dos sais da série de Hoffmeister sobre a identidade imunológica de Dtxd.	45
Figura 6	Relação entre as intensidades de fluorescência a 350 e 330 nm das amostras da fase aquosa de Dtxd após sonicação na presença de acetato de etila e de sais.	46
Figura 7	Efeito de NaCl sobre a estrutura secundária do Dtxd durante a sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$.	49
Figura 8	Efeito de KSCN sobre a estrutura secundária do Dtxd durante a sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$.	50
Figura 9	Efeito de MgCl_2 sobre a estrutura secundária do Dtxd durante a sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$.	51
Figura 10	Efeito de NaH_2PO_4 sobre a estrutura secundária do Dtxd durante a sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$.	52
Figura 11	Efeito da concentração dos sais da série de Hoffmeister no $\theta_{196 \text{ nm}}$ de Dtxd.	53
Figura 12	Efeito da concentração dos sais da série de Hoffmeister no $\theta_{222 \text{ nm}}$ de Dtxd.	53
Figura 13	Efeito da concentração dos sais da série de Hoffmeister no conteúdo de hélice- α de Dtxd.	55
Figura 14	Efeito da concentração dos sais da série de Hoffmeister no $\theta_{260 \text{ nm}}$ de Dtxd.	55
Figura 15	Estrutura química geral da fosfatidilcolina (a), quitosana (b), PVA (c).	59
Figura 16	Pontes de hidrogênio que se formam com quitosana em solução.	59
Figura 17	Pontes de hidrogênio que se formam com PVA em solução.	59
Figura 18	Estrutura química da Mucina.	61
Figura 19	Interação entre mucina e os polímeros quitosana e PVA.	62
Figura 20	Interação entre mucina e as diferentes formulações lipossomais.	63
Figura 21	Efeitos da temperatura, da concentração e do conteúdo de ácido siálico da interação de mucina com REVs-Chi.	64
Figura 22	Efeitos da temperatura, da concentração e do conteúdo de ácido siálico da interação de mucina com REVs-Chi.	65
Figura 23	Comparações entre as afinidades de Mu-III ou M-IS com Chi e PVA.	66

FIGURA		PÁGINA
Figura 24	Correlação entre mucina adsorvida e o potencial zeta das diferentes partículas.	67
Figura 25	Fotografia de REVs, REVs-Chi e REVs-Chi-PVA por microscopia de inversão de fase.	68
Figura 26	Fotografia de REVs-Chi-PVA por microscopia confocal.	69
Figura 27	Fotografias por microscopia eletrônica de transmissão das diversas formulações.	70
Figura 28	Fotografia por microscopia eletrônica de REVs-Chi-PVA/Dtxd. Fotografia da réplica obtida por criofratura (freeze-fracture) de REVs-Chi-PVA/Dtxd.	70
Figura 29	Efeito da trealose na cinética de liberação de Dtxd encapsulado em partículas de REVs-Chi-PVA.	72
Figura 30	Efeito da liofilização na cinética de liberação de Dtxd das partículas de REVs-Chi-PVA/Dtxd.	73
Figura 31	Cinética de liberação de Dtxd das diferentes formulações.	74
Figura 32	Produção de IgA salivar contra Dtxd nas diferentes formulações.	77
Figura 33	Comparação entre as produções IgA salivar nas diferentes formulações.	78
Figura 34	Correlação entre as produções de IgA salivar e a adsorções das diferentes partículas com Mu-III.	78
Figura 35	Comparação entre as produções de IgA vaginal em resposta a diferentes formulações administradas em via oral (A) e subcutânea (B).	80
Figura 36	Correlação entre as produções de IgA vaginal e a adsorções das diferentes partículas com Mu-III.	80
Figura 37	Títulos de IgG ₁ nas diferentes formulações administradas em via oral (A) e subcutânea (B).	82
Figura 38	Títulos de IgG _{2a} nas diferentes formulações administradas em via oral (A) e subcutânea (B).	83
Figura 39	Correlação entre a produção de IgA anti-Dtxd depois da dose de reforço e a complexidade das formulações.	84
Figura 40	Correlação entre a produção de Figura IgG ₁ anti-Dtxd depois da dose de reforço e a complexidade das formulações.	85
Figura 41	Correlação entre a produção de IgG _{2a} anti-Dtxd depois da dose de reforço e a complexidade das formulações.	86
Figura 42	Distribuição de casos confirmados de difteria no Brasil entre 1997 e 2006 (Sinan/SVS/MS, 2007).	89
Figura 43	Efeitos de Chi e PVA no raio hidratação e na estrutura da bicamada de REVs (SPC: Cho, 6:1).	99

LISTA DOS ESQUEMAS

ESQUEMA		PÁGINA
Esquema 1	Representação esquemática da estrutura da toxina diftérica.	48

LISTA DAS TABELAS

TABELA		PÁGINA
Tabela 1	Produtos lipossomais no Mercado.	21
Tabela 2	Produtos lipossomais em estudos clínicos.	22
Tabela 3	Efeito dos sais da série de Hoffmeister nas concentrações das diferentes espécies moleculares de Dtxd após a sonicação.	43
Tabela 4	Tamanho dos REVs-Chi, potencial zeta e eficiência de encapsulação de Dtxd.	56
Tabela 5	Características dos diferentes aminoácidos de Dtxd.	58
Tabela 6	Eficiência de polimerização interfacial nas diferentes formulações.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Chi	Quitosana ou chitosan
Cho	Colesterol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOC	Deoxicolato de sódio
Dtxd	Toxoide diftérico
FITC	Isoticianato de fluoroceína
IBu	Instituto Butantan
GUVs	Vesículas unilamelares gigantes
GOVs	Vesículas oligolamelares gigantes
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LUVs	Vesículas unilamelares grandes
MLVs	Vesículas multilamelares
Mu	Mucina
Mu-III	Mucina tipo III - suína (1 % de ácido siálico)
Mu-IS	Mucina tipo II - bovina (12 % de ácido siálico)
M_w	Massa molar media
OLVs	Vesículas oligolamelares
PVA	Álcool polivinílico
REV	Método de preparação de lipossomas por evaporação em fase reversa
REVs	Vesículas obtidas por evaporação em fase reversa
REVs-Chi	Vesículas obtidas por evaporação em fase reversa revestidas por quitosana
REVs-Chi-PVA	Vesículas obtidas por evaporação em fase reversa revestidas por quitosana e PVA
REVs/Dtxd	Vesículas obtidas por evaporação em fase reversa com Dtxd encapsulado
REVs-Chi/Dtxd	Vesículas obtidas por evaporação em fase reversa revestidas por quitosana com Dtxd encapsulado
REVs-Chi-PVA/Dtxd	Vesículas obtidas por evaporação em fase reversa revestidas por quitosana e PVA com Dtxd encapsulado
REVs-Chi-Tre	Vesículas obtidas por evaporação em fase reversa revestidas por quitosana com trealose.
SC	Via subcutânea
SPC	Fosfatidilcolina de soja
SUVs	Vesículas unilamelares pequenas
TEM	Microscopia de Transmissão Eletrônica
TMB	Tetrametilbenzdina
Tre	Trealose
θ	Ângulo de medida de luz espalhada em relação ao feixe de luz incidente
W	Watts

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. A quitosana.....	22
1.2. PVA (poli álcool vinílico).....	24
 2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1. Materiais.....	26
2.2. Métodos.....	27
2.2.1. Preparativos.....	27
2.2.1.1. Ultraconcentração de Toxóide diftérico (Dtxd).....	27
2.2.1.2. Marcação Dtxd com isotiocianato de fluoresceína.....	27
2.2.1.3. Preparo de lipossomas por Evaporação em Fase Reversa (REV)....	28
2.2.1.3.1. Preparo de lipossomas unilamelares grandes (LUVs) vazios através do método de Evaporação em Fase Reversa (REV)....	28
2.2.1.3.2. Encapsulação de Dtxd em lipossomas unilamelares grandes (LUVs) através do método de Evaporação em Fase Reversa (REV).....	28
2.2.1.3.3. Preparo de lipossomas unilamelares grandes (LUVs) vazios revestidos com quitosana (Chi) através do método de Evaporação em Fase Reversa (REV).....	29
2.2.1.3.4. Encapsulação de Dtxd em lipossomas unilamelares grandes (LUVs) revestidos com quitosana (Chi) através do método de Evaporação em Fase Reversa (REV).....	29
2.2.2. Analíticos	30
2.2.2.1. Dosagem de proteínas.....	30
a. Método de Lowry modificado.....	30
b. CLAE.....	30
2.2.2.2. Dosagem de proteína - ELISA.....	30
2.2.2.3. Dosagem de mucina.....	31
2.2.2.4. Dosagem de quitosana.....	31
2.2.2.5. Espectroscopia de fluorescência.....	32
2.2.2.6. Espectroscopia de Dicroísmo circular.....	32

2.2.3. Caracterizações da Estabilidade de Dtxd durante as etapas de preparação de REVs-Chi.....	32
2.2.3.1. Efeito dos sais da série de Hoffmeister na solubilidade de Dtxd durante a formação de micelas reversas.....	32
2.2.4. Caracterizações dos REVS-Chi (LUVs revestidas por quitosana) <i>in vitro</i>	33
2.2.4.1. Avaliação da eficiência de encapsulação de Dtxd.....	33
2.2.4.2. Eficiência de polimerização interfacial de quitosana sobre REVs....	33
2.2.4.3. Estudos de estabilidade das REVS-Chi em simulados de suco gástrico e suco intestinal.....	33
2.2.4.4. Tamanho dos REVs-Chi.....	34
2.2.4.5. Potencial zeta.....	34
2.2.4.6. Caracterização microscópica de REVs.	34
2.2.4.6.1. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	34
2.2.4.6.2. Microscopia eletrônica de crio-fratura (freeze-fracture).....	34
2.2.4.7. Interação mucina/quitosana.....	35
2.2.4.8. Adsorção de REVs-Chi ou REVS-Chi-PVA à Mu- III.....	35
2.2.4.9. Efeito do conteúdo em ácido siálico de Mu-III (1 %) e Mu-IS (12 %), da temperatura e da concentração das mucinas na interação com REVs-Chi ou REVs-Chi-PVA.....	35
2.2.5. Estudos <i>in vivo</i>	36
2.2.5.1. Imunização.....	36
2.2.5.2. ELISA para quantificar anticorpo anti- Dtxd desenvolvido em camundongo.....	36
3. RESULTADOS.....	38
3.1. Caracterizações da Estabilidade de Dtxd durante as etapas de preparação de REVs-Chi.....	38
3.1.1. Efeito da sonicação na conformação de Dtxd.....	38
3.1.2. Espectroscopia de fluorescência.....	44
3.1.3. Espectroscopia de Dicroísmo circular.....	46
3.2. Caracterizações dos REVS-Chi (LUVs revestidas por quitosana) <i>in vitro</i> ...	54

3.2.1. Tamanho dos REV-Chi, potencial zeta e avaliação da eficiência de encapsulação de Dtxd.....	54
3.2.2. Eficiência de polimerização interfacial de quitosana.....	57
3.2.3. Propriedade mucoadesiva das partículas.....	59
3.2.3.1. Interação mucina/quitosana e mucina/PVA.....	59
3.2.3.2. Adsorção de mucina aos REV-Chi ou REV-Chi-PVA.....	61
3.2.4. Microscopias eletrônicas das REV.....	66
3.2.5. Estudos de estabilidade das REV-Chi	68
3.2.5.1. Estudos de estabilidade das REV-Chi.....	68
3.2.5.2. Estudos de estabilidade das REV-Chi em simulados de suco gástrico e suco intestinal.....	72
3.3. Estudos <i>in vivo</i>	73
3.3.1. Ensaios Biológicos.....	73
 4. DISCUSSÃO.....	 85
 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	 102
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 104

1. Introdução

Lipossomas são partículas coloidais formados por uma membrana composta por fosfolípeos que se auto-associam e encapsulam parte do sistema aquoso no qual estão dispersos (LASIC e PAPAHA DJOPOULOS, 1998). Os fosfolípeos contêm duas cadeias hidrocarbônicas que constituem a porção hidrofóbica ou apolar da molécula e a porção hidrofílica ou polar da molécula, formada pelo glicerol, grupo fosfato e a colina. Moléculas hidrofílicas podem ser encapsuladas no compartimento aquoso do lipossoma e moléculas hidrofóbicas podem se inserir na bicamada fosfolipídica (VRIES, MARK e MARRINK, 2004; POLOZOVA *et alii*, 1999; LASIC, 1998). Podem ser classificados: quanto ao tamanho, método de preparação ou número de lamelas (uma lamela é constituída de uma bicamada de fosfolípeos). Lipossomas multilamelares (MLV - multilamellar vesicles), também chamados de oligolamelares (OLV - oligolamellar vesicles), possuem um diâmetro médio que varia geralmente de 400 nm a alguns micrômetros. Lipossomas unilamelares são definidos em dois grupos: grandes (LUV - large unilamellar vesicles) com diâmetros entre 80 nm e 1 µm e pequenos (SUV - small unilamellar vesicles) com diâmetros variando entre 20 e 80 nm. Também existem os lipossomas gigantes unilamelares (GUV - giant unilamellar vesicles) ou oligolamelares (GOV - giant oligolamellar vesicles) com diâmetros superiores a 1 µm, podendo chegar a dezenas de micrômetros (LASIC e PAPAHA DJOPOULOS, 1998). Outra classificação usada para os lipossomas está de acordo com sua composição e aplicação: convencionais, de longa circulação,

direcionados, fusogênicos, polimerizados, elásticos, magnetolipossomas e quitossomas (DELATTRE *et alii*, 1993).

A primeira proposta para uso de lipossomas como veículo de transporte de drogas foi em 1971, por Gregoriadis (GREGORIADIS e RYMAN, 1971). Atualmente existem muitas técnicas de preparo de lipossomas, muitas das quais são escalonáveis para produção em larga escala. Por causa da grande variedade de lipossomas (tamanhos, composição, modos de preparação) e das facilidades de manipulações existem várias propostas de formulações onde diferentes drogas são encapsuladas. Podem ser formulados como suspensão, pó seco, aerossol, creme ou loção e, praticamente, todas as vias de administração podem ser usadas (LASIC e PAPAHAADJOPOULOS, 1998). Muitas das formulações já são licenciadas (Tabela 1) (Drugs@FDA, 10/04/2007; PATEL, PATEL e PATEL 2006; PRESTIDGE, BARNES e ER 2005; FELNEROVA *et alii*, 2004; VERMA e GARG, 2001), outras estão em estudos clínicos (Tabela 2) (PRESTIDGE, BARNES e ER 2005; FELNEROVA *et alii*, 2004) e inúmeras em fase de desenvolvimento.

O sucesso dos lipossomas como veículo de transporte de drogas no tratamento de doenças como câncer, infecções crônicas, vacinas e doenças autoimunes (Drugs@FDA, 10/04/2007; PATEL, PATEL e PATEL 2006; PRESTIDGE, BARNES e ER 2005; FELNEROVA *et alii*, 2004; VERMA e GARG 2001, LASIC e PAPAHAADJOPOULOS, 1998) vêm do fato de que, através da encapsulação, há redução da toxicidade sistêmica em relação à droga e aumento do índice terapêutico (com isto pode-se diminuir o número de doses para se atingir o mesmo objetivo). Além disso, há também aumento de estabilidade da própria droga, uma vez que ela está encapsulada.

Tabela 1. Produtos lipossomais no Mercado.

Nome de fantasia	Princípio ativo	Doença relacionada	Companhia	Ano de aprovação
Doxil TM or Caelyx TM	Doxorubicina	Sarcoma de Kaposi	SEQUUS, USA	1995
DaunoXome TM	Daunorubicina	Sarcoma de Kaposi, Câncer de mama e de pulmão	NeXstar, USA	1996
Myocet/Evacet	Doxorubicina	Metástase de Câncer de mama	Liposome	2000
Ambisome TM	Amphotericina-B	Infecção por fungos, Leishmaniose	The liposome Company	1997
Amphotec TM	Amphotericina-B	Infecção por fungos, Leishmaniose	SEQUUS, USA	1997
Fungizone®	Amphotericina-B	Infecção por fungos, Leishmaniose	Bristol-Squibb, Netherland	1971
Abelcet	Amphotericina-B	Infecção por fungos, Leishmaniose	Enzon	1995
ALEC TM	DPPC-PG liofilizado e livre de proteínas	Surfactante pulmonar para prematuros	Britannia Pharm, UK	1988
Topex-Br	Sulfato de Terbutalina	Asma	Ozone, USA	2006
Depocyt	Cytarabina	Quimioterápico contra Câncer	Skye Pharm, USA	1999
Novasome®	Vacina contra varíola	Varíola	Novavax, USA	1999
Avian retrovirus vaccine	Retrovirus aviário morto	Varíola	Vineland lab, USA	
Epaxal® -Berna Vaccine	Capsídeo do Virus da hepatite-A + hemaglutininas, neuraminidases de influenza+ lipídeos	Hepatite A	Berna Biotechnology	1994
Inflexal® V	Virosomas da influenza (hemaglutininas, neuraminidases, lipídeos)	Influenza	Berna Biotechnology	1999
Doxil®	Doxorubicina-HCl	Câncer refratário de ovário	ALZA, USA	1995
Evacet TM	Doxorubicina	Metástase de Câncer de mama	The liposome company, USA	2000
VincaXome	Vincristine	Tumores sólidos	NeXstar, USA	
Mikasome®	Amikacin	Infecção bacteriana	NeXstar, USA	
Autragen TM	Tretinoin	Sarcoma de Kaposi	Aronex Pharm, USA	1993
Survanta®	Surfactante pulmonar	Surfactante pulmonar para prematuros	Ross Labs	1991
Nyotran TM	Nystatin	Infecção sistêmica causada por fungos	Aronex Pharm, USA	

Os lipossomas também têm uma ação adjuvante em vacinas (RAO e ALVING, 2000), fenômeno descrito pela primeira vez em 1974 por Allison e Gregoriadis (ALLISON e GREGORIADIS, 1974). No campo de vacinologia, a integração de proteínas funcionais do envelope viral nos lipossomas levou a um produto chamado de virosoma, um excelente veículo para co-encapsulação de vacinas de subunidades (proteínas purificadas), com excelente imunogenicidade

e tolerabilidade (FELNEROVA *et alii*, 2004). Entretanto, os lipossomas não resistem à ação dos sais biliares e das enzimas do trato gastrointestinal reduzindo, portanto, o seu uso em veiculação de vacinas orais. Há necessidade do uso de lipídeos polimerizáveis ou outros polímeros que recubram a sua superfície externa.

Neste projeto, pretende-se usar quitosana para fazer um revestimento (interno e externo) de lipossomas de fosfolipídeos naturais.

Tabela 2. Produtos lipossomais em estudos clínicos.

Nome de fantasia	Principia ativo	Doença relacionada	Companhia	Fase do estudo clínico
VincaXome	Vincristina (onco-TCS)	Tumores sólidos	Innex Pharmaceutical	III (2005)
Nyotran TM	Nystatin	Infecção sistêmica causada por fungos	Aronex Pharm, USA	III (2005)
	Doxorubicina	Câncer de mama	NeoPharm/Pharmacia	III (2005)
	Paclitaxel	Câncer de mama	NeoPharm/Pharmacia	II e III (2005)
	Platinum	Câncer de pulmão	Aronex Pharm, USA	II (2005)
	Vacina BLP 25	Câncer de pulmão (NSCLC)	Biomira	IIb (2005)
	Inibidor da topoisomerase	Câncer de pulmão (SCLC)	OSI Pharmaceuticals	II (2005)
	Ácido retinóico all-trans	Linfoma NHL	Antigenics, Inc.	II (2005)
	Daunorubicina	Linfoma NHL	NeXtar	II (2005)
	Inibidor da topoisomerase	Câncer de ovário	Gilead Sciences	II (2005)
	Doxorubicina	Câncer de próstata	NeoPharm/Pharmacia	III (2005)
	14 Endonuclease V (14NS)	Câncer de pele	AGI Dermatics	Application submitted
Allovectin	HLA-B e DNA plasmídeo de microglobulina- β -2	Câncer de cabeça e pescoço	Vical	II (2004)
	DNA-plasmídeo de interleucina 2	Câncer de próstata e rim	Vical	II (2004)
Lerafon	Anti-senso toraf-1	Leucemia	NeoPharm	I (2004)
	Mitoxanthrone	Outros cânceres	NeoPharm	II (2004)
	Myocet combinado com ATB	Câncer de bexiga	Liposome	III (2004)
	Éter lipídico lipossomal	Câncer de bexiga	Liposome	I (2004)
	TLC ELL 12	Câncer de próstata, de cabeça e de pulmão	Élan Pharm	I (2004)
	Aroplatina	Câncer de pulmão e de pâncreas	Aroronex Pharm	I e II (2004)

1.1. A quitosana

Quitosana, α -(1-4)-amino-2-deoxy- β -D-glucan (Chi), é a forma desacetilada da quitina, um polissacarídeo natural, presente nas carapaças de crustáceos. Esta macromolécula é um carregador ou veiculador de drogas ideal por causa das suas características intrínsecas tais como, carga positiva, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade e uma estrutura linear rígida (OTAKE *et alii*, 2006; KO *et alii*, 2003; LEE *et alii*, 2003; HEJAZI e AMIJI, 2002; VAN DER LUBEN *et alii*, 2001) Além disto, tem atividade antimicrobiana, é um produto de baixo custo e é disponível em alta escala (MARTINO, SITTINGER e RISBUD, 2005; HUANG *et alii*, 2005_a; KHOR e LIM, 2003; MADIHALLY e MATTHEW, 1999). Isto seria extremamente útil no desenvolvimento de produtos voltados à Saúde Pública em geral. Combinando-se as características estruturais dos lipossomas e da quitosana, pode-se obter um veículo transportador de drogas de liberação controlada, resistente ao trato gastrointestinal. Muitos investigadores exploraram a alta afinidade da quitosana por membranas usando derivados ou não de quitosana como revestidores de lipossomas (WU *et alii*, 2004; RENGEL *et alii*, 2002; TAKEUCHI, YAMAMOTO E KAWASHIMA, 2001; FILIPOVIC-GRIC, SKALKO-BASNET e JALSENJAK, 2001). Outras propostas de formulações usam partículas pré-formadas de quitosana e as revestem com lipossomas obtidos através de evaporação de fase reversa (REVs) (JAIN, SHARMA e VYAS, 2006). Na maioria das formulações descritas a polimerização interfacial da quitosana/lipossomas se faz através de vesículas pré-formadas, mas todos com a mesma intenção que é a de se estabilizar a emulsão (GUZEY e McCLEMENTS, 2007; HARNSLAWAT, PONGSAWATMANIT e McCLEMENTS, 2006; AOKI, DEKER e

McCLEMENTS, 2005; GU, DEKER e McCLEMENTS, 2005; KLINKESORN *et alii*, 2005_a; 2005_b; OGAWA, DEKER e McCLEMENTS, 2003) além de se funcionalizar as propriedades superficiais dos lipossomas (FENG, RUAN e LI, 2004; CASTRO *et alii*, 2005 e SANDOVAL *et alii*, 2005). Sabe-se, da literatura, que a quitosana tem propriedades mucoadesivas, que favorece um contacto íntimo e extenso entre as partículas e as células intestinais, aumentando assim a absorção, no caso de drogas (WAWREZINIECK *et alii*, 2008) ou no caso de vacinas (MARÓN *et alii*, 2007) o tempo de residência das partículas e, portanto a estimulação de células imuno-competentes (ZARU *et alii*, 2009).

Muitos dos processos usam partículas lipossomais obtidas por métodos em que os lipossomas estão muito diluídos e, portanto, sua proposta de formulação farmacêutica fica prejudicada. Existe um método descrito (MERTINS *et alii*, 2005) em que são produzidos REVs de fosfolipídeos naturais contendo Chi nas superfícies interna e externa. A vantagem deste método é que o soluto e a quitosana podem ser diluídos na fase aquosa e, portanto, o processo de encapsulação se faz em uma só etapa. Recentemente, descrevemos pela primeira vez na literatura (MARÓN *et alii*, 2007), algumas características da encapsulação de Dtxd (toxóide diftérico) em REVs recobertos por Chi (REVs-Chi) usando-se como fosfolipídeos a fosfatidilcolina de soja (SPC). O interesse em se obter este tipo de veículo é o de obter um adjuvante para administração oral de vacinas.

Uma das limitações destas partículas lipossomais revestidas por quitosana, as REVs-Chi, é que se observa agregação das partículas (MARÓN *et alii*, 2007). Uma das soluções possíveis para corrigir esta agregação seria o uso de um

surfactante, como o poli álcool vinílico (PVA), para se estabilizar as partículas de REVs-Chi.

1.2. PVA (poli álcool vinílico)

O poli álcool vinílico (PVA) é um polímero sintético solúvel em água, atóxico, altamente hidrofílico, biodegradável, biocompatível (YOU *et alii*, 2007) e, por isso, amplamente estudado para aplicações biomédicas.

O PVA é muito estudado em enxertos poliméricos, por causa de suas propriedades mecânicas (LIU *et alii*, 2009) e, em veiculação de drogas (KURKURI e AMINABHATI, 2004). Houve muitos esforços na literatura de polímeros para se modificar a estrutura básica de Chi misturando-a com outros polímeros, como o PVA, (JAVALKAR, *et alii*, 2007; SMITHA, SRIDAR e KHAN, 2004; SMITHA, SRIDAR e KHAN, 2005) para melhorar as suas propriedades. Além da mistura, no sentido exato, de Chi e PVA, os polímeros poderiam ser usados separadamente ou ainda através dos produtos como enxertos do co-polímero como também reticulados ou entrelaçados formados quimicamente. Existem resultados onde o PVA e a Chi se misturam perfeitamente (KIM, PARK e KIM, 2003; SRINIVASA, *et alii*, 2003), mas são contestados por outros que sugerem que não se forma uma mistura porque Chi e PVA não são compatíveis molecularmente (CHUANG *et alii*, 1999; YANG *et alii*, 2004). Entretanto existem muitos outros trabalhos na literatura que concluem que a mistura é compatível, dependendo mais do método de preparo e da composição da mistura (COSTA-JÚNIOR, PEREIRA e MANSUR, 2009).

Neste trabalho, o PVA será adicionado às REVs-Chi e, portanto, a discussão se mistura ou não com Chi não é necessária neste momento. O que nos interessa é que ele interaja e revista os REVs-Chi, impedindo as interações inter-partículas seguidas por agregações.

O objetivo desta dissertação foi a produção e caracterização de partículas de REVs-Chi e REVs-Chi-PVA (REVs-Chi revestidas com poliálcool vinílico), com uma nova composição de REVs para uso em veículo de administração oral de vacinas. As partículas foram caracterizadas através de métodos físico-químicos e imunológicos. A proteína encapsulada foi o toxóide diftérico (Dtxd) que também foi caracterizado estruturalmente. Foram realizados ensaios biológicos para se acompanhar a produção de anticorpos (IgA, IgG₁, IgG_{2a}) em camundongos imunizados com REVs-Chi e REVs-Chi-PVA.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

O Dtxd (toxóide diftérico) e anti-soro diftérico padrão desenvolvido em cavalo, foram gentilmente doados pela Divisão de Produção e Controle de Qualidade do Instituto Butantan. Fosfatidilcolina de soja (SPC), desoxicolato de sódio (DOC) foram obtidos da Avanti Polar Lipids. Sephadex G25 e Tween 80 foram obtidos da GE Healthcare. Colesterol (Cho), quitosana (Chi, 70 kDa), álcool polivinílico (PVA, Mw 127 kDa), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e mucinas (tipo I-S e tipo III) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co (USA). Tetrametilbenzidina (TMB) foi comprada da Polysciences. Acetato de etila, ácido periódico, fucsina básica, metabisulfito de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da Merck. Conjugados anti-IgA, anti-IgG₁, anti-IgG_{2a} ligados a peroxidase foram obtidos da BD Pharmingen. Ósmio, uranila e óxido de propileno foram adquiridos da EM Sciences (EUA). Membranas YM30 e DIAFLO, filtros de polycarbonato de poro 0,45 µm foram adquiridos da Millipore, coluna de filtração em gel [QC-PAK GFC 300 (7,8 mm x 15 cm, Vt = 7,17 mL)] da Shimadzu. Todos os outros sais e solventes utilizados foram de grau analítico. **Animais:** camundongos geneticamente selecionados de alta produção de anticorpos, Linhagem H_{III} foram doados pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Camundongos BalB-C foram mantidos pelo biotério central do IBu. **Os seguintes equipamentos foram utilizados:** Ultraconcentrador AMICON (modelos 8050 e 8010),

Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech, Leitor de ELISA Titerteck Multiskan MCC/ 340, Sistema CLAE Shimadzu, modelo LC- 10VP equipado com detector de UV, modelo SCL- 10AVP, espectrofluorímetro HITACHI F 2000, espectropolarímetro de dicroísmo circular Jasco- 810 (CD). Aparelho de espalhamento de luz (Zeta Pals- Brookhaven), microscópio de inversão de fases Nikon-TMS com câmera acoplada Nikon Fx35WA, sonicador de sonda Branson, modelo 450, evaporador rotatório Tecnal, TE- 210, microscópio de transmissão eletrônica (TEM) LEO modelo 906E e microscópio Confocal LSM 510 META, microscópio eletrônico JEOL 100 CX, processador de criofraturas JEOL JED- 9000.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparativos

2.2.1.1. Ultraconcentração de toxóide diftérico (Dtxd): O toxóide diftérico foi submetido à ultraconcentração no aparelho AMICON (modelos 8050 e 8010). Foi usado o método de Lowry para dosar a concentração de proteína.

2.2.1.2. Marcação Dtxd com isotiocianato de fluoresceína: Resumidamente, uma solução de FITC em DMSO a 1 mg/mL (5 mL), recentemente preparada, foi adicionada lentamente e sob agitação a uma solução de Dtxd (10 mL) a 5 mg/mL em carbonato de sódio 100 mM, pH 9,0. Para cada mg de proteína foram adicionados 50 µL da solução do marcador. A reação foi deixada ao abrigo da luz por 8 horas a 4 °C. Foram adicionados 312,5 µL de

NH₄Cl (concentração final de 50 mM). A reação foi incubada por 2 horas a 4 °C. O corante não ligado foi separado por cromatografia em minicolunas de Sephadex G25 (FRY, WHITE e GOLDMAN, 1978). Controle do processo: relação entre Abs_{495 nm} (FITC) (PERFETTO, CHATTOPADHYAY e ROEDERER, 2004; DALY e McGRATH, 2003; McGRATH e DALY, 2003; McGRATH, ARRIBAS e DALY, 1996) e Abs_{280 nm} (PETERSON, 1977).

2.2.1.3. Preparo de lipossomas por Evaporação em Fase Reversa (REV)

2.2.1.3.1. Preparo de lipossomas unilamelares grandes (LUVs) vazios através do método de Evaporação em Fase Reversa (REV): adicionaram-se lentamente e sob agitação constante, 200 µL de em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 a 10 mL de uma solução de SPC: Cho (relação de 3: 1) em acetato de etila. A suspensão foi sonicada a uma potência virtual de 40 W, por 4 minutos. O organogel foi formado usando-se um evaporador rotatório, sob vácuo de 15 hg/cm² e à temperatura de 35 °C. As vesículas foram lavadas 3 vezes com água desionizada através de centrifugação a 2 000 g O precipitado foi ressuspensionado em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 (REVs) (MARÓN *et alii*, 2007 e MERTINS *et alii*, 2005).

2.2.1.3.2. Encapsulação de Dtxd em lipossomas unilamelares grandes (LUVs) através do método de Evaporação em Fase Reversa (REV): adicionaram-se lentamente e sob agitação constante, 200 µL de em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 e Dtxd (12 mg) a 10 mL de uma solução de SPC: Cho (relação molar de 3: 1) em acetato de etila. A suspensão foi sonicada a uma

potência virtual de 40 W, por 4 minutos. O organogel foi formado usando-se um evaporador rotatório, sob vácuo de 15 hg/cm² e à temperatura de 35 °C. As vesículas foram lavadas 3 vezes com água desionizada através de centrifugação a 2 000 g. O conteúdo de Dtxd não encapsulado foi medido por Lowry ou CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 (REVs/Dtxd) (MARÓN *et alii*, 2007).

2.2.1.3.3. Preparo de lipossomas unilamelares grandes (LUVs) vazios revestidos com quitosana (Chi) através do método de Evaporação em Fase Reversa (REV): adicionaram-se lentamente e sob agitação constante, 200 µl de quitosana a 0,5 % em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 a 10 mL de uma solução de SPC: Cho (relação molar de 3: 1) em acetato de etila. A suspensão foi sonicada a uma potência virtual de 40 W, por 4 minutos. O organogel foi formado usando-se um evaporador rotatório, sob vácuo de 15 hg/cm² e à temperatura de 35 °C. A formulação final foi a seguinte 221: 73: 1 (relação molar de SPC: Cho: Chi, respectivamente). Os REVs-Chi foram lavados 3 vezes com água desionizada através de centrifugação a 2 000 g. O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 (REVs-Chi) ou em PVA 1 % (REVs-Chi-PVA) em H₂O desionizada, pH 4,5 (MARÓN *et alii*, 2007, MERTINS *et alii*, 2005).

2.2.1.3.4. Encapsulação de Dtxd em lipossomas unilamelares grandes (LUVs) revestidos com quitosana (Chi) através do método de Evaporação em Fase Reversa (REV): adicionaram-se lentamente e sob agitação constante, 200 µl de quitosana a 0,5 % em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 e 12 mg de Dtxd a 10 mL de uma solução de SPC: Cho (relação molar de 3: 1) em acetato de etila. A

suspensão foi sonicada a uma potência virtual de 40 W, por 4 minutos. O organogel foi formado usando-se um evaporador rotatório, sob vácuo de 15 hg/cm² e à temperatura de 35 °C. A formulação final foi a seguinte 221: 73: 1 (relação molar de SPC: Cho: Chi, respectivamente). Os REVs-Chi foram lavados 3 vezes com água desionizada através de centrifugação a 2 000 g. O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 (REVs-Chi/Dtxd) ou em PVA 1 % (REVs-Chi-PVA/Dtxd) em H₂O desionizada. A quantidade de Dtxd não encapsulada foi medida nos sobrenadantes através do método de Lowry modificado ou por CLAE (MARÓN *et alii*, 2007).

2.2.2. Analíticos

2.2.2.1. Dosagem de proteínas

a. Método de Lowry modificado: as amostras foram analisadas por adaptação do método de Lowry modificado (PETERSON, 1977).

b. CLAE: as amostras foram analisadas também por filtração em gel [coluna QC-PAK GFC 300 (7,8 mm x 15 cm, V_t = 7,17 mL)] em sistema de CLAE da Shimadzu (modelo LC- 10VP equipado com detector de UV, modelo SCL- 10AVP), conforme método desenvolvido neste laboratório (CAMPANA *et alii*, 2004).

2.2.2.2. Dosagem de proteína - ELISA: Foi adaptado de acordo com o adaptado e modificado em nosso laboratório (NAMUR *et alii*, 2004). O Dtxd: amostras do toxóide diftérico foram adicionadas às placas de ELISA e depois de 2

horas foram bloqueados com solução de leite desnatado a 10 %. Depois de 30 minutos, foi adicionado um anticorpo IgG específico (desenvolvido nos camundongos) aos “pocinhos”. Trinta minutos após foi adicionado o conjugado anti-camundongo-peroxidase e depois de mais 30 minutos, o substrato. Depois de 15 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com H_2SO_4 1M. A absorbância foi lida automaticamente a 450 nm num leitor de ELISA Titerteck Multiskan MCC/340.

2.2.2.3. Dosagem de mucina: As amostras contendo mucina livre foram submetidas ao mesmo tratamento usado para se efetuar a curva padrão. Curva padrão: Foram adicionados 2 mL de solução estoque de mucina (0,125; 0,250; 0,375; 0,5 mg/mL) a 200 μL de ácido periódico seguido por incubação a 37 °C, por 2 horas. Foram então adicionados 200 μL de reagente de Schiff. Depois de 30 minutos à temperatura ambiente as amostras foram lidas a 555 nm (HE, DAVIS e ILLUM, 1998).

2.2.2.4. Dosagem de quitosana: As amostras contendo quitosana livre foram submetidas ao mesmo tratamento usado para se efetuar a curva padrão. Tomaram-se amostras de volumes conhecidos (15, 30, 45, 60, 80, 100, 150, 200 e 250 μL) de quitosana e completaram-se os volumes para 300 μL de solução. Foram adicionadas então, alíquotas de 3 mL do marcador Cibacrom brilhante vermelho 3B-A (0,075 g/L em glicina-HCl 0,1 M, pH 3,2). Controles: adicionaram-se 300 μL de tampão a 3 mL do corante. As amostras foram lidas a 575 nm (MUZZARELLI, 1998).

2.2.2.5. Espectroscopia de fluorescência: As fluorescências intrínsecas do Dtxd foram medidas em espectrofluorímetro HITACHI F 2000. A excitação da amostra foi a 280 nm e a emissão foi medida de 300 a 400 nm.

2.2.2.6. Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD): Os espectros de CD foram realizados em um espectropolarímetro JASCO J-810 sob fluxo de nitrogênio, em uma cubeta de 1 cm de caminho óptico a 25 °C. A percentagem de estrutura em hélice- α foi calculada de acordo com o descrito na literatura (GREENFIELD e FASMAN, 1969).

2.2.3. Caracterizações da Estabilidade de Dtxd durante as etapas de preparação de REV-Chi.

2.2.3.1. Efeito dos sais da série de Hoffmeister na solubilidade de Dtxd durante a formação de micelas reversas: o Dtxd foi diluído a uma concentração final de 5 mM em KSCN, NaH_2PO_4 , NaCl ou MgCl_2 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 acetato de etila, em seguida foram sonicadas por 4 minutos a uma potência virtual de 40 W. Após a sonicação as amostras foram centrifugadas a 2 000 g por 10 minutos e as fases aquosas foram retiradas e analisadas por absorbância a 269 nm em sistema de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), espectroscopia de fluorescência, CD e por ELISA.

2.2.4. Caracterizações dos REVS-Chi (LUVs revestidas por quitosana) *in vitro*.

2.2.4.1. Avaliação da eficiência de encapsulação de Dtxd: Foi medida indiretamente através de dosagem de proteína nas águas de lavagens da formulação (vide o método de preparo de REVs-Chi).

2.2.4.2. Eficiência de polimerização interfacial de quitosana sobre REVs: As formulações preparadas (REVs, REVs-Chi, REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd) foram lavadas em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5. Tomaram-se os sobrenadantes que foram, então, dosados quanto ao teor de Chi livre. A dosagem de Chi foi adaptada de método descrito (MUZZARELLI, 1998). Chi adicionada no processo de produção de REVs-Chi menos Chi medida livre é igual à Chi adsorvida.

2.2.4.3. Estudos de estabilidade das REVS-Chi em simulados de suco gástrico e suco intestinal: as amostras de REVs-Chi contendo ou não o toxóide diftérico (**Dtxd**) foram incubadas com simulados de suco gástrico (0,2 % de NaCl e 0,7 % de HCl, pH em 1,2) ou suco intestinal (0,68 % de KHPO_4 e 19 % de NaOH 0,2 M, pH em 7,5) sob agitação constante a 37 °C. A intervalos regulares foram retiradas alíquotas para análises de proteína no sobrenadante (JAIN, SHARMA e VYAS, 2006).

2.2.4.4. Tamanho dos REV-Chi: Foram medidos usando um aparelho de espalhamento quase-elástico de luz (QELS) modelo Brookhaven Zeta Pals (JAIN, SHARMA e VYAS, 2006 e FANG *et alii*, 2001).

2.2.4.5. Potencial zeta: Para a determinação do tamanho das partículas de lipossomas, REV, REV-Chi e REV-Chi-PVA foram diluídos em 3 mL de água. Após filtração em membrana de 0,45 µm, cada amostra foi lida 5 vezes (JAIN, SHARMA e VYAS, 2006 e HUANG *et alii*, 2005_b) em aparelho Brookhaven - Zeta Pals.

2.2.4.6. Caracterização microscópica de REV.

2.2.4.6.1. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM): para avaliação da morfologia das REV, REV-Chi e REV-Chi-PVA utilizou-se a Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). A amostra foi centrifugada e depois fixada com solução de glutaraldeído 2 %, acetato de ósmio 2 % e acetato de uranila 1 %. Em seguida, desidratou-se com álcool, adicionou-se óxido de propileno, colocou-se em forma para inclusão e fizeram-se cortes de 400 nm (semi-fino) para prova e de 70 nm (fino) para colocar em tela. Corou-se com acetato de chumbo e acetato de uranila. Fotografou-se o material (aumentos de 12.000 vezes, 27.000 vezes e 60.000 vezes) em microscópio de transmissão eletrônica (TEM) LEO modelo 906E.

2.2.4.6.2. Microscopia eletrônica de crio-fratura (freeze-fracture): Para microscopia eletrônica de crio-fratura as amostras foram crio-fixadas em

propano congelado por nitrogênio líquido. O processo de fratura foi feito no equipamento JEOL JED-9000 e depois, as amostras foram recobertas com prata e carbono e limpas com ácido nítrico e uma mistura clorofórmio/metanol (1: 1) e analisadas no microscópio eletrônico JEOL 100 CX.

2.2.4.7. Interações mucina/quitosana e mucina/PVA: soluções estoques (2 mg/mL) de quitosana, PVA (como controle de adsorção) e mucina (tipo III) foram preparadas em tampão fosfato 10 mM, pH 4,5. Foram preparadas amostras em razões diferentes de mucina: Chi (1: 3; 1: 1; 3: 1 e 9: 1) ou mucina: PVA (1: 3; 1: 1; 3: 1 e 9: 1). A seguir, foram incubadas sob agitação por 30 minutos e foram medidas as absorbâncias a 500 nm. Controles: mediram-se as absorbâncias da mucina e dos polímeros individualmente (HE, DAVIS e ILLUM, 1998).

2.2.4.8. Adsorção de REV-Chi ou REVS-Chi-PVA à Mu- III: volumes iguais de REV-Chi ou REV-Chi-PVA foram adicionados, sob forte agitação, a volumes iguais de uma solução de mucina (Mu- III) a 0,5 mg/mL. A seguir, as amostras foram incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada 2 000 g, por 20 minutos. Os sobrenadantes foram usados para se determinar o conteúdo de mucina livre (RENGEL *et alii*, 2002).

2.2.4.9. Efeito do conteúdo em ácido siálico de Mu-III (1 %) e Mu-IS (12%), da temperatura e da concentração das mucinas na interação com REV-Chi ou REV-Chi-PVA: foram preparadas soluções aquosas de mucina (Mu-III e Mu-IS) com diferentes concentrações (0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL). Adicionaram-se 5 mL de REV-Chi e REV-Chi-PVA a 5 mL das soluções de Mu-III

ou Mu-IS. Incubaram-se as amostras, sob agitação, a 25 °C ou 37 °C por 2 horas. Após a incubação, as dispersões foram centrifugadas a 2 000 g por 2 minutos. Quantificou-se mucina livre nos sobrenadantes (HE, DAVIS e ILLUM, 1998).

2.2.5. Estudos *in vivo*.

2.2.5.1. Imunização: foram imunizados 9 grupos (5 animais em cada) de camundongos do tipo Balb-C de 2-3 meses de idade (18- 20 g). Eles receberam 5 µg de toxóide diftérico por via oral ou subcutânea. As amostras de sangue foram colhidas no sistema plexo retro-orbital dos animais em intervalos pré-determinados (10°, 28°, 38° e 56° dias depois da primeira imunização) e medidas as produções IgG₁ e IgG_{2a} mediante ensaios de ELISA. No 30° dia administraram-se uma dose de reforço de 5 µg de Dtxd livre ou veiculada nas diferentes formulações. Semanalmente foram colhidas amostras de lavado vaginal dos animais para a dosagem de IgA, também dosadas por ELISA. No final do experimento, 57° dia, administrou-se pilocarpina aos animais (1 mg/ kg) e em seguida colheu-se a saliva para dosagem de IgA. O título de anticorpo é considerado a recíproca do fator de diluição a 20 % do ponto de saturação (BUENO DA COSTA *et alii*, 1998).

2.2.5.2. 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 leite em pó desnatado 10 %. Depois de 30 minutos a 37 °C, a placa foi

lavada 3 vezes com PBSt (PBS Tween 20) e foram adicionados 100 µL dos soros ou saliva ou ainda lavado vaginal dos camundongos imunizados, previamente diluídos em PBSt. Após 30 minutos de incubação a 37 °C, a placa foi lavada 3 vezes com PBSt e foram adicionados 100 µL de cada conjugado anti-mouse-peroxidase diluído em PBSt/leite em pó a 0,1 %. Depois de 30 minutos de incubação a 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 Titerteck Multiskan MCC/340.

3. Resultados

A PROTEÍNA

3.1. Caracterizações da Estabilidade de Dtxd durante as etapas de preparação de REV-Chi

3.1.1. Efeito da sonicação na conformação de Dtxd

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 alii*, 1996 e ALONSO *et alii*, 1994).

Para se evitar ou minimizar as degradações de proteínas durante ou após o processo de microencapsulação em lipossomas revestidos de quitosana por REV há estratégias de melhoramentos na formulação que poderiam ser usadas: 1. variar os componentes da formulação de forma a se obter a estabilidade desejada ou 2. variar o processo de microencapsulação.

Nesta dissertação, optou-se por variar os componentes da formulação através da adição de agentes estabilizadores de proteínas a serem encapsuladas em lipossomas revestidos de quitosana. Usou-se o método de preparação por evaporação em fase reversa (MERTINS *et alii*, 2005 e MARÓN *et alii*, 2007) para a obtenção das partículas.

Para que se compreenda a série de experimentos que se seguiram, resumimos o processo de nanoencapsulação de proteína em lipossomas

revestidos por quitosana através do método de REV que pode ser descrito como um sistema $(A_1/O)/A_2$. Para efeito de simplificação o processo de formação de lipossomos, REVs, está representado na **Figura 1**. A formação de REVs revestidos por quitosana (REVs-Chi) está representada na **Figura 2**.

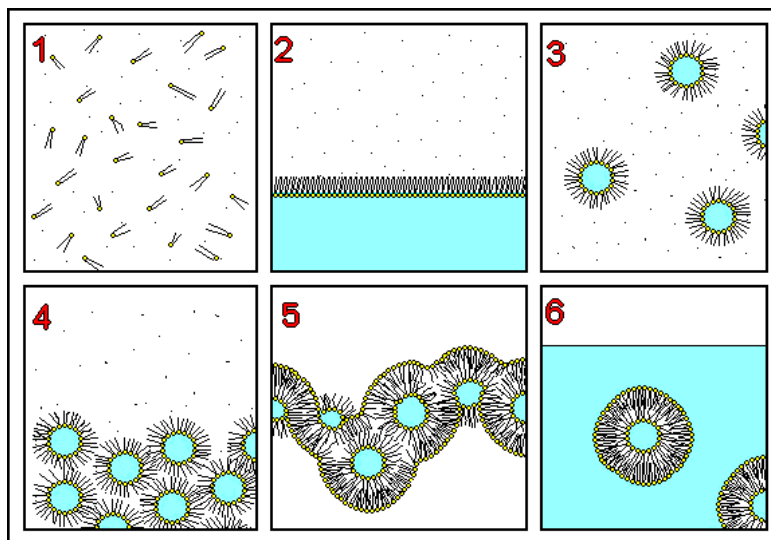


Figura 1. Formação de REVs. **Etapa 1.** Lipídeos (SPC: Cho) + $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \rightarrow$ Dissolução (O); **Etapa 2.** Adição de Dtxd em PBS $\rightarrow A_1 + O$; **Etapa 3.** Sonicação de $A_1 + O \rightarrow$ formação das micelas reversas (A_1/O); **Etapa 4.** Evaporação do solvente orgânico com aproximação das micelas reversas. **Etapa 5.** Formação de um organogel (A_1/O) (as micelas se colam, formam vesículas). **Etapa 6.** Adição PBS (A_2) $\rightarrow$ REVs (A_1/O) / A_2 .

As desnaturações e agregações de Dtxd podem ocorrer nas etapas **2**, **3** e **4**, por causa do contacto com o solvente orgânico e da sonicação, que submete a proteína a pressões altas, gradiente de temperaturas, forças de cisalhamento, possibilidades de oxidação e à ação de radicais livres. O cisalhamento da fase aquosa aumenta as interfaces hidrofóbicas (desvantagem do método) o que leva à adsorção de proteína, seguida por desenovelamento e agregação. Em outras palavras, pode haver perda de proteína através da diminuição de sua solubilidade.

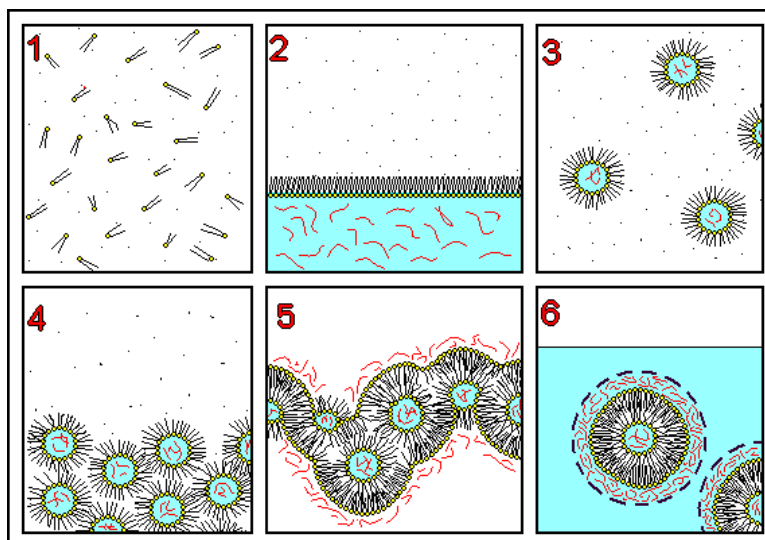


Figura 2. Formação de REV-Chi. **Etapa 1.** Lipídeos (SPC: Cho) + $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \rightarrow$ Dissolução (O); **Etapa 2.** Adição de Dtxd + Chi em PBS $\rightarrow A_1 + O$; **Etapa 3.** Sonicação de $A_1 + O \rightarrow$ formação das micelas reversas (A_1/O). **Etapa 4.** Evaporação do solvente orgânico com aproximação das micelas reversas. **Etapa 5.** Formação de um organogel (A_1/O) (as micelas se colabam, formou vesículas contendo Chi externa e internamente e **Etapa 6.** Adição PVA 1 % em água (A_2) $\rightarrow$ REVs (A_1/O) / A_2 .

O objetivo desta etapa experimental foi o de se determinar até onde a sonicação (contato com a interface $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) causaria agregação na molécula do Dtxd. Pretendeu-se usar os sais da série de Hoffmeister no sentido de se minimizar ou mesmo evitar o desenovelamento e esta agregação. Era importante que se determinasse a natureza desta interação, para que se racionalizasse uma formulação estável de Dtxd em REV-Chi. Sabe-se que os sais da série de Hoffmeister, como o KSCN, protegem o Dtxd de modificações conformacionais como o desenovelamento ou a abertura da ligação S-S após sonicação na presença de CH_2Cl_2 . Aumenta-se a solubilidade de Dtxd em 95 %, com o uso de KSCN o que corresponde também a uma proteína com estrutura mais próxima da nativa e reconhecida imunologicamente (NAMUR *et alii*, 2009; NAMUR *et alii*, 2004). Entretanto, nesta dissertação, o solvente usado foi outro (acetato de etila) o que poderia

interferir na constante dielétrica e conseqüentemente na partição de Dtxd entre as fases (NAMUR *et alii*, 2009; NAMUR *et alii*, 2004).

A solubilidade de Dtxd após a emulsificação na presença de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ e na ausência de qualquer um dos sais foi de 91 % (**Figura 3**). Os sais NaCl, KSCN e MgCl_2 diminuíram ainda mais a solubilidade da Dtxd durante após a sonicação. À medida que houve o aumento das concentrações destes sais, menores foram às solubilidades de Dtxd. O MgCl_2 foi o sal que menos protegeu o Dtxd da precipitação. Analisou-se mais detalhadamente, observou-se que as solubilidades de Dtxd nas presenças de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ e de alguns dos sais usados foram bem prejudicadas chegando a valores tão baixos quanto de 70,3 % (NaCl 70 mM), 72,6 % (KSCN a 150 mM) e 61,1 % em MgCl_2 (30 mM) (**Figura 3**), ou seja, entre 30 a 40 % de perda de massa.

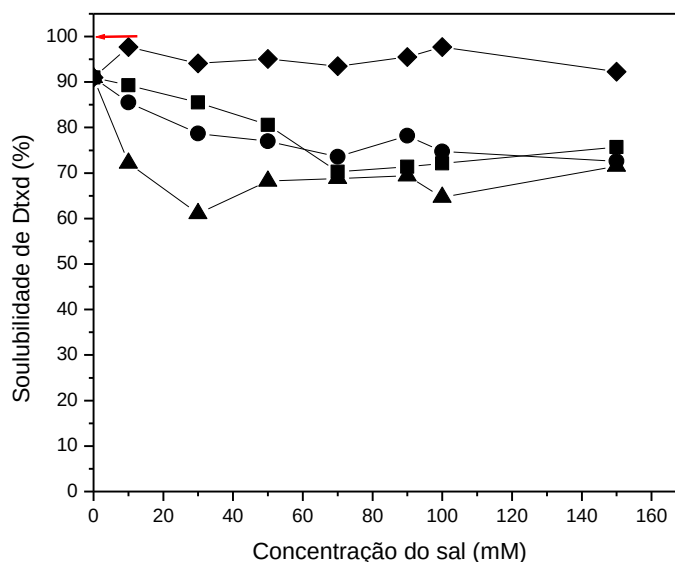


Figura 3: Efeito dos sais da série de Hoffmeister na solubilidade de Dtxd após sonicação na presença de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. O conteúdo protéico dos sobrenadantes foi analisado por dosagem de proteína a 280 nm nas presenças de (-■-) NaCl, (-●-) KSCN, (-▲-) MgCl_2 e (-◆-) NaH_2PO_4 após sonicação em acetato de etila ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$). Controle Dtxd em H_2O antes da sonicação.

Já na presença de NaH_2PO_4 , a solubilidade aumentou em todas as concentrações usadas, sendo que em 10 e 100 mM foram as melhores condições (98 %) de solubilização da Dtxd após a sonicação (Figura 3).

As amostras da fase aquosa foram diluídas a uma mesma concentração de 2 μM em PBS pH 7,2 e submetidas à filtração em gel através de sistema de CLAE (CAMPANA *et alii*, 2004). As concentrações de dímero de Dtxd foram maiores nas amostras que estavam na presença de NaH_2PO_4 em relação aos outros sais (Figura 4 e Tabela 3). Houve uma grande diminuição de monômeros após a sonicação na presença de KSCN (Figura 4 e Tabela 3) o que coincidiu com um aumento de FA (Fragmento A) e FB (Fragmento B) na presença deste sal (Figura 4). A quantidade de monômeros nas amostras sonicadas na presença de NaCl é menor do que em relação às amostras sonicadas na presença de NaH_2PO_4 e coincide com uma quantidade um pouco maior de FA e FB (Figura 4).

Tabela 3. Efeito dos sais da série de Hoffmeister nas concentrações das diferentes espécies moleculares de Dtxd após a sonicação.

Sal	Dtxd (dímero) (proporção relativa)	Dtxd (monômero) (proporção relativa)	FB + FA (proporção relativa)
NaCl	↓	↓	↑
KSCN	↓	↓↓↓↓	↑↑↑↑
MgCl_2	↓	↓	↑
NaH_2PO_4	↓	=	↑

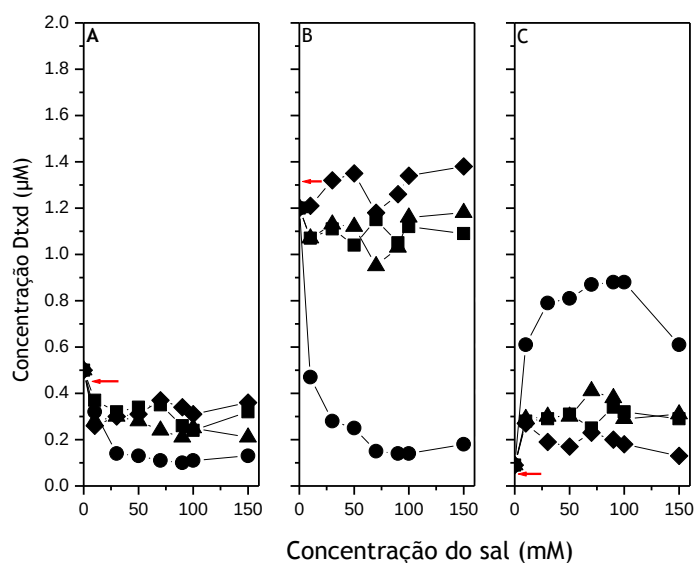


Figura 4. Efeito dos sais da série de Hoffmeister nas concentrações das diferentes espécies moleculares de Dtxd após a sonicação. O conteúdo das diversas espécies moleculares de Dtxd da fase aquosa foram [após sonicação em Acetato de etila ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) nas presenças de (-■-) NaCl, (-●-) KSCN, (-▲-) MgCl_2 e (-◆-) NaH_2PO_4] injetados em coluna de filtração em gel 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, C. Concentração de fragmentos A e B. Controle: Dtxd em H_2O sem sonicação (→).

Não houve a formação de agregados solúveis nas presenças de todos os sais estudados (Figura 4). As amostras que se apresentaram com maiores quantidades de monômeros e menores quantidades de FA e FB foram as que estavam na presença de NaH_2PO_4 (Figura 4).

Estas mesmas amostras foram analisadas por ELISA para se verificar o reconhecimento imunológico do Dtxd através do soro antidiftérico padrão (desenvolvido em cavalo pelo IBu). Através dessa análise a menor identidade imunológica foi sobre a estrutura da Dtxd também na presença de KSCN (Figura 5). *O NaCl foi o sal que preservou melhor a identidade imunológica da Dtxd e o NaH_2PO_4 foi o segundo melhor sal tendo a*

concentração de 90 mM o seu melhor desempenho de preservação da conformação imunológica (Figura 5).

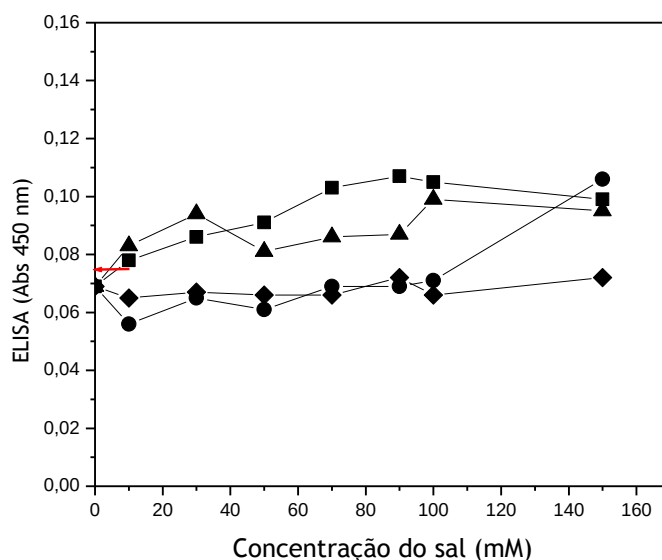


Figura 5: Efeito dos sais da série de Hoffmeister sobre a identidade imunológica de Dtxd. As amostras de Dtxd em (■) NaCl, (●) KSCN, (▲) MgCl₂ e (◆) NaH₂PO₄ foram analisadas por ELISA após sonicação em acetato de etila (CH₃CO₂C₂H₅). Controle Dtxd em H₂O sem sonicação (→).

3.1.2. Espectroscopia de fluorescência

Foram realizados espectros de fluorescência das fases aquosas de Dtxd 7,36 µM após a sonicação na presença de CH₃CO₂C₂H₅ (na presença ou na ausência dos sais) e calculou-se a razão entre as intensidades de fluorescência a 350 nm e 330 nm (**Figura 6**). Sabe-se que, através desta razão entre as intensidades de fluorescência podem-se verificar as exposições de resíduos hidrofóbicos para um meio mais polar (SOUTO E ITO, 2000).

Não houve exposição de triptofano ao meio mais polar quando o Dtxd foi sonicado na presença de acetato de etila e dos sais da série de Hoffmeister estudados, pois não houve variação da razão F_{350}/F_{330} nm (Figura 6).

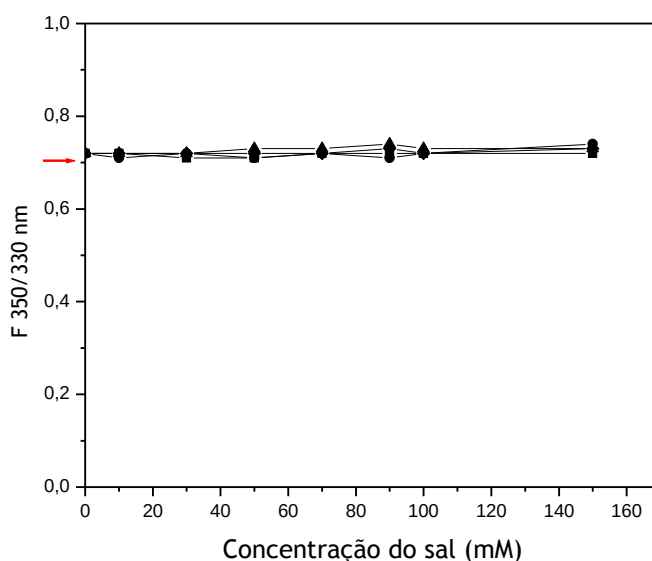


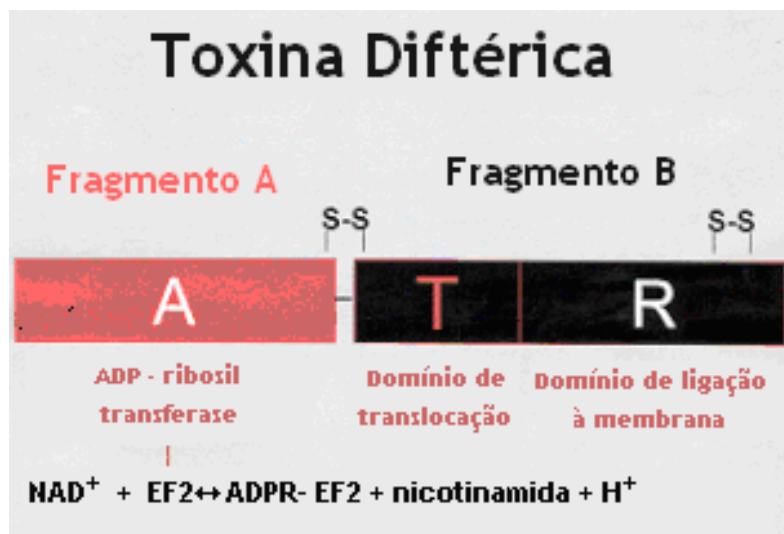
Figura 6. Relação entre as intensidades de fluorescência a 350 e 330 nm das amostras da fase aquosa de Dtxd após sonicação na presença de acetato de etila e de sais. As fases aquosas das amostras (■-) NaCl, (●-) KSCN, (▲-) MgCl₂ e (◆-) NaH₂PO₄ após sonicação em acetato de etila (CH₃CO₂C₂H₅) foram analisadas por espectroscopia de fluorescência. A seta indica o controle em **H₂O sem sonicação (→)**.

Até aqui, concluiu-se que o Dtxd sonicado na presença de NaH₂PO₄ manteve a maior quantidade de fração solúvel, com conformação imunológica preservada e com menor quantidade de fragmentos A e B. Este Dtxd correspondeu a uma conformação sem exposição de resíduos hidrofóbicos para o meio aquoso, que se traduziu em manutenção da estrutura terciária da proteína.

3.1.3. Espectroscopia de Dicroísmo circular

As possíveis variações conformacionais, relacionadas à estrutura secundária da Dtxd, obtidos após a sonicação na presença de acetato de etila e dos sais da série de Hoffmeister também foram observadas por CD. Todos os espectros foram comparados com o controle, que foi realizado com Dtxd 7,36 μM em água, sem passar pelo processo de sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$.

Sabe-se que um efeito Cotton positivo na região de 195-197 nm está relacionado à estrutura de folha pregueada β (TILSTRA e MATTICE, 1996) e também que um efeito Cotton negativo nesta mesma região está associado à estrutura desordenada ou randômica (TILSTRA e MATTICE, 1996). Na região 217-218 nm o Efeito Cotton é negativo para a estrutura de folha pregueada β (TILSTRA e MATTICE, 1996). Os cromóforos associados a esta região espectral são as ligações peptídicas (TILSTRA e MATTICE, 1996). A conformação do ângulo diédrico da ligação S-S (que liga o fragmento B ao A) do Dtxd também é passível de sofrer alteração durante o processo de formação da primeira emulsão. É importante lembrar aqui que o Dtxd tem duas pontes S-S (C_{186} - C_{201} e C_{461} - C_{471}). Uma destas ligações S-S é inter-cadeias (FA-FB, C_{186} - C_{201}) e a outra é intra-cadeia (FB C_{461} - C_{471}) (**Esquema 1**) (NAMUR *et alii*, 2009; NAMUR *et alii*, 2004). Dentre estas duas ligações, a mais provável de sofrer mudanças conformacionais é aquela entre C_{186} - C_{201} do que a C_{461} - C_{471} , isto por impedimentos estéricos. (NAMUR *et alii*, 2009; NAMUR *et alii*, 2004). 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 (TILSTRA e MATTICE, 1996).



Esquema 1. Representação esquemática da estrutura da toxina diftérica (adaptado da literatura (NAMUR e BUENO DA COSTA, 2004).

As variações observadas nos espectros de CD sobre a influência de cada um dos sais sobre a conformação de Dtxd (**Figuras 7 a 10**) foram, resumidamente, agrupadas em 4 figuras principais (**Figuras 11 a 14**). *A sonicação, por si só, causou uma diminuição de 14 % em $\theta_{196\text{ nm}}$ (Figura 11) e 15,4 % em $\theta_{222\text{ nm}}$ (Figura 12) na estrutura de Dtxd (controle).*

Observou-se que nas amostras contendo NaCl houve alterações nos valores de $[\theta_{196\text{ nm}}]$, que corresponderam a uma diminuição entre 10 % (NaCl 10 mM) e 33 % (NaCl 150 mM) de folhas pregueadas β (**Figura 7 e 11**). Os valores de $[\theta_{222\text{ nm}}]$ também se alteraram pouco dentre as concentrações de NaCl estudadas; a quantidade de hélice- α ficou em torno de 76,5 % (**Figura 12 e 13**). Os valores de $[\theta_{260\text{ nm}}]$ foram positivos, praticamente em todas as concentrações de NaCl estudadas. O efeito Cotton negativo, mas muito próximo de zero, foi observado na amostra de NaCl 50 mM (**Figura 14**). Isto implicou em variações $\leq 60^\circ$ e corresponde a uma molécula que não se expôs

ao solvente, o que corrobora os dados observados por fluorescência (Figura 6).

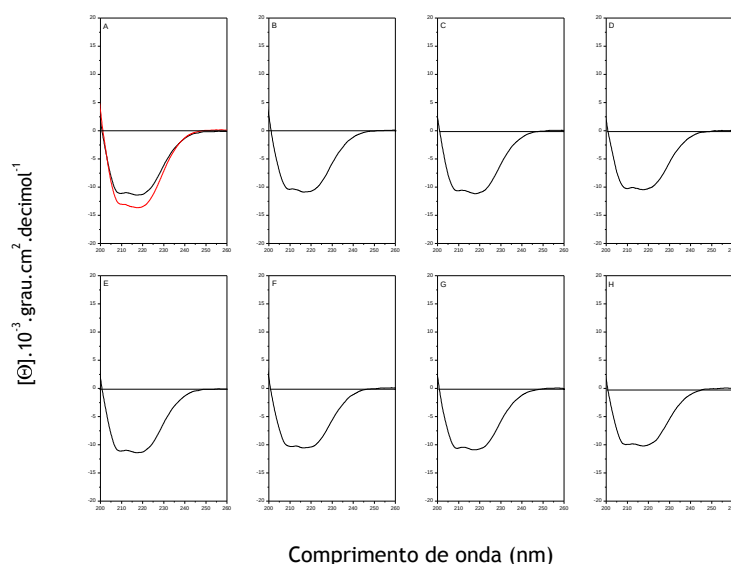


Figura 7. Efeito de NaCl sobre a estrutura secundária do Dtxd durante a sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. Utilizou-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Controle: A. Dtxd 7,36 μM padrão em água, pH 7,2 sem sonicar (-) e Dtxd 7,36 μM sonicado em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ 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.

Não foi possível a análise das amostras da fase solúvel de Dtxd sonicadas na presença de acetato de etila e de KSCN na região de $\theta_{196 \text{ nm}}$ por causa do espalhamento de luz intenso. O valor de $\theta_{196 \text{ nm}}$ de Dtxd em KSCN a 10 mM é o mesmo que o observado quando sonicação foi realizada na presença de água (Figura 11).

Observaram-se diminuições nos efeitos Cottons negativos a $[\theta_{222 \text{ nm}}]$ de Dtxd em KSCN (Figuras 8 e 12). *A maior diminuição de $\theta_{222 \text{ nm}}$ foi em KSCN a 150 mM (Figuras 8 e 12) quando as porcentagens de hélice- α ficaram em torno de 76,65 % (Figura 13 e Tabela 1). Praticamente não houve*

alterações de $[\theta_{260 \text{ nm}}]$ na presença de KSCN. A alteração maior observada foi causada pela própria sonicação e isto não pode ser revertido através do uso de KSCN (Figura 14).

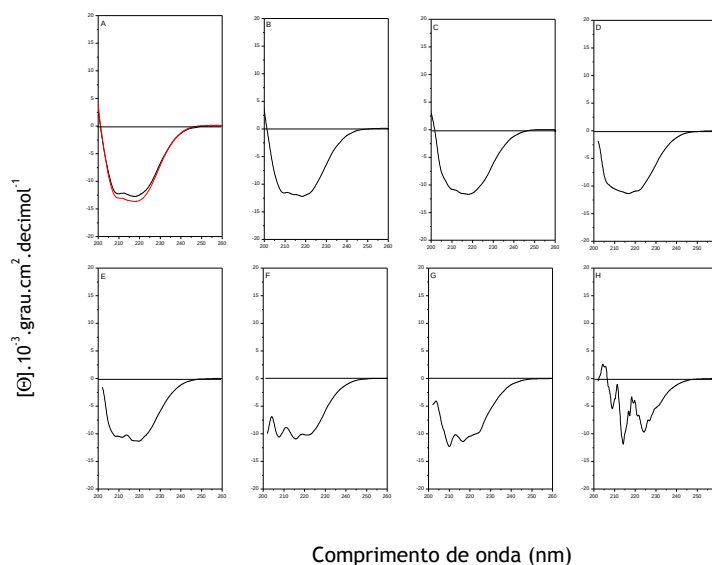


Figura 8. Efeito de KSCN sobre a estrutura secundária do Dtxd durante a sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. Utilizou-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Controle: A. Dtxd 7,36 μM padrão em água, pH 7,2 sem sonicar (-) e Dtxd 7,36 μM sonicado em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ sem KSCN (-) e na presença de (B) KSCN 10 mM, (C) KSCN 30 mM, (D) KSCN 50 mM, (E) KSCN 70 mM, (F) KSCN 90 mM, (G) KSCN 100 mM e (H) KSCN 150 mM.

Nas amostras de Dtxd que continham MgCl_2 observou-se diminuição de $[\theta_{196 \text{ nm}}]$, ou seja, uma diminuição da quantidade de folhas pregueadas β (Figuras 9 e 11). Os menores valores negativos de $[\theta_{222 \text{ nm}}]$ foram observados na presença de MgCl_2 (Figura 12). Entretanto isto correspondeu a um teor de hélice- α em torno de 76,70 % (Figura 13), o que não diferiu muito dos outros sais. Em $[\theta_{260 \text{ nm}}]$ os valores ficaram positivos (Figura 14). *Observou-se uma*

conformação de Dtxd, com o ângulo diédrico $\leq 60^\circ$, ou seja, houve um “fechamento” da molécula (Figura 14) em MgCl_2 150 mM.

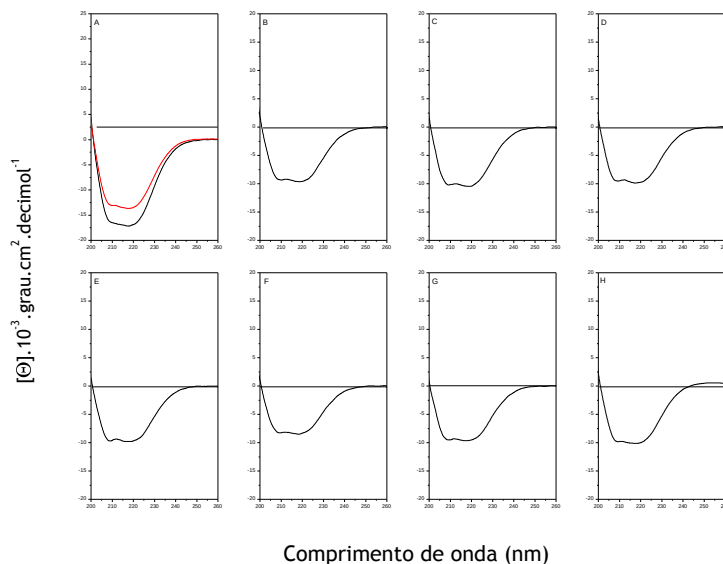


Figura 9. Efeito de MgCl_2 sobre a estrutura secundária do Dtxd durante a sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. Utilizou-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Controle: A. Dtxd 7,36 μM padrão em água, pH 7,2 sem sonicar (-) e Dtxd 7,36 μM sonicado em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ sem MgCl_2 (-) e na presença de (B) MgCl_2 10 mM, (C) MgCl_2 30 mM, (D) MgCl_2 50 mM, (E) MgCl_2 70 mM, (F) MgCl_2 90 mM, (G) MgCl_2 100 mM e (H) MgCl_2 150 mM.

As características estruturais de Dtxd a $[\theta_{196 \text{ nm}}]$ nas amostras sonicadas com NaH_2PO_4 são as que mais se aproximaram do controle de Dtxd em água antes da sonicação (Figuras 10 e 11). Os valores de $[\theta_{222 \text{ nm}}]$ encontrados em Dtxd sonicado na presença de NaH_2PO_4 foram os mais baixos, ou seja, os mais negativos o que significou uma indução de formação de estrutura helicoidal na presença deste sal (Figuras 12 e 13). Já em $[\theta_{260 \text{ nm}}]$ não ocorreu mudança na estrutura de Dtxd na presença de NaH_2PO_4 (Figura 14). Mais uma vez, a maior mudança estrutural, em relação à ligação S-S

foi causada pela sonicação em si e este efeito não pode ser revertido por nenhum dos sais.

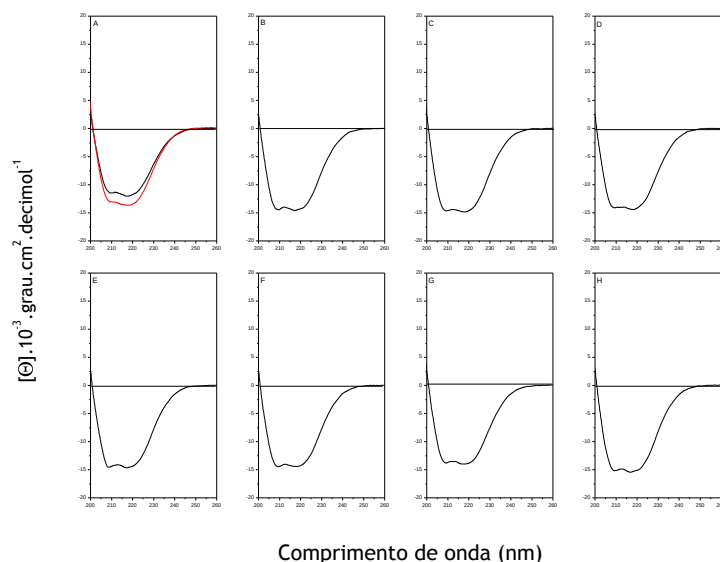


Figura 10. Efeito de NaH_2PO_4 sobre a estrutura secundária do Dtxd durante a sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. Utilizou-se uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Controle: A. Dtxd 7,36 μM padrão em água, pH 7,2 sem sonicar (-) e Dtxd 7,36 μM sonicado em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ sem NaH_2PO_4 (-) e na presença de (B) NaH_2PO_4 10 mM, (C) NaH_2PO_4 30 mM, (D) NaH_2PO_4 50 mM, (E) NaH_2PO_4 70 mM, (F) NaH_2PO_4 90 mM, (G) NaH_2PO_4 100 mM e (H) NaH_2PO_4 150 mM.

Os efeitos dos sais da série de Hoffmeister no conteúdo em folhas pregueadas- β de Dtxd após sonicação na presença de acetato de etila estão resumidos na **Figura 11**.

Os efeitos dos sais da série de Hoffmeister no conteúdo em hélice- α de Dtxd após sonicação na presença de acetato de etila estão resumidos na **Figura 12, 13**.

As variações de hélice- α de Dtxd durante este estudo foram analisadas também através dos resultados das variações de $\theta_{\text{observado}}$ (**Figura 12**),

tomando-se como 100 % aquele valor correspondente ao $\theta_{\text{observado}}$ da molécula antes da sonicação. Estas variações estão resumidas na **Figura 13**.

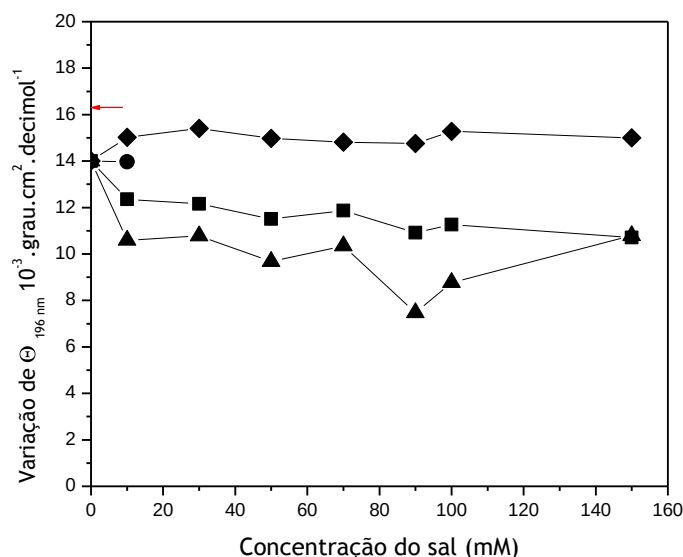


Figura 11: Efeito da concentração dos sais da série de Hoffmeister no $\theta_{196 \text{ nm}}$ de Dtxd. As amostras do Dtxd 7,36 μM obtidas nas presenças de (■) NaCl, (●) KSCN, (▲) MgCl_2 e (◆) NaH_2PO_4 após sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ foram analisadas por CD. A seta (→) indica o controle em **H_2O sem sonicação**.

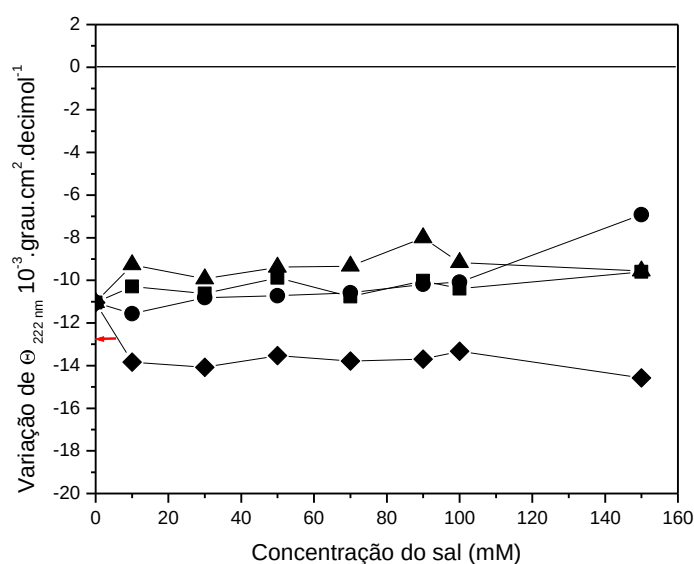


Figura 12: Efeito da concentração dos sais da série de Hoffmeister no $\theta_{222 \text{ nm}}$ de Dtxd. As amostras do Dtxd 7,36 μM obtidas nas presenças de (■) NaCl, (●) KSCN, (▲) MgCl_2 e (◆) NaH_2PO_4 após sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ foram analisadas por CD. A seta (→) indica o controle em **H_2O sem sonicação**.

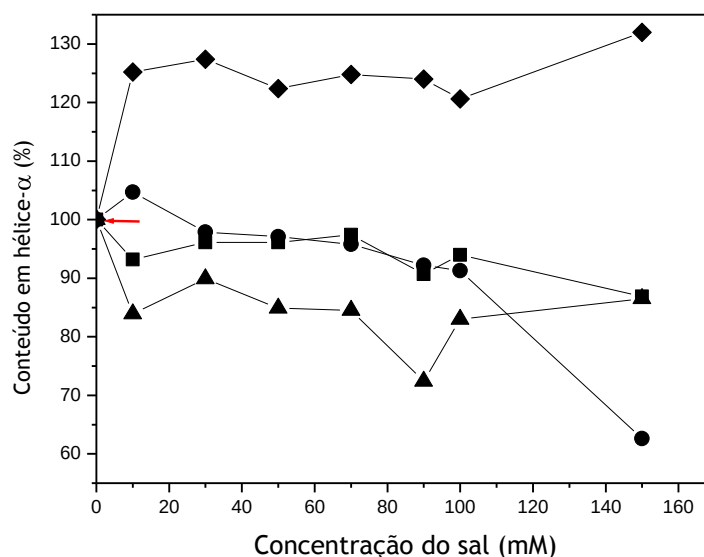


Figura 13: Efeito da concentração dos sais da série de Hoffmeister no conteúdo de hélice- α de Dtxd. As amostras de Dtxd 7,36 μM obtidas nas presenças de (-■-) NaCl, (-●-) KSCN, (-▲-) MgCl_2 e (-◆-) NaH_2PO_4 após sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ foram analisadas por CD. A seta ($\rightarrow$) indica o controle em H_2O sem sonicação.

O PO_4^{2-} induziu a formação de hélice- α (aumento de até 30 % no θ observado) e o MgCl_2 foi o que mais diminuiu o θ observado (diminuição de até 60 %) (Figura 13).

Os efeitos dos sais da série de Hoffmeister na conformação de S-S de Dtxd após sonicação na presença de acetato de etila estão resumidos na (Figura 14). Observaram-se grandes modificações no ângulo diédrico do S-S que eram, na proteína nativa, $\geq 120^\circ$ (Efeito Cotton negativo) e passaram para $\leq 60^\circ$ (Efeito Cotton positivo) (Figura 14). Isto pode ser interpretado como um “fechamento” da estrutura terciária de Dtxd o que corrobora os dados obtidos por fluorescência (Figura 6). Por fluorescência não se observou exposição de triptofano para um meio mais polar, ou seja, o aminoácido se encontrava num ambiente hidrofóbico. *Aqui, observou-se que o Dtxd, após*

sonicação, ficou mais “fechado” (com o ângulo S-S menor) e nenhum dos sais pode reverter esta situação (Figura 14).

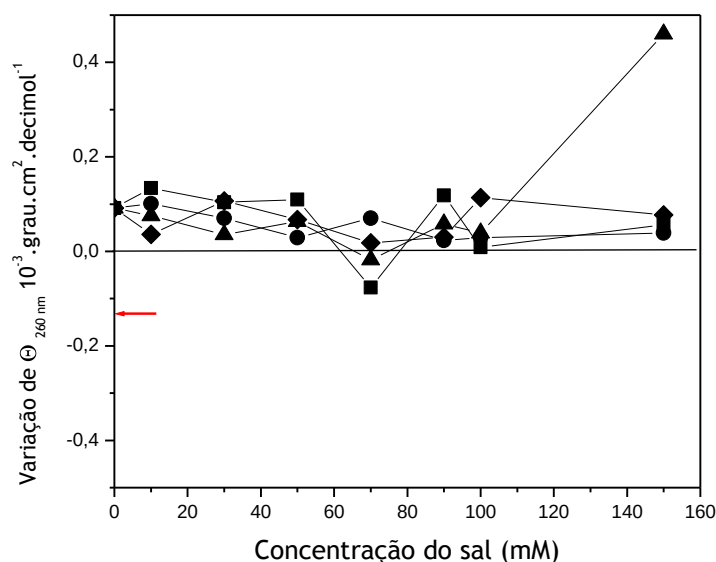


Figura 14: Efeito da concentração dos sais da série de Hoffmeister no $\Theta_{260\text{ nm}}$ de Dtxd. As amostras do Dtxd 7,36 μM obtidas nas presenças de (■) NaCl, (●) KSCN, (▲) MgCl_2 e (◆) NaH_2PO_4 após sonicação em $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ foram analisadas por CD. A seta (→) indica o controle em H_2O sem sonicação.

AS PARTÍCULAS

3.2. Caracterizações morfológicas e funcionais dos REVS-Chi (LUVs revestidas por quitosana) *in vitro*.

3.2.1. Tamanho dos REVs-Chi, potencial zeta e eficiência de encapsulação de Dtxd.

Foram obtidas REVs (vazias) e REVs/Dtxd (contendo a proteína) com tamanhos de 167 nm e 256 nm respectivamente. As REVs-Chi eram de 313 nm

de raio hidrodinâmico enquanto que as REVs-Chi/Dtxd eram de 524 nm e as REVs-Chi-PVA/Dtxd de 367 nm (Tabela 4).

As formulações apresentaram distribuição de tamanho bimodal, exceto a amostra de REVs/Dtxd que apresentou apenas uma única população. Os tamanhos e as cargas superficiais das partículas obtidas foram dependentes da complexidade da partícula (Tabela 4).

Tabela 4. Tamanho dos REVs-Chi, potencial zeta e eficiência de encapsulação de Dtxd.

FORMULAÇÃO	TAMANHO (nm)	CARGA SUPERFICIAL	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%)
REVs	167	-9,40	0
REVs/Dtxd	256	-3,71	58,8
REVs-Chi	313	-4,66	0
REVs-Chi/Dtxd	524	-9,94	69,2
REVs-Chi-PVA	367	-7,51	0
REVs-Chi-PVA/Dtxd	383	-12,3	75,4

As preparações de REVs, de REVs-Chi e de REVs-Chi-PVA encapsularam 58,8 %, 69,2 % e 75,4 % de Dtxd, respectivamente (Tabela 4). O Dtxd aumentou em 53 % o tamanho das REVs e também 40,3 % das REVs-Chi (Tabela 4). A quitosana aumentou o tamanho das partículas lipossomais em 67 % em relação às REVs. O PVA diminuiu 27 % do tamanho das partículas (REVs-Chi-PVA/Dtxd) em relação às REVs-Chi/Dtxd (Tabela 4).

Para que se facilite a apresentação dos dados e a argumentação para as conclusões, apresentam-se agora algumas considerações sobre a estrutura de Dtxd:

Sabe-se (BENNETT, CHOE e EISENBERG, 1994) que a massa molar de Dtxd é de 58,3 kDa e o pI calculado, a partir da sequência primária, é 4,25 (CAMPANA *et alii*, 2004) (Tabela 5). A carga iônica líquida do Dtxd é -11 (CAMPANA *et alii*, 2004). O Dtxd foi encapsulado em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5, onde então estava somente a 0,25 unidade de pH acima de seu pI. Mas, era bem provável que mesmo assim, neste pH 4,5, estivesse carregado negativamente (vide o número de cargas negativas neste pH).

A diminuição da carga negativa líquida de REVs/Dtxd (-3,71 mV) em relação às REVs (-9,40 mV) (lembre-se que são vazias) poderia ser compreendida como adsorção inespecífica do toxóide diftérico à superfície externa das REVs (Tabelas 4 e 5). O mesmo ocorreu quando se compararam REVs-Chi (-4,66 mV) com REVs (-9, 40 mV), ou seja, houve uma diminuição da carga negativa superficial líquida devido à adsorção da quitosana (um polícatión) à superfície externa das vesículas. Isto é uma evidência da adsorção de quitosana à superfície das REVs (Tabela 4) o que está de acordo com a literatura (LAYE, McCLEMENTS e WEISS, 2008). Quando se monitora a interação de lipossomas com Chi através da medida do tamanho e da carga superficial em suspensões de lipossomas a pH 3,0, o potencial ζ indica que os lipossomas puros são altamente aniônicos (-38 mV), enquanto as moléculas de quitosana são altamente catiônicas (+ 85 mV) (LAYE, McCLEMENTS e WEISS, 2008). Se compararmos REVs-Chi/Dtxd (- 9,94 mV) e REVs-Chi-PVA/Dtxd (- 12,3 mV) observamos o mesmo fenômeno em relação às REVs, ou seja, um

aumento da carga negativa da partícula causada pela presença de Dtxd (Tabela 4).

Tabela 5. Características dos diferentes aminoácidos de Dtxd.

Aminoácidos com grupos ionizáveis	Grupos ionizáveis	pK	Ácidos	Básicos
Carbóxi- terminal	α -COOH	2,34	11	36
E (Glu)	γ -COOH	3,86	36	16
D (Asp)	β -COOH	4,25	27	1
K (Lys)	ϵ -NH ₂	10,53		
R (Arg)	guanidino	12,48		
N-terminal	- NH ₃ ⁺	9,6		

Em resumo, o tamanho dos REVs e as eficiências de encapsulações para o Dtxd aumentaram com a adição de Chi e de PVA. A adsorção de quitosana à superfície de lipossomas foi acompanhada por aumento do potencial ζ . A adsorção de PVA à superfície de REVs-Chi foi acompanhada por diminuição do potencial ζ .

3.2.2. Eficiência de polimerização interfacial de quitosana

As interações entre SPC (fosfatidilcolina de soja), Dtxd e Chi, Dtxd-Chi e PVA, Chi-Chi e PVA-PVA podem ser afetadas pelos mesmos fatores que estabilizam as proteínas enoveladas e as associações de proteínas com outras proteínas ou ligantes: o emparelhamento de cargas opostas, a repulsão de cargas semelhantes, a formação de pontes de hidrogênio e o enterramento de resíduos hidrofóbicos (Tabela 6 e Figuras 15, 16 e 17).

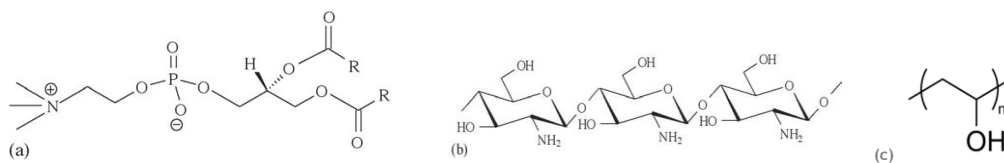


Figura 15. Estrutura química geral da fosfatidilcolina (a), quitosana (b), PVA (c). R= ácidos graxos (MERTINS et alii, 2005).

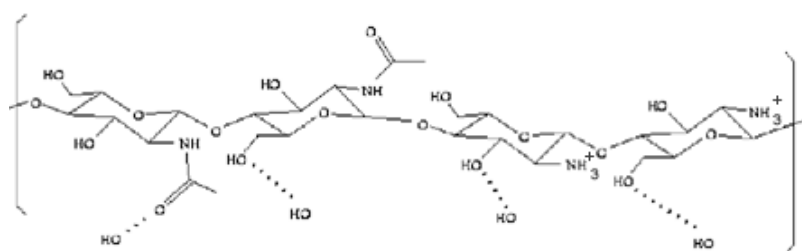


Figura 16. Pontes de hidrogênio que se formam com quitosana em solução.

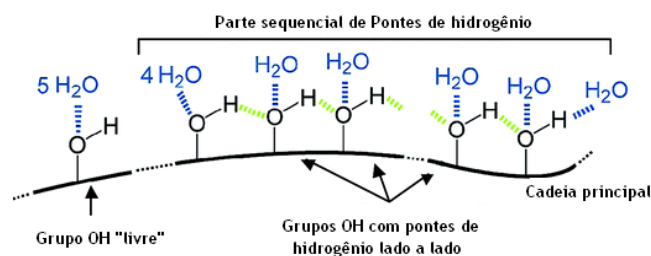


Figura 17. Pontes de hidrogênio que se formam com PVA em solução (SATOKAWA e SHIKATA, 2008).

Estas interações foram levadas em consideração no desenvolvimento da formulação REV-Chi-PVA/Dtxd. *A presença de Dtxd na formulação aumentou a eficiência de adsorção de quitosana às partículas de REVs (Tabela 6), o que pode ser explicado através das interações dos íons*

complementares Dtxd (negativo) e Chi (positiva). O mesmo foi observado quando o PG (fosfatidilglicerol) está presente na composição das vesículas, ou seja, um aumento da eficiência de polimerização de Chi sobre as vesículas contendo esta carga negativa (ZARU *et alii*, 2009). Isto explica também o aumento da carga negativa líquida da partícula se comparamos REVs-Chi/Dtxd com REVs-Chi (Tabelas 4 e 5). Estes resultados estão de acordo com o que foi discutido sobre o potencial ζ (Tabelas 4 e 5). O PVA é adicionado às partículas após as lavagens das mesmas, portanto não alterou a eficiência de adsorção da quitosana.

Tabela 6. Eficiência de polimerização interfacial nas diferentes formulações.

FORMULAÇÃO	EFICIÊNCIA DE POLIMERIZAÇÃO (%)
REVs-Chi	87,5 $\pm$ 1,2
REVs-Chi/Dtxd	98 $\pm$ 1,5
REVs-Chi-PVA/Dtxd	98 $\pm$ 1,5

3.2.3. Propriedade mucoadesiva das partículas

3.2.3.1. Interação mucina/quitosana e mucina/PVA

A mucina foi usada aqui para simular a interação entre os polímeros Chi e/ou PVA com a superfície intestinal, num ensaio de bioadesibilidade *in vitro*. O princípio do método utilizado para análise das interações entre os polímeros Chi e PVA com mucina (outro polímero, **Figura 18**) é o aumento de

turbidez conseqüente da agregação quando ocorre interação. Na ausência de interação, não há formação de agregados e a turbidez a 500 nm será zero (PREGO *et alii*, 2005; TAKEUCHI *et alii*, 2005; TAKEUCHI, YAMAMOTO e KAWASHIMA, 2001; HE, DAVIS e ILLUM, 1998).

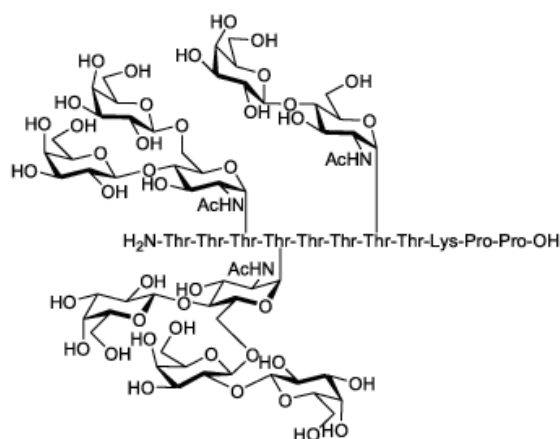


Figura 18. Estrutura química da Mucina (CAMPOS e CARVALHO, 2008).

Em testes realizados com os polímeros e com Mu-III (1 % de ácido siálico) em solução, observaram-se interações entre Mu e Chi somente nas relações de 1:1 (v/v, de soluções a 2 mg/ mL) e de 3:1 (v/v de soluções a 2 mg/ mL) (Figura 19). Isto significou que nos excessos de quitosana (relação 1:3) ou de mucina (9:1) não ocorreu interação, ou melhor, não foi suficiente para causar agregação entre os polímeros suficiente para aumentar a turbidez a 500 nm.

Foi interessante observar que, neste estudo, a quantidade usada de PVA em relação à quitosana foi mais de 2 000 vezes menor. Ou seja, a afinidade de mucina pelo PVA foi 2 000 vezes maior do que pela quitosana!

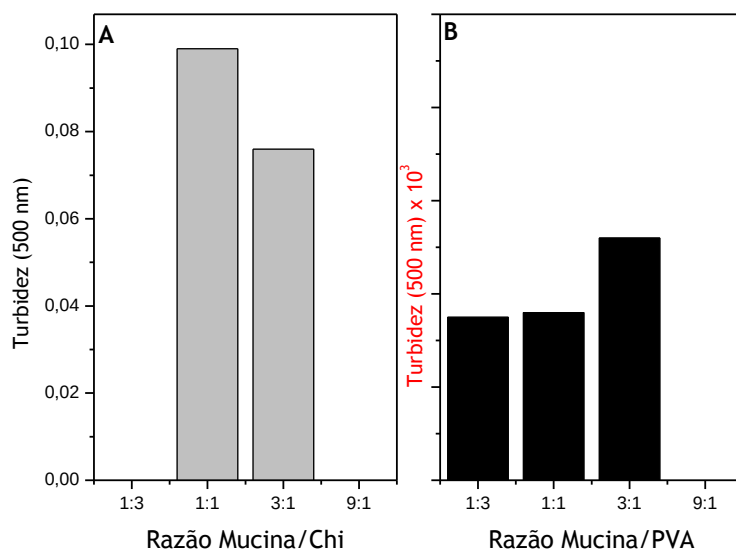


Figura 19. Interação entre Mu-III e os polímeros Chi e PVA. Em **A**, amostras de Mu-III (2 mg/mL) e quitosana (3 mM) foram colocadas para interagir. Após 30 minutos foi medida a turbidez a 500 nm. Em **B**, amostras de mucina (2mg/mL) e PVA (7,9 μ M foram colocadas para interagir. Após 30 minutos foi medida a turbidez a 500 nm. **É importante notar que a escala da interação de Mu/PVA (B) é 1000 vezes maior do que a escala da interação de Mu/Chi (A).**

3.2.3.2. Adsorção de mucina aos REVs-Chi ou REVS-Chi-PVA:

Sabe-se da literatura que a quitosana favorece a interação das partículas com a superfície intestinal (TAKEUCHI, YAMAMOTO e KAWASHIMA, 2001). Entretanto, se por um lado as partículas de lipossomas revestidos com Chi são mais estáveis ao trato gastrointestinal (MARÓN *et alii*, 2007) o mesmo não é verdade em relação à formulação em si quanto à agregação (MARÓN *et alii*, 2007; MERTINS *et alii*, 2005). A formulação de REVs-Chi tem tendência de ser formada por agregados (MARÓN *et alii*, 2007). Para se evitar a formação de agregados adicionou-se o PVA sobre a formulação de REVs-Chi. O objetivo deste experimento foi também o de se estudar o efeito do PVA sobre a adsorção das partículas, ou seja, se diminuiria a interação das partículas de

REVs-Chi com a mucosa intestinal. As mucinas tipos I-S e III foram usadas nestes experimentos para simular a superfície intestinal.

A partícula revestida por PVA, REVs-Chi-PVA, foi a que mais interagiu com a mucina. A presença de Dtxd interferiu pouco na adsorção de partículas de REVs-Chi com Mu-III (**Figura 20**). O mesmo tipo de interferência ocorreu quando se comparou REVs/Dtxd com REVs (**Figura 20**). Como o Dtxd em tampão fosfato 50 mM, pH 4,5 está próximo ao seu *pI* (pH 4,25), teoricamente, a carga líquida da molécula seria próxima de zero, mas ainda negativa o suficiente para haver interação de cargas (**Figura 20**).

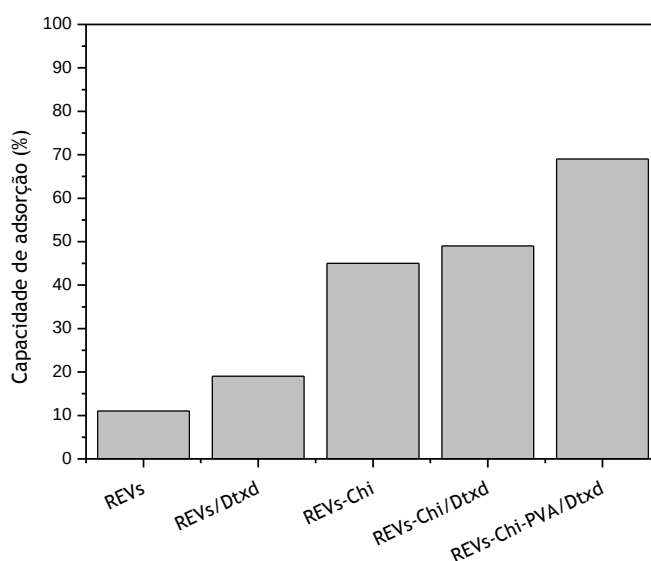


Figura 20. Interação entre mucina e as diferentes formulações lipossomais. A Mu-III livre após interação com as formulações foi medida através de medida de turbidez a 500 nm. O cálculo utilizado foi: mucina inicial - mucina livre = mucina adsorvida.

Por exemplo, quando se aumenta a carga líquida da superfície de lipossomas, com fosfatidilglicerol, mesmo que estes já estejam carregados com Chi há um aumento de interação com mucina (ZARU *et alii*, 2009). O aumento da interação das partículas REVs-Chi-PVA com mucina indicou que,

aqui nesta dissertação, a interação ocorreu não só por interações eletrostáticas (ZARU *et alii*, 2009), mas também através de pontes de hidrogênio (vide figuras 15- 17 e 20). E, adiantando, esta interação através de pontes de hidrogênio foi, aqui, muito mais eficiente na interação com Mu do que as interações eletrostáticas.

Os seguintes experimentos foram realizados com o objetivo de se estudar, separadamente, a contribuição do conteúdo de ácido siálico e da temperatura na interação da mucina com REV-Chi (Figura 21) ou com REV-Chi-PVA (Figura 22). A interação de Mu-III (ácido siálico 1%) com REV-Chi diminuiu com o aumento da temperatura (Figura 21 A). Entretanto esta interação não foi afetada pelo aumento da temperatura quando o conteúdo de ácido siálico era da ordem de 12 % (Mu-IS) (Figura 21 B).

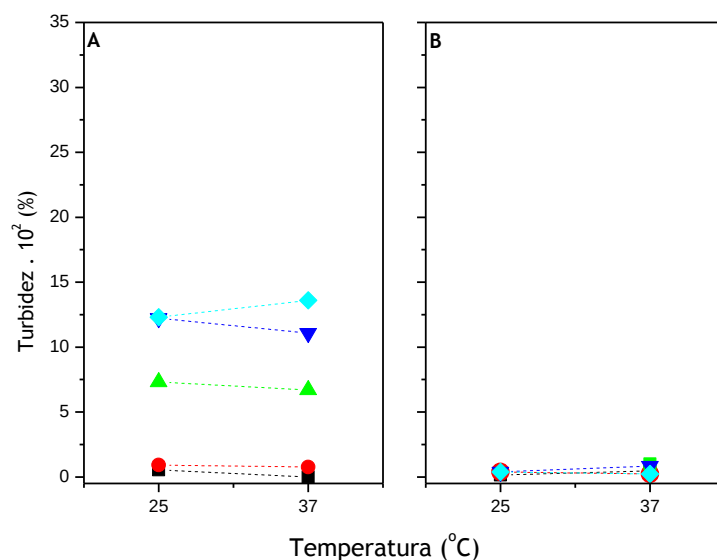


Figura 21. Efeitos da temperatura, da concentração e do conteúdo de ácido siálico das diferentes mucinas na interação com REV-Chi. Em **A** observam-se as interações de Mu-III (ácido siálico de 1 %) e em **B** com a Mu-IS (ácido siálico de 12 %) com o REV-Chi. Usaram-se concentrações de mucina diferentes: (■) 0,025 mg/mL; (●) 0,05 mg/mL, (▲) 0,1 mg/mL; (▼) 0,25 mg/mL; (◆) 0,5 mg/mL com quantidades fixas de REV-Chi. Controle: 100 % de turbidez a 500 nm = medida da mesma preparação de emulsão de REV-Chi usada para os experimentos.

Em contraste com o tipo de interação de Mu/REVs-Chi, a interação de mucina com REVs-Chi-PVA diminuiu com o aumento da temperatura tanto para a Mu-III (ácido siálico 1%) quanto com a Mu-IS (Siálico 12 %) (Figura 22). Observou-se que tanto para Mu-III quanto Mu-IS houve uma relação direta entre aumento da concentração de Mu e aumento da interação (Figura 22).

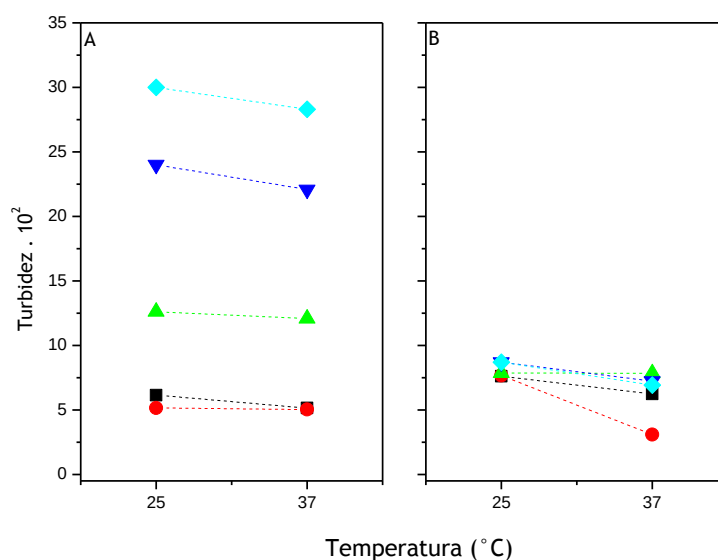


Figura 22. Efeitos da temperatura, da concentração e do conteúdo de ácido siálico das diferentes mucinas na interação com REVs-Chi-PVA. Em A observam-se as interações de Mu-III (ácido siálico de 1 %) e em B com a Mu-IS (ácido siálico de 12 %) com o REVs-Chi-PVA. Usaram-se concentrações de mucina diferentes: (■) 0,025 mg/mL; (●) 0,05 mg/mL, (▲) 0,1 mg/mL; (▼) 0,25 mg/mL; (◆) 0,5 mg/mL com quantidades fixas de REVs-Chi-PVA. Controle: 100 % de turbidez a 500 nm = medida da mesma preparação de emulsão de REVs-Chi-PVA usada para os experimentos.

É importante salientar que as afinidades tanto de Mu-III quanto de Mu-IS pelo PVA, contido nas REVs-Chi-PVA foram superiores às aquelas apresentadas com quitosana (Figura 23).

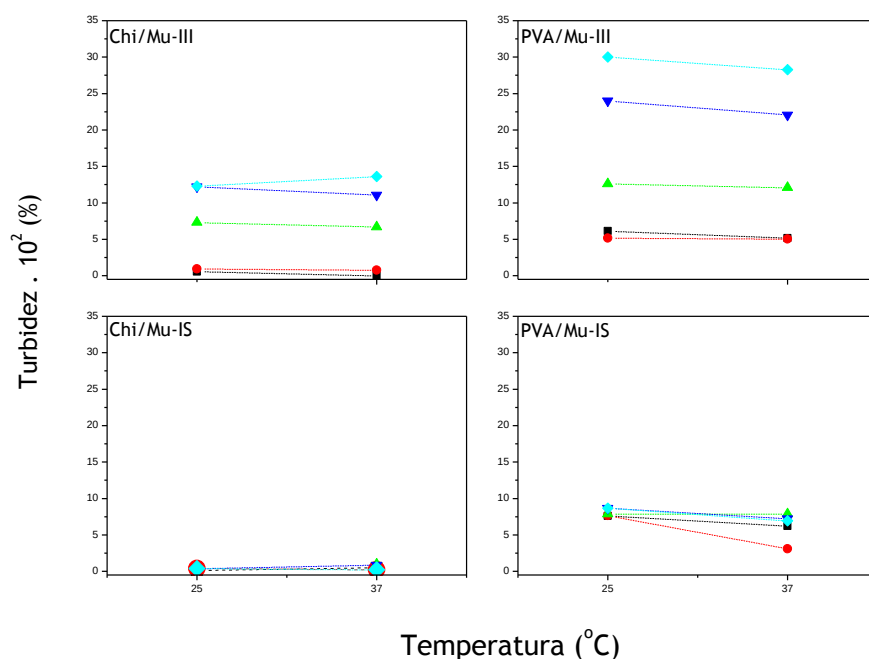


Figura 23. Comparações entre as afinidades de Mu-III ou Mu-IS com REVS-Chi e REVS-Chi-PVA em função da concentração de Mu-III ou Mu-IS e da temperatura.

Foram realizadas comparações entre as quantidades de mucina adsorvida e as cargas superficiais das partículas. O objetivo da análise foi o de se estudar a importância das cargas superficiais opostas de Mu-III e as diferentes partículas contendo ou não Chi e/ou PVA (que, por sua vez, não tem carga, mas influencia a carga líquida da partícula) e o próprio Dtxd. Observou-se uma correlação direta, R (coeficiente de correlação) entre mucina adsorvida e carga superficial das partículas, ou seja, potencial ζ (Figura 24).

Em resumo as maiores contribuições para a adsorção das partículas à mucina foram dadas pelo PVA (50 %), devido às pontes de hidrogênio, seguida pela Chi (34%), devido às interações iônicas.

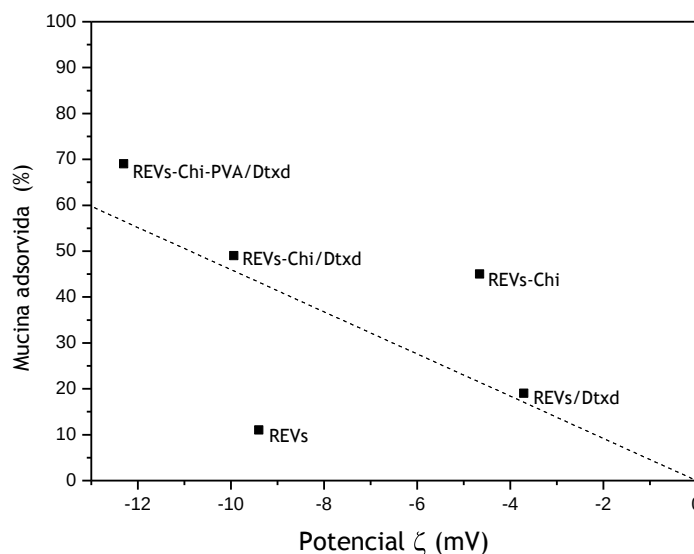


Figura 24. Correlação entre mucina adsorvida e o potencial zeta das diferentes partículas.

3.2.4. Microscopias eletrônicas das REVs

As REVs foram fotografadas através de diferentes técnicas. As partículas preparadas com PVA apresentaram um aumento de tamanho e de definição de superfície. Estes dados corroboram aqueles obtidos por espalhamento de luz (**Tabela 4**). Ou seja, as partículas de REVS-Chi/Dtxd são maiores do que as de REVs-Chi-PVA/Dtxd (**Figura 25 e Tabela 4**). As partículas de REVs-Chi-PVA são mais dispersas do que as REVs-Chi (**Figura 25**) de acordo com outros dados da literatura (NAKANO, TOZUKA e TAKEUCHI, 2008; MARÓN *et alii*, 2007). É interessante notar como o PVA evitou a agregação das partículas, aumento sua definição de superfície (**Figura 25**). Estes resultados são superiores aqueles observados na literatura, onde as partículas não são tão definidas (GORDON *et alii*, 2008; PREGO *et alii*, 2005; JAIN, SHARMA e VYAS, 2006).

Erro! Não é possível criar objetos a partir de códigos de campo de edição.

Figura 25. Fotografia de REVs, REVs-Chi e REVs-Chi-PVA por Microscopia de inversão de fase (- = 400 nm).

Muitos estudos com Chi são realizados com a formação de partículas puras do polímero (LI *et alii*, 2008; HAAS *et alii*, 2005; KOKIL *et alii*, 2005; PATEL *et alii*, 2005) e fica, portanto, difícil de comparar-se resultados da literatura com os experimentos desta dissertação. As partículas aqui obtidas tem um único compartimento aquoso interno (**Figura 26**). Na microscopia confocal, observamos que houve a encapsulação da proteína marcada por FITC no compartimento interno aquoso (**Figura 26**).

Através da microscopia eletrônica de transmissão observamos algumas diferenças na morfologia das vesículas no que diz respeito a tamanho e característica da borda: na amostra de REVs, observou-se uma borda formada pela bicamada lipídica bem definida, marcada por ósmio que tem afinidade por lipídeo (**Figura 27**).

Erro! Não é possível criar objetos a partir de códigos de campo de edição.

Figura 26. Fotografia de REVs-Chi-PVA por Microscopia confocal. Os verdes são Dtxd marcado com FITC.

Erro! Não é possível criar objetos a partir de códigos de campo de edição.

Figura 27. Fotografias por Microscopia eletrônica de transmissão das diversas formulações. REVs (A), REVs-Chi (B), REVs-Chi-PVA (C).

Na amostra de REV-Chi, observou-se a bicamada lipídica bem definida e, além disso, observou-se uma espécie de “névoa” na **Figura 27** (WU *et alii*, 2004) relativa à presença de quitosana. Como a quitosana tem facilidade em atrair água, acaba por aumentar o raio da vesícula e, conseqüentemente, seu tamanho. Na amostra de REV-Chi-PVA, observou-se a bicamada lipídica bem definida pela marcação com ósmio e uma “névoa” condensada que é a quitosana na presença do PVA.

Na microscopia de criofratura observamos REV-Chi-PVA/Dtxd como um lipossoma bem definido e com aspecto esponjoso. Não houve fratura nas bicamadas, ou seja, o que se observou foi somente a superfície externa das partículas (**Figura 28**). A falta de fratura pode ter sido devida ao “endurecimento” das membranas e das lamelas, causado tanto pela quitosana como pelo PVA (**Figuras 16 e 17 e 27**).

Erro! Não é possível criar objetos a partir de códigos de campo de edição.

Figura 28. Fotografia por Microscopia eletrônica de REV-Chi-PVA/Dtxd. Fotografia da réplica obtida por criofratura (freeze-fracture) de REV-Chi-PVA/Dtxd.

3.2.5. Estudos de estabilidade das REVS-Chi

3.2.5.1. Estudos de estabilidade das REVS-Chi.

Sabe-se que os lipossomas são instáveis ao congelamento e liofilização. A água de hidratação das cabeças polares dos fosfolípidos é o que impede com que, por exemplo, haja aproximação de duas partículas lipossomais numa

distância capaz de induzir a fusão das suas membranas. A trealose é um açúcar que substitui a água de hidratação durante o processo de liofilização e impede que as membranas se aproximem, durante a re-hidratação, causando fusão (CROWE *et alii*, 1985; CARPENTER e CROWE, 1989; STRAUSS, SCHURTENBERGER e HAUSER, 1986). Dentre os carboidratos estudados, sem dúvida a trealose é a que substitui melhor a água de hidratação das cabeças polares dos fosfolípidos (QUINTILIO *et alii*, 2000). O efeito da crioproteção da trealose na formulação de REV_s-Chi-PVA/Dtxd foi estudado para que fosse possível a preservação da formulação na forma liofilizada. Relembrando, a trealose foi adicionada a todos os componentes aquosos da formulação a uma concentração final de 400 mM de acordo com experiência anterior de nosso laboratório (QUINTILIO *et alii*, 2000). Observou-se que a trealose retardou a liberação de Dtxd tanto antes quanto depois da liofilização-rehidratação da formulação (**Figura 29**). O efeito controlador da trealose na liberação foi mais elevado após 240 minutos de incubação quando 79 % de Dtxd encapsulado REV_s-Chi (sem trealose) foi liberado em contraste com 19 % do REV_s-Chi-Tre que contém a trealose (**Figura 29 A**).

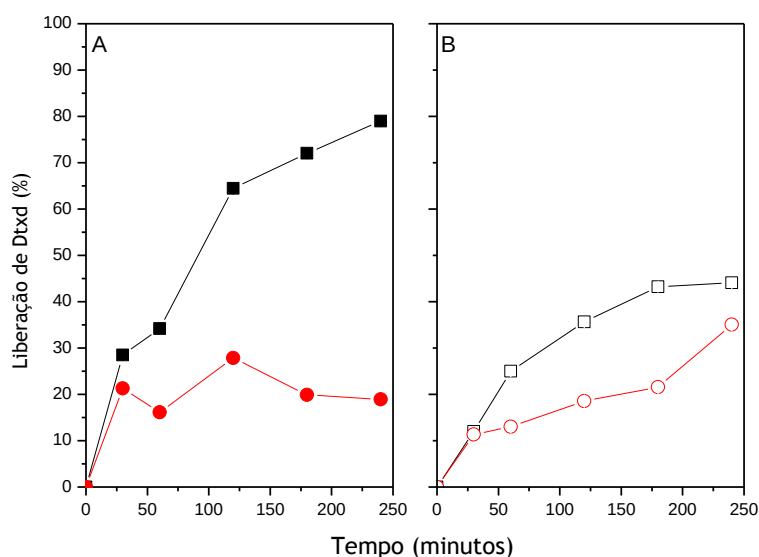


Figura 29. Efeito da trealose na cinética de liberação de Dtxd encapsulado em partículas de REVs-Chi-PVA. **A.** As amostras de REVs-Chi-PVA/Dtxd foram preparadas na ausência (■) e na presença (●) de trealose e incubadas imediatamente após sua preparação em PBS. **B.** As formulações foram preparadas na ausência (□) ou na presença (○) de trealose seguidas por congelamento e liofilização. Após a liofilização elas foram reidratadas e incubadas em PBS a 37 °C. Todas as amostras corresponderam a 100 % de atividade imunológica, quando analisadas por ELISA.

A liofilização retardou a liberação de proteína na ausência de trealose (**Figura 30**). Antes da liofilização observou-se uma liberação de 64,4 % do Dtxd em 120 minutos e após a liofilização esse percentual cai para 35,6 % (**Figura 30-A**). Com a trealose, observou-se um retardo menor na liberação de Dtxd das partículas. Em 120 minutos, antes da liofilização, a liberação foi de 27,8 % e após a liofilização foi de 18,6 % de Dtxd (**Figura 30-B**). É importante ressaltar que todas as amostras corresponderam a 100 % de atividade imunológica do Dtxd, quando analisadas por ELISA. Isto comprova o efeito protetor da trealose sobre a proteína. O efeito protetor da trealose sobre a membrana das REVs-Chi-PVA/Dtxd é deduzido indiretamente pelo fato

de não ter sido observada liberação total de Dtxd nos primeiros tempos da incubação. Repetindo, se a membrana estivesse desestruturada, a maior parte da proteína estaria nos primeiros tempos de incubação (**Figuras 29 e 30**). Além disto, observou-se uma partícula totalmente íntegra por microscopia eletrônica após fratura (**Figura 28**).

Em resumo, a trealose protegeu ambas, proteína e partícula dos efeitos deletérios da liofilização-rehidratação. Além disto, a trealose exerceu um poder de retardar a liberação de do soluto das partículas de REV_s-Chi-PVA/Dtxd.

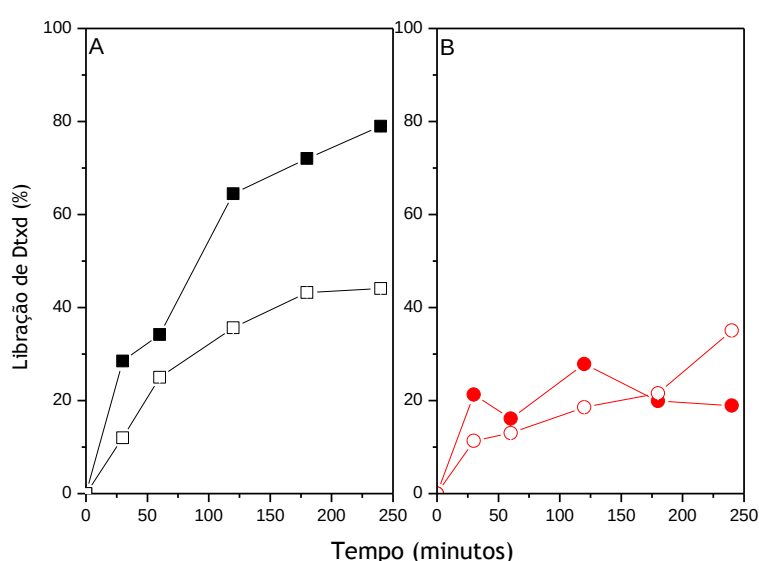


Figura 30. Efeito da liofilização na cinética de liberação de Dtxd das partículas de REV_s-Chi-PVA/Dtxd. **A.** As amostras de REV_s-Chi-PVA/Dtxd sem trealose incubadas antes (■) e após a liofilização (□). **B.** As amostras de REV_s-Chi-PVA/Dtxd com trealose incubadas antes (●) e após (○) a liofilização. Todas as amostras corresponderam a 100 % de atividade imunológica, quando analisadas por ELISA.

3.2.5.2. Estudos de estabilidade das REVS-Chi em simulados de suco gástrico e suco intestinal

Não houve diferença significativa entre as quantidades de Dtxd liberadas de REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd (**Figura 31**). Mas, observou-se que ambos, Chi e PVA retardaram a liberação de Dtxd das formulações REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd quando comparadas com REVs (**Figura 31**). Isto ocorreu tanto em simulados de suco gástrico (SG) quanto de suco intestinal (SI) (**Figura 31**).

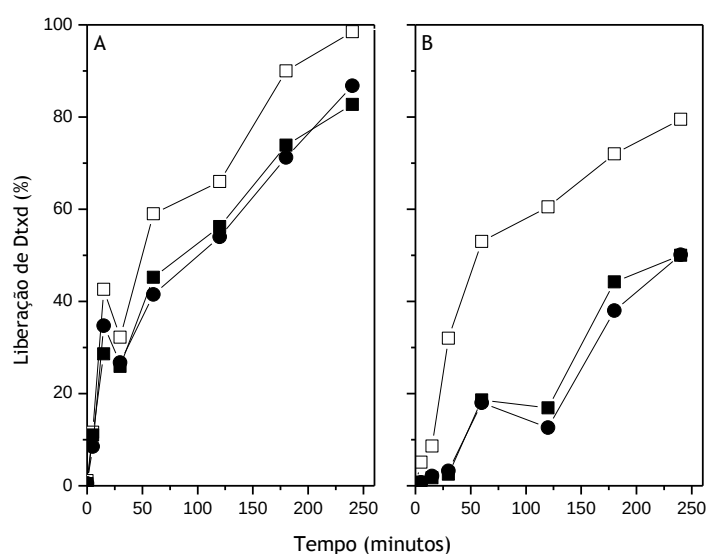


Figura 31. Cinética de liberação de Dtxd das diferentes formulações. As amostras das diferentes formulações REVs (-□-), REVs-Chi (-■-) e REVs-Chi-PVA (-●-) foram incubadas em suco gástrico (A) ou suco intestinal (B).

Todas as formulações resistiram aos extremos de pH, um dos principais fatores ligados à degradação de destas partículas principalmente nas suas

características de controlar a liberação do soluto. Em resumo, deduziu-se que as partículas estavam íntegras porque continuaram controlando a liberação de Dtxd. Esta interpretação é baseada em análises semelhantes (COSTA-JÚNIOR, PEREIRA e MANSUR, 2009; AHIRE *et alii*, 2007; VAN DER LUBBEN *et alii*, 2003).

Concluiu-se que as partículas revestidas por Chi e Chi-PVA resistiram aos extremos de pH do suco gástrico e suco intestinal e portanto continuaram a controlar a liberação do soluto.

3.3. Estudos *in vivo*

3.3.1. Ensaio Biológicos

Para racionalizar a apresentação destes resultados, é bom que tenhamos alguns critérios internos para as comparações, uma vez que a literatura a respeito é pouca ou mesmo inexistente (se considerarmos só o tipo de partícula: lipossomas revestidos por Chi). Para simplificar, consideremos o seguinte:

- a. Os lipossomas são adjuvantes de vacinas (ALLISON e GREGORIADIS, 1974). Entretanto, dada a sua instabilidade frente às fosfolipases intestinais, **são inadequados para uso oral**. Como adjuvantes, não são hábeis para imunomodulação (como transformar uma resposta Th1 em Th2, por exemplo); podem atingir um alvo específico (imunolipossomas); são ótimos para apresentação de antígenos; bons

para indução de resposta CTL e não atuam como um depósito (RAO e ALVING, 2000; BRAYDEN, 2001).

- b. Os *REVs-Chi* podem ser considerados *lipossomas funcionalizados*, ou seja, resistem ao trato gastrointestinal por causa do revestimento interno e externo com a Chi (HAGENAARS *et alii*, 2009; GORDON *et alii*, 2008; AMIDI *et alii*, 2007 e SANYOG *et alii*, 2006) e são capazes de interagir com o muco presente nas mucosas por causa também da Chi (HE, DAVIS e ILLUM, 1998; TAKEUCHI, YAMAMOTO e KAWASHIMA, 2001; PREGO *et alii*, 2005; TAKEUCHI *et alii*, 2005; CHAYED *et alii*, 2007; SVENSSON, THURESSON e ARNEBRANT, 2008).
- c. Teoricamente *poderiam ter uma ação de depósito adicional, em relação aos REVs tradicionais* (MARÓN *et alii*, 2007). Teoricamente os *REVs-Chi* poderiam ter as mesmas ações que os lipossomas convencionais com a *vantagem de serem mais resistentes do que os REVs tradicionais tanto in vitro quanto in vivo. A vantagem* do uso de PVA nos *REVs-Chi-PVA*, inicialmente, era o de *produzir se uma partícula dispersa, evitando a agregação* (Figuras 25- 28).

Os anticorpos IgA anti-Dtxd foram analisados nas amostras de saliva e lavados vaginais dos camundongos previamente imunizados com as diferentes formulações. Foram produzidos IgAs em todos os animais imunizados, tanto com a Dtxd livre quanto com a Dtxd veiculada nas diferentes formulações (Figura 32 e 33). Indubitavelmente, as partículas REVs, REVs-Chi e REVs-Chi-PVA atuaram com adjuvantes. A maior produção de IgA salivar foi observada

nos animais que foram imunizados via SC (subcutânea) com Dtxd encapsulada em REVs-Chi-PVA (Figura 32 e 33).

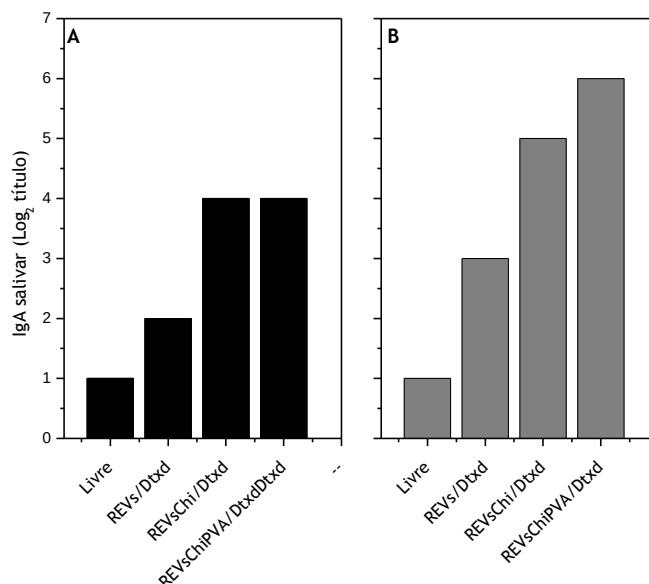


Figura 32. Produção de IgA salivar contra Dtxd nas diferentes formulações. Os camundongos foram injetados com 5 µg de Dtxd Livre ou encapsulada em REVs, REVs-Chi e REVs-Chi-PVA. Vias de administração: (A) oral e (B) subcutânea. Os títulos foram medidos no final do experimento, ou seja, 56 dias após a imunização.

A quantidade de IgA salivar produzida por animais imunizados oralmente com Dtxd veiculada em REVs-Chi ou REVs-Chi-PVA foi a mesma, o que indica que *o PVA não interferiu como adjuvante na formulação para vacina oral quando comparado com REVs-Chi* (Figura 32 A e 33), mas sim na vacina subcutânea (Figuras 32 B e 33).

Houve uma correlação direta entre produção de IgA salivar tanto animais injetados através da via oral (Figura 34 A, R = 0,91766) quanto da via subcutânea (Figura 34 B, R = 0,99718) e a interação de Mu com REVs ou as partículas revestidas quer seja com Chi ou com Chi-PVA

(Figura 34). A interação com Mu-III aqui, poderia ser um indicativo que *in vitro* teria havido um efeito de depósito das partículas.

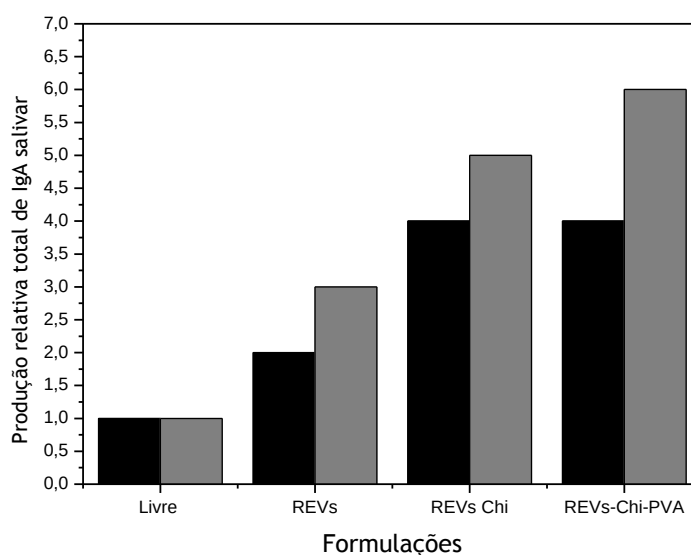


Figura 33. Comparação entre as produções IgA salivar nas diferentes formulações. Os camundongos foram injetados com 5 μ g de Dtxd Livre ou encapsulada em REVs, REVs-Chi e REVs-Chi-PVA. Vias de administração: (■) oral e (■) subcutânea. A quantidade de IgA produzida pelos camundongos injetados com Dtxd livre foi considerada o valor unitário. As outras produções de IgA foram tomadas em relação ao Dtxd livre.

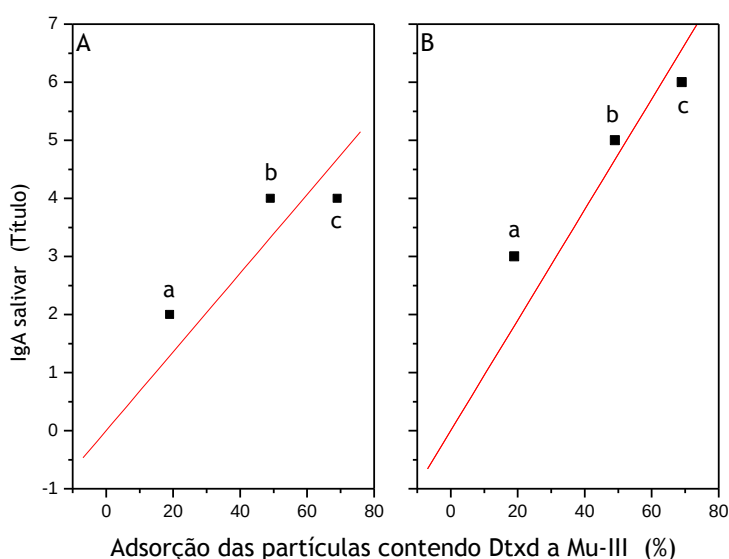


Figura 34. Correlação entre as produções de IgA salivar e a adsorções das diferentes partículas à Mu-III. Os camundongos foram imunizados através da via oral (A, $R = 0,91766$) ou subcutânea (B, $R = 0,99718$) com 5 μ g de Dtxd encapsulados nas diferentes formulações (a) REVs/Dtxd, (b) REVs-Chi/Dtxd ou (c) REVs-Chi-PVA/Dtxd.

Não houve produção de IgA anti Dtxd na secreção vaginal tanto nos animais imunizados através da via oral quanto nos animais imunizados através da via subcutânea quando o Dtxd foi administrado na forma livre. Em contrapartida, houve produção de IgA anti Dtxd na secreção vaginal tanto nos animais imunizados através da via oral quanto nos animais imunizados através da via subcutânea em todas as formulações lipossomais.

Quando os animais foram imunizados **oralmente** com Dtxd encapsulado em **REVs** a resposta imunológica foi a menor de todas (**Figura 35 A**) e não respondeu ao reforço (**Figura 35 A**). Ambas as formulações REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd produziram mais anticorpos do que REVs/Dtxd. REVs-Chi/Dtxd retardou a resposta em relação à REVs/Dtxd. Já REVs-Chi-PVA/Dtxd induziu o aumento de produção de IgA anti-Dtxd desde os primeiros dias após imunização (**Figura 35 A**). A resposta ao reforço foi mais acentuada nos animais imunizados com REVs-Chi/Dtxd, mas foi menor (em quantidade) do que aquela produzida pelos animais imunizados com REVs-Chi-PVA/Dtxd (**Figura 35 A**).

Quando os animais foram imunizados **subcutaneamente** com Dtxd encapsulado em **REVs** a resposta imunológica foi a menor de todas (**Figura 35 B**), mas respondeu ao reforço embora que tardiamente (**Figura 35 B**). Ambas as formulações REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd produziram mais anticorpos do que REVs/Dtxd. A resposta ao reforço foi menos acentuada e menor (em quantidade) nos animais imunizados com REVs-Chi/Dtxd do que aquela produzida pelos animais imunizados com REVs-Chi-PVA/Dtxd (**Figura 35 B**).

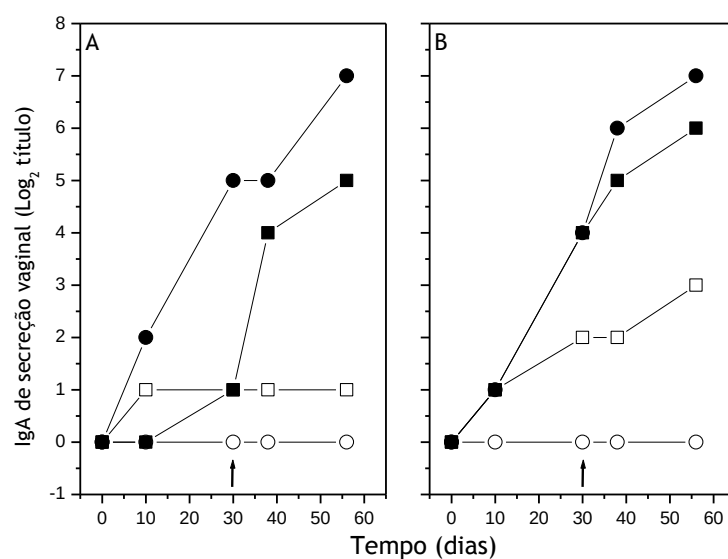


Figura 35. Comparação entre as produções de IgA vaginal em resposta a diferentes formulações administradas em via oral (A) e subcutânea (B). O Dtxd (5 µg) foi injetado nas formas Livre (-o-), REVs (-□-), REVs-Chi (-■-) e REVs-Chi-PVA (-●-). Dose de reforço: foram usadas as mesmas quantidades de Dtxd e nas mesmas formulações (↑).

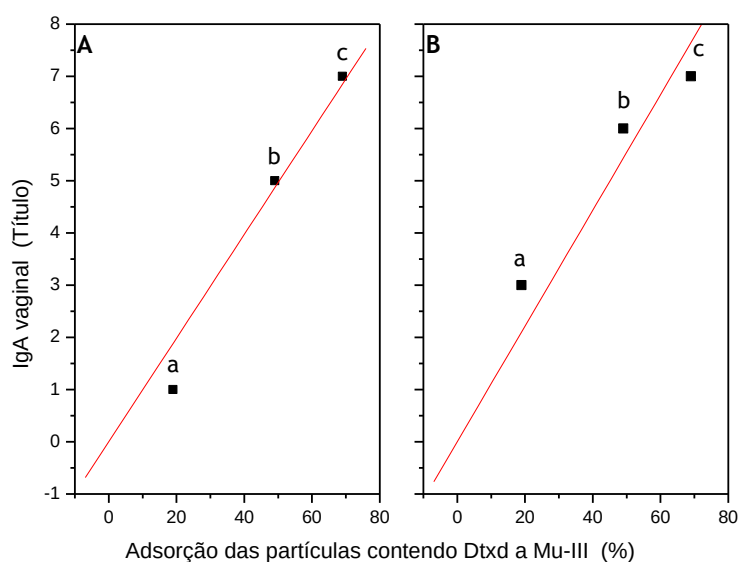


Figura 36. Correlação entre as produções de IgA vaginal e a adsorções das diferentes partículas com Mu-III. Os camundongos foram imunizados através da via oral (A, $R = 0,99718$) ou subcutânea (B, $R = 0,98624$) com 5 µg de Dtxd encapsulados nas diferentes formulações (a) REVs/Dtxd, (b) REVs-Chi/Dtxd ou (c) REVs-Chi-PVA/Dtxd.

Houve uma correlação direta entre produção de IgA vaginal tanto animais injetados através da via oral (Figura 36 A, $R = 0,99718$) quanto da via subcutânea (Figura 36 B, $R = 0,98624$) e a interação de Mu com REVs ou as partículas revestidas quer seja com Chi ou com Chi-PVA (Figura 36).

Houve produção de IgG₁ em todos os animais imunizados tanto através da via oral (Figura 37 A) quanto naqueles imunizados através da via subcutânea (Figura 37 B) com todas as formulações lipossomais usadas e também com Dtxd administrado na forma livre. Foram observadas produções de IgG₁ anti-Dtxd desde os primeiros dias após a imunização, mas as respostas foram maiores nas formulações com Chi ou Chi-PVA em comparação a REVs e à forma livre (Figura 37 A). Este efeito foi muito mais acentuado naqueles animais imunizados através da via subcutânea (Figura 37 B). Foram observadas respostas à dose de reforço em todas as vias e com todas as formulações usadas, exceto na via subcutânea para o Dtxd administrado livremente (Figura 37 A e B).

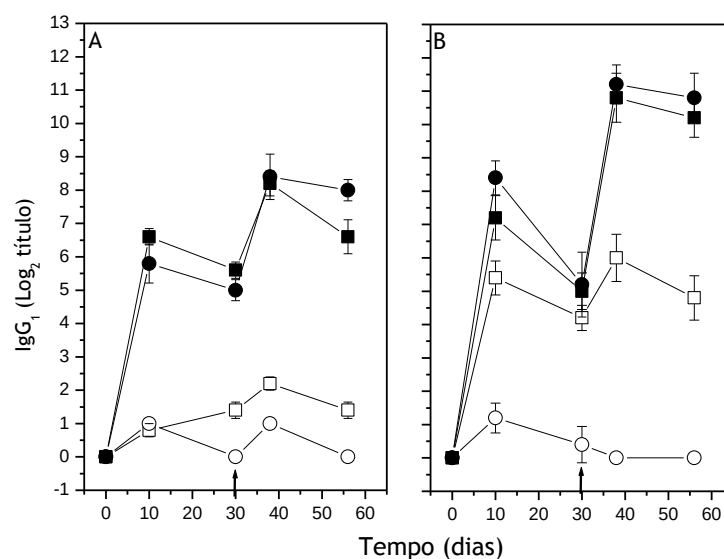


Figura 37. Títulos de IgG₁ nas diferentes formulações administradas em via oral (A) e subcutânea (B). O Dtxd (5 µg) foi injetado nas formas Livre (-o-), REVs (-□-), REVs-Chi (-■-) e REVs-Chi-PVA (-●-). Dose de reforço: as mesmas quantidades de Dtxd e nas mesmas formulações (↑).

Houve produção de IgG_{2a} nos animais imunizados com as formulações REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd através da via oral (**Figura 38 A**) e nos animais imunizados com as formulações REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd e REVs através da via subcutânea (**Figura 38 B**). *Nitidamente observou-se aqui que apesar das REVs terem um efeito adjuvante, este não se manifesta nos animais imunizados oralmente por causa da destruição dos lipossomas pelo trato gastrointestinal. O Dtxd livre também é destruído nos animais imunizados oralmente por causa do trato gastrointestinal (Figura 38 A) e por isto só se produz IgG_{2a} nos animais injetados subcutaneamente (Figura 38 B).*

Foram observadas produções de IgG_{2a} anti Dtxd desde os primeiros dias após a imunização, mas as respostas foram maiores nas formulações com Chi

ou Chi-PVA em comparação a REVs e à forma livre (**Figura 38 A**). Este efeito foi muito mais acentuado naqueles animais imunizados através da via oral (**Figura 38 A**). Foram observadas respostas à dose de reforço em todas as vias e com todas as formulações usadas, **exceto** na via oral (REVs e Dtxd livre) (**Figura 38 A**) e na via subcutânea para o Dtxd administrado livremente (**Figura 38 B**).

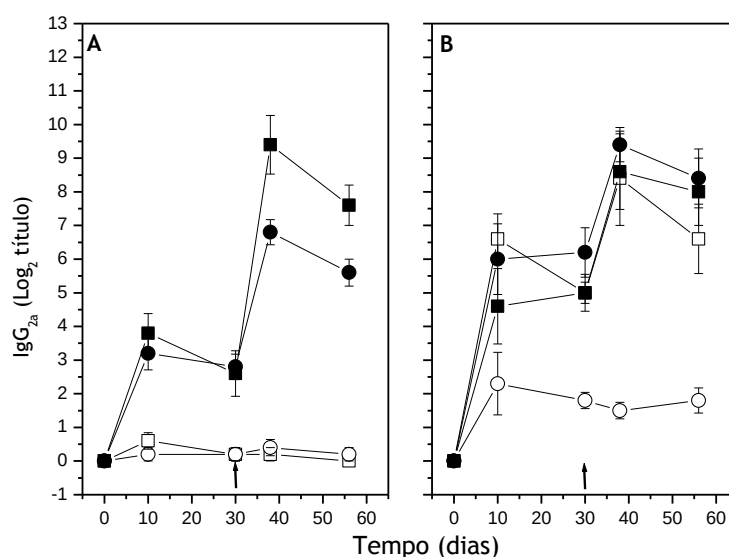


Figura 38. Títulos de IgG_{2a} nas diferentes formulações administradas em via oral (A) e subcutânea (B). O Dtxd (5 µg) foi injetado nas formas Livre (○), REVs (□), REVs-Chi (■) e REVs-Chi-PVA (●). Dose de reforço: as mesmas quantidades de Dtxd e nas mesmas formulações (↑).

Após a administração da dose de reforço, observaram-se os seguintes fatos:

Os camundongos responderam à dose de reforço de acordo com a complexidade das formulações. Não houve produção de IgA anti-Dtxd após a

dose de reforço nos animais imunizados com a formulação livre (Figura 39 A, B, C, e D).

Houve uma correlação direta entre a complexidade da formulação e resposta secundária quanto a produção de IgA ou seja, REV_s < REV_s-Chi < REV_s-Chi-PVA, tanto após 7 dias (Figura 39 A e B) quanto após 26 dias (Figura 39 C e D) da administração da dose de reforço.

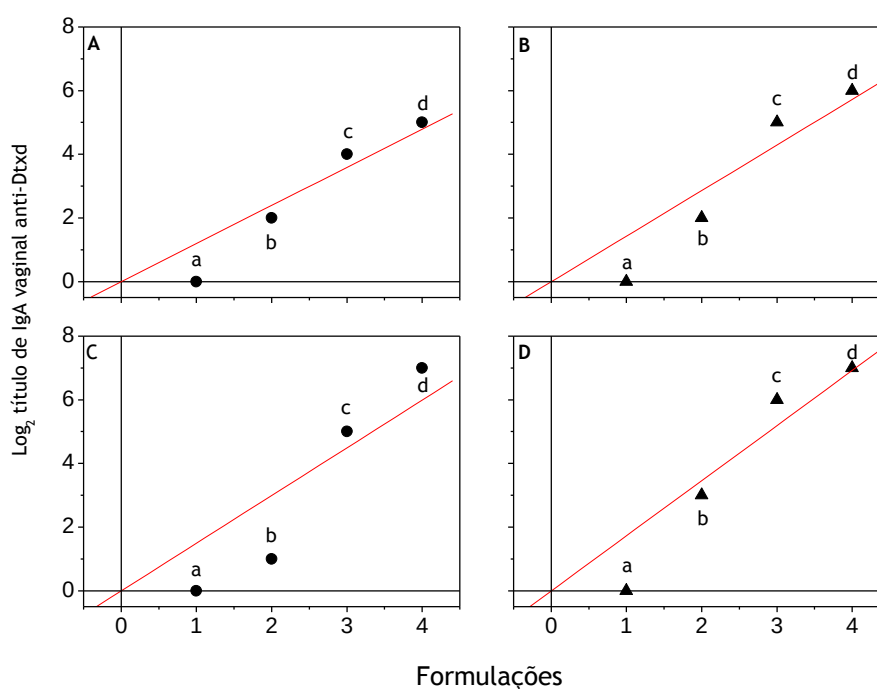


Figura 39. Correlação entre a produção de IgA anti-Dtxd depois da dose de reforço e a complexidade das formulações. Foram analisadas as produções de IgA anti-Dtxd 7 dias após a administração da dose de reforço em animais imunizados via oral (A) ou subcutânea (B). Foram analisadas as produções de IgA anti-Dtxd 26 dias após a administração da dose de reforço em animais imunizados via oral (C) ou subcutânea (D). Considerou-se a complexidade das formulações de acordo com a seguinte ordem: Livre (a) < REV_s (b) < REV_s-Chi (c) < REV_s-Chi-PVA (d). As correlações entre produções de IgA e complexidades da formulações foram: A = 0,98978; B = 0,9845; C = 0,97683 e D = 0,9798.

Não houve resposta secundária em relação ao IgG₁ quando o toxóide diftérico foi administrado livre aos animais (Figura 40 B, C, e D), salvo na administração por via oral após 7 dias da dose de reforço (Figura 40 A).

Houve uma correlação direta entre a complexidade da formulação e resposta secundária quanto a produção de IgG₁, ou seja, livre < REVs < REVs-Chi < REVs-Chi-PVA, após 26 dias (Figura 40 C e D) da administração da dose de reforço. Após 7 dias tanto REVs-Chi quanto REVs-Chi-PVA apresentaram a mesma resposta secundária quanto à produção de IgG₁ (Figura 40 A e B).

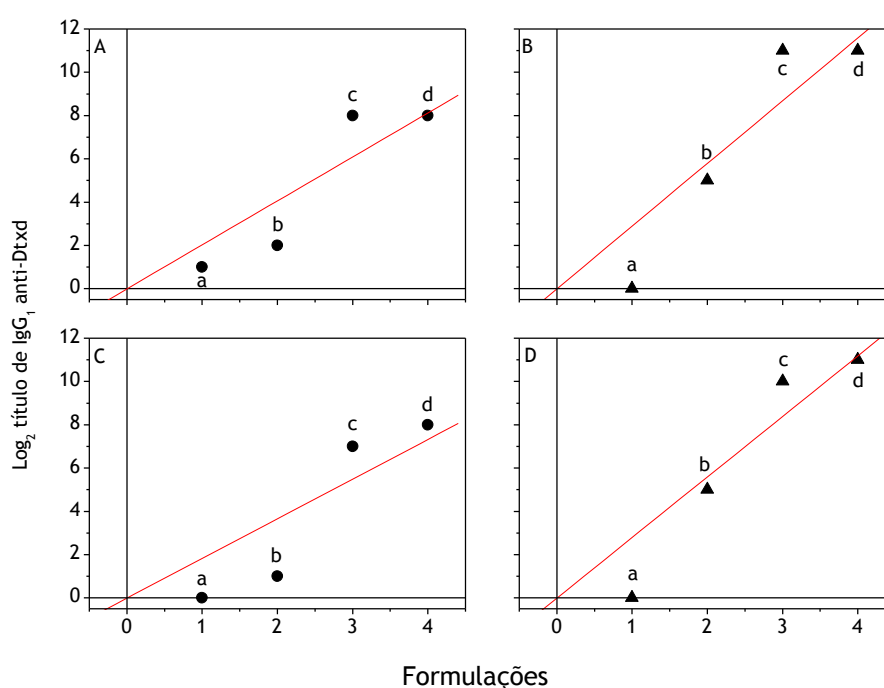


Figura 40. Correlação entre a produção de IgG₁ anti-Dtxd depois da dose de reforço e a complexidade das formulações. Foram analisadas as produções de IgG₁ anti-Dtxd 7 dias após a administração da dose de reforço em animais imunizados via oral (A) ou subcutânea (B). Foram analisadas as produções de IgG₁ anti-Dtxd 26 dias após a administração da dose de reforço em animais imunizados via oral (C) ou subcutânea (D). Considerou-se a complexidade das formulações de acordo com a seguinte ordem: Livre (a) < REVs (b) < REVs-Chi (c) < REVs-Chi-PVA (d). As correlações entre produções de IgG₁ e complexidades da formulações foram: A = 0,92338; B = 0,94728; C = 0,94868 e D = 0,96833.

Não houve resposta secundária quando o toxóide foi administrado livre e em REVs, por via oral, aos animais (Figura 41 A e C). Na via oral, tanto em 7 dias quanto 26 dias após a dose de reforço a resposta secundária

para REVs-Chi foi maior do que para REVs-Chi-PVA (Figura 41 A e C). Isto se resume em: Livre = REVs < REVs-Chi > REVs-Chi-PVA.

Houve uma correlação direta entre a complexidade da formulação e resposta secundária quanto à produção de IgG_{2a} ou seja, livre < REVs < REVs-Chi. Porém a resposta da produção de IgG_{2a} às formulações de REVs-Chi e REVs-Chi-PVA foram iguais, tanto após 7 dias (Figura 41 B) quanto após 26 dias (Figura 41 D) da administração da dose de reforço pela via subcutânea (Figura 41 B e D).

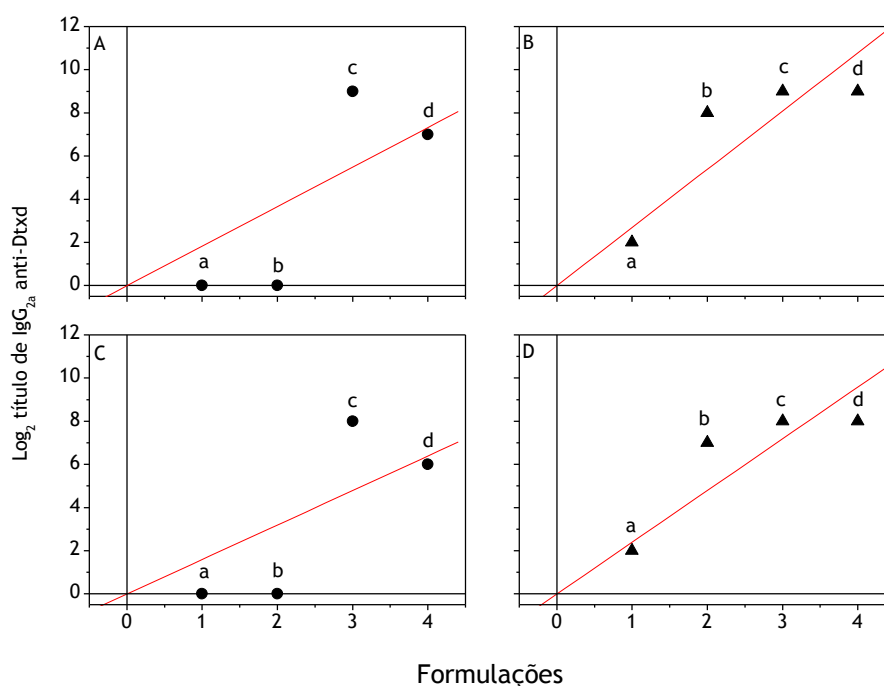


Figura 41. Correlação entre a produção de IgG_{2a} anti-Dtxd depois da dose de reforço e a complexidade das formulações. Foram analisadas as produções de IgG₁ anti-Dtxd 7 dias após a administração da dose de reforço em animais imunizados via oral (A) ou subcutânea (B). Foram analisadas as produções de IgG_{2a} anti-Dtxd 26 dias após a administração da dose de reforço em animais imunizados via oral (C) ou subcutânea (D). Considerou-se a complexidade das formulações de acordo com a seguinte ordem: Livre (a) < REVs (b) < REVs-Chi (c) < REVs-Chi-PVA (d). As correlações entre produções de IgG_{2a} e complexidades da formulações foram: A = 0,82572; B = 0,84366; C = 0,81409 e D = 0,85399.

4. Discussão

A difteria é uma doença cuja manifestação clínica resulta da ação de uma toxina extracelular produzida pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae*. A imunização rotineira contra difteria foi introduzida nas décadas de 40 e 50, levando a quase completa erradicação desta nos países desenvolvidos e na Europa na década de 80. No entanto essa doença é endêmica em algumas partes do mundo e desde 1980 algumas epidemias têm ocorrido na Europa. A mais importante foi a que ocorreu na Rússia e na Ucrânia em 1994, onde a OMS registrou 47.000 casos da doença e 1.700 mortes (WHO, 2009). As principais razões para a epidemia na Europa têm sido a **baixa cobertura da vacina, a queda da imunidade em adultos e a movimentação de refugiados**. É recomendável, segundo a WHO, o reforço na vacinação de adultos. No Brasil a difteria encontra-se sob controle: em 2001 foram registrados 19 casos e 3 mortes e em 2008, nenhum caso (MS, 2009) (**Figura 42**). A situação de controle da difteria no Brasil é conseguida com a manutenção de altas coberturas vacinais com a vacina DPT em menores de um ano, e a revacinação com a vacina dupla adulto (DT) a cada 10 anos. Para diminuir ainda mais a incidência dessa doença é feito também o aprofundamento da situação de controle, por meio do fortalecimento da vigilância epidemiológica e da elevação e homogeneidade das coberturas vacinais em cada município (MS, 2009). Portanto, de um modo geral (MS, 2009; WHO, 2009) a situação só é controlável se continuarem as vacinações.

A doença

Difteria e tétano são doenças bacterianas agudas e muitas vezes fatais, nas quais a manifestação clínica não é devida a uma infecção invasiva, mas devido à liberação de toxinas potentes que por sua vez causam os danos no paciente. Por esta razão, ambas as doenças podem ser prevenidas pela presença de anticorpos neutralizantes, que podem ser induzidos através de imunização com as formas não tóxicas da toxina ou por imunização passiva (soro hiperimune, como é aquele produzido por cavalos imunizados).

Ramon, na França em 1924 (RAMON, 1924) e Glenny e Hopkins na Inglaterra (GLENNY e HOPKINS, 1923) descobriram um método eficaz de destoxificação das toxinas tetânica e diftérica através do tratamento com formaldeído, o que permitiu a erradicação destas doenças nos países desenvolvidos (RAPPUOLI, 1997). As vacinas contra difteria (D) e tétano (T) continuam a ser preparadas até a atualidade através do método de destoxificação descrito por Ramon (RAPPUOLI, 1997). Apesar de estas vacinas serem efetivas, todas são de um baixo grau de pureza e têm sido associadas com alguns efeitos colaterais indesejáveis. Conseqüentemente é relevante o desenvolvimento tecnológico de vacinas mais avançadas, onde se purifique mais o antígeno ao mesmo tempo em que se proponha um adjuvante mais potente que o tradicional hidróxido de alumínio.

As vacinas D e T são geralmente associadas à vacina celular contra pertussis (DTP). Em alguns países já se associam D e T a uma vacina acelular contra pertussis. Entretanto têm sido observadas quedas de potência na vacina acelular tripla (DTaP) uma vez que não se encontram aqueles componentes da parede bacteriana de *Bordetella pertussis* (RAPPUOLI, 1997) que têm um efeito

adjuvante para D e T. Torna-se, portanto relevante que se estude também um método de se veicular estes antígenos para se aumentar a imunogenicidade (o veículo pode atuar também como adjuvante) e potência destas vacinas de segunda geração.

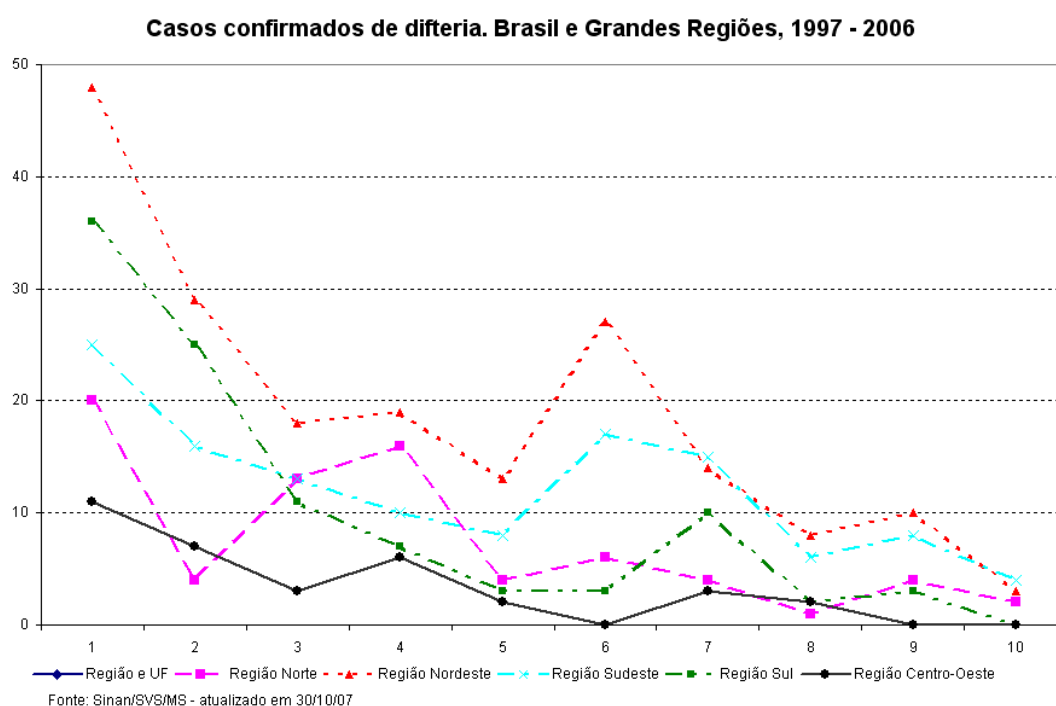


Figura 42. Distribuição de casos confirmados de difteria no Brasil entre 1997 e 2006 (Sinan/SVS/MS, 2007).

Os métodos de vacinação parenteral que necessitam de agulhas, são invasivos e, além disso, são rejeitados pela maioria dos pacientes. Os altos custos de uma campanha de vacinação envolvem a necessidade de se ter pessoal treinado e material descartável para se evitar o risco de contaminações como AIDS e hepatite. As vacinas administradas através da via parenteral estimulam a uma resposta sistêmica e, conseqüentemente, os anticorpos gerados desta

maneira não alcançam a superfície das mucosas que, por sua vez, são a porta de entrada para a maioria dos agentes infecciosos com é o caso da difteria. A imunização de mucosa é a primeira defesa imunológica (produção de IgA) que prevê o ataque dos agentes infecciosos e previnem danos maiores ao organismo (JAIN, SHARMA e VYAS, 2006; MEDINA e GUZMAN, 2000). Portanto a imunização oral é o meio mais seguro e conveniente na indução de imunidade de mucosa.

Portanto é atual, relevante e desejável que se busque um adjuvante de mucosa que seja também um bom veículo para antígenos como o toxóide diftérico. Nesta tese, o veículo com propriedades adjuvantes estudado foi o lipossoma. As vantagens do uso de lipossomas, por exemplo, como adjuvante e transportador de vacinas é que vários antígenos podem ser associados a uma mesma formulação (GREGORIADIS *et alii*, 1993). Com isto cópias múltiplas dos antígenos são “entregues” ao sistema imunológico de uma só vez. Entretanto, os lipossomas não resistem à ação dos sais biliares e das enzimas do trato gastrointestinal reduzindo, portanto, o seu uso em veiculação de vacinas orais. Mais recentemente, o desenvolvimento de uma partícula lipossomal resistente ao sistema digestório passou pelo uso de quitosana como revestimento (MARÓN *et alii*, 2007; GUZEY e McCLEMENTS, 2007; HARNSLAWAT, PONGSAWATMANIT e McCLEMENTS, 2006; AOKI, DEKER e McCLEMENTS, 2005; GU, DEKER e McCLEMENTS, 2005; KLINKERSON *et alii*, 2005_a; 2005_b; MERTINS *et alii*, 2005; WU *et alii*, 2004; OGAWA, DEKER e McCLEMENTS, 2003; RENGEL *et alii*, 2002; TACHEUCHI, YAMAMOTO e KAWASHIMA, 2001; FILIPOVIC-GRCIC, SKALKO-BASNET e JALSENJAK, 2001). Parte do problema de estabilidade lipossomal, frente ao meio biológico já é resolvida (MARÓN *et alii*, 2007; GUZEY e McCLEMENTS, 2006; HARNSILAWAT, PONGSAWATMANIT e McCLEMENTS, 2006; AOKI, DEKER e

McCLEMENTS, 2005; GU, DEKER e McCLEMENTS, 2005; KLINKERSON *et alii*, 2005_a; 2005_b; MERTINS *et alii*, 2005; WU *et alii*, 2004; OGAWA, DEKER e McCLEMENTS, 2003; RENGEL *et alii*, 2002; TAKEUCHI, YAMAMOTO e KAWASHIMA, 2001; FILIPOVIC-GRICIC, SKALKO-BASNET e JALSENJAK, 2001), mas, a estabilidade da formulação quanto à possível agregação das partículas (MARÓN *et alii*, 2007) só foi resolvida totalmente esclarecida e resolvida nesta dissertação, como será discutido mais para frente. Outro obstáculo a ser vencido numa formulação lipossomal através do método de formação de REVS (MARÓN *et alii*, 2007) era o da estabilidade do toxóide diftérico frente à sonicação e ao solvente usado na primeira fase da formação de vesículas.

A fase de formação da micela reversa (**etapa 1-3, Figura 1**) submete a proteína às 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, MERTINS *et alii*, 2005). Tudo isto pode levar à adsorção da proteína, seguidas por desenovelamento e agregação, como o descrito para métodos de emulsificação semelhantes (NAMUR *et alii*, 2009; PÉREZ-RODRIGUES *et alii*, 2003; PÉREZ, DE JÉSUS e GRIEBENOW, 2002; MEINEL *et alii*, 2001; DIWAN e PARK, 2001; CASTELLANOS *et alii*, 2002; WEERT *et alii*, 2000; SAH, 1999_a; SAH, 1999_b; XING *et alii*, 1996).

Ao longo dos últimos 30 anos foram descritos vários agentes protetores de desnaturação de proteínas durante suas microencapsulações. O que ocorre na literatura é a adição indiscriminada de agentes (BSA, sacarose, surfactantes não iônicos e PEG) potencialmente estabilizantes sem haver uma definição com uma discussão detalhada sobre a estrutura da proteína estudada e o que se estaria

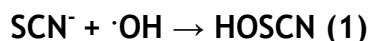
estruturalmente protegendo (NAMUR *et alii*, 2009). Naturalmente, que a estrutura da proteína praticamente definiria o uso do aditivo escolhido para protegê-la. As generalizações que são feitas ficam então prejudicadas (NAMUR *et alii*, 2009).

Admitiu-se que o mais simples então, seria o uso moléculas mais simples como os sais da série de Hoffmeister (NAMUR *et alii*, 2009), de longo uso na literatura. Vale ressaltar, que uma discussão profunda do efeito destes sais em nível molecular ainda é um campo em aberto, fugindo do escopo desta dissertação, uma vez que existem várias teorias (ZHANG e CREMER, 2006; DÉR *et alii*, 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 estabilizam (DÉR *et alii*, 2007). De um modo geral o efeito dos sais da série de Hoffmeister é mais acentuado pelos anions do que pelos cátions (ZHANG e CREMER, 2006).

Ao contrário de outras investigações onde o caotrópico SCN^- protegeu o Dtxd de precipitação (95 % de recuperação) na agitação em presença de CH_2Cl_2 (NAMUR *et alii*, 2009) aqui, nesta dissertação, houve diminuição da solubilidade em 73 % na presença de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. Ambos são solventes orgânicos e a proteína é a mesma! Resumindo, a solubilidade de Dtxd passou de 95 % quando sonificado na presença de CH_2Cl_2 para 27 % na presença de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$, ambos contendo SCN^- . Além disto, houve muitas diferenças nas frações solúveis do Dtxd sonificado na presença de CH_2Cl_2 ou na presença de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. Sabe-se, pela literatura (THOMAS, BOZEMAN e LEARN, 1991) que o SCN^- pode ser oxidado por peroxidase em solução. Aqui, o mecanismo de oxidação seria outro. Muito provavelmente na

situação gerada pela sonicação houve formação de radicais $\cdot\text{OH}$, que podem ter reagido com o SCN^- , formando o ácido hipotiocianoso.

Assim,



O HOSCN é um agente oxidante fraco que reage com grupos sulfidril, como, por exemplo, no Dtxd. Numa forma simplista, o Dtxd poderia ser representado como FA-S-S-FB (NAMUR e BUENO DA COSTA, 2004), poderia ter sido convertido em derivados tiocianato-sulfenila ou disulfetos (RSSCN ou RSSR) como foi descrito para outras moléculas (THOMAS, BOZEMAN e LEARN, 1991). Assim, propõe-se que a reação seja a seguinte:



Por esta razão é que a diminuição de monômeros de Dtxd teria ocorrido *in tandem* com o aumento de FA e FB (Figura 4).

O interessante foi que todos os outros íons estudados, exceto o PO_4^{2-} independentemente de serem caotrópicos (SCN^- e Mg^{2+}) ou cosmotrópicos (Cl^-) diminuíram a solubilidade de Dtxd durante a sonicação. Portanto o íon escolhido para a formulação de Dtxd em REVs foi o PO_4^{2-} . O mecanismo de ação deste íon, como de outros, ainda é um fenômeno em aberto. As variações da água de hidratação pela adição de sais não explica o efeito específico dos íons (ZHANG e CREMER, 2006; BIRESAW, MCKENZIE e BUNTON, 1985). O Dtxd estava em água e os íons foram adicionados após. Neste pH 6,5 a carga líquida de Dtxd era negativa e estava a 2,3 unidades de pH acima de seu pI (CAMPANA *et alii*, 2004).

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 sonicação a 40 W que aumentou enormemente a área de contacto. Portanto, aqui, o fenômeno de Hoffmeister precisa ser entendido em termos de interações entre íons e as macromoléculas (NAMUR, *et alii*, 2009; ZHANG e CREMER, 2006). O íon escolhido para ser usado na formulação foi o PO_4^{2-} por ter protegido a conformação “nativa” (inicial) do Dtxd: sem desenovelamento, sem exposição de resíduos hidrofóbicos e imunologicamente reconhecida. O Dtxd encapsulado em REVs-Chi-PVA nestas condições foi liberado controladamente e com a conformação imunologicamente reconhecida (**Figura 29**). Esta formulação de REVs, a REVs-Chi-PVA/Dtxd, foi estabilizada graças às presenças de Chi e PVA.

A maior vantagem do uso de Chi no desenvolvimento de partículas para veículos de uso oral é a sua alta propriedade de mucoadesão devido, segundo a literatura, às interações iônicas entre os grupos aminos primários carregados positivamente deste polímero e os grupos dos ácidos siálico e sulfônico, carregados negativamente presentes no muco (CHAYED e WINNIK, 2007; ILLUM, JABBAL-GILL e HINCHCLIFFE, 2001; HASSAN e GALLO, 1990). Nesta dissertação, a Chi aumentou em 35 % a adesibilidade das vesículas REVs-Chi em relação às REVs (**Figura 20**), o que é corroborado por outros dados da literatura (CHAYED e WINNIK, 2007; ILLUM, JABBAL-GILL e HINCHCLIFFE, 2001; TAKEUCHI *et alii*, 1996; HASSAN e GALLO, 1990). Este aumento de 35 % na adesibilidade de REVs-Chi à mucina, obtido nesta dissertação, poderia ser ainda melhorado.

Sabe-se que a propriedade de mucoadesibilidade da Chi pode ser aumentada através da formação de derivados contendo lipídeos (SVENSSON,

THURESSON e ARNEBRANT, 2008) ou grupo tiol (BERNKOP-SCHNÜRCH *et alii*, 2006), dentre outros. Estes grupos tióis na Chi formam ligações S-S com regiões ricas em resíduos de cisteínas no muco (BERNKOP-SCHNÜRCH, *et alii*, 2006; ROLDO *et alii*, 2004; LEITNER *et alii*, 2004), o que explicaria a sua maior adesibilidade. Entretanto, estas modificações químicas de Chi, implicam em aumento de custo (reagente; pessoal) e, para uma ampla utilização em saúde pública, não é desejável na formulação em estudo (MARTINO, SITTINGER e RISBUD, 2005; HUANG *et alii*, 2005_a; KHOR e LIM, 2003; MADIHALLY e MATTEW, 1999). Mas, restava uma questão em aberto: a agregação das partículas de REV-Chi entre si. O PVA foi usado, como em outras preparações da literatura como um “surfactante” não iônico para evitar que as partículas se colabassem e se agregassem (BUENO DA COSTA, 2000).

Além do efeito estabilizador do PVA, o mais interessante a ser notado nesta dissertação foi a **imensa afinidade de PVA pela Mu- III (Figura 19)**. Houve **uma diferença de 2000 vezes da sua afinidade pela mucina** quando comparado com a afinidade da Chi pela Mu-III. Este fato foi explorado aqui, adicionando-o à formulação de REV-Chi, transformando-a em REV-Chi-PVA. Sabe-se que a afinidade grande pela Mu-III seria esperada pela Chi particulada (CUI, QIAN e YIN, 2006; TAKEUCHI, YAMAMOTO e KAWASHIMA, 2001), mas não pelo PVA (HE, DAVIS e ILLUM, 1998), apesar de ter sido observado aqui (**Figuras 19 e 20**). Foram observadas diferentes proporções de adesão entre PVA-mucina, indo de 0,5 % (HE, DAVIS e ILLUM, 1998) até 22 % (TAKEUCHI *et alii*, 1996). Aqui, os sistemas de estudo foram mais complexos: a Chi estava adsorvida às REVs de SPC: Cho (6:1); o PVA estava adsorvido às REV-Chi. Portanto, no sistema particulado (REV-Chi-PVA) tinha muito menos PVA disponível para ser adsorvido

à Mu- III do que em solução. Mesmo assim, as REVs-Chi-PVA se adsorveram 20 % a mais à Mu-III do que as REVs-Chi (**Figura 20**). O mais interessante seria ver se haveria correlação entre o comportamento destas partículas *in vitro* com suas utilizações *in vivo*.

As interações entre partículas revestidas por Chi e mucina têm sido explicadas como sendo de natureza iônica (CHAYED e WINNIK, 2007; TAKEUCHI *et alii*, 2005; ILLUM, JABBAL-GILL e HINCHCLIFFE, 2001; HE, DAVIS e ILLUM, 1998; TAKEUCHI *et alii*, 1996; HASSAN e GALLO, 1990). Entretanto se se consideram que os potenciais ζ das partículas lipossomais observados nesta dissertação (REVs; REVs-Chi; REVs-Chi-PVA foram - 9,40, -4,66 e -7,51) foram todos negativos e que a mucina tem também carga negativa, deveria haver uma repulsão entre as REVs e Mu e não atração como a que se observou (**Figura 20**). Na melhor das hipóteses, a interação não deveria existir e isto contraria a literatura (CHAYED e WINNIK, 2007; TAKEUCHI *et alii*, 2005; ILLUM, JABBAL-GILL e HINCHCLIFFE, 2001; HE, DAVIS e ILLUM, 1998; TAKEUCHI *et alii*, 1996; HASSAN e GALLO, 1990).

A melhor hipótese que se aceita é que a natureza da interação entre PVA e Mu seja através de pontes de hidrogênio, como o que se observou nesta dissertação. Portanto, a capacidade de formar pontes de hidrogênio com a mucina é um requerimento sem o qual não há adesão entre os polímeros (THOMAS e PEPPAS, 2008; PEPPAS *et alii*, 2000; BANSIL, STANLEY e LAMONT, 1995; STROUS e DEKKER, 1992). Têm sido muito estudadas as interações através de pontes de hidrogênio entre polímeros mucoadesivos como o policianoacrilato (PAA) e o muco (BURES e PEPPAS, 1999; SMART, KELLAWAY e WORTHINGTON, 1984). As pontes de hidrogênio entre PVA e Mu existem isto é um fato. A

existência das pontes de hidrogênio é razoável quando se pensa na estrutura da mucina com os seus grupos carboxila das cadeias ramificadas dos açúcares, o ácido carboxílico e sulfato nos segmentos terminais das ramificações dos carboidratos. Foram estas pontes de hidrogênio que aumentaram tanto a afinidade de PVA por Mu (**Figura 19**). Entretanto, ressalta-se que só a presença de PVA não é condição necessária para que haja interação entre partículas recobertas e células, por exemplo, (NAKANO, TOZUKA e TAKEUCHI, 2008).

Foi muito interessante observar como a presença de Chi e/ou PVA nos REVs mudou completamente o seu tamanho e a estrutura da bicamada lipídica. As partículas lipossomais revestidas por Chi foram maiores do que as REVs contendo somente SPC: Cho (6: 1) (**Figura 43**). Sabe-se, da literatura (VOROB'EV *et alii*, 2007) que a presença de um soluto na água induz às modificações na estrutura da água e da camada de hidratação desta molécula. Em condições fisiológicas a Chi é capaz de captar 160 % mais de água (SILVA *et alii*, 2004) o que pode ser muito explorado em engenharia biomédica de tecidos (MANO, 2008). Aqui, a Chi aumentou não só o grau de hidratação e, conseqüentemente, o tamanho (167 nm → 313 nm) e a morfologia dos REVs (**Figura 43**), como também aumentou o tempo de residência do Dtxd no compartimento aquoso interno do lipossoma (**Figura 31**). Por causa do aumento do tamanho de lipossomas (127,1 nm → 161,2 nm) após a adição de PVA-R (com âncora hidrofóbica) admite-se que exista a associação deste polímero com a bicamada lipídica (NAKANO, TOZUKA e TAKEUCHI, 2008) o que corrobora os resultados obtidos nesta dissertação. Aqui, visivelmente (**Figura 43**) o PVA, também aumentou tamanho de REVs-Chi (313 nm → 367 nm, medido por espalhamento

quase elástico de luz) e modificou a morfologia da bicamada, que ficou mais densa (**Figura 43**).

Alguns géis, chamados de materiais ou polímeros inteligentes (ou géis sensíveis ao meio) são sensíveis ao meio: temperatura, campo magnético, composição do solvente, pH ou luz (JUODKAZIS *et alii*, 2000; SEIDA e NAKANO, 1994) mudando de estado ou de volume, por exemplo. Destacam-se dentre eles o NIPA (polivinil-acrilamida), PVME (poli vinil metil éter) e PVA (YAMAMOTO *et alii*, 2003). O PVA expande ou se contrai (35 %), reversivelmente, de acordo com a temperatura, o que é explicado em termos de hidratação- desidratação. O PVA capta água através de pontes de hidrogênio em temperatura ambiente. A partir de 37°C, o PVA descarta água (YAMAMOTO *et alii*, 2003). Aqui, não se observou este fenômeno (mudança de tamanho com a temperatura) porque fugia do escopo desta dissertação, mas, observou-se uma mudança na morfologia e na densidade da bicamada lipídica, o que pode estar associado com os graus de hidratações diferentes entre fosfolipídeo-Chi (REVs-Chi) e fosfolipídeo-Chi associada à PVA (REVs-Chi-PVA) (**Figura 43**) mudando os seus raios hidrodinâmicos (**Tabela 2**). No caso do PVA aparentemente houve exclusão de água da camada de hidratação (**Figura 43**). Ambos, Chi e PVA controlaram a velocidade de saída do soluto encapsulado (Dtxd) (**Figuras 29- 31**), como o descrito na literatura (JAIN, SHARMA e VYAS, 2006) diminuindo-a em relação à REVs. O mais interessante destes dados foi observar as correlações entre as capacidades de adsorções diferentes nas partículas estudadas e as suas características diferentes de induzir as formações de anticorpos contra Dtxd nos camundongos.

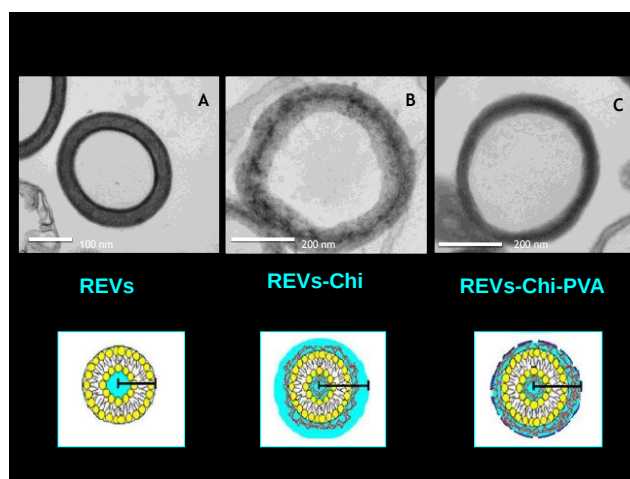


Figura 43. Efeitos de Chi e PVA no raio hidratação e na estrutura da bicamada de REVs (SPC: Cho, 6:1).

Existem muitas evidências experimentais demonstrando que a nanoencapsulação modifica a captura, o tráfico e o processamento do antígeno além do efeito adjuvante mediado pelo próprio veículo ou ainda através de outra molécula adicionada aos lipossomas, polímeros ou outros sistemas particulados (BRAMWELL e PERRIE, 2006). Como se discutiu anteriormente, aqui o foco foi o desenvolvimento de um veículo para vacina oral para a produção de anticorpos de mucosa, a saber, os IgAs.

O que se observa é que quando antígenos são veiculados em sistema particulados de liberação controlada contendo Chi há sempre um aumento na resposta imunológica, quanto à produção de IgAs (AHIRE *et alii*, 2007; AMIDI *et alii*, 2007; JAIN, SHARMA e VYAS, 2006; VAN DER LUBBEN *et alii*, 2003 e VAN DER LUBBEN *et alii*, 2001). O que deve ser ressaltado aqui é a correlação entre a complexidade de cada partícula obtida (REVs, REVs-Chi ou REVs-Chi-PVA), contendo Dtxd, e a produção de IgAs.

Houve uma correlação direta entre produção de **IgA salivar** tanto animais injetados através da via oral ($R = 0,91766$) quanto da via subcutânea

($R = 0,99718$) e a interação de Mu com REVs ou as partículas revestidas quer seja com Chi ou com Chi-PVA. Houve uma correlação direta entre produção de IgA vaginal tanto animais injetados através da via oral ($R = 0,99718$) quanto da via subcutânea ($R = 0,98624$) e a interação de Mu com REVs ou as partículas revestidas quer seja com Chi ou com Chi-PVA. Não houve resposta secundária quando o toxóide foi administrado livre aos animais. Houve uma correlação direta entre a complexidade da formulação e resposta secundária quanto à produção de IgA ou seja, REVs < REVs-Chi < REVs-Chi-PVA, tanto após 7 dias quanto após 26 dias da administração da dose de reforço. Estes dados, e este tipo de análise são os únicos na literatura. Infelizmente o que se analisa é a simples produção de IgA, sem contudo correlacioná-la com as propriedades das partículas (AHIRE *et alii*, 2007; AMIDI *et alii*, 2007; JAIN, SHARMA e VYAS, 2006; VAN DER LUBBEN *et alii*, 2003). Mesmo quando a intenção foi a de se produzir uma vacina oral e *mesmo com imunização por nebulização*, o que se analisa é a produção de IgG, que é não é um anticorpo produzido predominantemente em mucosa (ALPAR *et alii*, 2001; MIRSCHAMSY *et alii*, 1996)!

Houve produção de IgG₁ em todos os animais imunizados tanto através da **oral** quanto naqueles imunizados **via subcutânea** as formulações lipossomais usadas e também com Dtxd foi administrado na forma livre. Entretanto poucos (AMIDI *et alii*, 2007) descrevem a produção de subtipos de IgG na literatura (HAGENAARS *et alii*, 2009; AHIRE *et alii*, 2007; VAN DER LUBBEN *et alii*, 2003). Foram observadas produções de IgG₁ anti Dtxd desde os primeiros dias após a imunização, mas as respostas foram maiores nas formulações com Chi ou Chi-PVA em comparação a REVs e à forma livre. Este

efeito foi muito mais acentuado naqueles animais imunizados através da via subcutânea. Não houve **resposta secundária quanto IgG₁** quando o toxóide diftérico foi administrado livre aos animais, salvo na administração por via oral após 7 dias da dose de reforço (**Figura 40 A**). Houve uma correlação direta entre a complexidade da formulação e resposta secundária quanto à produção de IgG₁, ou seja, livre < REVs < REVs-Chi < REVs-Chi-PVA, após 26 dias da administração da dose de reforço. Após 7 dias tanto REVs-Chi quanto REVs-Chi-PVA apresentaram mesma resposta secundária quanto à produção de IgG₁ mas, ambas, maiores do que a formulação livre ou REVs.

Como descrito (HAGENAARS *et alii*, 2009; AMIDI *et alii*, 2007), aqui houve produção de **IgG_{2a}** nos animais imunizados com as formulações veiculadas em lipossomas revestidos por Chi e/ou PVA. Esta produção foi observada tanto nos animais imunizados através da via oral quanto nos animais imunizados através da via subcutânea (nesta REVs também ativo). ***Nitidamente observou-se aqui que apesar de REVs ter um efeito adjuvante, este não se manifesta nos animais imunizados oralmente por causa da destruição dos lipossomas pelo trato gastrointestinal.*** O Dtxd livre também é destruído ***nos animais imunizados oralmente por causa do trato gastrointestinal e por isto só se produz IgG_{2a} nos animais injetados subcutaneamente.*** Não houve resposta secundária quanto à formação de IgG_{2a} quando o toxóide foi administrado livre e em REVs, **por via oral**, aos animais. Na via oral, tanto em 7 dias quanto 26 dias após a dose de reforço a resposta secundária para REVs-Chi foi maior do que para REVs-Chi-PVA. Houve uma correlação direta entre a complexidade da formulação e resposta secundária quanto à produção de IgG_{2a} ou seja, livre < REVs < REVs-Chi. Porém

a resposta da produção de IgG_{2a} às formulações de REVs-Chi e REVs-Chi-PVA foram iguais, tanto após 7 dias quanto após 26 dias da administração da dose de reforço pela **via subcutânea**.

Sabe-se que os IgGs são produzidos na seguinte ordem: IgG₁ > IgG₃ > IgG_{2a}. Os anticorpos neutralizantes são devido, principalmente, ao IgG₁ (mais abundante) mas, o IgG_{2a} é mais específico e está relacionado com a maturidade imunológica (MARÓN *et alii*, 2007; SILVA *et alii*, 2006; BUENO DA COSTA, 2006; YADAV e KHULLER, 2001). O IgG_{2a} está relacionado com a resposta do tipo Th1 (celular) e o IgG₁ com a resposta Th2 (humoral) (YADAV e KHULLER, 2001).

Aqui, as relações IgG_{2a}/IgG₁ foram de 0,4; 0,09; 1,15 e 0,81 para formulações com Dtxd livre; REVs/Dtxd; REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd respectivamente, nos animais imunizados oralmente. As relações IgG_{2a}/IgG₁ foram de 0; 1,4; 0,80 e 0,84 para formulações com Dtxd livre; REVs/Dtxd; REVs-Chi/Dtxd e REVs-Chi-PVA/Dtxd respectivamente, nos animais imunizados através da via subcutânea. A maturidade imunológica dos animais injetados com Dtxd só foi alcançada por aqueles animais que foram imunizados com formulações lipossomais (REVs ou REVS-Chi). Observou-se que houve uma mudança razoável no perfil de produção de anticorpos anti-Dtxd 10 dias depois da dose de reforço induzidas pelas formulações REVs-Chi por camundongos imunizados pela via oral e REVs nos animais imunizados através da via subcutânea. Ambas produziram mais IgG_{2a} do que IgG₁ ou seja, as relações IgG_{2a}/IgG₁>1.

Conforme queria demonstrar, as formulações desenhadas para vacinação através da via oral, REVs-Chi/Dtxd e melhoradas quanto às suas estabilidades (REVS-Chi-PVA/Dtxd), resultaram em sucesso absoluto, pois induziram respostas imunológicas de mucosa e, além disto, melhoraram as produções de anticorpos neutralizantes e memória imunológica. Em adição, ambas as partículas também melhoraram a resposta imunológica da vacinação através da via subcutânea.

Sabendo-se do que:

- *Todos os produtos usados para a confecção da formulação REVs-Chi-PVA (SPC, Cho, Chi e PVA) são atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e de baixo custo.*
- *A formulação pode ser executada em condições isentas de germes.*
- *Os resultados de sua utilização foram muito além das expectativas.*

Considerou-se que a sua aplicação em Saúde Pública é economicamente viável. Seria necessário somente um estudo de escalonamento do processo como um todo. Os trabalhos, em nível de bancada, já foram dominados, conforme o que se queria demonstrar.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O cosmotrópico PO_4^{2-} aumentou a solubilidade (98 %) e protegeu a estrutura de Dtxd durante a formação de micela reversa no processo de produção de REVs. O SCN^- não só diminuiu a solubilidade inicial de Dtxd como também induziu, na presença de $\cdot\text{OH}$ (produzido durante a sonicação), a lise das ligações S-S da molécula. O Dtxd, sonicado na presença de PO_4^{2-} , reteve a sua conformação inicial e continuou a ser reconhecido imunologicamente.

Foram obtidas partículas redondas de REVs (256 a 524 nm), com as superfícies esponjosas, regulares, estáveis, resistentes ao suco gástrico e intestinal. O tamanho dos REVs e as eficiências de encapsulações para o Dtxd aumentaram com a adição de Chi e de PVA. Houve uma correlação direta entre mucina adsorvida e carga superficial das partículas, ou seja, potencial ζ . A afinidade de PVA em solução por Mu foi 2000 vezes maior do que aquela observada com a Chi. A afinidade de REVs-Chi-PVA por Mu-III foi 20 % maior do que aquela observada com as REVs-Chi. A trealose protegeu o Dtxd de danos durante a liofilização e durante a sua liberação das partículas. A trealose aumentou o tempo de residência do toxóide nas REVs (em todas as diferentes formulações). O Dtxd liberado das partículas reteve a sua atividade imunológica (*in vitro*).

Houve uma correlação direta entre a complexidade da formulação e resposta secundária quanto à produção de anticorpos. As formulações desenhadas para vacinação através da via oral, REVs-Chi/Dtxd e melhoradas quanto às suas estabilidades (REVS-Chi-PVA/Dtxd), resultaram em sucesso absoluto, pois induziram respostas imunológicas de mucosa e, além disto,

melhoraram as produções de anticorpos neutralizantes e memória imunológica. Em adição, ambas as partículas também melhoraram a resposta imunológica da vacinação através da via subcutânea.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando o sucesso da formulação estudada pode-se prever para o futuro os seguintes propósitos:

1. Estudo da viabilidade de se escalonar o processo de produção de REVs recobertas com Chi e PVA.
2. Aplicá-lo para a encapsulação de outros antígenos de interesse para veiculação tanto oral quanto subcutânea.
3. Aplicá-lo para o transporte de moléculas (drogas) diferentes de proteínas.
4. Fazer um estudo econômico da produção em larga escala de REVs-Chi-PVA como veículo geral de transporte oral de drogas e/ou vacinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AHIRE, VJ; SAWANT, KK; DOSHI, JB e RAVETKAR, SD (2007). Chitosan microparticles as oral delivery system for tetanus toxoid. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **33**: 1112- 1124.

ALLISON, AC e GREGORIADIS, G (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*, **252**: 252.

ALONSO, MJ; GUPTA, RK; MIN, C; SIBER, GR e LANGER, R (1994). Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine*, **12** (4): 299- 306.

ALPAR, HO; EYLES, JE; WILLIAMSON, ED e SOMAVARAPU, S (2001). Intranasal vaccination against plague, tetanus and diphtheria. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **51**: 173- 201

AMIDI, M; PELLIKAAN, HC; HIRSCHBERG, H; BOER, AH; CROMMELIN, DJA; HENNINK, WE; KERSTEN, G e JISKOOT, W (2007). Diphtheria toxoid-containing microparticle powder formulations for pulmonary vaccination: Preparation, characterization and evaluation in guinea pigs. *Vaccine*, **25**: 6818- 6829.

AOKI, T; DECKER, EA e McCLEMENTS, DJ (2005). Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocoloids*, **19**: 209- 220.

BANSIL, R; STANLEY, E e LAMONT, JT (1995). Mucin biophysics. *Annu. Rev. Physiol.*, **57**: 635- 657.

BENNETT, MJ; CHOE, S e EISENBERG, D (1994). Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 3127- 3131.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A; WEITHALER, A; ALBRECH, K e GREIMEL, A (2006). Thiomers: Preparation and *in vitro* evaluation of mucoadhesive nanoparticle drug delivery system. *Int. J. Pharm.*, **317**: 76- 81.

BIRESAW, G; MCKENZIE, DC e BUNTON, CA (1985). 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.*, **89**: 5144- 5146.

BOSTRÖM, M; WILLIAMS, DRM e NINHAM, BW (2003). Specific ion effects: Why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hoffmeister series. *Biophysical J.*, **85**: 686- 694.

BRAMWELL, VW e PERRIE, Y (2006). Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**: 717- 728.

BRAYDEN, DJ (2001). Oral vaccination in man using antigens in particles: current status. *Eur. J. of Pharma. Sci.*, **14**: 183- 189.

BUENO DA COSTA, MH (2006). A biotechnological approach to formulate vaccines within liposomes, Chapter 20, pp 387-403, in: *Liposome Technology 3rd Edition* (Gregory Gregoriadis, Editor) CRC Press.

BUENO DA COSTA, MH (2000). Microencapsulação de macromoléculas em polímeros biodegradáveis, Projeto FAPESP: 00/10490-7.

BUENO DA COSTA, MH; SANT'ANNA, AO; DE ARAUJO, OS; SATO, RA; QUINTILIO, W; SILVA, LVN; MATOS, CRT e RAW, I (1998). Conformational stability and antibody response to the 18kDa heat shock protein formulated into different vehicles. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **73**: 19- 28.

BURES, P e PEPPAS, NA (1999). Structural and Morphological Characteristics of Carriers Based on Poly (Acrylic Acid). *Polym. Prepr.*, **40 (1)**: 345- 346.

CAMPANA, RA; NAMUR, JAM; TAKATA, CS; ARAUJO, PS de e BUENO DA COSTA, MH (2004). Ionic interfaces and diphtheria toxoid interactions. *Prot. Expr. Purif.*, **33**: 161- 165.

CAMPO, VL E CARVALHO, I. (2008). Síntese de glicoaminoácidos de interesse biológico. *Quím. Nova*, **31**: 5.

CARPENTER, JF e CROWE, JH (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, **8**: 3916- 3922.

CASTELLANOS, IJ; CRUZ, G; CRESPO, RC e GRIEBENOW, K (2002). Encapsulation-induced aggregation and loss in activity of γ -chymotrypsin and their prevention. *J. Control. Rel.*, **81**: 307- 319.

CASTRO, C; GARGALLO, L; LEIVA, A e RADIC, D (2005). Interactions in blends containing chitosan with functionalized polymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, **97**: 1953- 1960.

CHAYED, S e WINNIK, FM (2007). *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of polysaccharide-based nanoparticulate oral drug delivery systems. *Eur. J. Pharma. Biopharma.*, **65**: 363- 370.

CHUANG, WY; YOUNG, TH; YAO, CH e CHIU, WY (1999). Properties of the poly (vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast *in vitro*. *Biomaterials*, **20**: 1479- 1487.

COSTA-JUNIOR, ES; PEREIRA, MM e MANSUR, HS (2009). Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically cross linked. *J. Mater. Sci. Med.*, **20**: 553- 561.

CROWE, LM; CROWE, JH, RUDOLF, C; WOMERSLEY, C e APPEL, L (1985). Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**: 240- 247.

CUI, F; QIAN, F e YIN, C (2006). Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **316**: 154- 161.

DALY, JC e McGRATH, JC (2003). Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Phar. Therap.*, **100**: 101- 118.

DELATTRE, J; COUVREUR, P; PUISIEUX, F; PHILIPPOT, JR e SHUBER, F. (1993). Les Liposomes. Paris: *INSERM*.

DÉR, A; KELEMEN, L ; FÁBIÁN, L; TANEVA, SG ; FODOR, E; PÁLI, T; CUPANE, A; CACACE, MG e RAMSDEN, JJ (2007). Interfacial water structure controls protein conformation. *J. Phys. Chem. B.*, **111**: 5344: 5350.

DIWAN, M e PARK, TG (2001). Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. *J. Control. Rel.*, **73**: 233- 244.

Drugs@FDA FDA approved drug products. <http://www.accessdata.fda.gov>, em 10/04/2007.

FANG,N; CHAN, V; MAO, H e LEONG, KW (2001). Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromol.*, **2**: 1161- 1168.

FELNEROVA, D; VIRET, J; GLÜCK, R e MOSER, C, (2004), Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr. Opinion in Biotech.*, **15**: 518- 529.

FENG, SS; RUAN, G e LI, QT (2004). Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM) *Biomaterials* **25**: 5181-5189

FILIPOVIC-GRIC, N; SKALKO-BASNET e JALSENJAK (2001). Mucoadhesive chitosan-coated liposomes: characteristics and stability. *Microencapsul.*, **18**: 1, 3-12.

FRY, DW; WHITE, JC e GOLDMAN, ID (1978). Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Anal. Biochem.*, **90**: 809- 815.

GLENNY, AT e HOPKINS, BE (1923). Diphtheria toxoid as an immunizing agent. *Br. J. Exp. Pathol.*, **4**: 283- 288.

GORDON, S; SAUPE, A; McBURNEY, W; RADES, T e HOOK, S (2008). Comparison of chitosan nanoparticles and chitosan hydrogels for vaccine delivery. *J. Pharma. Pharmacol.*, **60**: 1591- 1600.

GREENFIELD, N e FASMAN, GD (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, **8**: 4108- 4116.

GREGORIADIS, G; WANG, Z; BARENHOLZ, Y e FRANCIS, MJ (1993). Liposome-entrapped T-cell peptides help for a co-entrapped B-cell peptide to overcome genetic restriction in mice and induce immunological memory. *Immunology*, **80**: 535- 540.

GREGORIADIS, G e RYMAN, BE (1971). Liposomes as carriers of enzymes or drug: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem. J.*, **124**: 58.

GU, YS; DECKER, EA e McCLEMENTS, DJ (2005). Influence of pH and carageenan type on properties of beta-lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoloids*, **19**: 83- 91.

GUZEY, D e McCLEMENTS, DJ (2007). Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by beta-lactoglobulin-pectin complexes. *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2): 475- 485.

HAAS, J; RAVI KUMAR, MNV; BORCHARD, G; BAKOWSKY, U e LEHR, CM (2005). Preparation and characterization of chitosan and trimethyl-chitosan-modified Poly-(ε-caprolactone) nanoparticles as DNA carriers. *AAPS Pharma. Sci. Tech.* **6** (1): article 6 (<http://www.aapspharmascitech.org>).

HARNSILAWAT, T; PONGSAWATMANIT, R e McCLEMENTS, DJ (2006). Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein-polysaccharide electrostatic complexes format at the oil-water interface. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 5540-5547.

HASSAN, EE e GALLO, JM (1990). A simple rheological method for the *in vitro* assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharm. Res.*, **7**: 491-495.

HAGENNARS, N; MASTROBATTISTA, E; VERHEUL, RJ; MOOREN, I; GLANSBEEK, HL; HELDENS, JGM; BOSH, H e JISKOOT, W (2009). Physicochemical and immunological characterization of N,N,N-Trimethyl chitosan-coated whole inactivated Influenza virus vaccine for intranasal administration. *Pharma. Res.*, **26** (6): 1353- 1364.

HE, P; DAVIS, SS e ILLUM, L (1998). *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int. J. of Pharma.*, **166**: 75- 88.

HEJAZI, R e AMIJI, M (2002). Stomach-specific anti-H. Pylori therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.*, **235**: 87- 94.

HUANG, Y; GAO, J; LIANG, W e NAKAGAWA, S, (2005). Preparation and characterization of liposomes encapsulating chitosan nanoparticles. *Biol. Pharm. Bull.*, **28** (2): 387- 390.

HUANG, Y; ONIERY, S; SIEWE, M e MOSHFEGHIAN, SV (2005). *In vitro* characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, **26**: 7616- 7627.

ILLUM, L; JABBAL-GILL, I e HINCHCLIFFE, M (2001). Chitosan as a novel nasal delivery systems for vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **51**: 81- 96.

JAIN, S; SHARMA, RK e VYAS, SP (2006). Chitosan nanoparticles encapsulated vesicular systems for oral immunization: preparation, *in-vitro* and *in-vivo* characterization. *Pharm. Pharmacol.*, **58**: 303- 310.

JAWALKAR, SS; RAJU, VSN; HALLIGUDI, SB; SAIRAM, M e AMINABHAVI, TM (2007). Molecular modeling simulations to predict compatibility of poly (vinyl alcohol) and chitosan blends: A comparison with experiments. *J. Phys. Chem. B.*, **111**: 2431- 2439.

JUODKAZIS, S; MUKAI, N; WAKAKI, R; YAMAGUCHI, A; MATSUO, S e MISAWA, H (2000). Reversible phase transitions in polymer gels induced by radiation forces. *Nature*, **408 (6809)**: 178- 181.

KHOR, E e LIM, L (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, **24**: 2339- 2349.

KIM, SJ; PARK, SJ e KIM, SI (2003). Swelling behavior of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan. *React. Funct. Polym.*, **55**: 53- 59.

KLINKERSON, U; SOPHANODORA, P; CHINACHOTI, P; DECKER, EA e McCLEMENTS, DJ (2005a). Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *J. Agric. Food Chem.*, **53 (21)**: 8365- 8371.

KLINKERSON, U; SOPHANODORA, P; CHINACHOTI, P; DECKER, EA e McCLEMENTS, DJ (2005b). Increasing oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with electrostatic layer-by-layer deposition technology. *J. Agric. Food Chem.*, **53 (11)**: 4561- 4566.

KO, JA; PARK, HJ; HWANG, YS e PARK, JB, (2003). Chitosan microparticle preparation for controlled drug release by response surface methodology. *J. Microenc.*, **18**: 165- 173.

KOKIL, S; PATIL, P; MAHADIK, K e PARADKAR, A (2005). Studies on spray-dried mixtures of chitosan and hydrolyzed gelatin as tablet blinder: A technical note. *AAPS Pharma. Sci. Tech.*, **6 (3)**: article 54
(<http://www.aapspharmacitech.org>).

KURKURI, MD e AMINABHAVI, TMJ (2004). Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine. *J. Control. Rel.*, **96**: 9- 20.

LASIC, DD e PAPAHAJOPOULOS, D, (1998), General Introduction, em Medical application of liposomes. (LASIC, DD e PAPAHAJOPOULOS, D Ed.). *Elsevier Sci.*, 1- 16.

LASIC, DD (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotech.*, **16**: 307- 321.

LAYE, C; McCLEMENTS, DJ e WEISS, J (2008). Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. *J. of Food Sci.*, **73 (5)**: N7-N15.

LEE, DW; PARK, SJ; PARK, JB e PARK, HJ, (2003). Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microsphere. *J. Microenc.*, **20**: 179- 192.

LEITNER, VM; GUGGI, D; KRAULAND, AH e BERNKOP-SCHNÜRCH, A (2004). Nasal delivery of human growth hormone: *in vitro* and *in vivo* evaluation of a thiomers/glutathione microparticulate delivery system. *J. Control. Rel.*, **100**: 87- 95.

LI, H; WANG, M; SONG, L e GE, X (2008). Uniform chitosan hollow microspheres prepared with the sulfonated polystyrene particles templates. *Colloid Polym. Sci.*, **286**: 819- 825.

LIU, Y; VRANA, NE; CAHILL, PA e McGUINNESS, GB (2009). Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. *J. of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. (14th January, 2009). (<http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.31310>).

MANO, JF (2008). Viscoelastic properties of chitosan with different hydration degrees as studied by dynamic mechanical analysis. *Macromol. Biosci.*, **8**: 69-76.

MADIHALLY, SV e MATTHEW, HWT, (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, **20**: 1133- 1142.

MARÓN, LB; PENICHE, C; DA SILVEIRA, NP; POHLMANN, A; MERTINS, O; TATSUO, LN; SANT'ANNA, AO; MORO, AM; TAKATA, CS; ARAUJO, PS de e BUENO DA COSTA, MH (2007). LUVs recovered with chitosan: a new preparation for vaccine delivery. *J. Lip. Res.*, **15**: 155- 163.

MARTINO, AD; SITTINGER, MV e RISBUD, MV (2005). Chitosan: A versatile biopolymer for orthopedic tissue-engineering. *Biomaterials*, **29**: 5983- 5990.

McGRATH, JC e DALY, JC (2003). Do fluorescent drugs show you more than you wanted to know? *Brit. J. Pharm.*, **109**: 187- 189.

McGRATH, JC; ARRIBAS, S e DALY, JC (1996). Fluorescent ligands for the study of receptors. *Elsevier Sci.*, **17**: 393.

MERTINS, O; SEBBEN, M; POHLMANN, AR e SILVEIRA, NP (2005). Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. *Chem. Phys. Lip.*, **138**: 29- 37.

MEDINA, E e GUZMAN, CA (2000). Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **27**: 305- 311.

MEINEL, L; ILLI, OE; ZAPF, J; MALFANTI, M; MERKLE, HP e GANDER, B (2001). Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Rel.*, **70**: 193- 202.

MIRCHAMSY, H; MANHOURI, H; HAMED, PARVIZ AHOURAI, M; FATEH, G e HAMZELOO, Z (1996). Stimulating role of toxoids-laden liposomes in oral immunization against diphtheria and tetanus infections. *Biologicals*, **24**: 343- 350

MS (Ministério da Saúde), 23/06/2009: <http://portal.saude.gov.br> (Casos registrados de difteria).

MUZZARELLI, RAA (1998). Colorimetric determination of chitosan. *Anal. Biochem.*, **260**: 255- 257.

NAKANO, K; TOZUKA, Y e TAKEUCHI, H (2008). Effect of surface properties of liposome coated with a modified polyvinyl alcohol (PVA-R) on the interaction with macrophage cells. *Int. J. Pharma.*, **354**: 174- 179.

NAMUR, JAM; TAKATA, CS; ARAUJO, PS de e BUENO DA COSTA, MH (2009). Hoffmeister series ions protect Diphtheria toxoid from structural damages at solvent/water interface. *Materials*, **2**: 765- 775.

NAMUR, JAM e BUENO DA COSTA, MH (2004). How protein is degraded by Poly lactide-co-glycolide (PLGA) microspheres. *RMZ Mat. and Geonvironment*, **51** (1): 479- 483.

NAMUR, JAM; TAKATA, CS; ARAUJO, PS de e BUENO DA COSTA, MH (2004). How Hoffmeister ions series interferes on the Dtxd (diphtheria toxoid) during

encapsulation in PLGA microsphere. *Control. Rel.* **31th Ann. Meet. Trans., EUA, p. 540-541.**

OGAWA, S; DECKER, EA e McCLEMENTS, DJ (2003). Influence of environmental conditions on the stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *J. Agric. Food Chem.*, **51 (18)**: 5522-5527.

OTAKE, K; SHIMOMURA, T; GOTO, T; IMURA, T; FURUYA, T; YODA, S; TAKEBAYASHI; SAKAI, H e ABE, M (2006). One-step preparation of chitosan-coated cationic liposome by an improved supercritical reverse-phase evaporation method. *Langmuir*, **22**: 4054- 4059.

PATEL, JK; PATEL, PR; AMIN, AF e PATEL, MM (2005). Formulation and evaluation of mucoadhesive glipzide microspheres. *AAPS Pharma. Sci. Tech.*, **6 (1)**: article 10 (<http://www.aapspharmacitech.org>).

PATEL, SS; PATEL, NM e PATEL, MR (2006). Liposome: A versatile platform for target delivery of drug. *Pharmainfo.net*, **4**: article 5. (<http://www.pharmainfo.net/reviews>).

PEPPAS, NA; HUANG, Y; TORRES-LUGO, M; WARD, JH e ZHANG, J (2000). Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annu. Revs. Biomed. Eng.*, **2**: 9- 29.

PÉREZ-RODRIGUEZ, C; MONTANO, N; GONZALEZ, K e GRIEBENOW K (2003). Stabilization of chymotrypsin at the CH₂Cl₂/water interface and upon water-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres. *J. Control. Rel.*, **89**: 71- 85.

PÉREZ, C; de JESÚS, P e GRIEBENOW, K (2002). 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.*, **248**: 193- 206.

PERFETTO, SP; CHATTOPADHYAY, PK e ROEDERER, M (2004). Seventeen-color flow cytometry unraveling the immune system. *Nature*, **4**: 648- 654.

PETERSON, GL (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et alii which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**: 346- 356.

POLOZOVA, A; YAMAZAKI, A; BRASH, JL e WINNIK, FM (1999). Effect of polymer architecture on the interactions of hydrophobically-modified poly-(N-isopropylamides) and liposomes. *Coll. and Surf. A: Biointerfaces*, 147- 170.

PREGO, C; GARCIA, M; TORRES, D e ALONSO, MJ (2005). Transmucosal macromolecular drug delivery. *J.of Control. Rel.*, **101**: 151-162.

PRESTIDGE, C; BARNES, T e ER, Y (2005). Current Trends in liposomal Drug Delivery Systems in *Drug Delivery Companies. Report Spring/Summer@Pharmaventures Ltd.*

QUINTILIO, W; SATO, RA; SANT'ANNA, AO; ESTEVES, MI; SESSO, A; ARAUJO, PS de e BUENO DA COSTA, MH (2000). Large unilamellar vesicles as trehalose-stabilized vehicles for vaccines: storage time and *in vivo* studies. *J. Control. Rel.*, **67**: 409- 413.

RAMON, G (1924). Sur la toxine et surranatoxine diphtheriques. *Ann. Inst. Pasteur*, **38**: 1- 7.

RAO, M e ALVING, CR (2000). Delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, **41**: 171 -188.

RAPPUOLI, R (1997). New and improved vaccines against diphtheria and tetanus in: *New generation vaccines* (ML Levine, GC Woodrow, JB Kaper and GS Cobon, eds), pp 417- 436, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.

RAPPUOLI, R. (1997). Rational design of vaccines. The recombinant pertussis vaccine induces early and long-lasting protection. *Nat. Med.* **3**: 374- 376

RENGEL, RG; BARISIC, K; PAVELIC, Z; GRUBISIC, TZ; CEPALAK, I e FILIPOVIC-GRCIC, J (2002). High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **15**: 441- 448.

ROLDO, M; HORNOF, M; CALICETI, P e BERNKOP-SCHNÜRCH, A (2004). Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and *in vitro* evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**: 115- 121.

SAH, H (1999)_a. Protein behavior at the water/methylene chloride interface . *J. Pharm. Sci.*, **88**: 1320- 1325.

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

SANDOVAL, C; CASTRO, C; GARGALLO, L; RADIC, D e FREIRE, J (2005). Specific interactions in blends containing chitosan and functionalized polymers. Molecular dynamics simulations. *Polymer*, **46**: 10437- 10442.

SANYOG, J; SHARMA, RK e VYAS, SP (2006). Chitosan nanoparticles encapsulated vesicular systems for oral immunization: preparation, *in vitro* and *in vivo* characterization. *J. Pharma. Pharmacol.*, **58**: 303- 310.

SATOKAWA, Y E SHIKATA, T. (2008). Hydration structure and dynamic behavior of poly(vinyl alcohols) in aqueous solution, *Macromolecules*, **41**: 2908-13.

SCHWENDEMAN, SP; CARDAMONE, M; KLIBANOV, A e LANGER, R (1996). Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. *Eds Cohen, S. and Bernstein, H.*, 1-49 (Marcel Dekker, New York).

SEIDA, Y e NAKANO, Y (1994). The physical and chemical structure of temperature sensitive polymer gel and its surface property. *Kagaku Kogaku Ronbunshu.*, **20**: 213- 218.

SILVA, RM; SILVA, GA; COUTINHO, OP; MANO, JF e REIS, RL (2004). Preparation and characterization in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. *J. Mat. Sci.: Mater. in Med.*, **15 (10)**: 1105- 1112.

SILVA,AS; TAKATA, CS; SANT'ANNA, OA; LOPES, AC; SOARES, PA de e BUENO DA COSTA, MH (2006). Enhanced Liposomal Vaccine Formulation and Performance: Simple Physicochemical and Immunological Approaches. *J. of Lip. Res.*, **16**: 215-227.

SMART, JD; KELLAWAY, IW e WORTHINGTON, HE (1984). An *in-vitro* investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, **36 (5)**: 295- 299.

SMITHA, B; SRIDHAR, S e KHAN,AA (2005). Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *Eur. Polym. J.*, **41**: 1859- 1866.

SMITHA, B; SRIDHAR, S e KHAN,AA (2004). Polyelectrolyte complexes of chitosan and poly (acrylic acid) as proton exchange membrane for fuel cells. *Macromolecules*, **37**: 2233- 2239.

SOUTO, ALCF e ITO, AS (2000).Tryptophan fluorescence studies of melanotropins in the amphiphile-water interface of reversed micelles. *Eur. Biophys. J.*, **29**: 38- 47

SRINIVASA, PC; RAMESH, MN; KUMAR, KR e THARANATHANA, R (2003). Properties and sorption studies of chitosan-polyvinyl alcohol blend films. *N. Carbohydrates Polym.*, **53**: 431- 438.

STRAUSS, G; SCHURTENBERGER, P e HAUSER, H (1986). The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: stabilization during freeze-thawing and freeze-drying. *Biochim. Biophys. Acta*, **858**: 169- 180.

STROUS, GJ e DEKKER, J (1992). Mucin-type glycoproteins. *Critical Reviews in Biochem. Mol. Biol.*, **27**: 57- 92.

SVENSSON, O; THURESSON, K e ARNEBRANT, T (2008). Interactions between chitosan-modified particles and mucin-coated surfaces. *J. Coll. Int. Sci.*, **325**: 346- 350.

TAKEUCHI, H; THONGBORISUTE, J; MATSUI, Y; SUGIHARA, H; YAMAMOTO, H e KAWASHIMA, Y (2005). Novel mucoadhesion tests for polymers-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv. Drug Del. Rev.*, **57**: 1583- 1594.

TAKEUCHI, H; YAMAMOTO, H e KAWASHIMA, Y (2001). Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, **47**: 39- 54.

TAKEUCHI, H; YAMAMOTO, H; NIWA, T; HINO, T e KAWASHIMA, Y (1996). Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm. Res.*, **13 (6)**: 896- 901.

TILSTRA, L e MATTICE, WL (1996). The β -sheet $\leftrightarrow$ 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 p. 261-269.

THOMAS, JB e PEPPAS, NA (2008). Adhesives in: Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering (Gary E Wnek e Gary Bowlin, ed.) Sec ed., vol. **1**: 1- 8 (New York, USA).

THOMAS, EL; BOZEMAN, PM e LEARN, DB (1991). Lactoperoxidases: structure and catalytic properties, in: Peroxidases in Chemistry and Biology (J. EVERSE, K.E. EVERSE e M.B. GRISHAM, editors), Vol. I, CRC Press, pp 123- 143.

VAN DER LUBBEN, IM; KERSTEN, G; FRETZ, MM; BEUVERY, C; VERHOEF, JC e JUNGINGER, HE (2003). Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine*, **21**: 1400- 1408.

VAN DER LUBBEN; IM, VERHOEF, JC; BORCHARD, G e JUNGINGER, HE, (2001). Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug Del. Rev.*, **52**: 139- 144.

VERMA, RK e GARG, S (2001). Current status of drug delivery technologies and future directions. *Pharmaceutical Technology On-Line*, **25 (2)**: 1- 14.

VOROB'EV, M; CHUROCHKINA, N; KHOKHLOV, A e STEPNOVA, E (2007). Hydration characterization of hydrophobically modified polymers by dielectric measurements in the millimeter range. *Macromol. Biosci.*, **7**: 475- 481.

VRIES, AH; MARK, AE e MARRINK, SJ (2004). Molecular dynamics simulation of the spontaneous formation of a small DPPC vesicle in water in atomistic detail. *J. of Am. Chem. Soc.*, **126**: 4488- 4489.

WAWREZINIECK, A; PÉAN, JM; WÜTHRICH, P e BENOIT, JP (2008). Oral bioavailability and drug/carrier particulate systems. *Médecine/Sci.*, **24 (6-7)**: 659- 664.

WEERT, M; HOECHSTETTER, J; HENNINK, WE e CROMMELIN, DJA (2000). The effect of water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme. *J. Control. Rel.*, **68**: 351- 359.

WHO (23/06/2009)

<http://www.who.int/vaccines/globalsummary/immunization/timeseries/tsincidencedip.htm>

WU, Z; PING, Q; WEI, Y e LAI, J (2004). Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. *Acta Pharmacol. Sin.*, **25 (7)**: 996- 972.

XING, DKL; CRANET, DT; BOLGIANO, B; CORBEL, MJ; JONES, C e SESARDIC, D (1996). Physical-chemical and immunological studies on the stability of free and microsphere-encapsulated tetanus toxoid *in vitro*. *Vaccine*, **14**: 1205-1213.

YADAV, D e KHULLER, G (2001). Evaluation of the T cells and costimulatory molecules in the protective efficacy of 30 kDa secretory protein against experimental tuberculosis. *Immunol. Cell. Biol.*, **79**: 207- 212.

YAMAMOTO, H; HEYAMOTO, N; MATSUI, T; MURAYAMA, N e SHIBATA, J (2003). Volumetric change and surface properties of temperature-sensitive polyvinilalcohol (PVA) hydrogel. *Int. J. Thermophys.*, **24**: 1385- 1393.

YANG, JM; SU, WY; LEU, TL e YANG, MC (2004). Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. *J. Memb. Sci.*, **236**: 39- 51.

YOU, CH; MIYAZAKI, T; ISHIDA, E; ASHIZUKA, M; OHTSUKI, C e TANIHARA, M (2007). Fabrication of poly (vinyl alcohol)-apatite hybrids through biomimetic process. *J. Eur. Cer. Soc.*, **27 (2)**: 1585- 1588.

ZARU, M; MANCA, ML; FADDA, AM e ANTIMISIARIS, SG (2009). Chitosan-coated liposome for delivery to lungs by nebulisation. *Coll. Surf.*, **71**: 88- 95.

ZHANG, Y e CREMER, PS (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hoffmeister series. *Current Opinion Chem. Biol.*, **10**: 658: 663.

RELAÇÃO DE ANEXOS

Anexo I:

Súmula curricular

Anexo II:

Rescia, V.C., Ramos, H.R., Takata, C.S., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2009_a). Diphtheria toxoid conformation in the context of its nanoencapsulation within liposomal particles sandwiched by Chitosan. Submetido para *J. Lip. Res.*

Anexo III:

Rescia, V.C., Takata, C.S., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2009_b). Dressing liposomal particles with chitosan and poly (vinyl alcohol) for oral vaccine delivery. Submetido para *J. Lip. Res.*

Anexo IV:

Rescia, V.C., Takata, C.S., Sant'anna, O.A., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2009_c). *In vitro* versus *in vivo* correlation assays for an oral chitosan-liposomal diphtheria vaccine. Submetido para *J. Lip. Res.*

ANEXO I

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Vanessa Cristina Rescia

Local e data de nascimento: São Paulo, 11 de Fevereiro de 1978.

FORMAÇÃO ESCOLAR E ACADÊMICA

1. **Mestranda em Ciências** - Departamento de Clínica Médica (2007 - 2009)
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP.
Título: REVs-Chi: um novo sistema particulado para encapsulação de macromoléculas terapêuticas.
Orientadora: Maria Helena Bueno da Costa.
2. **Graduação em Farmácia e Bioquímica** (2000 - 2003).
Universidade Bandeirante de São Paulo - Osasco - SP.
3. **Técnico em Patologia Clínica** (1994 - 1997).
Colégio Fernão Dias Pais - Osasco - SP.

OCUPAÇÃO

Aluna e bolsista de mestrado, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - de Junho de 2007 à Junho de 2009.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3. RESCIA, VC e BUENO DA COSTA, MH . LARGE UNILAMELLAR VESICLES SANDWICHED BY CHITOSAN FOR CONTROLLED DIPHTHERIA TOXOID LIBERATION. Em: 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008, Atenas. The FEBS Journal. Oxford : WILEY-BLACKWELL, 2008. v. 275. p. 370-370.
4. RESCIA, VC e BUENO DA COSTA, MH . SOYBEAN PHOSPHATIDYLCHOLINE VESICLES COVERED WITH CHITOSAN FOR A CONTROLLED DIPHTHERIA TOXOID LIBERATION. Em: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq) and XI Congress of the Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2008, Águas de Lindóia. São Paulo : By Adaltech, 2008. v. 6.
5. RESCIA, VC e BUENO DA COSTA, MH . STRUCTURAL STUDIES OF A

FORMULATION WITH CHITOSAN-COATED LIPOSOMES FOR A DIPHTHERIA. Em: X Reunião Científica Anual do Instituto Butantan Pesquisa Científica e Legislação: caminhos e descaminhos e quem sabe um encontro, 2008, São Paulo.

6. RESCIA, VC; MOURA, SP; MONTEAGUDO, E e BUENO DA COSTA, MH . DESIGN OF INTELLIGENT PARTICLES FOR ORAL VACCINE DELIVERY. Em: XXXVII Reunion Anual de la Sociedad Argentina de Biofisica, 2008, La Plata, BsAs.
7. RESCIA, VC; SIMÕES, AA e BUENO DA COSTA, MH . VACCINE VEHICLE CONSTRUCTED BY LARGE UNILAMELLAR VESICLES SANDWICHED BY CHITOSAN. Em: IX Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2007, São Paulo. Memórias do Instituto Butantan - 2007. São Paulo : Fundação Butantan, 2007. v. 64. p. 92-92.
8. RESCIA, VC; SIMÕES, AA e BUENO DA COSTA, MH . LARGE UNILAMELLAR VESICLES SANDWICHED BY CHITOSAN AS VACCINE VEHICLE. Em: XXXVI Reunião Anual em conjunto com a X Conferência da IUBMB, 2007, Salvador - Bahia - Brasil. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th IUBMB Conference. São Paulo : Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007. v. 1. p. 43-43.
9. RESCIA, VC; SIMÕES, AA; BUENO DA COSTA, MH . SOYBEAN PHOSPHATIDYLCHOLINE NANOVESICLES COVERED BY CHITOSAN AS A VACCINE VEHICLE FOR DIPHTHERIA TOXOID. Em: Taller de la Sociedad Argentina de Biofisica: "Biofisica de macromoléculas: aspectos estructurales e implicancias biológicas y biotecnológicas", 2007, Quilmes - Buenos Aires : Sociedad Argentina de Biofisica, 2007. v. 1. p. 12-12.
10. LIMA, AF ; PRADAL, MG ; DI DIO, R ; DI GIO, R ; BENNWART, M ; RESCIA, VC. DETECÇÃO DA PRESENÇA DE HEMOGLOBINA ANÔMALAS NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DE GLICOHEMOGLOBINA-HBA₁C. Em: 39^a Congresso Brasileiro de Patologia Clínica, 2005, São Paulo. Anais da Congresso Brasileiro de Patologia Clínica, 2005.

Publicações

Rescia, V.C., Ramos, H.R., Takata, C.S., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2009_a). Diphtheria toxoid conformation in the context of its nanoencapsulation within liposomal particles sandwiched by Chitosan. Submetido para *J. Lip. Res.*

Rescia, V.C., Takata, C.S., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2009_b). Dressing liposomal particles with chitosan and poly (vinyl alcohol) for oral vaccine delivery. Submetido para *J. Lip. Res.*

Rescia, V.C., Takata, C.S., Sant'anna, O.A., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2009_c). *In vitro* versus *in vivo* correlation assays for an oral chitosan-liposomal diphtheria vaccine. Submetido para *J. Lip. Res.*

Participação em eventos

Congressos

1. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq (2009)
2. Meeting on Nanotechnology, Liposomes and Health (2009).
3. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq e XI Congresso da PABMB (2008).
4. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference (2008).
5. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq e X Conferência da IUBMB (2007).
6. 39^a Congresso Brasileiro de Patologia Clínica (2005).

Simpósios e encontros

1. X Reunião Científica Anual do Instituto Butantan (2008).
2. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (2008).
3. Taller de la Sociedad Argentina de Biofísica. Biofísica de Macromoléculas: Aspectos estructurales e implicancias biológicas y biotecnológicas (2007).
4. IX Reunião Científica Anual do Instituto Butantan (2007).
5. Encontro de Usuário de HPLC da Chromsystems (2006).

ANEXO II

Diphtheria toxoid conformation in the context of its nanoencapsulation within liposomal particles sandwiched by Chitosan

VANESSA CRISTINA RESCIA,^{1,5} HENRIQUE R. RAMOS,² CÉLIA S. TAKATA,³
PEDRO S. DE ARAUJO,⁴ and Maria HELENA BUENO DA COSTA^{1*}

¹Lab. de Microesferas e Lipossomas - Centro de Biotecnologia- I. Butantan

²Laboratório de Biotecnologia Molecular - Centro de Biotecnologia- I. Butantan

³Div. Desenvolvimento Tecnológico e Produção-I. Butantan, São Paulo, Brasil

⁴Departamento de Bioquímica- IQ-Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁵Disciplina de Clínica Médica, Dep. Medicina - UNIFESP, São Paulo, Brasil

Chitosan, α - (1-4)-amino-2-deoxy- β -D-glucan) is a deacetylated form of chitin, a polysaccharide from crustacean shells. Its unique characteristics such as positive charge, biodegradability, biocompatibility, non-toxicity, and rigid structure make this macromolecule ideal for oral vaccine delivery system. We prepared reverse phase evaporation vesicles (REVs) sandwiched by chitosan (Chi) and polyvinyl alcohol (PVA). However, in this method there are still some problems to be circumvented related to protein stabilization. During the inverted micelle phase of protein nanoencapsulation, hydrophobic interfaces are expanded leading to interfacial adsorption followed by protein unfolding and aggregation. Here, spectroscopic and immunological techniques were used to ascertain the effects of the Hoffmeister series ions on Diphtheria toxoid (Dtxd) stability during the inverted micelle phase. A correlation was established between the salts used in aqueous solutions and the changes in Dtxd solubility and conformation.

Dtxd α -helical content was quite stable what led us to conclude that encapsulation occurred without protein aggregation or without exposition of hydrophobic residues. Dtxd aggregation was 98% avoided by the kosmotropic PO_4^{2-} . This ion was used to prepare a stable Dtxd and immunologically recognized REVs-Chi-PVA formulation in the presence of 50 mM PO_4^{2-} . Under these conditions the Dtxd retained its immunological identity. Therefore, we could obtain the maximum Dtxd solubility and stability after contact with $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ to begin its nanoencapsulation within ideal conditions. This was a technological breakthrough because a simple solution like salt addition avoided heterologous proteins usage.

Keys words: liposome-vaccine delivery; Hoffmeister serie ions, protein solubilization, protein stabilization, interaction protein/organic solvent, protein nanoencapsulation.

Address correspondence to Maria Helena Bueno da Costa, Laboratório de Microesferas e Lipossomas - Centro de Biotecnologia - I. Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 (05503-900) Butantan, São Paulo, SP, Brasil. Email: bdacosta@usp.br

Introduction

Reverse phase evaporation vesicles (REVs) can be sandwiched by chitosan (Chi) (Mertins et al., 2005) and covered by PVA (polyvinilic alcohol) to be used as

delivery vehicle for oral vaccine vehicle (Marón et al., 2007). It is known that protein encapsulation within REV-Chi (reverse phase evaporation method - chitosan vesicles) vesicles is a simple and straightforward procedure, as described by a group from our laboratory (Marón et al., 2007).

However, until today, empirical approaches for protein stabilization have been employed during the organic phase contact on double emulsion processes ($W_1/O/W_2$) or the inverted micelle phase on REV methods. In the initial phase of these methods high pressures, temperature gradients and shear forces enhance the probability of oxidations to occur, leading to free radicals formation and protein damages. When shear forces are considered, their net result is an increase on the organic solvent surface area which triggers protein adsorptions, aggregate precipitations and conformational damages (Wei, Lu and Lu, 2007; Pérez-Rodríguez et al., 2003; Castellanos, Cruz, and Crespo 2002; Pérez et al., 2002; Diwan and Park, 2001; Weert et al., 2000; Sah, 1999; Xing et al., 1996). BSA addition to Dtxd or to Tetanus toxoid (Audran et al., 1998; Johansen et al., 1998) was proposed to avoid antigen aggregation in protein encapsulation within PLGA microspheres. The underlying supposition is that BSA competes with the antigen for the adsorption at the CH_2Cl_2/H_2O interface. Evidently this can occur however, it is not reasonable to add heterologous proteins to pharmaceutical formulations intended for human usage. Here, we propose the simple addition of salts of the Hoffmeister series to avoid Dtxd aggregation and conformational modifications during its interfacial contact with $CH_3CO_2C_2H_5$, used during the inverted micelle phase in the REV method. We also discussed the mechanisms by which protein conformation was maintained and damages were avoided. A stabilized Dtxd was nanoencapsulated within REV-Chi-PVA and the protein liberation was followed by ELISA.

Materials and methods

Dtxd (Diphtheria toxoid) and anti-diphtheric standard antiserum (developed in horses) were a gift from Instituto Butantan – Divisão de Produção. The immunoconjugates, dimethylsulfoxide (DMSO) and 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) were from Polysciences; Chitosan (low molecular weight, 70-85 % deacetylation); polyvinyl alcohol (PVA, MW 127 kDa) were from

Sigma. Ethyl acetate ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) and all other reagents were of analytical grade. The following equipments were used: ultraconcentrator 8050 and 8010 models (Amicon); F 2000 spectrofluorimeter (Hitachi), spectropolarimeter Jasco-810; HPLC (Shimadzu) LC-10VP, equipped with UV detector (model SCL-10AVP); ELISA plate reader (Titerteck) Multiskan MCC/340 (Labsystems), Probe sonifier Branson, model 450; rotatory evaporator Tecnal TE-210; Zetasizer Brookhaven Zeta Pals; spectrophotometer Pharmacia Ultraspec 100, Nikon camera FX35WA, TMS Nikon inverted microscope.

Effects of Hoffmeister series ions on the Dtxd solubility during emulsification with ethyl acetate.

2 mL samples containing 5 mM Dtxd in KSCN, MgCl_2 , NaCl or NaH_2PO_4 (0, 10, 30, 50, 70, 90, 100 and 150 mM final concentrations) were added to 8 mL $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. After 4 minutes of emulsification with a probe sonifier (40 W nominal) the samples were centrifuged during 15 minutes at 18154 g. The protein contents of the aqueous phases were measured by the absorbance at 269 nm (Campana et al., 2004) or by HPLC (Campana et al., 2004). The soluble fractions were analyzed by CD (Circular dichroism), fluorescence and ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).

Circular dichroism

The soluble Dtxd fractions in different salts at different concentrations (0, 10, 30, 50, 70, 90, 100 and 150 mM final concentrations) were analyzed using a 0.1 cm path length cuvette in a Jasco-810 spectropolarimeter.

Fluorescence

The soluble Dtxd fractions in different salts (0, 10, 30, 50, 70, 90, 100 and 150 mM final concentrations) were analyzed using quartz cuvettes in a Hitachi F 2000 fluorimeter. The samples were excited at 269 nm and the fluorescence emission measured between 280 and 480 nm.

ELISA

Dtxd soluble samples were added to ELISA plates and after two hours at 37°C, they were blocked with 10% skim milk. After 30 min, the standard anti-Dtxd specific sera, developed in horses, was added to the wells. The conjugate (anti-horse whole IgG conjugate with peroxidase) was added 30 min later, and, after a further 30 min, the substrate was added. After 15 min at room temperature, the reaction was stopped with 1 M H₂SO₄. The absorbance was automatically measured at 450 nm in a Titertek Multiskan MCC/340. *Antibody titters* are the reciprocal serum dilution factor giving an absorbance value of 20 % of the saturation value.

Sandwiched Chitosan liposome recovered with PVA (REVs-Chi-PVA) preparation by the reverse evaporation method (REVs-Chi) containing Dtxd
Dtxd in 0,5 % chitosan (Chi) (in 200 µL of 50 mM phosphate, pH 4.5 buffer) was added to 60 mg of SPC and 10 mg Cho. After inverted micelle formation, by sonification, the organogel was formed in a rotatory evaporator under vacuum (15 mm Hg/cm). The organogel was resuspended in 1% PVA and lyophilized. REVs-Chi-PVA morphology was observed by microscopy.

Encapsulation efficiency: REVs; REVs-Chi or REVs-Chi-PVA

Suspensions containing Dtxd were dispersed in water and centrifuged twice at room temperature at 4 000 rpm, during 20 minutes. The Dtxd in the supernatants was measured by using adapted literature method (Peterson, 1977).

REVs, REVs-Chi and REVs-Chi-PVA morphologies.

Pictures were taken with a Nikon camera FX35WA interfaced with a TMS Nikon inverted microscope.

Diphtheria toxoid liberation from REVs-Chi-PVA

The samples were incubated in SGF (simulated gastric fluid, pH 1.2) or in SIF (simulated intestinal fluid) both prepared according to the United States Pharmacopoeia (USP 2002 and 2003). The dispersions of REVs (1.5 mL) or REVs-

Chi-PVA (1.5 mL) were added to the liberation media and incubated, under gentle agitation, at 37°C during. After 4 minutes of centrifugation at 4 000 rpm, aliquots were taken (4 mL) and an equal volume of the corresponding media was added. This procedure was repeated at pre-determined time points. The samples were analyzed for liberated Dtxd by protein analysis and ELISA.

3. Results and discussion

It was verified in this work that simple molecules like Hoffmeister salts could be the best solution to protect the Dtxd protein from aggregation and conformational damages during the sonification with $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$.

The Dtxd solubility was affected by the sonification both in the presence of $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ and in the absence of salts (Figure 1), when 9 % of the molecule precipitated. We have shown that Dtxd solubility decreased in the presence of SCN^- (Figure 1) with results in the literature (Curtis et al., 2002). It is well known that when the organic solvent is changed (to methylene chloride, for example) protein solubility changes. In the case of Dtxd sonified in the presence SCN^- solubility increased to 98 % (Namur et al., 2009), in contrast diminished, for lysozyme (Pérez and Griebenow, 2002). There are no rigid rules for protein solubility after sonification in the presence of Hoffmeister ions series, which implicates that the protein partition depends on several factors like dielectric constant and pH. The kosmotropic NaH_2PO_4 was the best salt for recovering Dtxd in all the concentrations studied (Figure 1). One outstanding observation was that Dtxd solubility in 10 mM or 100 mM NaH_2PO_4 was greater than all the other conditions studied (Figure 1). The Dtxd solubilities were inversely proportional to salt concentrations for the kosmotropic NaCl and for the chaotropics KSCN or MgCl_2 . 30 mM MgCl_2 provided the worst salt condition since it reduced Dtxd solubility by 40%.

The problem approached in this work was neither simple nor trivial: a ternary system composed by the protein Dtxd, the water and the organic solvent where a fourth element would be added - the salt, under sonification at 40 W. It would have been an oversimplification to opt for one of the theories (Dér et al., 2007;

Zhang and Cremer, 2006; Zhou, 2005, Boström, Williams and Niham, 2003) to explain the Hoffmeister effect on protein solubility. It is known, from the literature, that protein solubility changes (Zhou, 2005, Boström, Williams and Niham, 2003) in the presence of kosmotropic salts which stabilize solutes, by increasing the order of water or in the presence of chaotropic salts which create weaker hydrogen bonding thus decreasing the order of water and increasing its surface tension. Nowadays, it is known that the Hoffmeister series mechanism of action is related to ion specific phenomena (Zhang and Cremer, 2006). But, changes on water structure after salt additions do not explain the ion specific phenomenon (Dér et al., 2007; Leberman, 1991). In this investigation the chaotropics SCN^- and Mg^{2+} were used. In addition to their charge difference it is known that SCN^- is poorly hydrated while Mg^{2+} is strongly hydrated (Dér et al., 2007; Leberman, 1991). The Dtxd was dissolved in water containing salt at pH 6.5, 2 pH units above its pI (Campana et al., 2004) thus with a net negative charge. Therefore, it is reasonable to assume that an ionic interaction between the negatively charged Dtxd and Mg^{2+} did not favor protein solubility. In this salt condition the protein could precipitate after organic solvent contact, maximized by the sonication at 40 W. Accordingly, the Hoffmeister series would be understood as an ion specific phenomenon (Dér et al., 2007; Biresaw et al., 1985). Once more, the kosmotropic salts, NaCl and NaH_2PO_4 altered differently the Dtxd aggregation caused by agitation. While NaCl diminished the Dtxd solubility (Figure 1) the NaH_2PO_4 increased. Consequently, the PO_4^{2-} was further investigated to be used as a protective ion for Dtxd.

To know the nature and extent of these Dtxd losses, the soluble Dtxd fractions after emulsification in the presence of salts were applied on a gel filtration HPLC column. The typical Dtxd vaccine preparation contains different molecular dimmer species, namely dimer; monomer fragments A and B (Campana et al., 2004). Therefore, the distribution of these molecular species could be an indicative of the structural preservation of the protein (Table 1 and Figure 2).

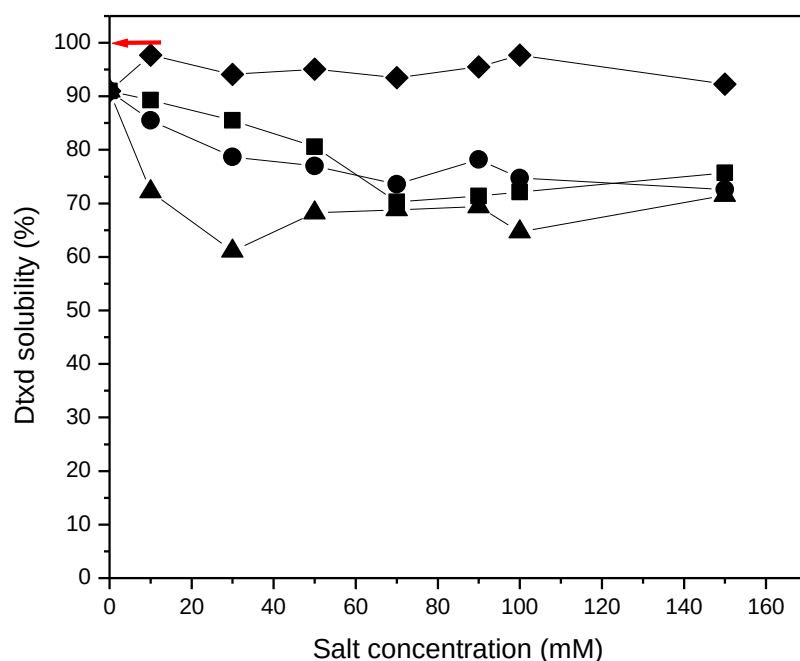


Figure 1. Effects of Hoffmeister series ions on Dtxd recovery during emulsification with CH₂Cl₂. The kosmotropics NaH₂PO₄ (-♦-), NaCl (-■-) or the chaotropics KSCN (-●-) and MgCl₂ (-▲-) were added to the Dtxd water solutions and sonified (40 W) during 4 minutes in the presence of CH₃CO₂C₂H₅. The soluble protein was measured by HPLC.

Table 1. Effect of Hoffmeister series ions on Dtxd different molecular species after sonification.

Salt used	Dtxd (dimer) (relative proportion)	Dtxd (monomer) (relative concentration)	FB + FA (relative concentration)
NaCl	↓	↓	↑
KSCN	↓	↓↓↓↓	↑↑↑↑
MgCl ₂	↓	↓	↑
NaH ₂ PO ₄	↓	=	↑

The dimer concentration decreased with all the salts used (Figure 2A). There was a large reduction in Dtxd monomers when the emulsification was done in the presence of SCN⁻ (Figure 2B). The increase in FA and FB (Fragments A and B) occurred in concert with the decrease of Dtxd monomers when Dtxd was

emulsified in the presence of SCN^- , suggesting the existence of a significant Dtxd monomer hydrolysis.

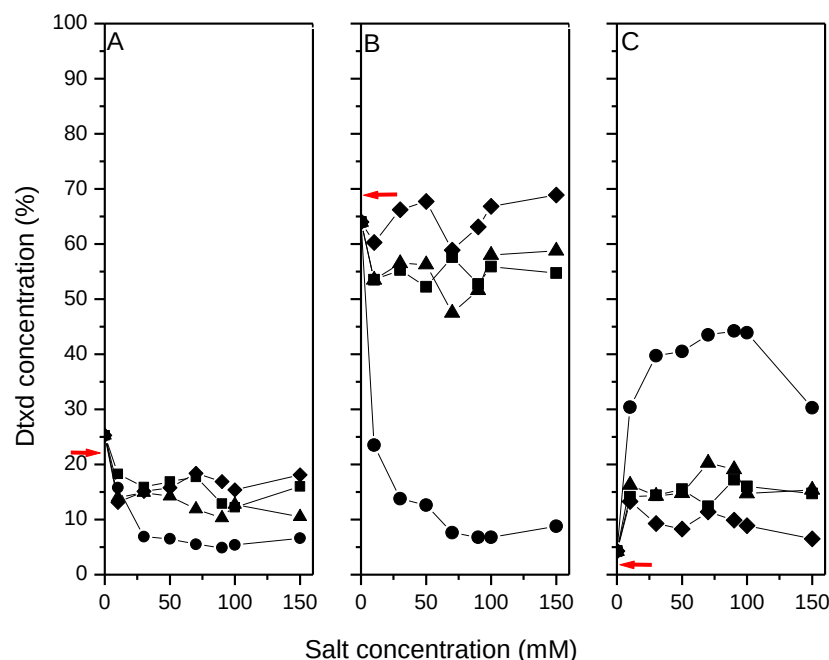
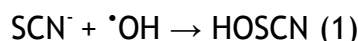


Figure 2. Effect of Hoffmeister series ions in different Dtxd molecular species after emulsification in the presence of $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. The kosmotropics NaH_2PO_4 ($\diamond$), NaCl ($\blacksquare$) or the chaotropics KSCN ($\bullet$) and MgCl_2 ($\blacktriangle$) were added to the Dtxd water solutions and sonified in the presence of $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ at 40 W. A. Dtxd dimer, B. Dtxd monomer and C. Fragments A and B. Controls: Dtxd sonified without salt and $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ (arrows in the pictures). The fractions containing soluble Dtxd molecular species were analyzed by HPLC gel filtration (QC-PACK GFC 300 column - 7.8 mm X 15 cm) previously equilibrated with PBS, at 20° C. Injection and elution flows were 0.6 mL/min.

SCN^- can be oxidized by peroxidase in solution (Thomas, Bozeman and Learn, 1991). Since there is no peroxidase in our system SCN^- oxidation was performed by the $\cdot\text{OH}$ radical (generated during the sonification) producing the hypothiocyanous acid.



The HOSCN is a weak acid that reacts with sulfhydryl groups present in Dtxd. Dtxd can be represented by two peptides (FA and FB) linked by a S-S bond: FA-S-S-FB (Namur et al., 2004). The FA-S-S-FB could be converted to thiocyanate-sulfenil or disulfates (RS-SCN or RS-SR) as described for other molecules

(Thomas, Bozeman and Learn, 1991). Accordingly, we propose that the reaction with Dtxd would be the following:



Thus, the decrease in Dtxd monomer would have occurred in concert with the increase in FA and FB (in fact, FA-S-SCN + FA-S-SCN) (Figure 2C).

The PO_4^{2-} and surprisingly the SCN^- retained the Dtxd immunological identities (Figure 3). An increase of immunological identity induced by Mg^{2+} and NaCl was observed (Figure 3). These results contrast with those already published, when Dtxd was emulsified in the presence of methylene chloride (Namur et al, 2009). The damages we observed on the immunologically recognized Dtxd conformation were small (Figure 3).

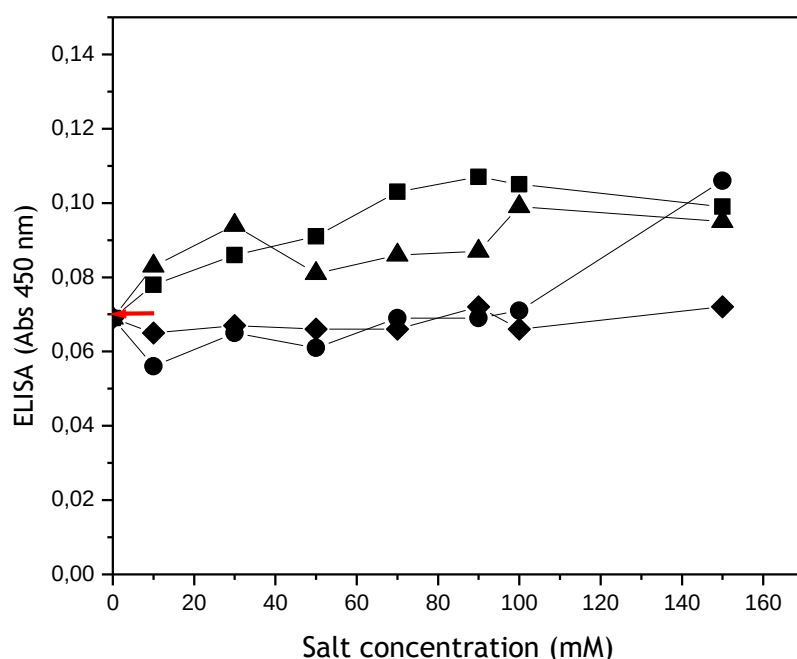


Figure 3. Immunological identity of the soluble Dtxd fractions. The kosmotropics NaH_2PO_4 (♦) or NaCl (■) or the chaotropics KSCN (●) and MgCl_2 (▲) were added to the Dtxd water solutions and sonified in the presence of $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ at 40 W. The soluble fractions were analyzed by ELISA. Control: untreated protein was 0,07 Absorbance units.

The extent of these small Dtxd conformational damages were analyzed by fluorescence. There were no changes in the F350 nm/F330 nm ratio (Figure 4). This led us to conclude that there was no tryptophan exposition to the media in

Dtxd which agrees with what was found by others (Souto and Ito, 2000). It is interesting to note that when the emulsification is done in the presence of CH_2Cl_2 , enormous Trp (W) expositions occur (Namur et al., 2009). Again a simple change on organic solvent induces not only Dtxd solubility differences but also conformational differences (Figure 4 and Namur et al., 2009).

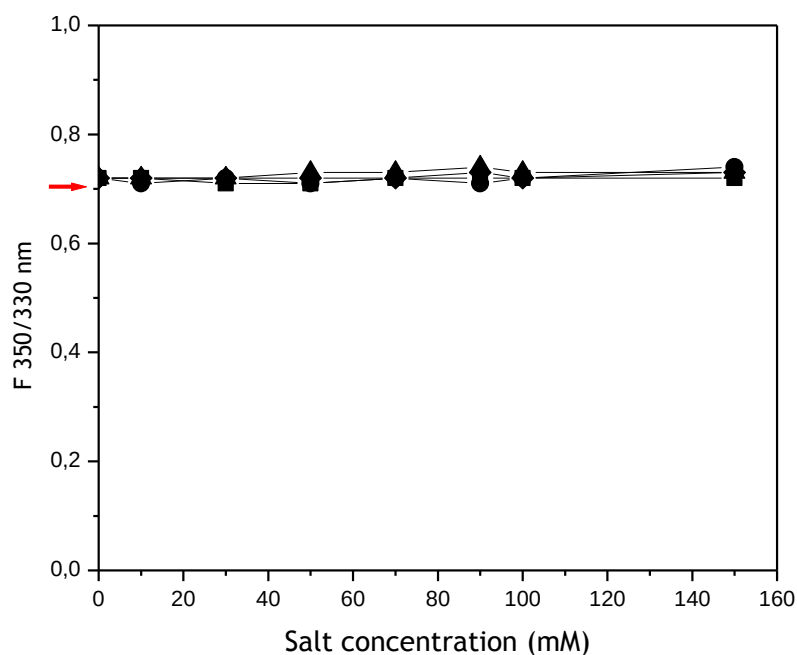


Figure 4. Effect of Hoffmeister series ions on Dtxd intrinsic fluorescence. The kosmotropics NaH_2PO_4 ($\diamond$), NaCl ($\blacksquare$) or the chaotropics KSCN ($\circ$) and MgCl_2 ($\blacktriangle$) were added to the Dtxd water solutions and sonified in the presence of $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ at 40 W. The soluble fractions were recorded by fluorescence spectra. The intensities $F_{350}/F_{330\text{nm}}$ were measured.

Circular dichroism was used to detail changes in Dtxd secondary structures. Changes in the $\theta_{196\text{nm}}$ (Tilstra and Matice, 1996) were observed in Dtxd fractions soluble in salt solutions (Figure 5). Decreases on β -sheet content were observed when Dtxd was sonified, both in the presence of the kosmotropics Cl^- or PO_4^{2-} as well as in the presence of the chaotropics Mg^{2+} and SCN^- (Figure 5). It was concluded that an extensive protection on β -sheet Dtxd content (90,4 %) was achieved when the protein was sonified in the presence of PO_4^{2-} .

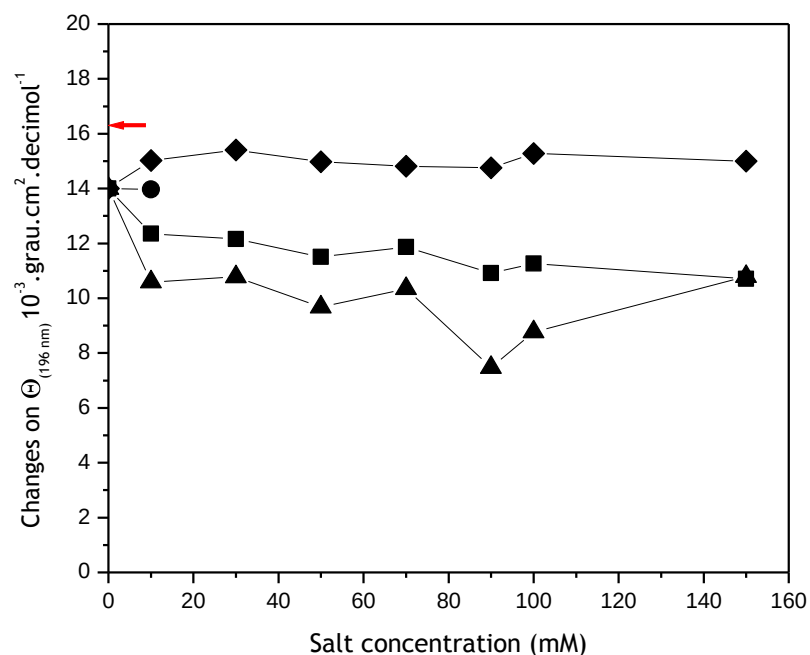


Figure 5. Effect of Hoffmeister series ions on Dtxd β -sheet content. The kosmotropics NaH_2PO_4 (♦-), NaCl (■-) or the chaotropics KSNC (●-) and MgCl_2 (▲-) were added to the Dtxd water solutions and sonified in the presence of $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ at 40 W. The CD spectra of these soluble fractions were performed using a 0.1 cm path length cuvette. The observed θ at 196 nm was used to measure the extent of protein modifications.

Further conformational changes on α -helical content were observed at $\theta_{222\text{nm}}$ (Figure 6) and for S-S dihedral angle conformations, at $\theta_{260\text{nm}}$ (Figure 7). The largest negative Cotton effect was observed with Dtxd emulsified in the presence of MgCl_2 . The best salt condition was obtained when Dtxd was sonified in the presence of PO_4^{2-} (Figure 6 A and B). PO_4^{2-} was the unique salt able to increase Dtxd α -helix content when sonified in the presence of $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ (Figure 6 B).

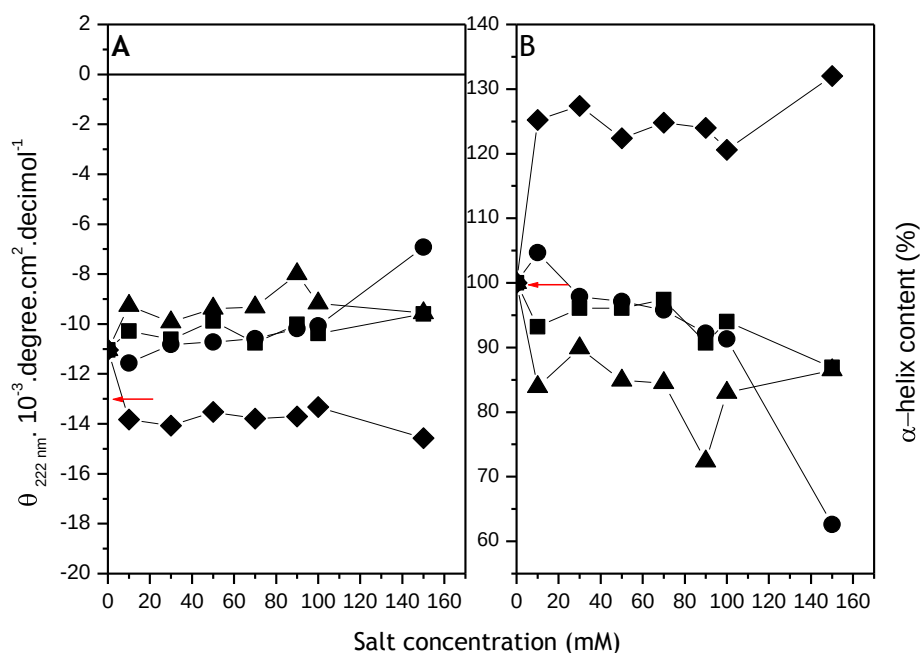


Figure 6. Effect of Hoffmeister series ions on Dtxd α -helix content. **A.** The kosmotropics NaH₂PO₄ (♦), NaCl (■) or the chaotropics KSNC (●) and MgCl₂ (▲) were added to the Dtxd water solutions and sonified in the presence of CH₃CO₂C₂H₅ at 40 W. The CD spectra of these soluble fractions were performed using a 0.1 cm path length cuvette. The observed θ at 222 nm was used to measure the extent of α -helix content. **B.** The α -helix contents were compared with the α -helix content presented by the control, considered as 100 %.

Diphtheria toxin has two S-S bridges (C₁₈₆-C₂₀₁ and C₄₆₁-C₄₇₁). One of them is an inter-peptide linkage (FA-FB, C₁₈₆-C₂₀₁) and the other is an intra-peptide linkage (FB, C₄₆₁-C₄₇₁). The Dtxd dihedral S-S angle (linkage between the FA and FB) suffered conformational alterations during the sonification in the presence of organic solvent (Figure 7). Probably, the observed dihedral changes are related with the C₁₈₆-C₂₀₁ bridge because of the steric hindrance and constraints on the other S-S linkage (C₄₆₁-C₄₇₁). It is known that angular dihedral variations $\geq 120^\circ$ are related with a negative Cotton effect. In contrast, angular dihedral variations $\leq 60^\circ$ induce positive Cotton effects (Pérez and Griebenow, 2002; Tilstra and Mattice, 1996). All salts used changed the S-S conformation within Dtxd (Figure 7). Dtxd in water presented a S-S opening of $\geq 120^\circ$ corresponding to negative Cotton effect value of $-0,15 \cdot 10^{-3} \text{ degree.cm}^2\text{.decimol}^{-1}$ (Control, Figure 7). After sonification this value changed to $+0,10 \cdot 10^{-3} \text{ degree.cm}^2\text{.decimol}^{-1}$ which corresponds to a positive Cotton effect related to a S-S opening of $\leq 60^\circ$. This result corroborates the observation that no W

exposition was detected by fluorescence spectroscopy (Figure 4). This could indicate that after sonification Dtxd became more closed with its W buried away from the environment.

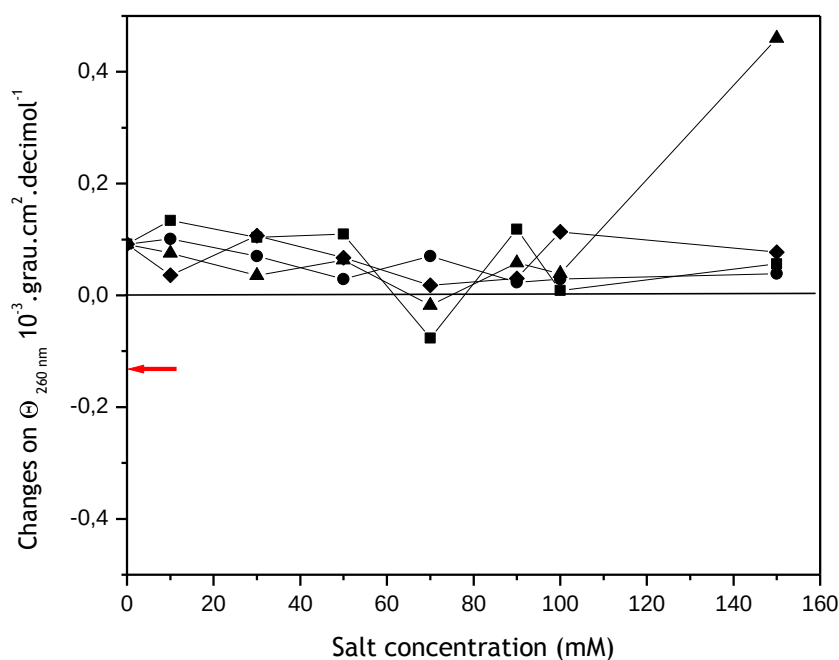


Figure 6. Effect of Hoffmeister series ions on Dtxd S-S dihedral angle. **A.** The kosmotropics NaH₂PO₄ (♦-♦-), NaCl (■-■-) or the chaotropics KSCN (●-●-) and MgCl₂ (▲-▲-) were added to the Dtxd water solutions and sonified in the presence of CH₃CO₂C₂H₅ at 40 W. The CD spectra of these soluble fractions were performed using a 0.1 cm path length cuvette. The observed θ at 260 nm was used to measure the extent of S-S dihedral opening. Control: Dtxd in water measured before sonification.

When considering all the previous results, Dtxd microencapsulations within REVs-Chi-PVA sonified in the presence PO₄²⁻ had encapsulations efficiencies which raised from 51 % (Marón et al, 2007) to 69,2 for REVs-Chi and from 65 % (Marón et al., 2007) to 75,4 % for REVs-Chi-PVA. These REVs-Chi-PVA containing Dtxd liberated all the protein content with immunological activity, making them very good candidates for oral vaccines vehicles (Figure 8).

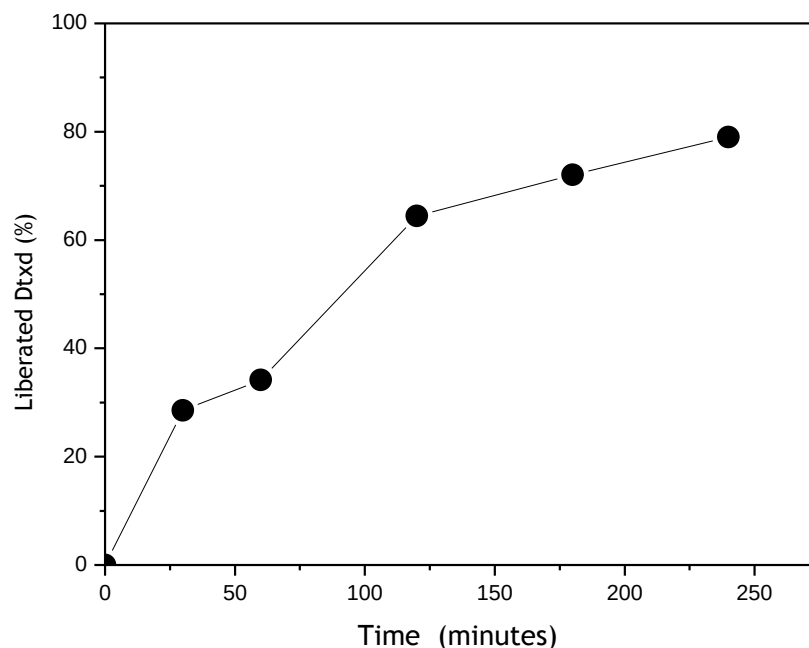


Figure 8. Kinetic profile of Dtxd liberation from REV-Chi-PVA. The REV-Chi-PVA /Dtxd were incubated within PBS. Periodically samples were taken and analysed by measuring protein and ELISA.

Conclusion

We were able to obtain the maximum protein solubility after emulsification in the presence of $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ to begin its REV-Chi-PVA microencapsulation within ideal conditions. This was a technological breakthrough because a simple solution such as salt addition avoided the usage of heterologous proteins.

Aknowledgements: FAPESP (00/10970-7), CNPq (302047/2008-5) and Fundação Butantan. VC Rescia had a fellowship from CAPES.

References

- Audran, R.; Men, Y.; Johansen, P.; Gander, B.; Corradin, G. (1998). Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. *Pharm Res* 15: 1111-1116.
- Biresaw, G., McKenzie, D.C., Bunton, C.A. and Nicoli, D.F. (1985). 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* 89: 5144-5146.

Boström, M., Williams, D.R.M. and Niham, B.W. (2003). Specific ion effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hoffmeister series. *Biophys J* 85: 686-694.

Campana, R.A., Namur, J.A.M., Takata, C.S., Araujo, P.S. and Bueno da Costa, M.H. (2004). Ionic interfaces and diphtheria toxoid interactions. *Prot Express Purif* 33: 161-65.

Castellanos, I.J., Cruz, G., Crespo, R.C. and Griebenow, K. (2002). Encapsulation-induced aggregation and loss in activity of γ -chymotrypsin and their prevention. *J Control Rel* 81: 307-319.

Curtis, R.A., Ulrich, J., Montaser, A., Pausnitz, J.M. and Blanch, H.W. (2002). Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions. *Bioeng* 79:367- 380.

Dér, A., Kelemen, L., Fábián, L., Taneva, S.G., Fodor, E., Páll, T., Cupane, A., Cacace, M.G. and Ramsden, J.J. (2007). Interfacial water structure controls protein conformation. *J Phys Chem B* 111: 5344-5350.

Diwan, M. and Park, T.G. (2001). Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. *J Control Rel* 73: 233-244.

Johansen, P.; Men, Y., Audran, R., Corradin, G., Merkle, H.P. and Gander, B. Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives (1998). *Pharm Res* 15: 1103-1110.

Leberman, R. (1991). The Hoffmeister series and ionic strength. *FEBS* 284: 193- 294.

Marón, L.B., Peniche, C., Da Silveira, N.P., Pohlmann, A., Mertins, O., Tatsuo, L.N., Sant'anna, A.O., Moro, A.M., Takata, C.S., de Araujo, P.S. and Bueno da Costa, M.H. (2007). LUVs recovered with chitosan: a new preparation for vaccine delivery. *J Lip Res* 5: 155- 163.

Mertins, O., Sebben, M., Pohlmann, A.R. and Silveira, N.P. (2005). Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. *Chem Phys Lip* 138: 29- 37.

Namur, J.A.M., Takata, C.S., Araujo, P.S. de and Bueno Da Costa, M.H. (2009). Hoffmeister series ions protect Diphtheria toxoid from structural damages at solvent/water interface. *Materials* 2: 765- 775.

Namur, J.A.M., Takata, C.S., Moro, A.M., Politi, M.J., Araujo, P.S., Cuccovia, I.M. and Bueno da Costa, M.H. (2004). Lactic acid triggers, *in vitro*, thiomersal to degrade protein in the presence of PLGA microspheres. *Int J Pharm* 273: 1- 8.

Pérez C., Castellanos, I.J., Costantino, H., Al-Azzam, W. and Griebenow, K. (2002). Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. *J Phar Pharmacol* 54: 301-313.

Pérez, C., and Griebenow, K. (2002). Effects of salts on lysozyme stability at the water-oil interface and upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres. *Biotechnol Bioeng* 82: 825-832.

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

Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et alii which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346- 356.

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

Souto, A.L.C.F. and Ito, A.S. (2000). Tryptophan fluorescence studies of melanotropins in the amphiphile-water interface of reversed micelles. *Eur Biophys J* 29:38- 47

Thomas, E.L., Bozeman, P.M. and Learn, D.B. (1991). Lactoperoxidases: structure and catalytic properties, in: y, Everse, J., Everse, K.E., and Grisham, M.B. ed. Peroxidases in Chemistry and Biology, Vol. I, CRC Press, pp 123- 143.

Tilstra, L. and Mattice, W.L. (1996). The beta sheet to coil transition of polypeptides, as determined by circular dichroism. In Fasman, G. *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, 1st Ed. Plenum Press, NY, USA, pp. 261- 269.

Weert, M., Hoechstetter, J., Hennink, W.E. and Crommelin, D.J.A. (2000). The effect of water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme. *J Control Rel* 68: 351-359.

Wei, G., Lu, L.F. and Lu, W.Y. (2007). Stabilization of recombinant human growth hormone against emulsification-induced aggregation by Pluronic surfactants during microencapsulation. *Int J Pharm* 338: 125-132.

Xing, D.K.L., Cranet, D.T., Bolgiano, B., Corbel, M.J., Jones, C. and Sesardic, D. (1996). Physico-chemical and immunological studies on the stability of free and microsphere-encapsulated tetanus toxoid *in vitro*. *Vaccine* 14: 1205-1213.

Zhang, Y. and Cremer, P.S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hoffmeister series. *Cur Op Chem Biol* 10: 658-663.

Zhou, H.X. (2005). Interactions of macromolecules with salt ions: an electrostatic theory for the Hoffmeister effect. *Proteins* 61: 69-78.

ANEXO III

Dressing liposomal particles with chitosan and poly (vinyl alcohol) for oral vaccine delivery.

VANESSA CRISTINA RESCIA,^{1,4} CÉLIA S. TAKATA,²
PEDRO S. DE ARAUJO,³ and M. HELENA BUENO DA COSTA^{1*}

¹Lab. de Microesferas e Lipossomas - Centro de Biotecnologia- I. Butantan

²Div. Desenvolvimento Tecnológico e Produção-I. Butantan, São Paulo, Brasil

³Departamento de Bioquímica- IQ-Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁴Disciplina de Clínica Médica, Dep. Medicina - UNIFESP, São Paulo, Brasil

Liposomes have been used as adjuvants since 1974 (Allison and Gregoriadis, 1974). One major limitation for the use of liposomes in oral vaccines is the lipid structure instability caused by enzyme activities. Our goal was to combine liposomes which can encapsulate antigens (Dtxd, diphtheria toxoid) with chitosan which protects the particles and promotes mucoadhesibility. We employed physical techniques to understand the process by which liposomes (SPC: Cho, 3:1) can be sandwiched with chitosan (Chi) and stabilized by PVA (Poly-vinyl alcohol) which are biodegradable and biocompatible polymers. Round and smooth surfaced particles of REV-Chi (Reversed phase vesicles sandwiched by Chi) stabilized by PVA were obtained. The REV encapsulation efficiencies (Dtxd was used as the antigen) were directly dependent on the Chi and PVA present in the formulation. Chi adsorption on REV surface was accompanied by an increase of ζ potential. In contrast, PVA adsorption on REV-Chi surface was accompanied by a decrease of ζ potential. The presence of Dtxd increased the Chi surface adsorption efficiency. The PVA affinity by mucine was 2000 higher than that observed with Chi alone and did not depend on the molecule being in solution or adsorbed on the liposomal surface. The liberation of encapsulated Dtxd was retarded by encapsulation within REV-Chi-PVA. These results lead us to conclude that these new and stabilized particles were able to adsorb to intestinal surfaces, resisted degradation and controlled the antigen release. Therefore, REV-Chi-PVA particles can be used as an oral delivery adjuvant.

Key words: oral adjuvant, liposome stabilization, polymer interactions, chitosan-PVA interactions, particulate adjuvant.

*Address correspondence to Maria Helena Bueno da Costa, Laboratório de Microesferas e Lipossomas - Centro de Biotecnologia - I. Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, 05503-900 - Butantan, São Paulo, SP, Brasil. Email: bdacosta@usp.br

Introduction

It is well accepted that the increased residence time of particulate delivery systems at mucosal surfaces may facilitate (and increase) the uptake of such agents. Accordingly, mucoadhesive agents provide a strategy that may increase the antigen residence time and consequently the uptake of biodegradable particulate drug carriers when administered by oral route. The other advantage

of oral or mucosal vaccination is the production of local antibodies at the same sites where the pathogens enter the body. Furthermore, the obvious disadvantages of invasive injections compared to non-invasive mucosal vaccination are the low patient compliance and high costs due to the need of a sterile manufacturing process and for qualified personnel to administer the vaccine (Slutter, Hagenaars and Jiskoot, 2008; van der Lubben et al., 2003). Since the orally administered vaccines are degraded by the stomach acidic environment and the various enzymes in the gastrointestinal (GI) tract, investigators have suggested different possibilities to avoid degradation of antigens before reaching the target cells. The use of Chi (chitosan) - a mucoadhesive polymer - was proposed for the production of an oral delivery system, resistant to the aggressions of the digestive tract (Marón et al., 2007; Guzey and Clements, 2007; Harnsilawat et al., 2006; Aoki et al., 2005; Gu et al., 2005; Klinkerson et al., 2005_a; 2005_b; Mertins et al., 2005; Wu et al., 2004; Ogawa et al., 2003_a; van der Lubben et al., 2003; Rengel et al., 2002; Takeuchi et al., 2001; Filipovic-Grcic, Skalko-Basnet and Jalsenjak, 2001). Chi is a glucosamine and N-acetylglucosamine polymer derived by partial depolymerization of chitin, a natural component of crustacean shells. It is inexpensive, biodegradable, non toxic and biocompatible (Qin et al., 2006; Martino, Sittinger and Risbud, 2005; Huang et al., 2005; Khor and Lim, 2003; Madihally and Mattew, 1999). The liposomes sandwiched by chitosan (REVs-Chi) used as an oral vaccine vehicle, aggregate in vitro (Marón et al., 2007). To avoid particle aggregation the REVs-Chi were stabilized by PVA (poly-alcohol vynilic) (Marón et al., 2007). Here, using physical techniques, the rational use

of PVA is discussed step by step in the preparation of REV-Chi for oral vaccine delivery and how the PVA can affect particle adhesibility to mucus.

Materials and methods

The antigen Dtxd (Diphtheria toxoid) was a gift from Dr Célia S. Takata , Instituto Butantan (Lot AnD/PAG 14/05, 1650 Lf/mL, **SPC** (Soy phosphatidylcholine) was purchased from Avanti Polar Lipids (USA); **Chi** (Chitosan, low molecular weight, deacetylation degree 75-85 %) and **PVA** (polyvinilic alcohol, Mw 127 kDa), **Cho** (cholesterol); **Mu** (Types1S and III mucin) were obtained from Sigma and Aldrich, respectively. All other chemicals and solvents used were of analytical grade. **Equipments:** Probe sonifier Branson, model 450; rotatory evaporator Tecnal TE-210; Zetasizer (Brookhaven Zeta Pals); spectrophotometer Pharmacia Ultraspec 2000, TEM, transmission electronic microscope LEO model 906E, JEOL 100CX electronic microscope, criofracturer JEOL JED-9000 and an ELISA automatic reader Titerteck Multiscan MCC/340 (Labsystems).

Liposome preparation by reverse evaporation method (REVs)

The buffer (200 µL) 50 mM phosphate, pH 4.5 was added to 60 mg of SPC (Soy lecithin) and 10 mg of Cho in 10 mL of ethyl acetate. After sonication, the organogel was formed in a rotatory evaporator under vacuum (15 mm Hg/cm). The liposomes were resuspended in 50 mM phosphate and their morphology observed by TEM.

Sandwiched Chitosan liposome preparation by reverse evaporation method (REVs-Chi)

Dtxd in 0,5 % Chi (in 200 μ L of 50 mM phosphate buffer pH 4,5) was added to 60 mg of SPC (Soy lecithin) and 10 mg of Cho in 10 mL of ethyl acetate. After sonication, the organogel was formed in a rotatory evaporator under vacuum (15 mm Hg/cm). The liposomes were resuspended in 50 mM phosphate buffer and their morphology observed by TEM.

Sandwiched Chitosan liposome preparation by reverse evaporation method (REVs-Chi-PVA)

The procedure was the same described above except that the liposomes were resuspended in 1 % PVA in water and their morphology observed by TEM and by freeze fracture electronic microscopy.

Particle size

REVs, REVs-Chi or REVs-Chi-PVA suspensions empty or loaded with Dtxd were diluted in 10 mL deionised water, then subjected to photon correlation spectroscopy.

Encapsulation efficiency

REVs, REVs-Chi or REVs-Chi-PVA suspensions containing Dtxd were dispersed in water and centrifuged twice at room temperature at 4 000 rpm, during 20 minutes. The Dtxd in the supernatants was measured according to Peterson, 1977.

Efficiency of Chi interfacial polymerization within the different particle preparations.

REVs-Chi or REVs-Chi/Dtxd or REVs-Chi-PVA/Dtxd were washed with phosphate buffer and the supernatant assayed for free Chi according to Muzzarelli, 1998.

REVs and REVs-Chi morphologies

Pictures were taken with TEM and freeze fracture. Briefly, for the TEM, the samples were centrifuged and the supernatant fixed with 2 % glutaraldehyde, 2 % osmium tetroxide 1 % uranyl acetate. After dehydration propylene oxide was added. Lead acetate and uranyl acetate were used for staining. For the electron microscopy of cryofractures, the samples were cryo-fixed in frozen propane. The fracture was done in a JEOL JED 9000 and the samples were covered with silver and carbon, cleaned with nitric acid and chloroform/methanol (1:1). The analyses were done in an electronic microscope JEOL 100 CX.

Mucin III and chitosan or PVA interactions

Stock solutions of 3 mM Chi, 7.9 mM PVA and 2 mg/mL mucin III (Mu-III) were prepared in 50 mM phosphate buffer, pH 4.5. The samples used for the interaction studies were 1:3; 1:1; 3:1 and 9:1 Mu-III:Chi respectively or 1:3; 1:1; 3:1 and 9:1 Mu-III:PVA respectively. Samples were incubated, under agitation, for 30 minutes and the absorbance at 500 nm measured. Controls were performed according to the literature (He, Davis and Illum, 1998) by reading the absorbance of the polymers individually.

REVs-Chi or REVs-Chi-PVA interactions with Mu-III

REVs-Chi or REVs-Chi-PVA were added under strong agitation to 0.5% Mu-III (v/v) followed by incubation at room temperature (RT) during 60 minutes. After this time, the samples were centrifuged at 2 000 g for 20 minutes. The free Mu-III was measured in the supernatants according to the method of Rengel et al., 2002.

Diphtheria toxoid liberation from REVs or REVs-Chi or REVs-Chi-PVA

The samples were incubated in SGF (simulated gastric fluid, pH 1.2) or in SIF (simulated intestinal fluid) both prepared according to the United States Pharmacopoeia (USP 2002 and 2003). The dispersions of REVs, REVs-Chi or REVs-Chi-PVA (1.5 mL) were added to the liberation media and incubated, under gentle agitation, at 37°C. After 4 minutes of centrifugation at 2 000 g, aliquots were taken (4 mL) and an equal volume of the corresponding media was added. This procedure was repeated at pre-determined time points. The samples were analyzed for liberated Dtxd.

Results and discussion

Regular, round, soft porous sponge like particles of liposomes “dressed” with chitosan and PVA were obtained (Figure 1).



Figure 1. Freeze-fracture electron micrograph of REV-Chi-PVA.

Particles of REVs, REVs-Chi and REVs-Chi-PVA empty or containing Dtxd with different sizes were obtained. In general, the particle size and the encapsulation efficiencies were dependent on the liposome composition (particle complexity) (Table 1). If REVs were considered the reference, the addition of Chi and Dtxd increased particle sizes (Table 1). PVA decreased the particle size, if REVs-Chi/Dtxd were considered the reference (Table 1). It is important to take into account the Dtxd structure to facilitate the discussion about these particles physical characteristics.

It is known, from the literature, that the Dtxd Mn is 58.3 kDa (Bennett, Choe and Eisenberg, 1994) and its calculated pI is 4.25 (Campana et al., 2004). Here, the Dtxd was nanoencapsulated into different REVs particles at a pH above its pI therefore, with a net negative charge. The decrease of the negative liquid charge of REVs/Dtxd (-3.71 mV) in relation to REVs (-9.40 mV) could be

understood as a protein non specific adsorption on the external particle surface (Table 1). The same occurred after the adsorption of Chi (a polycation) on REVs, forming the REVs-Chi. This result is in agreement with other literature data (Laye, MacClements and Weiss, 2008), in which the empty liposomal particle has a ζ -potential of -38 mV and the Chi a ζ -potential of +85 mV. If this was compared with the ζ -potentials for REVs-Chi/Dtxd (-9.94 mV) and REVs-Chi-PVA/Dtxd (-12.3 mV) the same phenomena occurred, meaning that the increase of the net negative charge was due to externally adsorbed Dtxd (Table 1). Then (considering REVs as the initial particle) the particle sizes (Figure 2) and the encapsulation efficiencies for Dtxd increased with the presence of Chi and PVA (Table1). The adsorption of Chi (87.5 %) on REVs surface was accompanied by an increase on ζ -potential and in contrast, the adsorption of PVA with a decrease of ζ -potential (Table 1). The presence of Dtxd within REVs particles increased the efficiency of Chi polymerization probably due to the interaction between Chi (positively charged) and Dtxd (negatively charged).

It was very interesting to note that the presence of Chi and/or PVA on REVs changed completely the thickness and the structure of the REVs bilayer (Figure 2). It is known, from the literature, that the presence of a solute into the media induces modifications in water and also in the hydration shell of the molecule (Vorob'ev et al., 2007). Under physiological conditions Chi is able to capture 160 % more water (Silva et al., 2004). This could explain why Chi increased not only the hydration shell (Figure 2) but also the size (167 nm $\rightarrow$ 313 nm) and structure of REVs (Figure 2).

Table 1. Particle sizes, surface charges and encapsulations efficiencies.

Formulations	Size (nm)	ζ -potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)	Efficiency of interfacial Chi polymerization (%)
REVs	167	-9,40	0	-
REVs/Dtxd	256	-3,71	58,8	-
REVs-Chi	313	-4,66	0	87.5
REVs-Chi/Dtxd	524	-9,94	69,2	98
REVs-Chi-PVA	367	-7,51	0	87.5
REVs-Chi-PVA/Dtxd	383	-12,3	75,4	98

It was described (Nakano, Tozuka and Takeuchi, 2008) that a modified PVA by a lipidic anchor (PVA-R) associates with the lipid bilayer because of an observed increase of size. Here, PVA also increased the particle size (313 nm $\rightarrow$ 367 nm), modified the thickness of bilayer (probably by modifying the hydration shell) and thus the association occurred (Figure 2).

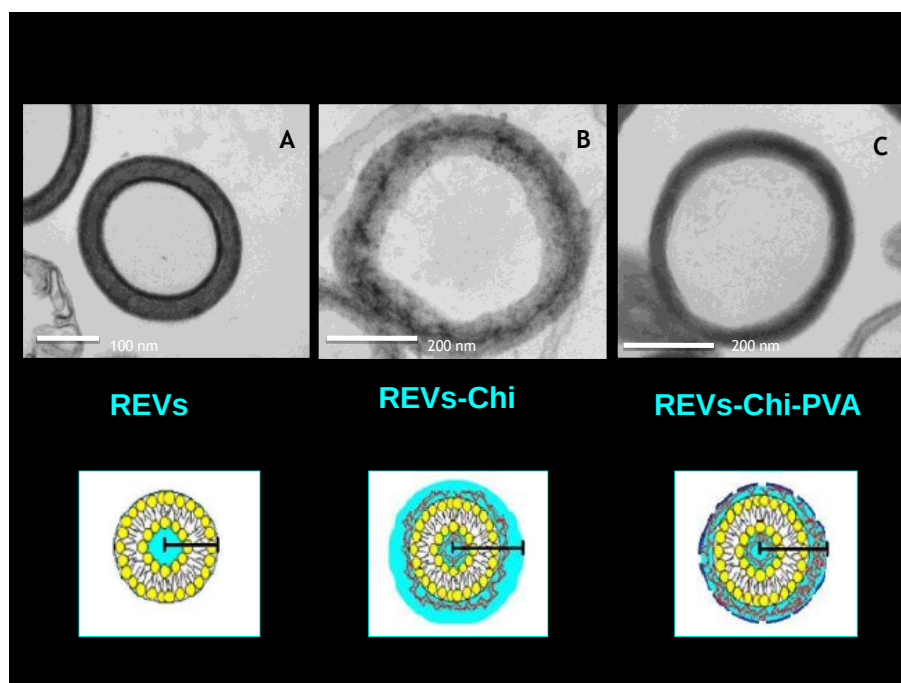


Figure 2. Micrographs of different formulations by Transmission electronic microscopy.

These particles were constructed to be used for mucosal vaccine delivery. The mucins (Mu) were used as a model to study the mucoadhesibility properties of

Chi, PVA and the particles dressed with them. The increase on turbidity, used for the interaction assays, is based on the particle formation between Mu/Chi or Mu/PVA (Prego, et al, 2005; Takeuchi et al., 2005; Takeuchi, Yamamoto and Kawashima, 2001 and He, Davis and Illum, 1998). It was observed that the interaction between Mu-III (1 % of sialic acid) and Chi occurred only in the conditions 1:1 and 3:1 (both v/v of Mu-III at 2 mg/mL and 3 mM Chi, respectively) (Figure 3). This suggests that in the excess of Chi (1:3, Mu-III/Chi) or Mu-III (9:1) the interaction did not occur or, better, it probably occurred but was not able to increase the particle size and consequently the turbidity (Figure 3). The most interesting observation (Figure 3) was the degree of affinity between Mu-III and PVA which was 2000 greater than that observed with Chi.

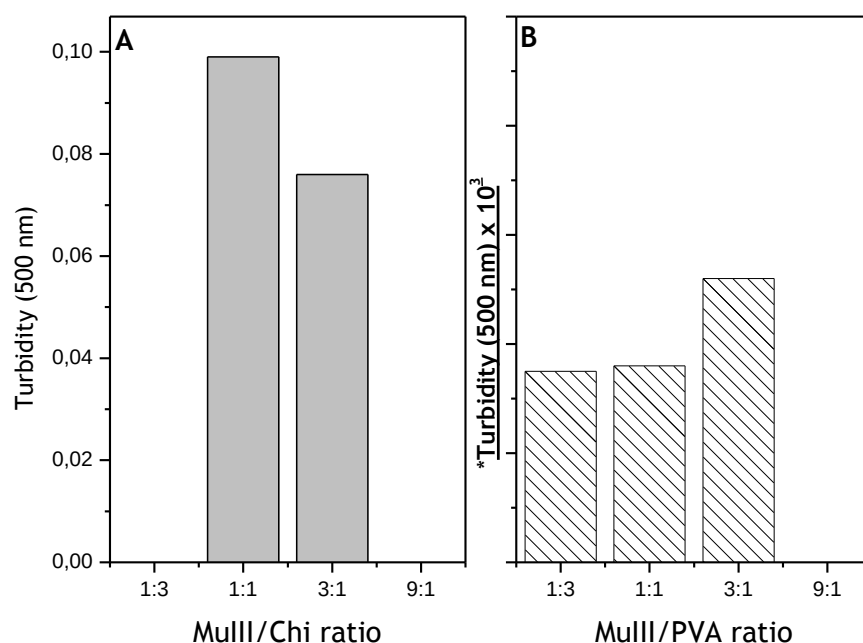


Figure 3. Interaction between Mu-III and Chi or PVA. (A) The Mu-III was incubated with Chi (v/v final concentration 1mg/mL: 1.5 mM , Mu-III:Chi, respectively) . (B) The Mu-III was incubated with PVA 1:1, v:v (final concentration 1mg/mL: 3.45 μ M, Mu-III: PVA, respectively). After 30 minutes, the turbidities were read. Note that the B scale is 10³ x greater than A scale.

According to the literature the ionic interactions between the Chi primary amino groups and the negatively charged sialic and sulfonic groups in the mucus is desirable to increase intestinal particle capture (Chayed and Winnik, 2007; Illum, Jabbal-Gil and Hinchcliffe, 2001; Hassan and Gallo, 1990). Here, the adhesibility of REVs to mucus was 35 % increased by the presence of Chi (Figure 4) which is corroborated by other authors (Chayed and Winnik, 2007; Illum, 2001; Takeuchi et al, 1996; Hassan and Gallo, 1990).

A direct correlation was observed between Mu adhesibility/Chi or Mu adhesibility/Chi-PVA on the particle (Figure 4 and 5) and ζ -potential. Therefore, these adhesibility factors were due not only ionic interactions (Figure 4 and 5) but to other elements.

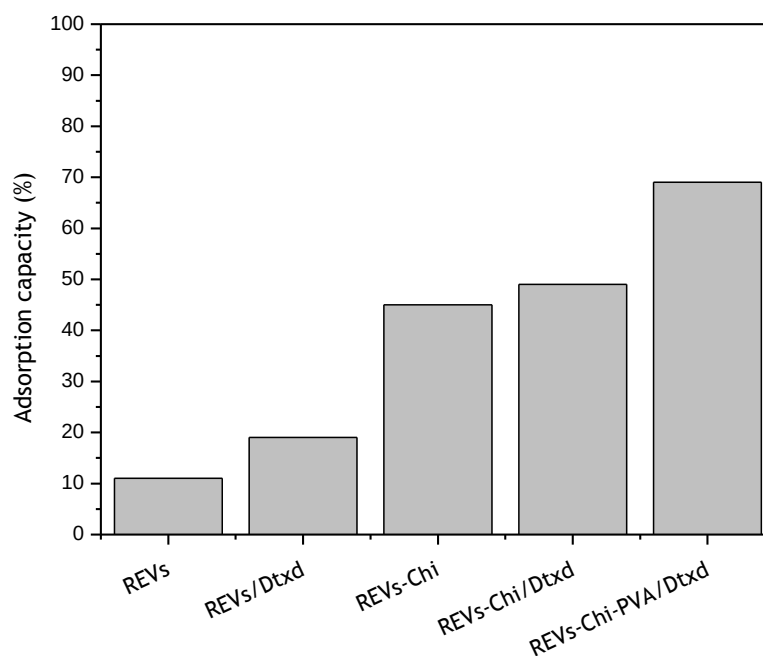


Figure 4. Mucin III and different liposomal formulations interactions. The type III Mucin (0,5 mg/mL) was incubated with REVs; REVs/Dtxd; REVs-Chi; REVs-Chi/Dtxd or REVs-Chi-PVA-Dtxd during 20 minutes at 37 °C. The supernatants were read at 500 nm.

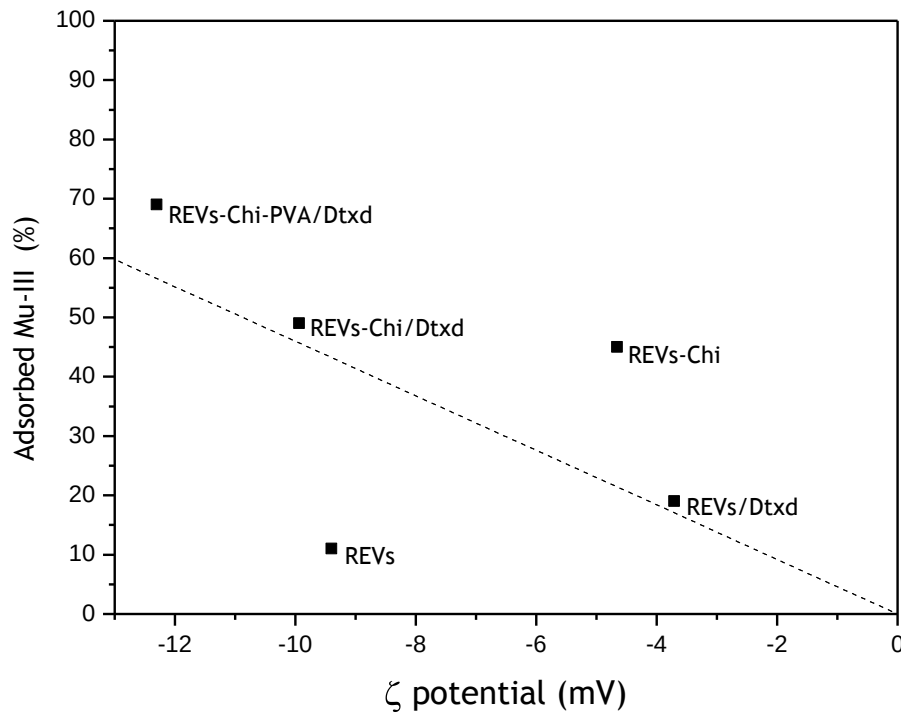


Figure 5. Correlation between adsorbed Mu-III and ζ potential of different particles.

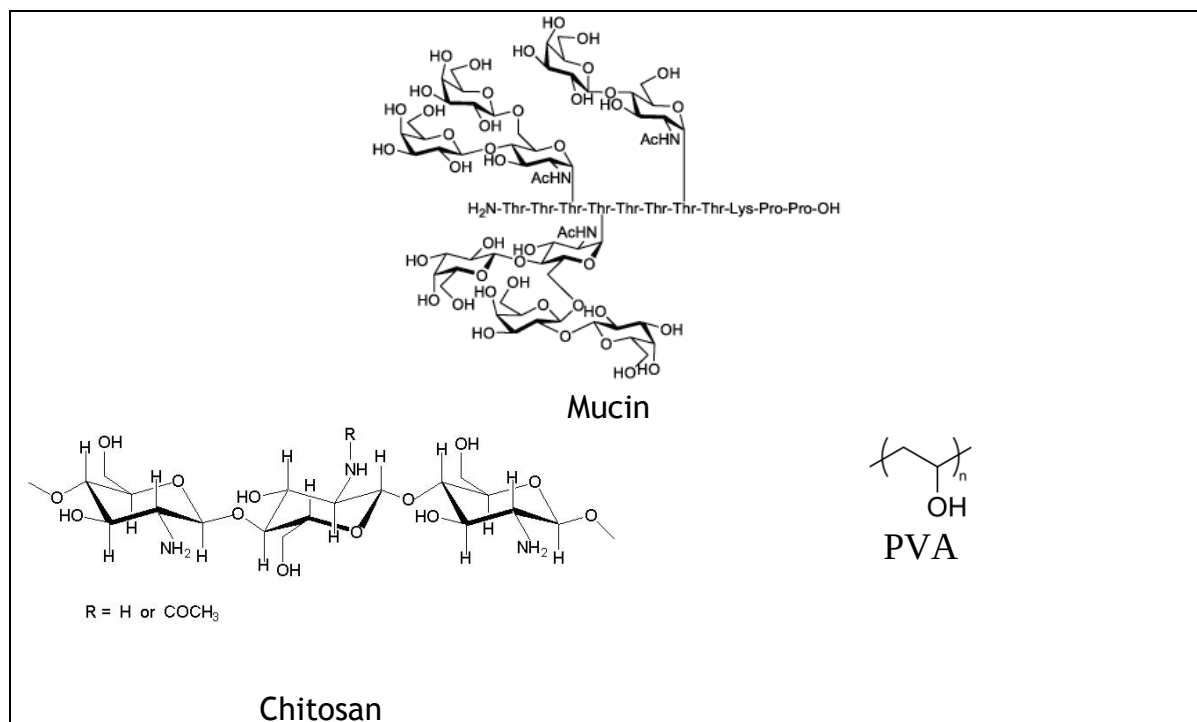
The enhancement of adhesibility induced by Chi can be increased even further by using lipid modified Chi (Svenson, Thuresson and Arnebrant, 2008) or thiol modified Chi (Bernkop-Schnürch et al., 2006). These thiol groups could form S-S linkages with the cysteine rich mucus region (Bernkop-Schnürch, 2006, Roldo et al., 2004; Leitner et al., 2004) what explains its better adhesibility.

However, these chemical modifications could increase production costs (Martino, Sittinger and Risbud, 2005; Huang et al., 2005; Khor and Lim, 2003; Madihally and Matthew, 1999). The decrease in costs, enhance in adhesibility and particle stability were all obtained in this work with the use of PVA. It is known that the increase on particle affinity by Mu-III (Figure 4) should be expected for

particulate Chi (Cui, Qian and Yin, 2006; Takeuchi, Yamamoto and Kawashima, 2001), but not for PVA (He, Davis and Illum, 1998).

The statement that the interactions between Chi and MU-III being only ionic, as reported elsewhere (Chayed and Winnik, 2007; Takeuchi et al., 2005; Illum, 2001; He et al., 1998; Takeuchi et al., 1996; Hassan and Gallo, 1990) is not accurate. The observed ζ -potentials for the particles studied, were all negative (Table 1) Mu-III is also negatively charged therefore, repulsion should have occurred and not attraction as observed (Figure 4). This observation did not agree with published results (Chayed and Winnik, 2007; Takeuchi et al, 2005; Illum, Jabbal-Gill and Hinchcliffe, 2001; He, Davis and Illum, 1998; Takeuchi et al 1996; Hassan and Gallo, 1990). One plausible explanation for our results is that the interaction between PVA and Mu involved hydrogen bonds more than ionic interactions. It is known that the capacity of establish hydrogen bonds between polymers is a requirement for adhesions to occur (Thomas and Peppas, 2008; Peppas et al., 2000; Bansil, Stanley and Lamont, 1995; Strous and Dekker, 1992).

This was a reasonable assumption when PVA and Mu structures were taken in consideration. Mu is rich in carboxyl groups - from its sugar lateral chains - and has sulfate groups (Scheme 1). Mu, PVA and Chi are rich in -OH groups (Scheme 1).



Scheme 1. The polymers representations.

When the particles containing Dtxd were incubated in simulated gastric or simulated intestinal fluids it was observed that both Chi and PVA retarded the Dtxd liberation. The liberated protein retained its immunological activity indicating that the particles can be further studied in biological assays for vaccine delivery.

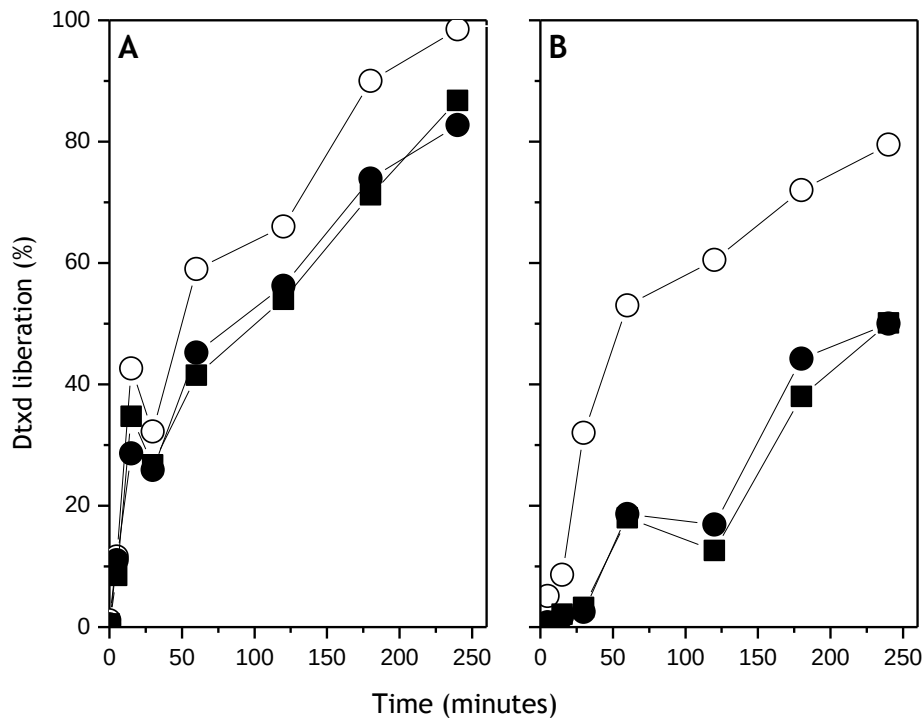


Figure 8. Effect of the media of liberation of Dtxd from different formulations. The particles containing Dtxd: REVs (o); REVs-Chi (●) or REVs-Chi-PVA (■) were incubated in **A.** Simulated gastric fluid or **B.** Simulated intestinal fluid and incubated at 37 °C. Liberated Dtxd were measured by Lowry HPLC or by ELISA. All the liberated protein retained 100 % of their immunological activities measured by ELISA.

Conclusions

Well characterized particles of liposomes dressed with Chi and PVA were able to adhere to Mu. These mucosal delivery systems retarded and controlled the Dtxd liberation.

Acknowledgements

FAPESP (00/10970-7), CNPq (302047/2008-5) and Fundação Butantan. VC Rescia had a fellowship from CAPES.

References

- Allison, AC and Gregoriadis, G (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*, 252: 252.
- Aoki, T., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2005). Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocol* 19: 209- 220.

Bansil, R., Stanley, E. and Lamont, J.T. (1995). Mucin biophysics. *Ann Rev Physiol* 57: 635- 657.

Bennett, M.J., Choe, S. and Eisenberg, D. (1994). Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc Natl Acad Sci* 91: 3127- 3131.

Bernkop-Schnürch, A., Weithaler, A., Albrech, K. and Greimel, A. (2006). Thiomers: Preparation and *in vitro* evaluation of mucoadhesive nanoparticle drug delivery system. *Int J Pharm* 317: 76- 81.

Campana, R.A., Namur, J.A.M., Takata, C.S., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2004). Ionic interfaces and diphtheria toxoid interactions. *Prot Expr Purif* 33: 161- 165.

Chayed, S. and Winnik, F.M. (2007). *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of polysaccharide-based nanoparticulate oral drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 65: 363- 370.

Cui, F., Qian, F. and Yin, C. (2006). Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles. *Int J Pharm* 316: 154- 161.

Filipovic-Grcic, J., Skalko-Basnet, N. and Jalsenjak, I. (2001). Mucoadhesive chitosan-coated liposomes: characteristics and stability. *Microencapsulation* 18: 3-12.

Gu, Y.S., Decker, E.A., and McClements, D.J. (2005). Influence of pH and carageenan type on properties of beta-lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocol* 19: 83- 91.

Guzey, D. and McClements, D.J. (2007). Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by beta-lactoglobulin-pectin complexes. *J. Agric Food Chem* 55 (2): 475- 485.

Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R. and McClements, D.J. (2006). Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein-polysaccharide electrostatic complexes format at the oil-water interface. *J. Agric Food Chem* 54: 5540-5547.

Hassan, E.E. and Gallo, J.M. (1990). A simple rheological method for the *in vitro* assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharm Res* 7: 491-495.

He, P., Davis, S.S. and Illum, L. (1998). *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharma* 166: 75-88.

Huang, Y., Gao, J., Liang, W. and Nakagawa, S. (2005). Preparation and characterization of liposomes encapsulating chitosan nanoparticles. *Biol Pharm Bull* 28 (2): 387- 390.

Illum, L., Jabbal-Gill, I. and Hinchcliffe, M. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery systems for vaccines. *Adv Drug Del Rev* 51: 81- 96.

Khor, E. and Lim, L. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24: 2339- 2349.

Klinkerson, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2005_a). Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *J Agric Food Chem* 53 (21): 8365- 8371.

Klinkerson, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2005_b). Increasing oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with electrostatic layer-by-layer deposition technology. *J Agric Food Chem* 53 (11): 4561- 4566.

Leitner, V.M., Guggi, D., Krauland, A.H., and Bernkop-Schnürch, A. (2004). Nasal delivery of human growth hormone: *in vitro* and *in vivo* evaluation of a thiomers/glutathione microparticulate delivery system. *J Control Rel* 100: 87-95.

Laye, C., McClements, D.J. and Weiss, J. (2008). Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. *J Food Sci* 73 (5): N7-N15.

Madhally, S.V. and Matthew, H.W.T. (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 20: 1133-1142.

Marón, L.B., Peniche, C., da Silveira, N.P., Pohlmann, A., Mertins, O., Tatsuo, L.N., Sant'anna, A.O., Moro, A.M., Takata; C.S., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, MH (2007). LUVs recovered with chitosan: a new preparation for vaccine delivery. *J Lip Res* 15: 155- 163.

Martino, A.D., Sittinger, M.V. and Risbud, MV (2005). Chitosan: A versatile biopolymer for orthopedic tissue-engineering. *Biomaterials* 29: 5983- 5990.

Mertins, O., Sebben, M., Pohlmann, A.R. and Silveira, N.P. (2005). Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. *Chem Phys Lip* 138: 29- 37.

Muzzarelli, R.A.A. (1998). Colorimetric determination of chitosan. *Anal Biochem* 260: 255- 257.

Nakano, K., Tozuka, Y. and Takeuchi, H. (2008). Effect of surface properties of liposome coated with a modified polyvinyl alcohol (PVA-R) on the interaction with macrophage cells. *Int J Pharma* 354: 174- 179.

Ogawa, S., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2003). Influence of environmental conditions on the stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *J Agric Food Chem* 51 (18): 5522-5527.

Peppas, N.A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J.H. and Zhang, J. (2000). Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Ann Rev Biomed Eng* 2: 9- 29.

Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346- 356.

Prego, C., Garcia, M., Torres, D. and Alonso, M.J. (2005). Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Control Rel* 101: 151-162.

Qin, C., Gao, J., Wang, L., Zeng, L. and Lyu, Y (2006). Safety evaluation of short-term exposure to chitooligomers from enzymic preparation. *Food Chem Toxicol* 44: 855- 861.

Rengel, R.G., Barisic, K., Pavelic, Z., Grubisic, T.Z., Cepalak, I. and Filipovic-Grcic, J. (2002). High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Eur J Pharm Sci* 15: 441- 448.

Roldo, M., Hornof, M., Caliceti, P. and Bernkop-Schnürch, A. (2004). Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and *in vitro* evaluation. *Eur J Pharm Biopharm* 57: 115- 121.

Silva, R.M., Silva, G.A., Coutinho, O.P., Mano, J.F. and Reis, R.L. (2004). Preparation and characterization in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. *J Mater Sci Mater Med* 15 (10): 1105- 1112.

Slutter, B., Hagenaaars, N., Jiskoot, W. (2008). Rational design of nasal vaccines. *J Drug Targ* 16 (1): 1-17.

Strous, G.J. and Dekker, J. (1992). Mucin-type glycoproteins. *Critical Reviews in Biochem. Mol Biol* 27: 57- 92.

Svensson, O., Thuresson, K. and Arnebrant, T. (2008). Interactions between chitosan-modified particles and mucin-coated surfaces. *J Col Int Sci* 325: 346- 350.

Takeuchi, H., Thongborisute, J., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H. and Kawashima, Y. (2005). Novel mucoadhesion tests for polymers-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev* 57: 1583- 1594.

Takeuchi, H., Yamamoto, H. and Kawashima, Y. (2001). Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. [*Adv Drug Del Rev* 47: 39- 54.](#)

Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T. and Kawashima, Y. (1996). Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm Res* 13 (6): 896- 901.

Thomas, J.B. and Peppas, N.A. (2008). Adhesives in: Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering (Gary E W e Gary Bowlin, ed.) Sec ed., vol. 1: 1-8 (New York, USA).

USP, United States Pharmacopoeia and National formulary United States (2002) and (2003). Pharmacopoeial Convention Inc., Rockville, MD, 25th and 26th editions.

Van der Lubben, I.M., Kersten, G., Fretz, M.M., Beuvery, C., Verhoef, J.C., and Junginger, H.E. (2003). Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine* 21: 1400- 1408.

Vorob'ev, M., Churochkina, N., Khokhlov, A. and Stepnova, E. (2007). Hydration characterization of hydrophobically modified polymers by dielectric measurements in the millimeter range. *Macromol Biosci* 7: 475- 481.

Wu, Z., Ping, Q., WEI, Y. and LAI, J. (2004). Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. *Acta Pharmacol Sin* 25 (7): 996- 972.

ANEXO IV

***In vitro* versus *in vivo* correlation assays for an oral chitosan-liposomal diphtheria vaccine.**

VANESSA C RESCIA^{1,5}, CÉLIA S TAKATA², OSVALDO A SANT'ANNA³,
PEDRO SOARES DE ARAUJO⁴ AND MARIA HELENA BUENO DA COSTA^{1, *}

¹Lab. de Microesferas e Lipossomas - Centro de Biotecnologia- I. Butantan

²Div. Desenvolvimento Tecnológico e Produção-I. Butantan, São Paulo, Brasil

³Laboratório de Imunogenética-I. Butantan, São Paulo, Brasil

⁴Departamento de Bioquímica- IQ-Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁵Disciplina de Clínica Médica, Dep. Medicina - UNIFESP, São Paulo, Brasil

Liposomes sandwiched by chitosan (REVs-Chi) as vehicles for oral vaccines have been well characterized in our laboratory. These particles were designed to be captured by mucus, to interact with oral surfaces and to withstand the enzymes of the gastric transit. Three different formulations containing Dtxd (diphtheria toxoid): REVs [reverse phase evaporation vesicles of SPC: Cho (3: 1)]; REVs-Chi (REVs sandwiched by chitosan) and REVs-Chi-PVA were used to immunize mice. Through adhesibility assays and antibody anti-diphtheria experiments we observed a direct correlation between particle complexity (free antigen < REVs < REVs-Chi < REVs-Chi-PVA) and antibody production (IgA, IgG₁ and IgG_{2a}) in all the assays (R= 0,91766-0,99718). The most striking result was the absence of IgA production in those mice immunized with the free antigen, proving the excellence of the engineered particles. In addition to enhancement of mucosal antibodies production, the formulations with Chi and PVA stimulated both, humoral antibody production and selectivity. We have shown that it was possible to establish a correlation between REVs-Chi/Dtxd and REVs-Chi-PVA/Dtxd and the enhancement of mucosal immunity. These particles can be used as a general vehicle for oral drug or vaccine delivery systems.

Key words: mucosal immunity, chitosan- liposomes, liposomes, humoral immunity, oral immunity, particulate adjuvants, vaccine delivery, drug delivery systems.

* Address correspondence to Maria Helena Bueno da Costa, Laboratório de Microesferas e Lipossomas - Centro de Biotecnologia - I. Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, 05503-900, Butantan, São Paulo, SP, Brasil.
Email: bdacosta@usp.br

Introduction

Improvements in vaccine formulations that make vaccine delivery easier and safer, decrease dependency on the cold chain or reduce the number of immunization interventions needed, could have a significant impact on preventive medicine. The WHO recommendations encompass the use of new delivery systems (to improve immunogenicity and to decrease the number of

doses) and the abolishment of the needle in vaccination (Friede and Aguado, 2005). Traditional needle-based, invasive, parenteral vaccination methods suffer from various drawbacks, like the need for trained personnel to administer the vaccines, high expenses, patient inconvenience and associated risk of needle-borne infections (for example AIDs, hepatitis) due to the use of contaminated needles. Further, parenterally administered vaccines mainly stimulate a systemic response and antibodies generated in this manner do not always reach the mucosal surfaces, which is the predominant entry site for most infectious pathogens (Influenza, Diphtheria, Pneumonia) (Friede and Aguado, 2005; Bramwell and Perrie, 2006). Mucosal immunization provides the first line of immunological defense (i.e., induction of secretory IgA that prevents the attachment of infectious pathogens to mucosae) (Bramwell and Perrie, 2006; Medina and Guzman, 2000).

Chitosan (Chi) particles have been used as oral vehicles for vaccine delivery (Ahire et al., 2007; Amidi et al., 2007; Jain, Sharma and Vyas, 2006; Bramwell and Perrie, 2005; Van der Lubben et al., 2003) because of its mucoadhesive characteristics (Chayed and Winnik, 2007; Illum, Jabbal-Gill and Hinchcliffe, 2001; Hassan and Gallo, 1990). A well characterized system composed by a mixture of liposomes and Chi particles have been prepared for oral vaccination purposes (Rescia et al., 2009_a; Rescia et al, 2009_b; Marón et al., 2007). This system, named REVs-Chi (reverse phase vesicles sandwiched by chitosan) is used here as a model to encapsulate the Dtxd (Diphtheria toxoid) antigen. The central idea of this investigation was to describe, step by step, a model to correlate particle adhesibility *in vitro* with produced IgA, *in vivo*.

Materials and methods

The Dtxd (Diphtheria toxoid) antigen was a gift from Dr Célia S. Takata, Instituto Butantan (Lot AnD/PAG 14/05, 1650 Lf/mL. SPC (Soy phosphatidylcholine) was purchased from Avanti Polar Lipids (USA); Chi (Chitosan, low molecular weight, deacetylation degree 75-85 %) and PVA (poly-vinilic alcohol, Mw 127 kDa), Cho (cholesterol) and Mu (Types 1S and III mucin) were obtained from Sigma-Aldrich. The immunoconjugates anti-IgG₁, anti-IgG_{2a} and anti-IgA conjugated with peroxidase were purchased from Biosciences. All other chemicals and solvents used were of analytical grade. Animals: Balb-C mice were maintained in the Central Biotério of Butantan Institute. Equipments: Probe sonifier Branson, model 450; rotatory evaporator Tecnal TE-210; Zetasizer (Brookhaven Zeta Pals); spectrophotometer Pharmacia Ultraspec 2000, TEM (transmission electronic microscopy) LEO model 906E, and an ELISA automatic reader Titerteck Multiscan MCC/340 (Labsystems).

Liposome preparation by reverse evaporation method (REVs)

The buffer (200 µL) 50 mM phosphate, pH 4.5 was added to 60 mg of SPC and 10 mg of Cho in 10 mL of ethyl acetate. After sonication, the organogel was formed in a rotatory evaporator under vacuum (15 mm Hg/cm). The liposomes were resuspended in 50 mM phosphate and their morphology observed by TEM.

Sandwiched Chitosan liposome preparation by reverse evaporation method (REVs-Chi)

Dtxd in 0,5 % Chi (in 200 μ L of 50 mM phosphate buffer pH 4,5) was added to 60 mg of SPC and 10 mg of Cho in 10 mL of ethyl acetate. After sonication, the organogel was formed in a rotatory evaporator under vacuum (15 mm Hg/cm). The liposomes were resuspended in 50 mM phosphate buffer and their morphology observed by TEM.

Sandwiched Chitosan liposome preparation by reverse evaporation method (REVs-Chi-PVA)

The procedure was the same described except that the liposomes were resuspended in 1 % PVA in water and their morphology observed by TEM and freeze fractured electronic microscopy.

Encapsulation efficiency

The REVs/Dtxd, REVs-Chi/Dtxd or REVs-Chi-PVA/Dtxd suspensions were dispersed in water and centrifuged twice at room temperature at 2000 g for 20 minutes. The Dtxd in the supernatants was measured according to Peterson, 1977. The encapsulated protein content was calculated by differences between the Dtxd added and the free Dtxd in the supernatant.

Particle size

REVs, REVs-Chi or REVs-Chi-PVA suspensions empty or loaded with Dtxd were diluted in 10 mL deionised water, filtered and then subjected to photon correlation spectroscopy.

In vivo assays

Nine groups of Balb-C mice were injected with 5 µg of free Dtxd (as the control) or encapsulated in different formulations namely REVs, REVs-Chi or REVs-Chi-PVA. The administration routes were oral (through gavage) or sub-cutaneous for all described formulations. At determined intervals (10^o, 28^o, 38^o and 56 days after immunization) blood was collected through orbital plexus puncture and the produced IgG₁ and IgG_{2a} anti-Dtxd were measured by ELISA. After 30 days the mice received a booster of 5 µg Dtxd within the corresponding formulation. Weekly samples of the mice vagina secretions were taken for IgA anti-Dtxd analysis. At the end of the experiment pilocarpine was administered to mice and their saliva was collected for IgA anti-Dtxd determination.

ELISA and antibody titters

Samples of 100 µL containing 20 µg of Dtxd in 100 mM carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6 were added to ELISA plates and after two hours at 37°C, they were blocked with 10 % skim milk. After 30 min, the anti-Dtxd specific serum developed in mice was added to the wells. The conjugate (anti-IgG₁ or anti-IgG_{2a} conjugate with peroxidase) was added 30 min later, and after a further 30 min, the substrate was added. The absorbance was automatically measured at 450 nm in a Titertek Multiskan MCC/340. **Antibody titters:** as previously defined (Bueno da Costa et al., 1998), titers are the reciprocal serum dilution factor giving an absorbance value of 20% of the saturation value.

Results and discussion

Round particles of REVs (170 nm), REVs-Chi (313 nm) and REVs-Chi-PVA (370 nm) (Figure 1) with encapsulation efficiencies for Dtxd between 59 % and 76 % were used to immunize the mice.

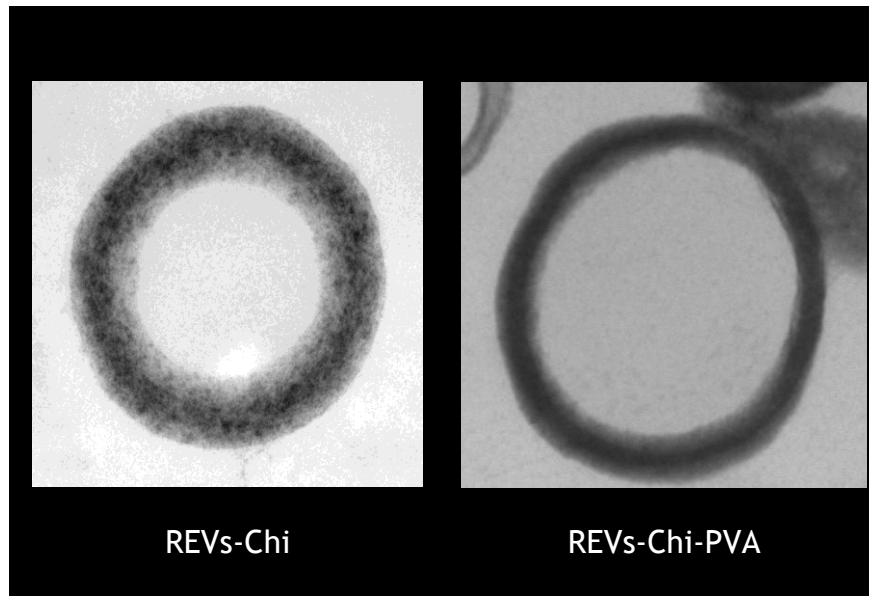


Figure 1. Electronic micrography of different REVs.

The different particle formulations used in this work were previously assayed for their adhesibility capacities (Rescia et al., 2009_a). The type III mucin (Mu-III) was used to mimic mucus on particle adhesibility assays. The particles adhesibility for REVs, REVs-Chi and REVs-Chi-PVA (containing Dtxd) were shown to be 19 %, 49 % and 69 % on Mu-III, respectively (Rescia et al, 2009_b). These adhesibility results were correlated with their capacities to induce the anti-Dtxd production. These comparisons were based on the premise: the better the particle adhere the better they will induce antibody production. This was studied for both oral as sub-cutaneous routes.

The IgA anti-Dtxd was analyzed in saliva and vaginal secretions from mice immunized by both routes. All the studied particles acted as adjuvants (Figure 2). REVs-Chi-PVA/Dtxd induced the highest IgA production in the animals immunized via the sub-cutaneous route (Figure 2). The amount of IgA produced by the mice immunized orally with REVS-Chi/Dtxd or REVS-Chi-PVA/Dtxd was the same. Therefore, it can be assumed that PVA had not an additional effect over Chi in its adjuvanticity (Figure 2).

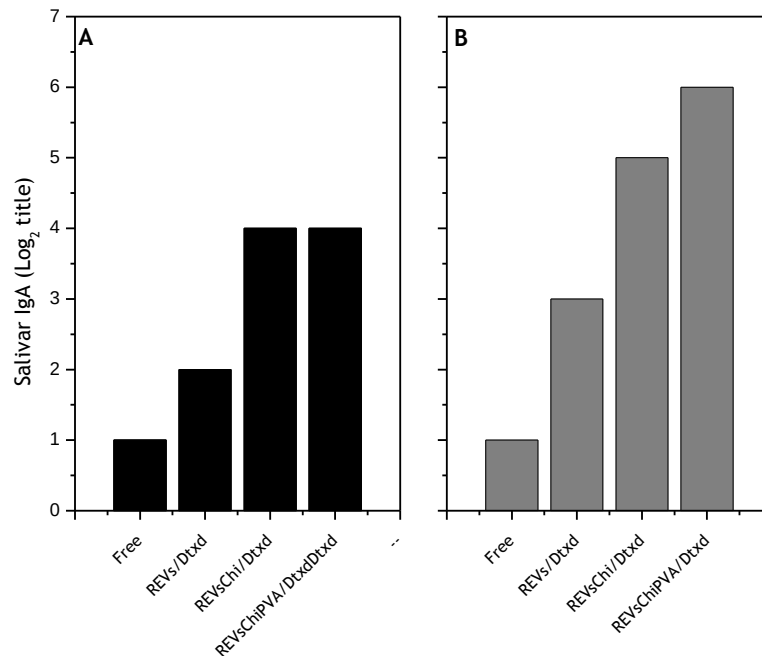


Figure 2. Salivary IgA produced by different formulations. The mice were injected with 5 μ g of free Dtxd or encapsulated within REVs; REVs-Chi or REVs-Chi-PVA through different routes (A) oral or (B) sub-cutaneous. The saliva of each group was collected and pooled 57 days after immunization.

There was a direct correlation between salivary IgA anti-Dtxd produced by those mice immunized orally and the respective particle adhesibility. REVs-Chi/Dtxd or REVs-Chi-PVA/Dtxd produced more IgA because they were more adhesive than pure lipid REVs containing Dtxd (Figure 3). The best correlation

(expressed as R = correlation coefficient) observed between salivary IgA produced and particle adhesibility was for mice immunized through the sub-cutaneous route (Figure 3 B, $R = 0,99718$).

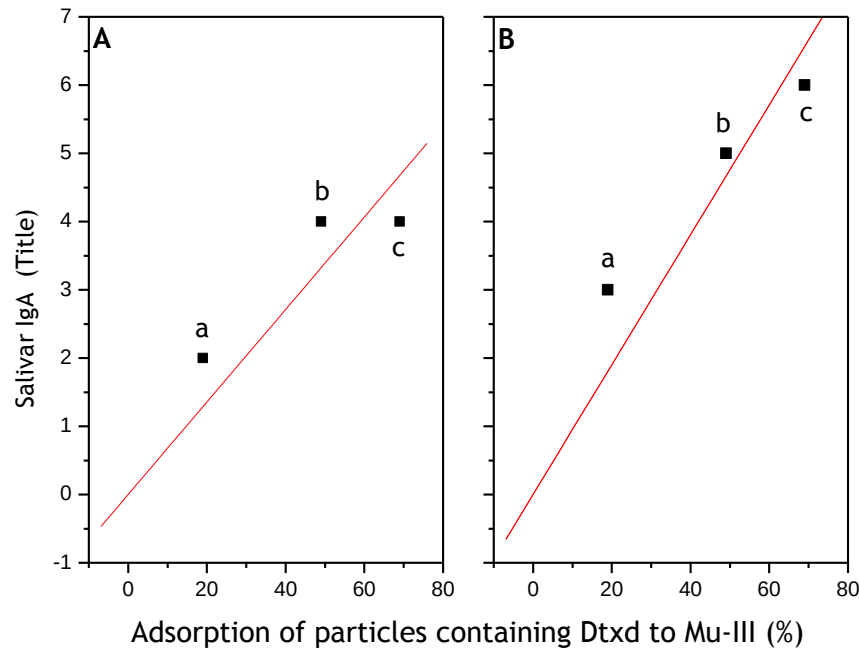


Figure 3. Correlation between salivary IgA produced and particle adhesibility to mucin. The measured anti-Dtxd IgA titers were plotted against the adhesibility to Mu-III for each particle assayed (in %). The mice were immunized with REVs/Dtxd (a) or REVs-Chi/Dtxd (b) or REVs-Chi-PVA/Dtxd (c) through oral (A) or sub-cutaneous (B) routes. The correlation coefficient for oral route was 0.91766 and for sub-cutaneous route 0.99718.

In the profile for vaginal mucosa IgA production (Figure 4) the most relevant facts were: absence of antibody (oral or sub-cutaneous routes) in those mice injected with free Dtxd (except for the mice injected orally with REVs/Dtxd) and increase of anti-Dtxd production for all other particulate formulations (Figure 4).

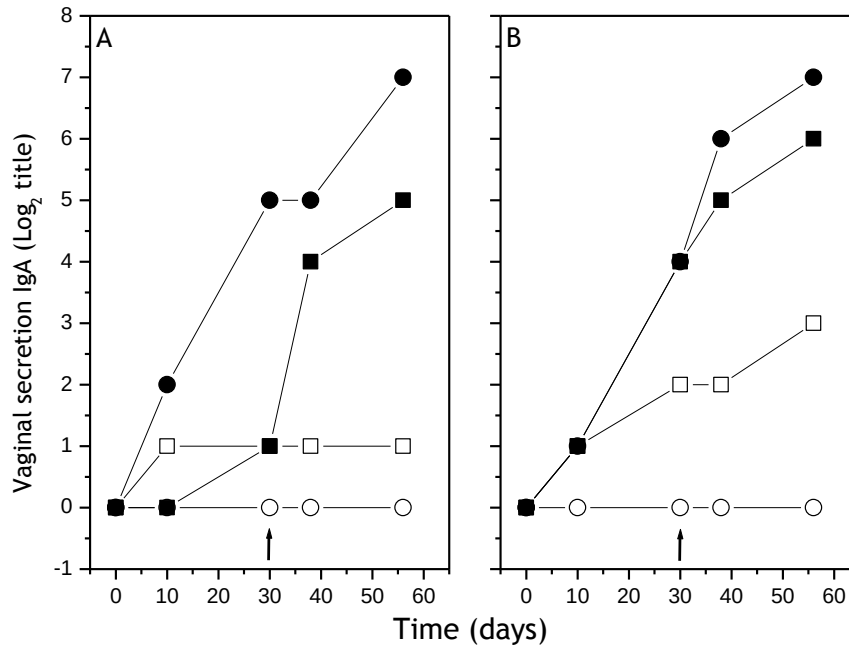


Figure 4. Production of vaginal secretion IgA in function of different formulations. The mice were injected with 5 μ g of free (-o-) Dtxd or encapsulated within REVs (-□-), REVs-Chi (-■-) or REVs-Chi-PVA (-●-) through different routes: **(A)** oral or **(B)** sub-cutaneous. The vaginal secretion was collected and pooled for each group weekly.

Again, the best correlation between IgA production and particle adhesibility was observed in the mice injected with particles containing Chi or Chi-PVA. The observed R on mice immunized through oral route (0.99718) was higher than the one through sub-cutaneous route (0.98624) (Figure 5).

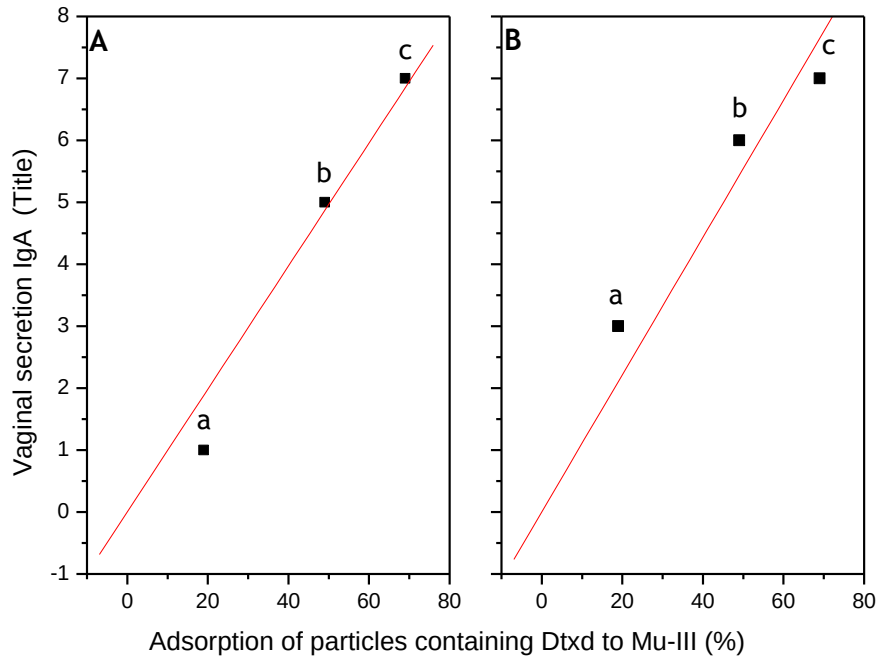


Figure 5. Correlation between vaginal secretion IgA and particle adhesibility to mucin. The measured anti-Dtxd IgA titters was plotted against the adhesibility to Mu-III for each particle assayed (in %). The mice were immunized with REVs/Dtxd (a) or REVs-Chi/Dtxd (b) or REVs-Chi-PVA/Dtxd (c) through oral (A) or sub-cutaneous (B) routes. The correlation coefficient for oral route was 0.99718 and for sub-cutaneous route 0.98624.

In addition to mucosal antibody production the production of humoral antibodies, IgG₁ (Figure 6 A and B) and IgG_{2a} (Figure 6 C and D) was investigated. The most relevant observations were: the unique important response to free antigen corresponded to the production of IgG_{2a} in the mice immunized sub-cutaneously (Figure 6 D); the absence of IgG_{2a} in the mice immunized orally with REVs/Dtxd (Figure 6 C); the only significant response to REVs/Dtxd was obtained in mice injected through the sub-cutaneous route (Figure 6 B and D). This led us to conclude that the traditional free antigen formulation for Dtxd vaccine was acceptable and that REVs acted as adjuvant as firstly demonstrated by Allison and Gregoriadis (Alison and Gregoriadis, 1974). However, the formulations presented here (REVs-Chi/Dtxd and REVs-Chi-PVA/Dtxd) were superior: they

produced at least 512 times more IgG₁ (oral route) and 1024 more IgG_{2a} (oral route) than the free antigen (Figure 6 A and C); they produced 4096 times more IgG₁ (sub-cutaneous route) and 1024 more IgG_{2a} (sub-cutaneous route) than the free antigen (Figure 6 B and D).

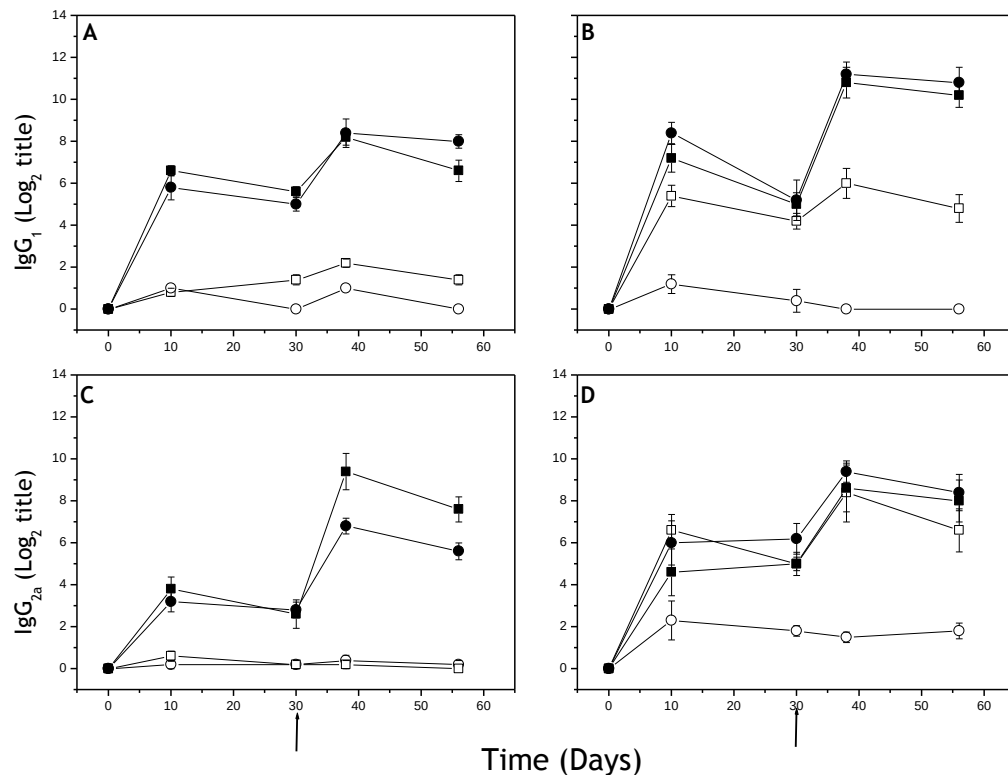


Figure 6. Profile of IgG₁ and IgG_{2a} production as a function of different formulations. The mice were injected with 5 µg of free (-o-) Dtxd or encapsulated within REVs (-□-), REVs-Chi (-■-) or REVs-Chi-PVA (-●-) through different routes: (A) oral or (B) sub-cutaneous. The blood was collected weekly.

It is well known that antibodies are produced in the following order: IgG₁ → IgG₃ → IgG_{2a}. The neutralizing antibodies are mainly due to IgG₁ (more abundant) but the IgG_{2a} is more specific and is related to the immunological maturation degree (Bueno da Costa, 2006; Silva et al., 2006; Marón et al., 2007; Yadav and Khuller, 2001). It is known, from the literature, that IgG_{2a} is related

to a TH₁ (cellular) response and the IgG₁, to a TH₂ (humoral) response (Yadav and Khuller, 2001). This can be expressed through the IgG_{2a}/IgG₁ ratio. When the IgG_{2a}/IgG₁ ratio is < 1 the immunological response is predominantly humoral; when the IgG_{2a}/IgG₁ > 1 the response is cellular (Yadav and Khuller, 2001). The ratios IgG_{2a}/IgG₁ obtained were: 0.4; 0.09; 1.15 and 0.81 respectively for mice immunized orally with the formulations free Dtxd; REVs/Dtxd; REVs-Chi/Dtxd and REV-Chi-PVA/Dtxd. For mice immunized sub-cutaneously the IgG_{2a}/IgG₁ ratios were: 0; 1.4; 0.80 and 0.84 respectively with the formulations free Dtxd; REVs/Dtxd; REVs-Chi/Dtxd and REV-Chi-PVA/Dtxd. The maturity was achieved by using the REVs formulations (sub-cutaneous route) and REVs-Chi (oral route). These results represent a clear evidence for the adjuvant action of REVs only in the sub-cutaneous route and the superior quality of REVs-Chi for the oral route.

Another way to ascertain the immunological memory is to analyze the response after boosting the mice with the same antigen. A correlation between the formulation complexity and the ability to best respond to the boosters was found. A direct correlation between the formulation complexity and the vaginal IgA secondary response was as follows: free antigen < REVs/Dtxd < REVs-Chi/Dtxd < REVs-Chi-PVA/Dtxd (Figure 7 A and B, oral and sc, respectively) both 7 days after boosting as 26 days after boosting (Figure 7 C and D, oral and sc, respectively).

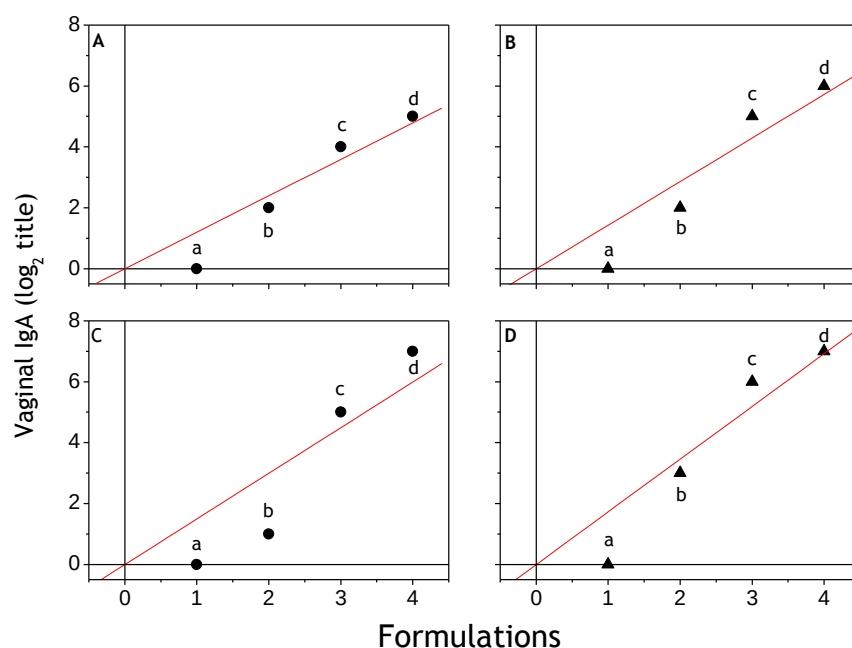


Figure 7. Correlation between vaginal secretion IgA anti-Dtxd produced after booster as a function of the formulation complexity. The IgA was assayed 7 days after the booster (5 μ g) in the mice immunized through oral route (A) or sc (B). The IgA was assayed 26 days after the booster (5 μ g) in the mice immunized through oral route (C) or sub-cutaneous (D). The formulation complexity was: free antigen (a) < REVs/Dtxd (b) < REVs-Chi/Dtxd (c) < REVs-Chi-PVA/Dtxd (d). The observed correlations were for 0.98978 (A); 0.9845 (B); 0.97683 (C) and 0.9798 (D).

No secondary IgG₁ response was observed on the mice injected with free Dtxd (Figure 8 B, C and D) exception made for a not significant increase 7 days after booster through oral route (Figure 8 A). But a good correlation between secondary response and formulation complexity was acquired on the mice injected with particulate formulations both 7 days (oral - 0.92338 and sub-cutaneous - 0.94728) as 26 days after booster (oral - 0.94868 and sub-cutaneous - 0.96833). Again, analyzing the production of IgG₁ PVA practically did not potentialize the chitosan adjuvant power 7 days after the booster on both oral and subcutaneous routes (Figure 8 A and B). However, at the 26th day the presence of PVA on the formulation induced an increase on response when

compared to formulation containing chitosan alone (Figure 8 C and D). In addition, the excellence of the particulated formulations was demonstrated similarly for humoral memory responses.

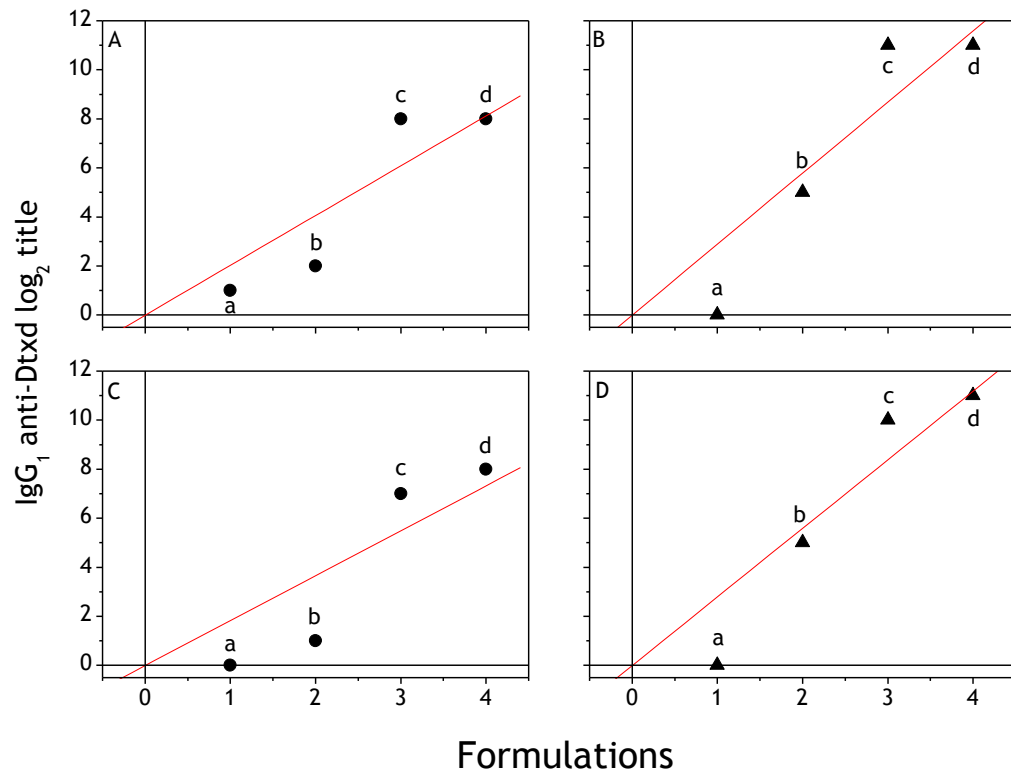


Figure 8. Correlation between IgG₁ anti-Dtxd produced after booster as a function of formulation complexity. The IgG₁ was assayed 7 days after the booster (5 μ g) in the mice immunized through oral route (A) or sub-cutaneous (B). The IgG₁ was assayed 26 days after the booster (5 μ g) in mice immunized through oral route (C) or sub-cutaneous (D). The formulation complexity was: free antigen (a) < REVs/Dtxd (b) < REVs-Chi/Dtxd (c) < REVs-Chi-PVA/Dtxd (d). The observed correlations were 0.92339 (A); 0.94728 (B); 0.94868 (C) and 0.96833 (D).

A good evidence of acquiring memory, concerning IgG_{2a}, was observed only on the mice injected with the particulate formulations (Figure 9). But here, the correlation between formulation complexity and response to booster was not good: 7 days after the booster, for the mice injected through oral or sub-cutaneous routes the Rs were 0.82572 and 0.84366 and 26 days after booster the

Rs were 0.81409 (oral) and 0.85399 (sub-cutaneous). The liposomal destruction by the oral route hindered their adjuvant property because no response to booster was observed (Figure 9 A and B). This demonstrated our hypothesis that Chi and PVA not only protected the liposomal membrane but also potentialize its adjuvant characteristics.

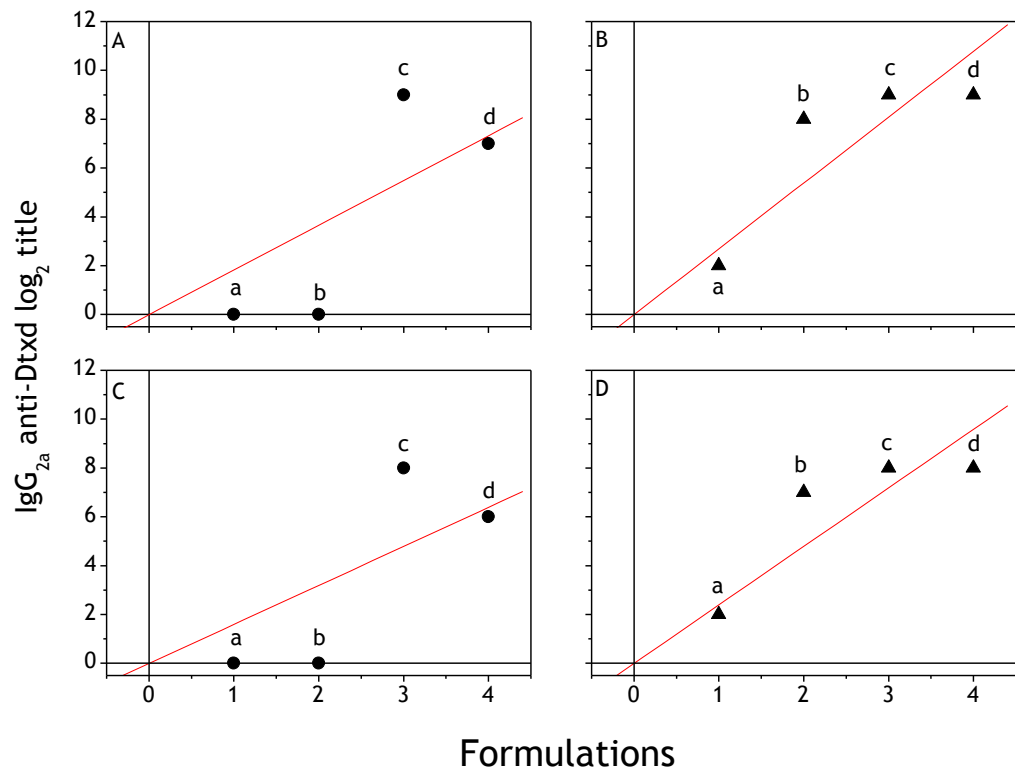


Figure 9. Correlation between lgG_{2a} anti-Dtxd produced after booster as a function of formulation complexity. The lgG_{2a} was assayed 7 days after the booster (5 μg) in the mice immunized through oral (A) or sub-cutaneous (B) routes. The lgG_{2a} was assayed 26 days after the booster (5 μg) in the mice immunized through oral (C) or sub-cutaneous (D) routes. The formulation complexity was: free antigen (a) < REVs/Dtxd (b) < REVs-Chi/Dtxd (c) < REVs-Chi-PVA/Dtxd (d). The observed correlations were for 0.82572 (A); 0.84366 (B); 0.81409 (C) and 0.85399 (D).

Discussion

A good vaccine is the one that increases not only the antibody response but the maturity and the immunological memory. The common point analyzed in the literature is the total IgG production (Amidi et al., 2007; Ahire et al., 2007; Jain, Sharma and Vyas, 2006; Alpar et al., 2001; Van der Lubben et al., 2001) and a few groups analyzed the IgG sub-groups such as IgG₁ (Hagenaars et al., 2009; Amidi et al., 2007) and IgG_{2a} (Hagenaars et al., 2009; Amidi et al., 2007). We have shown that it is important to discriminate between IgG₁ and IgG_{2a}. The first (IgG₁) confers mainly neutralizing ability and the second (IgG_{2a}) immunological maturity (Bueno da Costa, 2006; Silva et al., 2006; Marón et al., 2007; Yadav and Khuller, 2001). Both the increase on neutralizing and maturity capacities were obtained for the particulate systems used: REVs-Chi/Dtxd and REVs-Chi-PVA/Dtxd. It was clearly demonstrated that REVs/Dtxd was not able to act as adjuvant when used in oral route. It was interesting to observe that few authors measured the IgA production for Chi particles (Amidi et al., 2007; Ahire et al., 2007; Jain, Sharma and Vyas, 2006; Van der Lubben et al., 2003). In agreement with the literature results we observed an increase in salivary and vaginal IgA for the particles protected with Chi alone or with Chi and PVA.

A few authors investigated the immunological memory (Hagenaars et al., 2009) for protected (by Chi or PVA) liposomal particles. The new here is that we found also a mathematical correlation between particle adhesibility with IgA production. Extending the aim of this investigation we also observed a humoral response. All of them were correlated with the capacity of the particles to adhere to mucin. Evidently mucin is not present systemically, but it can be an indirect measure of the known “deposit” effect exerted by particulate adjuvants.

Conclusions

As expected, we could demonstrate that REVs/Dtxd did not act as adjuvant when used for the oral route. The REVs-Chi and REVs-Chi-PVA increased both the mucosal and the systemic responses. All these *in vivo* particulate adjuvant capacities were mathematically correlated with their *in vitro* adhesibility characteristics. A simple mathematical treatment of the data can be useful to analyze and select new vaccine delivery systems.

Aknowledgements

FAPESP (00/10970-7), CNPq (302047/2008-5) and Fundação Butantan. VC Rescia had a fellowship from CAPES. We would like to express our gratitude to Tatiana Cristina Silva for training VC Rescia during these experiments.

Bibliography

Ahire, V.J., Sawant, K.K., Doshi, J.B. and Ravetkar, S.D. (2007). Chitosan microparticles as oral delivery system for tetanus toxoid. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 33: 1112- 1124.

Allison, A.C. and Gregoriadis, G. (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*, 252: 252.

Alpar, H.O., Eyles, J.E., Williamson, E.D. and Somavarapu, S. (2001). Intranasal vaccination against plague, tetanus and diphtheria. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51: 173- 201

Amidi, M., Pellikaan, H.C., Hirschberg, H., Boer, A.H., Crommelin, D.J.A., Hennink, W.E., Kersten, G. and Jiskoot, W. (2007). Diphtheria toxoid-containing microparticle powder formulations for pulmonary vaccination: Preparation, characterization and evaluation in guinea pigs. *Vaccine*, 25: 6818-6829.

Bramwell, V.W. and Perrie Y. (2006). Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? *J. Pharm. Pharmacol.*, 58: 717- 728.

Bramwell, V.W. and Perrie Y. (2005). Particulate delivery systems for vaccines. [*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*](#) 22 (2): 151- 214.

Bueno da Costa, M.H. (2006). A biotechnological approach to formulate vaccines within liposomes, Chapter 20, pp 387-403, in: Liposome Technology 3rd Edition (Gregory Gregoriadis, Editor) CRC Press.

Bueno da Costa, M.H. Sant'Anna, O.A., de Araujo, P.S. Sato, R.A., Quintilio, W., Silva, L.V.N., Matos, C.R.T. and Raw, I. (1998). Conformational stability and antibody response to the 18kDa heat shock protein formulated into different vehicles. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 73: 19- 28.

Chayed, S. and Winnik, F.M. (2007). *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of polysaccharide-based nanoparticulate oral drug delivery systems. *Eur. J. Pharma. Biopharma.*, 65: 363- 370.

Friede, M. and Aguado, M.T. (2005). Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. [*Adv. Drug. Deliv. Rev.*](#), 57(3): 325- 331.

Hagennars, N., Mastrobattista, E., Verheul, R.J., Mooren, I., Glansbeek, H.L., Heldens, J.G.M., Bosh, H. and Jiskoot, W. (2009). Physicochemical and immunological characterization of N,N,N-Trimethyl chitosan-coated whole inactivated Influenza virus vaccine for intranasal administration. *Pharma. Res.*, 26 (6): 1353- 1364.

Hassan, E.E. and Gallo, J.M. (1990). A simple rheological method for the *in vitro* assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharm. Res.*, 7: 491-495.

Illum, L., Jabbal-Gill, I. and Hinchcliffe, M. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery systems for vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51: 81- 96.

Jain, S., Sharma, R.K. and Vyas, S.P. (2006). Chitosan nanoparticles encapsulated vesicular systems for oral immunization: preparation, *in-vitro* and *in-vivo* characterization. *Pharm. Pharmacol.*, 58: 303- 310.

Marón, L.B., Peniche, C., da Silveira, N.P., Pohlmann, A., Mertins, O., Tatsuo, L.N., Sant'anna, A.O., Moro, A.M., Takata, C.S. Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2007). LUVs recovered with chitosan: a new preparation for vaccine delivery. *J. Lip. Res.*, 15: 155- 163.

Medina, E. and Guzman, C.A. (2000). Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 27: 305- 311.

Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. wich is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346- 356.

Silva, A.S., Takata, C.S., Sant'anna, O.A., Lopes, A.C., Soares, P.A. de and Bueno da Costa, M.H. (2006). Enhanced Liposomal Vaccine Formulation and

Performance: Simple Physicochemical and Immunological Approaches. *J. Lip. Res.*, 16: 215- 227.

Rescia, V.C., Ramos, H.R., Takata, C.S., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2009a). Diphtheria toxoid conformation in the context of its nanoencapsulation within liposomal particles sandwiched by Chitosan. Submitted to *J. Lip. Res.*

Rescia, V.C., Takata, C.S., Araujo, P.S. de and Bueno da Costa, M.H. (2009b). Dressing liposomal particles with chitosan and poly (vinyl alcohol) for oral vaccine delivery. Submitted to *J. Lip. Res.*

Silva, V.A., Takata, C.S., Sant'Anna, O.A., Lopes, A.C., de Araujo, P.S. and Bueno da Costa, M.H. (2006). Enhanced liposomal vaccine formulation and performance: simple physico-chemical and immunological approaches. *J Lip Res* 16: 215- 227.

Van der Lubben, I.M., Kersten, G., Fretz, M.M., Beuvery, C., Verhoef, J.C., and Junginger, H.E. (2003). Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine*, 21: 1400- 1408.

Van der Lubben; I.M., Verhoef, J.C., Borchard, G. and Junginger, H.E. (2001). Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug Del. Rev.*, 52: 139- 144.

Yadav, D. and Khuller, G. (2001). Evaluation of the T cells and costimulatory molecules in the protective efficacy of 30 kDa secretory protein against experimental tuberculosis. *Immunol. Cell. Biol.*, 79: 207- 212.