



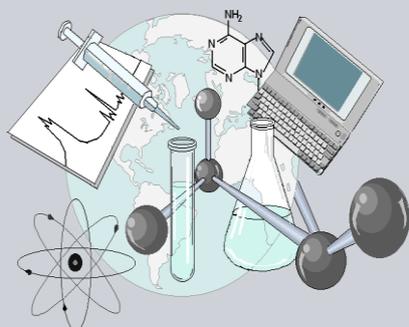
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

*“Microesferas de albumina (BSA) reticulada com  
N’,N’-dimetilacrilamida para aplicação em sistemas  
de liberação de fármacos e antígenos”*

Dissertação apresentada por  
**DANIELLY LADEIRA ANIBAL SITTA**  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química do Departamento de Química  
do Centro de Ciências Exatas da  
Universidade Estadual de Maringá  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em  
Química.

CEE



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, ABRIL/2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

*Dissertação de Mestrado*

*Microesferas de albumina (BSA) reticulada com  
N',N'-dimetilacrilamida para aplicação em sistemas de  
liberação de fármacos e antígenos*

**Mestranda:** Danielly Ladeira Anibal Sitta

**Orientador:** Prof. Dr. Adley Forti Rubira

**Maringá, abril de 2013.**

*Dedico este trabalho a  
minha mãe e irmã, por me  
ajudarem a superar os piores  
momentos, e ao amor da minha  
vida, Marcos, o melhor presente  
que Deus me deu.*

## ***Agradecimentos***

*A Deus por ter me dado a vida, por me sustentar, me dar saúde e me surpreender a cada dia.*

*Ao professor **Adley F. Rubira** pelo apoio e por ter confiado em mim, me aceitando como sua aluna.*

*Ao meu marido, **Marcos**, pelo amor e apoio.*

*A minha irmã, **Michelle**, por todos esses anos de apoio.*

*A minha mãe, pela força e confiança.*

*Aos meus avós, por me acolherem.*

*Aos meus tios e primos pelo amor e por sempre me apoiarem.*

*Aos meus sogros, por também fazerem parte desta conquista.*

*Ao **Marcos Rogério Guilherme** pela co-orientação no desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos demais professores do **GMPC** pelas contribuições diretas ao trabalho.*

*Aos amigos pela alegria, companheirismo, carinho, cuidados e pela força nos momentos difíceis.*

*Aos colegas de laboratório de pesquisa pela amizade, apoio e por me alegrarem, mesmo nos piores dias: **Vanessa, Thelma, Elizângela,***

***Elisangela, Pablo, Ernandes, Marcos Kunita, Marcos Roberto, Bruna, Pamela, Manuel, Guilherme.***

*Aos demais colegas do Departamento de Química e do grupo GMPC.*

*Ao Claudemir e a Cristina, da secretaria de pós-graduação, pela prestatividade.*

*A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro.*

*“Pois como imaginou na sua  
alma, assim é”*

***Provérbios 23:7(a)***

## Resumo

---

As proteínas representam uma classe de polímeros naturais com um grande potencial para aplicação na produção de nano e de micropartículas, especialmente a albumina, a qual é a proteína mais abundante do sistema circulatório do corpo humano. Neste trabalho a albumina de soro bovino (BSA) modificada quimicamente com anidrido maleico (AM) foi utilizada para formar micropartículas reticuladas com *N,N'*-dimetilacrilamida (DMAA) por meio de reação de polimerização/reticulação em uma emulsão água-óleo. A morfologia das partículas foi estudada considerando as influências de DMAA, do tempo de agitação (15, 30, 60 e 120 minutos) e da quantidade de álcool polivinílico (PVA) (0%, 1% e 2%), parcialmente hidrolisado. Foi observado que a modificação da BSA com AM foi efetiva e que 15 minutos de agitação já são suficientes para promover a polimerização/reticulação. As partículas formadas durante 15 e 30 minutos de agitação, na presença de PVA, são predominantemente mais esféricas e homogêneas, quando comparadas com a morfologia das amostras obtidas sem PVA, especialmente para 15 minutos. Para os tempos de agitação 60 e 120 minutos, a adição de PVA contribuiu eficientemente para a formação de microesferas, especialmente para o tempo de 60 minutos. Partícula polimérica à base albumina é uma alternativa para liberação controlada de vitamina B<sub>12</sub>, uma vitamina hidrossolúvel essencial para os seres humanos. O perfil de liberação *in vitro* da vitamina B<sub>12</sub> foi analisado usando amostra de BSA modificada com AM e polimerizada/reticulada com DMAA, formada com 15 minutos de tempo de agitação e sem PVA. Para esta condição, o diâmetro médio das partículas foi de  $0,19 \pm 0,05 \mu\text{m}$ . A porcentagem de encapsulamento foi  $79 \pm 2 \%$ . Os coeficientes difusionais, os quais permitem descrever o perfil de liberação, foram 0.44, 0.62, 1.00, 1.75 e 0.78 para os tampões de pH 2, 4, 6, 8 e 10, respectivamente. Outra aplicação proposta para as partículas obtidas foi como adjuvante para vacina destinada às mucosas contra Hepatite B. A eficiência de encapsulamento de antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg) foi de 74,2%.

## Abstract

---

The proteins represent a class of natural polymers with a great potential for application in nano and microparticles, especially albumin, which is the most abundant protein in the circulatory system of the human body. In this work, bovine serum albumin (BSA), chemically modified with maleic anhydride (MA), was used to form micro particles crosslinked with *N,N'*-dimethylacrylamide (DMAA) through polymerization/crosslinking reaction in a water-in-oil emulsion. The particle morphology was studied considering the influences of DMAA, the stirring time (15, 30, 60 and 120 minutes) and the amount of polyvinyl alcohol (PVA) (0%, 1% and 2%), partially hydrolyzed. It was observed that the modification of BSA with AM was effective and 15 minutes of stirring were enough to induce polymerization/crosslinking reaction. The particles formed in 15 and 30 minutes of stirring in the presence of PVA were predominantly spherical and more homogeneous as compared to the morphology of the sample without PVA, especially those produced in 15 minutes. For stirring times of 60 and 120 minutes, PVA efficiently contributes to the formation of microspheres, especially those obtained in 60 minutes. Albumin-based polymer particle is a promising alternative for the controlled release of vitamin B<sub>12</sub>, which is a water-soluble vitamin essential for human beings. The *in vitro* release profile of vitamin B<sub>12</sub> was analyzed using samples of BSA modified with AM and polymerized/crosslinked with DMAA, formed in 15 minutes of stirring time and without PVA. For this condition, the average particle diameter was  $0.19 \pm 0.05$   $\mu\text{m}$ . The percentage of encapsulation was  $79 \pm 2\%$ . The diffusional coefficients, which allow describe the release mechanisms, were 0.44, 0.62, 1.00, 1.75 and 0.78 for the buffers at pH 2, 4, 6, 8 and 10, respectively. Another proposed application for particles obtained were as an adjuvant for the mucosal vaccine for Hepatitis B. The encapsulation efficiency of surface antigen of hepatitis B (HBsAg) was 74.2%.

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	IV
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>INTRODUÇÃO</b>	
<b>1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	2
<b>1.2 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS</b> .....	5
<b>1.3 UTILIZAÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA</b> .....	8
<b>1.4 MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS</b> .....	11
<b>1.4.1 Método de polimerização/reticulação</b> .....	11
1.4.1.1 Polimerização/Reticulação Interfacial.....	12
1.4.1.2 Polimerização/Reticulação em emulsão.....	13
<b>1.5 ALBUMINAS SÉRICAS</b> .....	15
<b>1.6 VITAMINA B<sub>12</sub></b> .....	18
<b>1.7 VACINAS DESTINADAS ÀS MUCOSAS</b> .....	22
<b>1.8 HEPATITE B</b> .....	25
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>OBJETIVOS</b> .....	28

## CAPÍTULO 3

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1 MATERIAIS .....	<b>31</b>
3.2 MÉTODOS .....	<b>31</b>
3.2.1 Modificação de BSA com AM .....	<b>31</b>
3.2.2 Reticulação química de BM com e sem DMAA .....	<b>32</b>
3.2.3 Caracterização de BSA, BM e das amostras reticuladas .....	<b>33</b>
3.2.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	33
3.2.3.2 Caracterização espectroscópica <sup>1</sup> H RMN.....	34
3.2.3.3 Espectroscopia <sup>13</sup> C RMN CP-MAS do estado sólido.....	34
3.2.3.4 Difratometria de raios-X (DRX).....	34
3.2.3.5 Estudo da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	34
3.2.4 Carregamento (loading) das microesferas com vitamina B <sub>12</sub> .....	<b>35</b>
3.2.5 Construção da curva de calibração da vitamina B <sub>12</sub> por UV-vis .....	<b>35</b>
3.2.6 Cálculo da eficiência de encapsulamento de vitamina B <sub>12</sub> pelas microesferas.....	<b>37</b>
3.2.7 Teste de liberação in vitro da vitamina B <sub>12</sub> .....	<b>37</b>
3.2.8 Estudo do perfil de liberação e mecanismo de liberação de vitamina B <sub>12</sub> a partir das microesferas .....	<b>38</b>
3.2.9 Análise morfológica das microesferas após intumescimento .....	<b>40</b>
3.2.10 Estudo da influência da membrana de diálise no perfil de liberação ...	<b>400</b>
3.2.11 Carregamento (loading) das microesferas com antígenos da hepatite B .....	<b>41</b>

3.2.12 Construção da curva de calibração de proteína total para quantificação de antígeno .....	41
3.2.13 Cálculo da eficiência de encapsulamento de antígeno da hepatite B pelas microesferas de BSA .....	43
3.2.14 Verificação do efeito da BSA na determinação de antígeno .....	44

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

<b>4.1 MODIFICAÇÃO DE BSA COM AM</b> .....	46
<b>4.2 RETICULAÇÃO DE BM</b> .....	55
<b>4.3 ESTUDO DO PERFIL E MECANISMO DE LIBERAÇÃO IN VITRO DE VITAMINA B12 PELAS MICROPARTÍCULAS DE BSA</b> .....	66
<b>4.4 ENCAPSULAMENTO DE ANTÍGENO DA HEPATITE B</b> .....	72

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

.....	73
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – Interdependência entre fatores importantes no design de sistemas de liberação controlada de fármacos.....	7
<b>Figura 1.2</b> – Emulsões: <b>(a)</b> O/W; <b>(b)</b> W/O; <b>(c)</b> W/O/W; <b>(d)</b> O/W/O.....	15
<b>Figura 1.3</b> – Estrutura espacial da HSA.....	17
<b>Figura 1.4</b> - Revisão da literatura - o impacto da albumina na liberação de fármacos: número de citações em PubMed combinando as palavras “albumin” e “drug carrier” de 1970 a 2010, exibido como intervalos de 2 anos.....	18
<b>Figura 1.5</b> - Estrutura da vitamina B <sub>12</sub> .....	19
<b>Figura 1.6</b> - Causas de deficiência de cobalamina em 172 pacientes hospitalizados no hospital universitário de Strasbourg, França.....	20
<b>Figura 3.1</b> - Curva de calibração de vitamina B <sub>12</sub> em água com pico de referência em 360 nm.....	36
<b>Figura 3.2</b> – Curva de calibração de proteína total.....	43
<b>Figura 4.1</b> - Reação de hidrólise do AM resultando em ácido fumárico e maleico.....	46
<b>Figura 4.2</b> - Estruturas dos aminoácidos cisteína, serina, tirosina e lisina.....	48
<b>Figura 4.3</b> - Esquemas para reações de ataque nucleofílico dos grupamentos <b>(a)</b> tiol do resíduo cisteína, <b>(b)</b> hidroxila dos resíduos serina e tirosina, e <b>(c)</b> amina do resíduo lisina ao AM.....	48
<b>Figura 4.4</b> - Espectros de FTIR de BSA <b>(a)</b> e BM <b>(b)</b> .....	49
<b>Figura 4.5</b> - Espectros de RMN <sup>1</sup> H de BSA <b>(a)</b> e BM <b>(b)</b> .....	51
<b>Figura 4.6</b> - Espectros de RMN <sup>13</sup> C CP-MAS de BSA <b>(a)</b> e BM <b>(b)</b> . <b>(A)</b> de 200 a 0 ppm; <b>(B)</b> de 140 a 110 ppm; <b>(C)</b> de 45 a 10 ppm.....	52

<b>Figura 4.7</b> - Difratomogramas de raios-X de BSA <b>(a)</b> , BM <b>(b)</b> e ANI <b>(c)</b> .....	54
<b>Figura 4.8</b> - Micrografias de MEV: <b>(a)</b> BSA e <b>(b)</b> BM.....	54
<b>Figura 4.9</b> – Espectros de FTIR de BM <b>(a)</b> , BR(15min) <b>(b)</b> e BRDMAA(15min) <b>(c)</b> .....	55
<b>Figura 4.10</b> – Espectros de <sup>13</sup> C RMN CP-MAS de BM <b>(a)</b> , BR(15min) <b>(b)</b> e BRDMAA(15min) <b>(c)</b> .....	56
<b>Figura 4.11</b> - Difrátograma de raio-X de BM <b>(a)</b> , BR(15min) <b>(b)</b> e BRDMAA(15min) <b>(c)</b> .....	57
<b>Figura 4.12</b> - Micrografias de MEV: <b>(a)</b> BR(15min); <b>(b)</b> BRDMAA(15min); <b>(c)</b> BRDMAA(15min)1%P; <b>(d)</b> BRDMAA(15min)2%P.....	59
<b>Figura 4.13</b> - Micrografias de MEV: <b>(a)</b> BRDMAA(30min); <b>(b)</b> BRDMAA(30min)1%P; <b>(c)</b> BRDMAA(30min)2%P.....	60
<b>Figura 4.14</b> - Micrografias de MEV: <b>(a)</b> BRDMAA(60min); <b>(b)</b> BRDMAA(60min)1%P; <b>(c)</b> BRDMAA(60min)2%P.....	61
<b>Figura 4.15</b> - Micrografias de MEV: <b>(a)</b> BRDMAA(120min); <b>(b)</b> BRDMAA(120min)1%P; <b>(c)</b> BRDMAA(120min)2%P.....	62
<b>Figura 4.16</b> - Histograma com a distribuição de tamanho das partículas BRDMAA(15min).....	65
<b>Figura 4.17</b> - Perfis de liberação de vitamina B <sub>12</sub> pela amostra BRDMAA(15min) em <b>(a)</b> pH 2.0; <b>(b)</b> pH 4.0; <b>(c)</b> pH 6.0; <b>(d)</b> pH 8.0; <b>(e)</b> pH 10.0.....	66
<b>Figura 4.18</b> - Micrografias de MEV da amostra BDMAA(15min) intumescida em <b>(a)</b> pH 2.0, <b>(b)</b> pH 4.0, <b>(c)</b> pH 6.0, <b>(d)</b> pH 8.0 e <b>(e)</b> pH 10,0.....	70
<b>Figura 4.19</b> - Perfis de liberação de vitamina B <sub>12</sub> diretamente da membrana em <b>(a)</b> pH 2.0; <b>(b)</b> pH 4.0; <b>(c)</b> pH 6.0; <b>(d)</b> pH 8.0; <b>(e)</b> pH 10.0.....	71

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> - Produtos comercializados contendo micropartículas poliméricas.....	10
<b>Tabela 3.1</b> - Código das amostras reticuladas usando diferentes quantidades de PVA e tempos de agitação.....	33
<b>Tabela 3.2</b> - Expoente difusional e mecanismo de liberação a partir de matrizes de diferentes formas geométricas.....	40
<b>Tabela 4.1</b> - Números de onda e atribuições das bandas dos espectros de FTIR de BSA e BM.....	50
<b>Tabela 4.2</b> - Deslocamentos químico e atribuições de sinais dos espectros de <sup>1</sup> H RMN da BSA e BM .....	51
<b>Tabela 4.3</b> - Deslocamentos químico e atribuições de sinais dos espectros de <sup>13</sup> C RMN CP-MAS da BSA e BM .....	53
<b>Tabela 4.4</b> - Tempos para liberação de vitamina B <sub>12</sub> atingir o equilíbrio (t <sub>∞</sub> ), coeficientes difusionais ( <i>n</i> ), constantes de proporcionalidade ( <i>k</i> ), coeficientes de correção das retas ( <i>r</i> <sup>2</sup> ) e porcentagens de fármaco liberada para os diferentes meios.....	68

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AM</b>	Anidrido Maleico
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovina
<b>CP- MAS</b>	Polarização Cruzada com Rotação em Torno do Ângulo Mágico
<b>DMAA</b>	N,N'-Dimetilacrilamida
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>HBV</b>	Vírus da Hepatite B
<b>HBsAg</b>	Antígeno de Superfície da Hepatite B
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>HSA</b>	Albumina de Soro Humano
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>KD</b>	Kilodalton
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>O/O</b>	Óleo/Óleo
<b>O/W</b>	Óleo/Água
<b>O/W/O</b>	Óleo/Água/Óleo
<b>PI</b>	Ponto Isoelétrico
<b>PEGT/PBT</b>	Polietilenoglicoltereftalato/Polibutileno tereftalato
<b>PVA</b>	Polivinil Álcool
<b>q.s</b>	Quantidade suficiente
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear

**TEMED** N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

**UV-vis** Radiação Ultravioleta-visível

**W/O** Água/Óleo

**W/O/W** Água/Óleo/Água

# CAPÍTULO 1

## *Introdução*

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Micro e nanopartículas à base de polímeros naturais têm ocupado uma posição de destaque em biotecnologia devido as suas potencialidades terapêuticas. Uma das áreas promissoras na aplicação destas partículas é a pesquisa e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, sendo que a principal aplicação está voltada para liberação de fármacos. Tais formulações envolvem a associação de um fármaco com um sistema transportador permitindo a modulação das propriedades farmacocinéticas e melhora da biodistribuição do fármaco, que pode ser controlado pelo tamanho da partícula e pelas propriedades de superfície<sup>[1]</sup>.

As nano e micro partículas podem ser preparadas a partir de vários materiais tais como: proteínas, polissacarídeos e polímeros sintéticos. A seleção dos materiais constituintes da matriz é dependente de vários fatores. Entre eles, o tamanho das nanopartículas desejadas e as propriedades inerentes ao fármaco, tais como solubilidade e estabilidade e características de superfície, como carga e permeabilidade. Além desses fatores é importante salientar ainda o grau de biocompatibilidade, biodegradabilidade e de toxicidade, bem como o perfil de liberação do fármaco desejado, e a antigenicidade do produto final<sup>[2]</sup>.

As proteínas são macromoléculas naturais que apresentam propriedades interessantes para a produção de nano e micro partículas. Isto se deve ao fato dos materiais derivados de proteínas serem biodegradáveis, não-antigênicos, metabolizáveis e também por serem passíveis de modificação da superfície e fixação covalente de fármacos e ligantes<sup>[1]</sup>.

A albumina é a proteína mais abundante do sistema circulatório <sup>[1], [3], [4]</sup> e tem sido amplamente utilizada para preparar micropartículas. Uma propriedade notável da albumina é a capacidade de se ligar reversivelmente a uma ampla gama de moléculas <sup>[4]</sup>, o que pode ser uma característica interessante em um sistema de liberação controlada. Tanto a Albumina de soro bovino (BSA) quanto à albumina de soro humano (HSA) são utilizadas para produção de nano/micropartículas <sup>[5] - [11]</sup>. Ambas apresentam estrutura muito similar (75% da sequência homóloga <sup>[4]</sup>), porém, pelo fato de ser mais barata, a BSA é mais viável para fins de testes *in vitro*.

Partículas de albumina constituem uma alternativa biotecnológica para liberação controlada de vitamina B<sub>12</sub>, também chamada de cobalamina, uma vitamina hidrossolúvel essencial para os seres humanos <sup>[12]</sup>, sendo que 15% das pessoas acima de 60 anos apresentam deficiência desta vitamina, o que pode causar anemia e levar a distúrbios neurológicos <sup>[13] - [15]</sup>.

A carência de cobalamina é a deficiência de vitamina mais comum nos países industrializados devido à má absorção de alimentos que contenham esta vitamina e também devido a distúrbios gastrintestinais <sup>[14], [15]</sup>. Embora a ingestão de vitamina B<sub>12</sub> por via oral possa aliviar os sintomas, administrações de rotina são necessárias e somente grandes doses diárias podem manter níveis adequados de vitamina B<sub>12</sub> no sangue <sup>[15]</sup>. Sob condições de deficiência desta vitamina também são empregadas injeções intramusculares, o que também requer administrações constantes <sup>[12]</sup>. A utilização de partículas de albumina é uma alternativa para tentar melhorar a biodisponibilidade oral da vitamina B<sub>12</sub> aumentando a permeação através da mucosa intestinal.

Partículas de albumina constituem também uma proposta interessante para aplicação em vacinas destinadas às mucosas. A imunização pelas mucosas induz a produção de anticorpos locais (imunoglobulina A – IgA), que previne a colonização da mucosa local e pode produzir respostas específicas em outras mucosas distantes. Esta característica é importante, pois a imunidade contra doenças transmitidas sexualmente (hepatite B, por exemplo), pode ser conseguida através da estimulação das mucosas orais e nasais por exemplo. Além disto, a vacinação pela mucosa estimula resposta sistêmica pela produção do anticorpo imunoglobulina G (IgG), que é uma defesa contra invasão por microrganismos ou seus produtos, o que imuniza contra patógenos que são adquiridos através de outras vias, como pele e sangue.

Além de estimular a produção de anticorpos locais e sistêmicos, outras vantagens incluem o fato de não ser invasiva, não requerer agulhas, seringas ou pessoas especializadas para administração, nem alto padrão de pureza ou esterilidade como no caso de vacinas injetáveis. Essas características podem reduzir significativamente o custo de produção e administração e aumentar a aceitação (já que elimina a dor) [16] -[18].

O desafio é encapsular os antígenos de forma a protegê-los da acidez e de enzimas do ambiente das mucosas e gástrico e garantir que as cápsulas que chegam ao intestino sejam internalizadas pelas células M e transportadas até as células linfóides subepiteliais dando início a resposta imune.

Neste trabalho, as microesferas de BSA modificada quimicamente com anidrido maleico (AM) foram sintetizadas através de reação de polimerização na presença de *N,N'*-dimetilacrilamida (DMAA) em emulsão água/óleo (W/O).

## 1.2 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

A tecnologia de liberação controlada e de distribuição de fármacos tem sofrido grandes avanços e passou de primitivas formas de liberação retardada, em 1960, para sistemas altamente sofisticados de liberação em 1990, sendo hoje já utilizada por milhares de pacientes em todo ano <sup>[19]</sup>, <sup>[20]</sup>. Fármacos podem agora ser liberados durante períodos que variam de dias a anos. Tais avanços tecnológicos produziram muitas formas farmacêuticas de liberação controlada clinicamente úteis, forneceram nova vida para muitos fármacos já existentes <sup>[19]</sup> e pode permitir a utilização clínica de novos fármacos <sup>[20]</sup>.

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das áreas de fronteira da ciência, que envolve abordagem científica multidisciplinar <sup>[1]</sup>, <sup>[21]</sup> e os cientistas nesta área tem sido muito criativos e eficazes no desenvolvimento de novas tecnologias para novos desafios <sup>[19]</sup>.

A liberação controlada de fármacos envolve a associação de um fármaco com um sistema transportador, permitindo a modulação das propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição do fármaco <sup>[1]</sup>. Tais sistemas são concebidos com o intuito de administrar medicamentos a taxas pré-determinadas, por períodos de tempo pré-definidos, e tem sido utilizados para superar as limitações das formulações farmacêuticas convencionais <sup>[8]</sup>.

Sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam numerosas vantagens em relação às formas de administração convencionais. Entre elas pode-se citar a maior eficácia (a dose e a frequência de administração podem ser reduzidas) e menor toxicidade (já que a liberação do fármaco pode ser voltada para órgãos, tecidos e células específicos, em um perfil pré-

determinado). Estas características reduzem os efeitos secundários indesejados, melhorando a adesão e a conveniência do paciente<sup>[10], [21]</sup>.

Muitos fatores devem ser avaliados simultaneamente no desenvolvimento de um sistema de liberação, tais como propriedade do fármaco ou substância a ser transportada, via de administração, natureza do carreador, mecanismo de liberação desejado, capacidade de direcionamento e biocompatibilidade<sup>[19]</sup>. Dentre esses vários fatores ainda existem muitas variações possíveis, conforme esquema representado na **Figura 1.1**. Devido à extensa interdependência entre estes fatores, não é fácil estabelecer um processo sequencial para a concepção de uma forma de dosagem de liberação controlada. A escolha de um dos fatores é susceptível de afetar e/ou ser afetado por outros fatores<sup>[19]</sup>.

Neste sentido, avanços na liberação controlada de fármacos tem sido amplamente baseados em avanços de polímeros funcionais<sup>[19]</sup>. A versatilidade dos polímeros torna possível o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com diferentes perfis<sup>[19]</sup>. Essa versatilidade é graças à existência de numerosos polímeros naturais e sintéticos e seus copolímeros, com características específicas (como sensibilidade a variações de pH e temperatura) que podem ser selecionados e modificados de forma a tentar atender a expectativa de um dispositivo específico.

A questão da biocompatibilidade, já citada é um fator determinante para o sucesso do uso clínico do dispositivo. Desenvolvimento de novos polímeros ou modificação de polímeros existentes para melhorar a biocompatibilidade requer uma melhor compreensão sobre a reação do corpo quando em contato com o material<sup>[19]</sup>.



**Figura 1.1** – Interdependência entre fatores importantes no design de sistemas de liberação controlada de fármacos.

**Fonte:** PARK e MRSNY (2000). **Adaptado**

A liberação controlada de fármacos, ainda que tenha passado por grandes avanços nas últimas décadas, é uma área que tem muito a que se

acrescentar. Pesquisas visando beneficiar pacientes com tratamentos mais eficientes e com menos efeitos secundários são interessantes.

### **1.3 UTILIZAÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

Nano e micropartículas ocupam posição de destaque na tecnologia de liberação de fármacos <sup>[21]</sup>. Para este fim, elas foram primeiramente desenvolvidas por volta de 1970, como carreadores para vacinas e medicamentos para tratamento de câncer <sup>[1]</sup>, <sup>[22]</sup> e nos últimos anos, esta estratégia tem ganhado crescente interesse <sup>[6]</sup>.

Os sistemas poliméricos nanoparticulados, quando aplicados à sistemas de liberação de fármacos, apresentam inúmeras vantagens em relação às formas convencionais de administração, MOHANRAJ e CHEN (2006) citaram:

- as características de tamanho e de superfície podem ser manipuladas de forma a atingir a liberação sítio-específica do fármaco;
- é possível controlar e manter a liberação do fármaco durante o transporte e no sítio desejado, alterando a distribuição nos órgãos, e subsequente remoção do fármaco de modo a alcançar aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos secundários;
- as características de liberação e degradação da partícula podem ser moduladas pela escolha dos constituintes da matriz;

- a carga de fármaco pode ser relativamente alta e este pode ser incorporado no sistema sem qualquer reação química, o que é um fator importante para preservar a sua atividade;
- a liberação sítio específica pode ser conseguida através de ligantes específicos na superfície da partícula ou usando orientação magnética;
- o sistema pode ser utilizado em várias vias de administração incluindo oral, nasal, intra-ocular e etc.

Além destas vantagens, as nano e micropartículas também são conhecidas devido à sua tendência de se acumularem em áreas inflamadas do corpo<sup>[21]</sup>.

Alguns exemplos de fármacos liberados a partir de micropartículas poliméricas comercializados estão mostrados na **Tabela 1.1**.

Em relação as micropartículas, as nanopartículas tem como vantagem uma maior eficácia e redução da degradação enzimática, além de possuir uma maior absorção celular<sup>[23]</sup>.

Dentre os vários materiais utilizados para a produção de nano e micropartículas, tem havido considerável interesse na utilização de proteínas como materiais de partida para sistemas de liberação controlada<sup>[6]</sup>. Isto se deve ao fato dos nanomateriais derivados de proteínas serem biodegradáveis, não-antigênicos, metabolizáveis e também por serem passíveis de modificação da superfície e fixação covalente de fármacos e ligantes<sup>[1]</sup>.

Na literatura são relatados trabalhos envolvendo o desenvolvimento de sistemas eficientes baseados em micro e nano partículas de proteínas, tais como gelatina, legumina, gliadina e especialmente albumina<sup>[1]</sup>.

**Tabela 1.1** - Produtos comercializados contendo micro partículas poliméricas.

<b>Nome do produto</b>	<b>Princípio Ativo</b>	<b>Empresa</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Lupron Depot®</b>	Acetato de Leuprolida	TAP	Câncer de próstata
<b>Nutropin Depot®</b>	Hormônio do Crescimento (GH)	Genetech	Deficiência infantil de GH
<b>Suprecur® MP</b>	Acetato de Buserelina	Aventis	Câncer de próstata
<b>Decapeptyl®</b>	Pamoato de Triptorelina	Ferring	Câncer de próstata
<b>Sandostatin LAR®Depot</b>	Acetato de Octreotida	Novartis	Acromegalia
<b>Somatuline® LA</b>	Lanreotida	Ipsen	Acromegalia
<b>Trelstar™ Depot</b>	Pamoato Triptorelina	Pfizer	Câncer de próstata
<b>Arestin®</b>	Minociclina	Orapharma	Doenças periodontais
<b>Risperidal® Consta™</b>	Risperidona	J. & Johnson	Antipsicótico

**Fonte:** Mundargi *et al.* (2008). **Adaptado**

Já foram desenvolvidas nanopartículas BSA pela técnica de desovatação para liberação de curcumina (um fármaco para o tratamento contra o câncer) [25]. Pelo método de reticulação em emulsão foram desenvolvidas micropartículas de BSA utilizando glutaraldeído como agente

reticulante, para liberação de sulfato de terbutalina (fármaco usado no tratamento de asma brônquica, bronquite crônica e enfisema) [7], micropartículas de BSA, modificada quimicamente com anidrido metacrílico, para liberação de propanolol (indicado para o tratamento de hipertensão arterial) [8], e também micropartículas de BSA, modificada com anidrido metacrílico, copolimerizada com N-isopropilacrilamida, e como fármacos modelos, cafeína e teofilina [26].

#### **1.4 MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS**

As nanopartículas são preparadas mais frequentemente por três métodos: dispersão de polímeros pré-formados, coacervação de polímeros hidrofílicos e polimerização dos monômeros. No entanto o método envolvendo a tecnologia de fluido supercrítico também é descrito na literatura para a produção de nanopartículas [2].

A seguir é relatado as características do método utilizado neste trabalho, a polimerização/reticulação dos monômeros que é subdividido em polimerização interfacial e polimerização em emulsão.

##### **1.4.1 Método de Polimerização/Reticulação**

Neste método, os monômeros são polimerizados. O fármaco é incorporado pela dissolução no meio de polimerização ou por absorção das partículas depois da polimerização completa. A suspensão de partículas é

então purificada para remover vários estabilizadores e agentes tensoativos utilizados [2], [27], [28].

O processo de polimerização em si consiste em geral de três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na polimerização radicalar, um iniciador (e as vezes, um catalisador), é normalmente utilizado como uma fonte de radicais livres, os radicais primários. Uma fração desses radicais primários inicia uma sequência rápida de reação com moléculas de monômero, dando origem ao radical de polímero. Segue-se a propagação da cadeia pela reação entre radicais de polímero e monômeros [29], [30]. A atividade dos radicais é destruída por reação entre dois radicais de modo a formar uma ou duas moléculas. Esta reação de terminação é chamada de recombinação mútua se apenas uma molécula é formada e terminação por desproporcionamento se duas moléculas são formadas [29].

Os métodos de polimerização para produção de nano e micropartículas são polimerização interfacial e polimerização em emulsão [30].

#### *1.4.1.1 Polimerização/Reticulação Interfacial*

A polimerização interfacial ocorre quando a reação de polimerização é conduzida na interface de dois solventes em uma emulsão. O monômero é dissolvido na fase dispersa e é polimerizado na interface, formando nanocápsulas.

As vantagens da técnica de polimerização interfacial são a elevada eficiência de encapsulamento do fármaco e a rapidez do processo. A principal

desvantagem é a utilização de solventes orgânicos, pois a lavagem de solventes é um procedimento demorado e difícil <sup>[30]</sup>.

#### 1.4.1.2 Polimerização/Reticulação em emulsão

Polimerização em emulsão é um dos métodos mais rápidos para a preparação de nanopartículas <sup>[30]</sup>, também é um dos mais utilizados.

Uma emulsão pode ser definida como uma mistura de gotículas de um líquido em um segundo líquido. Os dois tipos mais comuns de emulsões são óleo/água (O/W) e água/óleo (W/O), onde o termo óleo é usado para denominar o líquido insolúvel em água <sup>[31]</sup>. Estes dois tipos são ilustrados nas **Figuras 1.2 (a) e 1.2 (b)**. O líquido de dentro das gotículas é chamado fase interna ou dispersa e o líquido de fora das gotículas é chamado fase externa ou contínua <sup>[31]</sup>.

A estabilidade da emulsão é relacionada com a natureza do filme interfacial e com forças interpartículas (atração ou repulsão) que são importantes na prevenção da coagulação <sup>[31]</sup>.

As emulsões apresentam grande área interfacial, assim qualquer redução na tensão interfacial reduz a força motriz para a coalescência, o que promove a estabilização. Os tensoativos ou agente emulsionantes adsorvem na interface, reduzindo a tensão superficial, por isto muitas vezes eles são necessários para formação de uma emulsão estável <sup>[32]</sup>.

Muitas substâncias anfífilas que formam filmes impedindo a coalescência de gotículas da fase dispersa, são estabilizantes de emulsões. Alguns exemplos são proteínas (BSA, caseína), glucosídeos, lipídeos,

esteróides, carbonato de cálcio, glicerol, iodeto de mercúrio <sup>[31]</sup> e polímeros (PVA).

Também existem emulsões múltiplas onde ambos os tipos de emulsão O/W e W/O coexistem no mesmo sistema. Surfactantes lipofílicos e hidrofílicos são usados para estabilizar as duas emulsões. As gotículas da fase dispersa contem gotas menores dispersas em si, por isto, também são chamadas de "emulsões de emulsões" <sup>[22]</sup>.

Os dois principais tipos de emulsões múltiplas são água/óleo/água (W/O/W) e de óleo/água/óleo (O/W/O), representadas nas **Figuras 1.2 (c) e 1.2 (d)**. Uma das aplicações das emulsões múltiplas é a preparação de micropartículas poliméricas para sistemas de liberação controlada de fármacos <sup>[22]</sup>.

Na produção de micro e nanopartículas poliméricas para sistemas de liberação de fármacos, a escolha do tipo de emulsão vai depender da solubilidade do fármaco e dos monômeros utilizados.

Caso a emulsificação não seja espontânea, pode-se utilizar agitação mecânica ou ultrassom.

As vantagens da polimerização em emulsão incluem a rápida polimerização e a obtenção de polímeros com alto peso molecular <sup>[30]</sup>, além de, em particular a polimerização em emulsão W/O, ter as etapas de preparação bem definidas e simples <sup>[32]</sup>. Por isto esta técnica pode satisfazer exigências para produção de nanopartículas a partir de materiais naturais hidrofílicos <sup>[32]</sup>.

A desvantagem desta técnica é a contaminação do polímero com solventes orgânicos, agentes emulsionantes e água <sup>[30]</sup>.

Alguns exemplos de partículas preparadas pelo método de polimerização/reticulação em emulsão são microesferas de BSA [6], [8], [26], [33], nano e microesferas de pectina [34], nano e microesferas de amido [32], [35], nanoesferas de sulfato de condroitina e magnetita [36].

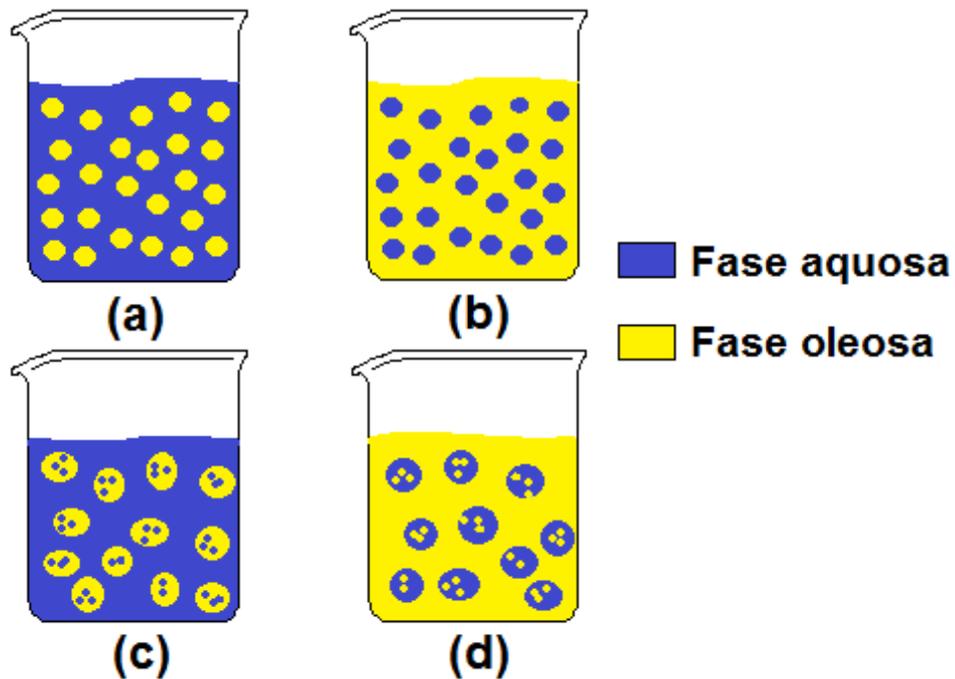


Figura 1.2 – Emulsões: (a) O/W; (b) W/O; (c) W/O/W; (d) O/W/O.

### 1.5 ALBUMINAS SÉRICAS

Albuminas séricas são as proteínas mais extensamente estudadas e aplicadas devido à sua disponibilidade, baixo custo, estabilidade, propriedades de ligação com ligantes não usuais, biodegradabilidade, não-toxicidade e não-antigenicidade [9], [37]-[39]. Tem servido como proteínas modelos para muitos estudos bioquímicos, biofísicos e físico-químicos [37].

Trata-se da proteína mais abundante no plasma sanguíneo e serve como proteína depósito e de transporte para numerosos compostos endógenos

e exógenos. Ela se liga a compostos hidrofóbicos, como ácidos graxos, bilirrubina, tiroxina, ácidos biliares e esteróides, servindo como um agente de solubilização e transporte <sup>[4], [40]</sup>.

A albumina também contribui para a pressão osmótica coloidal, mantém o pH do sangue e tem sido sugerida como uma possível fonte de aminoácidos para vários tecidos <sup>[4], [38]</sup>. Além disto, tem a capacidade de se ligar a muitos substratos, como metais (cálcio, cobre e zinco), aminoácidos, hormônios e a muitas substâncias terapêuticas <sup>[39], [41]</sup>.

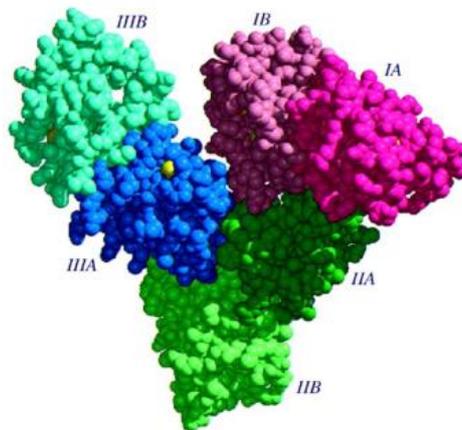
Uma propriedade útil da albumina é a sua elevada solubilidade o que está relacionado com a sua carga negativa elevada a um pH neutro, embora existam regiões distintas da cadeia com carga neutra, fator importante na interação com moléculas hidrofóbicas <sup>[4]</sup>.

Estas proteínas possuem elevado teor helicoidal e alto teor de cisteína (17 ligações dissulfetos), e têm pesos moleculares aproximados de 65 kD <sup>[4], [39]</sup>. Também possuem elevada porcentagem de resíduos de aminoácidos carregados e baixa abundância de triptofano, glicina e metionina <sup>[4]</sup>. HSA é composta por 585 aminoácidos com um peso molecular de 66,5 kD <sup>[4], [39]</sup>.

Comparações de sequências de aminoácidos de HSA e de BSA revelou elevada homologia <sup>[39]</sup>, cerca de 75% <sup>[4]</sup>. As albuminas são formadas por três domínios (I, II, e III), cada um deste constituídos por dois subdomínios (A e B) <sup>[39], [40]</sup>, conforme pode ser observado na **Figura 1.3**. Apesar da simetria interna estrutural, os três domínios possuem diferentes capacidades de ligação <sup>[40]</sup>.

Há um interesse muito grande na aplicação farmacêutica de albumina como transportador de fármacos tanto por parte dos pesquisadores quanto da indústria <sup>[41]</sup>. O gráfico representado na **Figura 1.4** mostra o quanto a pesquisa

em torno de albumina em sistemas de liberação de fármacos cresceu no período entre 1970 e 2010.



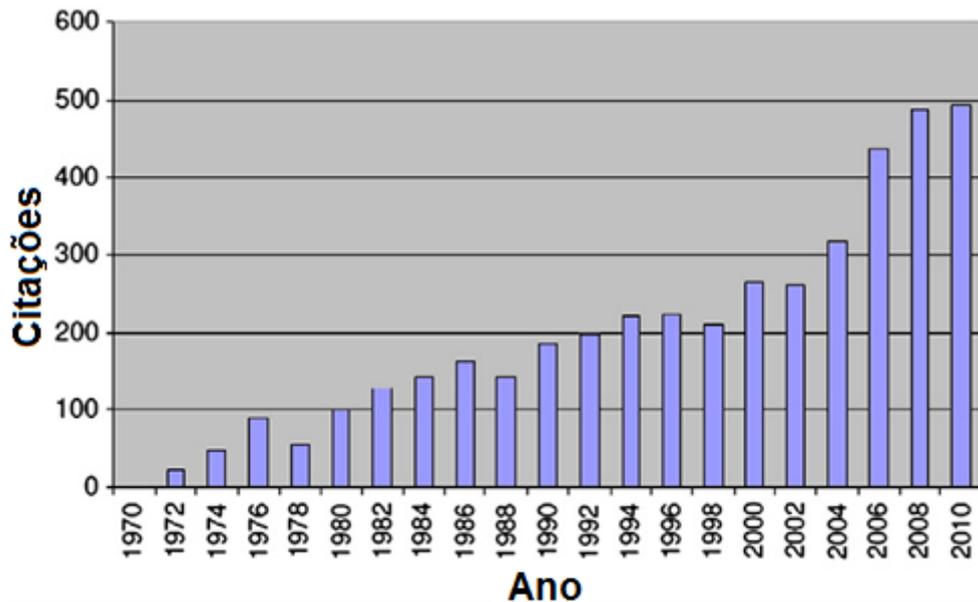
**Figura 1.3** – Estrutura espacial da HSA.

Fonte: CHOI *et al.* (2002).

A HSA já é um fármaco de sucesso com 1,3 bilhões de dólares em vendas mundiais em 2010. É usada para vários propósitos, principalmente como um substituto do sangue, para o tratamento de queimaduras graves, síndrome nefrótica ou para compensar a desnutrição ou caquexia em doentes com câncer<sup>[41]</sup>.

Há um número crescente de produtos aprovados com base em albumina, dentre eles um derivado de insulina humana ligado a albumina (Levemir® e Victoza®) para o tratamento de diabetes tipo 1 e 2, nanopartículas de albumina e taxol (Abraxane®) para o tratamento de câncer de mama metastático que está também sob investigação clínica em outras indicações tumorais, e <sup>99m</sup>Tc-agregados de albumina (Nanocoll® e Alburess®) para o diagnóstico de câncer e artrite reumatóide, bem como para linfocintigrafia, além de muitos fármacos à base de albumina ou ligado a esta proteína estarem em ensaios clínicos<sup>[41]</sup>.

Diante de toda essas características, interesses e aplicações de albuminas de soro, nota-se o potencial destas proteínas como material de partida para constituir formulações farmacêuticas.



**Figura 1.4** - Revisão da literatura - O impacto da albumina na liberação de fármacos: número de citações em **PubMed** combinando as palavras “albumin” e “drug carrier” de 1970 a 2010, exibido como intervalos de 2 anos.

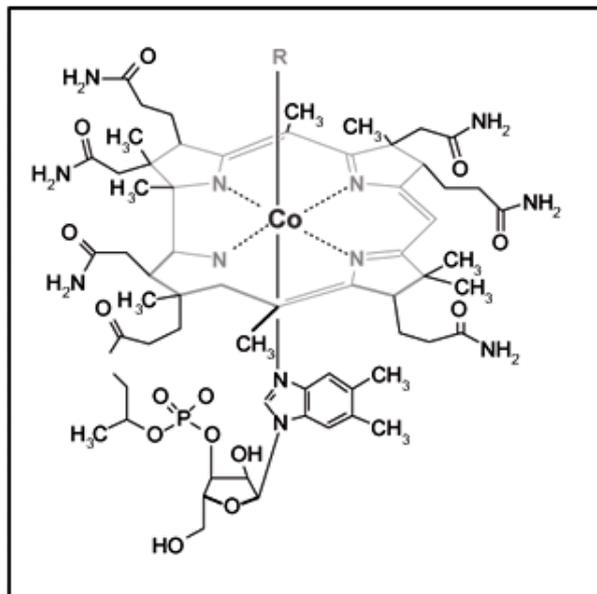
Fonte: ELSADEK e KRATZ (2012). Adaptado

## 1.6 VITAMINA B<sub>12</sub>

A vitamina B<sub>12</sub>, também chamada cobalamina, é uma vitamina solúvel em água, essencial para os seres humanos <sup>[12]</sup>. Sua estrutura, representada na **Figura 1.5**, apresenta um anel tetrapirrólico contendo cobalto <sup>[43]</sup>, e dependendo do grupamento **-R**, é denominada hidroxilcobalamina (se **-R** é uma hidroxila, **-OH**), cianocobalamina (se **-R** é um grupo ciano, **-CN**), metilcobalamina (se **-R** é um grupamento metila, **-CH<sub>3</sub>**) e adenosilcobalamina (se **-R** é um grupamento adenosila) <sup>[44]</sup>. As formas sintéticas são

cianocobalamina e hidroxicobalamina. É produzida por microorganismos e encontrada em tecidos animais.

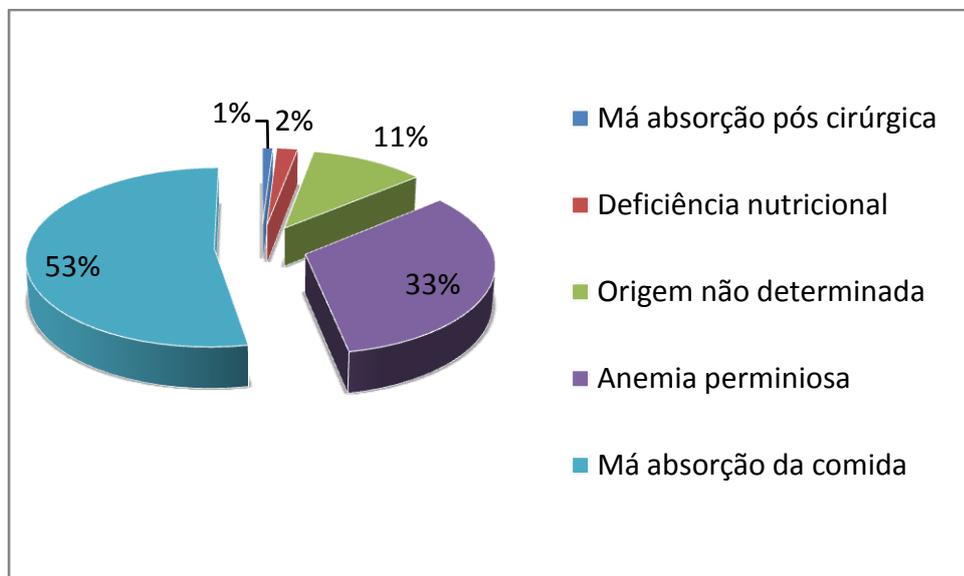
A absorção de vitamina B<sub>12</sub> é um processo relativamente complexo. A vitamina B<sub>12</sub> ligada às proteínas nos alimentos é liberada pelo ácido do estômago e se liga à glicoproteína específica, denominada transcobalamina I, que está presente nas secreções das glândulas salivares e estômago. No duodeno, essa transcobalamina I ligada à vitamina é digerida, e a vitamina B<sub>12</sub> se liga ao fator intrínseco, outra glicoproteína secretada pelo estômago, essencial para absorção da vitamina no íleo terminal<sup>[43]</sup>.



**Figura 1.5** - Estrutura da vitamina B<sub>12</sub>.

Muitos pesquisadores têm relatado um aumento notável no baixo teor de vitamina B<sub>12</sub> no soro sanguíneo de pessoas idosas<sup>[45]</sup>. Estima-se que cerca de 15% dos indivíduos idosos em países desenvolvidos apresentem deficiência de vitamina B<sub>12</sub><sup>[14], [15], [43]</sup>. Na maioria das vezes, esta deficiência relacionada com a idade, pode ser devido à atrofia gástrica e à incapacidade resultante de

dissociar a vitamina B<sub>12</sub> das proteínas dos alimentos a que está ligada. Outras causas incluem a anemia perniciosa, em que tanto o fator intrínseco quanto o ácido gástrico não são produzidos, má absorção intestinal envolvendo o íleo terminal, cirurgia para remoção do estômago ou do íleo, medicamentos que interferem na secreção de ácido gástrico, e uma dieta vegetariana estrita [43]. O gráfico mostrado na **Figura 1.6**, mostra algumas causas de deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e suas porcentagem de incidência.



**Figura 1.6** - Causas de deficiência de cobalamina em 172 pacientes hospitalizados no hospital universitário de Strasbourg, França.

**Fonte:** ANDRÈS *et al.* (2005). **Adaptado**

Embora apenas uma minoria das pessoas que apresentem deficiência de vitamina B<sub>12</sub> exiba sintomas clinicamente evidentes, esta deficiência pode causar anemia e distúrbios neurológicos em pessoas entre 40 e 90 anos, com pico de ocorrência entre 60 e 70 anos, com algumas ocorrências em pacientes com menos de 40 anos de idade [13]-[15], [45].

Em indivíduos sadios a vitamina B<sub>12</sub> é obtida através da alimentação por produtos de origem animal e também algumas algas e produtos fermentados [46], já em casos de deficiência desta vitamina, embora a ingestão oral possa aliviar os sintomas, administrações de rotina são necessárias e somente grandes doses diárias podem manter níveis adequados no sangue [15]. Outra alternativa são injeções intramusculares, o que também requer administrações constantes [12].

Devido à importância da vitamina B<sub>12</sub> para o metabolismo humano e crescente incidência de deficiência da mesma, formulações alternativas para tentar melhorar a permeação através da mucosa intestinal ou promover a liberação controlada no sangue, possibilitando a diminuição das doses e frequência de administração, facilitando o tratamento, são interessantes.

Um exemplo de trabalho neste sentido, foi desenvolvido por SOHIER *et al.* (2003), em que micropartículas constituídas de um copolímero em blocos de polietilenoglicoltereftalato/polibutileno tereftalato (PEGT/PBT) foram sintetizadas afim de liberar vitamina B<sub>12</sub>. As partículas foram carregadas com o fármaco através do processo de dupla emulsão, variando-se a quantidade e tipo de tensoativo (BSA e PVA) e a composição do copolímero. As microesferas obtidas apresentaram tamanho entre 50 e 70µm. Constatou-se que a variação da composição do copolímero permitiu o ajuste da taxa de liberação e da eficiência de encapsulamento para atender necessidades específicas. A liberação de vitamina B<sub>12</sub> a partir das microesferas foi dependente da presença de agentes tensoativos. As microsferas contendo BSA foram caracterizadas por uma liberação rápida de 70% da vitamina dentro dos primeiros 5 dias, seguido de um de liberação lenta por 2 semanas. As

microesferas contendo PVA e as que foram preparadas sem agentes tensoativos demonstraram uma liberação lenta por 60 dias. As concentrações de tensoativo não tiveram influência sobre a taxa de liberação<sup>[47]</sup>.

Outro exemplo foi desenvolvido por RAMESH (2009), onde microesferas de Poli ( $\alpha$ -caprolactona) contendo vitamina B<sub>12</sub> foram preparadas pelo método de emulsão seguida de evaporação do solvente, variou-se e comparou-se a técnicas de emulsão óleo/óleo (O/O), *hot melt* e W/O/W. O tamanho médio dessas partículas foi 12-64  $\mu$ m. No teste de liberação *in vitro* em pH 7.4, 90% da vitamina encapsulada foi liberada em um período de 28 dias<sup>[12]</sup>.

## **1.7 VACINAS DESTINADAS ÀS MUCOSAS**

As membranas mucosas cobrem as vias aerodigestiva e urogenitais, bem como a conjuntiva do olho, o ouvido interno e o canal de todas as glândulas exócrinas. A maioria dos patógenos inicia a infecção ou afeta as mucosas do hospedeiro<sup>[16], [48], [49]</sup>. Após a colonização, alguns microorganismos geram doenças, liberando substâncias tóxicas, outros, penetram os tecidos do hospedeiro podendo causar doenças sistêmicas ou em órgãos específicos<sup>[16]</sup>. Assim, a utilização da via mucosa para vacinação é muito importante para o controle da infecção e prevenção de doenças.

Para os antígenos induzirem respostas imunes nas mucosas, eles devem ser transportados através da barreira epitelial nesses locais. Isto é conseguido através da indução de um epitélio especializado sobre os folículos linfóides das mucosas que contém células M, um tipo de célula epitelial único especializado no transporte de macromoléculas, partículas e microorganismos

[50]. As células M transferem os antígenos particulados para células apresentadoras de antígenos no tecido linfóide associado ao intestino. Estas células são chamadas de "portas de entrada" para o sistema imune da mucosa e estão contidas dentro de sítios indutivos, conhecidos como placas de Peyer que são agregados de folículos linfóides encontrados principalmente no íleo terminal do intestino delgado <sup>[16]</sup>, <sup>[51]</sup>.

As características das respostas imunes induzidas pela via mucosal pode conferir vantagens em relação à vacinação parentérica. Em primeiro lugar, a imunização das mucosas induz a produção de anticorpos específicos para o antígeno (Imunoglobulina A - IgA) no local da infecção. Esta resposta local patógeno-específica, pode ser importante não apenas para a prevenção de doenças infecciosas no indivíduo receptor da vacina, mas pode ser também útil para eliminar a condição de portador saudável e conseqüentemente, a transmissão de infecções para indivíduos não protegidos. Outra vantagem é que a imunização em um local da mucosa pode induzir respostas específicas em locais distantes <sup>[16]</sup>. Esta característica é interessante, pois a imunidade contra doenças transmitidas sexualmente (hepatite B, por exemplo), pode ser conseguida através da imunização estimulada em outras mucosas, orais e nasais, por exemplo, o que elimina barreiras culturais e religiosas <sup>[16]</sup>. Além disso, a vacinação pela mucosa estimula resposta sistêmica pela produção do anticorpo imunoglobulina G (IgG), uma defesa adicional contra invasão de microorganismos ou os seus produtos que são adquiridos através de outras vias, como pele e sangue. A estimulação simultânea de anticorpos locais e sistêmicos é particularmente importante para a proteção contra patógenos que

podem infectar o hospedeiro através de ambas as rotas, sistêmica e mucosa, como por exemplo, hepatite B e HIV (Human Immunodeficiency Virus)<sup>[16], [17]</sup>.

Outras vantagens incluem o fato de não ser invasiva não requer agulhas, seringas, pessoas especializadas para administração, nem alto padrão de pureza ou esterilidade como no caso de vacinas injetáveis. Também possibilita um controle da biodisponibilidade do antígeno no tecido linfóide. Essas características podem aumentar a adesão à vacina, evitar problemas de infecções transmissíveis pelo sangue, devido a reutilização e inadequada esterilização de agulhas em países em desenvolvimento e diminuir o custo de produção e administração<sup>[16]-[18]</sup>.

Apesar de muitas características atraentes da vacinação na mucosa, a maioria das vacinas até agora em uso são vacinas parenterais e as poucas vacinas destinadas às mucosas disponíveis baseiam-se em microrganismos inteiros que atuam como potentes imunogênicos<sup>[16], [49]</sup>.

Para melhorar a segurança, as vacinas modernas são baseadas principalmente em antígenos purificados derivados do patógeno. Estes são geralmente fracamente imunogênicos e necessitam de adjuvantes específicos para a mucosa que estimulam ou amplificam a resposta imune. Uma limitação para o desenvolvimento de vacinas destinadas às mucosas tem sido a falta de segurança desses adjuvantes<sup>[16]</sup>. Outro desafio é a proteção do antígeno do ambiente hostil da mucosa.

Micropartículas poliméricas biodegradáveis constituem uma alternativa para encapsulação, proteção e entrega dos antígenos e em alguns casos, elas podem agir como adjuvantes. Elas já são utilizadas em vários modelos de vacinação experimental<sup>[16]</sup>.

É conhecido que antígenos particulados são mais eficazes para a imunização oral do que antígenos solúveis <sup>[18]</sup>. Isto é consequência, principalmente da sua maior incorporação pelas placas de Peyer <sup>[18]</sup>. A absorção das micropartículas poliméricas pelas células M favorece o direcionamento dos antígenos para as placas de Peyer após a administração oral e são igualmente eficazes por via intranasal <sup>[16], [18]</sup>.

Alguns estudos têm demonstrado a importância do tamanho das partículas sobre a absorção das partículas na vacinação da mucosa. Há estudos que demonstraram que a absorção ótima de partículas foi observada com partículas de tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$ , mas também existe observação de que micropartículas com diâmetro inferior a 5  $\mu\text{m}$  são absorvidas por placas de Peyer de ratos, induzindo resposta imunitária <sup>[52]</sup>.

Ainda existem muitos desafios a serem superados para o desenvolvimento de novas vacinas eficientes e seguras destinadas às mucosas. O desenvolvimento de micropartículas poliméricas biodegradáveis visando à aplicação nessas vacinas contribui para avanços nessa área de pesquisa tão importante e promissora.

## **1.8 HEPATITE B**

A hepatite B, uma infecção do fígado potencialmente fatal causada pelo vírus da hepatite B (HBV), e suas complicações são um grande problema de saúde pública, mesmo em áreas de baixa prevalência, como a Europa e os Estados Unidos <sup>[53], [54]</sup>.

Aproximadamente 30% da população mundial (cerca de 2 bilhões de pessoas), tem evidência sorológica de infecção atual ou passada pelo HBV. Destes, estima-se que 360 milhões tem infecção crônica e 600 mil pessoas morrem a cada ano devido às complicações como hepatite B aguda, carcinoma hepatocelular (uma forma de câncer de fígado) e cirrose<sup>[54] - [57]</sup>. A maior parte (88%) da população mundial vive em áreas de endemicidade alta ou intermédia<sup>[57]</sup>.

Na ausência de vacinação, mais de 20% de mortes relacionadas com o HBV são atribuídas à infecção perinatal. A infecção crônica desenvolve-se em 80-90% dos recém-nascidos infectados no primeiro ano de vida, e o risco diminui para 30-50% para as crianças infectadas entre 1 e 4 anos de idade. Em adolescentes e adultos, a infecção por HBV ocorre por transmissão sexual, exposição à produtos sanguíneos infectados ou agulhas e seringas contaminadas, com 2-5% dos casos tornando-se cronicamente infectados<sup>[57]</sup>.

Devido à gravidade desta doença e a grande incidência, a vacinação contra HBV tem sido recomendada para grupos de alto risco. Nos últimos anos, a maioria dos países industrializados tem feito campanhas de vacinação contra hepatite B<sup>[58]</sup>.

A estatística alarmante acima apresentada é representativa principalmente para os países menos desenvolvidos, onde a vacinação em massa ainda não foi implantada. Para que uma maior difusão da imunização por meio de vacinas possa ser alcançada é necessário o desenvolvimento de vacinas mais estáveis e baratas<sup>[58]</sup>. Além disso, apesar da eficácia das vacinas contra a hepatite B já existentes, falhas de imunização às vezes ocorrem, o que pode ser explicado por vários fatores, como armazenamento e administração

inadequados das vacinas, idade avançada do indivíduo a ser imunizado, doença hepática crônica e imunossupressão. O fator genético para a resistência às vacinas é outro ponto importante, atingindo uma taxa de até 10% [59].

Com relação às vacinas convencionais contra a hepatite B licenciadas em utilização, todas contêm alúmen como adjuvante. Apesar de ser um estimulador potente de células B (células que quando expostas a antígenos se diferenciam em plasmócitos - células produtoras de anticorpos - e células B de memória imunitária), o alúmen é menos eficaz na indução de uma resposta imunitária do tipo Th1 por via intramuscular. Esta resposta imunitária é necessária para o controle de infecções intracelulares, tais como infecções virais [59], [60].

O desenvolvimento de novos adjuvantes seguros para vacina contra HBV é necessário para explorar novas vias de administração desta vacina (como as mucosas) e também para maximizar a eficácia das vacinas já existentes. Nos últimos anos, esta idéia tornou-se ainda mais urgente uma vez que novas gerações de antígenos são predominantemente proteínas recombinantes purificadas, que são muitas vezes fracamente imunogênicos [59].

## **CAPÍTULO 2**

# ***Objetivos***

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver microesferas contendo BSA como uma constituinte chave e a aplicação em sistemas de liberação de fármacos e antígenos.

Os objetivos específicos foram:

- i) Promover a modificação da BSA com anidrido maleico.
- ii) Sintetizar microesferas de BSA modificada quimicamente usando DMAA como co-monômero para a formação da rede polimérica.
- iii) Observar o efeito de DMAA na formação das microesferas de BSA.
- iv) Observar os efeitos do tempo de agitação e da quantidade de PVA na morfologia das microesferas de BSA.
- v) Avaliar o perfil de liberação *in vitro* de vitamina B<sub>12</sub> encapsulada em microesferas de BSA.
- vi) Encapsular antígeno de hepatite B em microesferas de BSA para formulação de uma vacina destinada à via das mucosas.

## CAPÍTULO 3

# ***Materiais e Métodos***

### 3.1 MATERIAIS

BSA (Sigma-Aldrich, 68000 g.mol<sup>-1</sup>, ≥98,0%), AM (Sigma-Aldrich, ≥99,0%), álcool etílico absoluto P.A. (Fmaia, ≥99,3%), fosfato de sódio bibásico anidro (Nuclear, 98,0%), fosfato de potássio monobásico (Labsynth, 99,0%), *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Invitrogen, d=0,780 g.mL<sup>-1</sup>, ≥99,0%), persulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Sigma-Aldrich, ≥98,0%), álcool benzílico (Fmaia, 99,0%), PVA parcialmente hidrolisado (Aldrich, Mw = 13000-23000 g.mol<sup>-1</sup>, 87-89% hidrolisado), tampão pH 4,0, pH 7,0 e pH 10,0 (Synth), cloreto de sódio (Synth, 99,0%), ácido clorídrico (Chemco, 36,5-38,0%), vitamina B<sub>12</sub>, (Sigma-Aldrich, ≥98,5%), Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratórios) e ampolas de Vacina Hepatite B (recombinante) (Sanofil), compostas por 20µg de antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg), 0,5mg de gel de hidróxido de alumínio, timerosal (0,01% p/v), fosfato de potássio monobásico q.s, fosfato de sódio dibásico q.s, 8,5 mg de cloreto de sódio e água para injeção q.s.p 1,0 mL.

### 3.2 MÉTODOS

#### 3.2.1 Modificação de BSA com AM

Foram dissolvidos 0,5 g de BSA e 0,05 g de AM em 25 mL de tampão fosfato com concentração de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e pH 5,5. A mistura foi mantida sob agitação a 37 °C durante 3 horas. A albumina modificada (BM) foi precipitada em etanol gelado, separada por centrifugação a 9500 rpm e temperatura de

2 °C, lavada em água destilada-deionizada e precipitada em etanol, por três vezes. O produto foi seco por liofilização a -55 °C.

### **3.2.2 Reticulação química de BM com e sem DMAA**

BM (0,1 g) e PVA (apenas para algumas formulações) foram previamente dissolvidos em 5 mL de tampão pH 7,0. A solução resultante foi então incorporada a 20 mL de álcool benzílico. A mistura foi mantida sob atmosfera inerte de Argônio durante 30 minutos. Em seguida, 52 µL de DMAA, 0,02 g de persulfato de amônio (iniciador) e 12,5 µL de catalisador TEMED foram incorporados. A mistura, ainda sob atmosfera de Argônio a 20 °C, foi agitada a 750 rpm para formar emulsão.

O tempo de agitação e a quantidade de PVA (porcentagem em massa de PVA em relação à massa de fase aquosa) usados na reação de reticulação foram descritos na **Tabela 3.1**.

O material obtido foi precipitado em etanol gelado, separado por centrifugação a 9500 rpm, a 2° C por três vezes, e seco por liofilização a -55 °C.

Para verificar o efeito de DMAA na reticulação e na morfologia do material formado, repetiu-se o procedimento descrito acima usando tempo de agitação de 15 minutos sem adicionar DMAA ou PVA, formando a amostra BR(15min).

**Tabela 3.1** - Código das amostras reticuladas usando diferentes quantidades de PVA e tempos de agitação.

<b>Código</b>	<b>PVA(%massa/massa da fase aquosa)</b>	<b>Tempo de agitação (minutos)</b>
BR(15min)	0	15
BRDMAA(15min)	0	15
BRDMAA(15min)1%P	1	15
BRDMAA(15min)2%P	2	15
BRDMAA(30min)	0	30
BRDMAA(30min)1%P	1	30
BRDMAA(30min)2%P	2	30
BRDMAA(60min)	0	60
BRDMAA(60min)1%P	1	60
BRDMAA(60min)2%P	2	60
BRDMAA(120min)	0	120
BRDMAA(120min)1%P	1	120
BRDMAA(120min)2%P	2	120

### **3.2.3 Caracterização de BSA, BM e das amostras reticuladas**

*3.2.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de FTIR de BSA, de BM e das albuminas reticuladas BR(15min) e BRDMAA(15min) foram obtidos por meio de um espectrômetro da marca Bomen, modelo MB-100. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr. Para obter resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  foram feitas 128 varreduras para cada espectro.

### 3.2.3.2 Caracterização espectroscópica $^1\text{H}$ RMN

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN de BSA e de BM foram obtidos em um espectrômetro da marca Varian, modelo Mercury Plus operando a 300MHz. Para obtenção dos espectros, BSA e BM foram solubilizadas em 0,7 mL  $\text{D}_2\text{O}$  (20 mg  $\text{L}^{-1}$ ) com 0,05% de 3-(trimetil-silil) propionato de sódio 2,2,3,3- $\text{d}_4$  (TPS) como referência interna (0 ppm).

### 3.2.3.3 Espectroscopia $^{13}\text{C}$ RMN CP-MAS do estado sólido

Os espectros no estado sólido  $^{13}\text{C}$  RMN CP-MAS de BSA e BM foram obtidos em um espectrômetro Varian, modelo Mercury Plus, operando a 75,45 MHz.

### 3.2.3.4 Difractometria de raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios-X de BSA e BM foram obtidos em um espectrofotômetro em Shimadzu, modelo D6000, equipado com uma fonte de Cu 40 Kv e 30 mA e filtro de Níquel.

### 3.2.3.5 Estudo da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características morfológicas de BSA e de BM foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu, modelo SS 550) operando

a 12 kV. Para esta análise foi depositada uma fina camada de ouro sobre as amostras pela técnica sputtering.

### **3.2.4 Carregamento (loading) das microesferas com vitamina B<sub>12</sub>**

A vitamina B<sub>12</sub> foi carregada nas microesferas já durante a síntese das mesmas, utilizando a condição BRDMAA(15min).

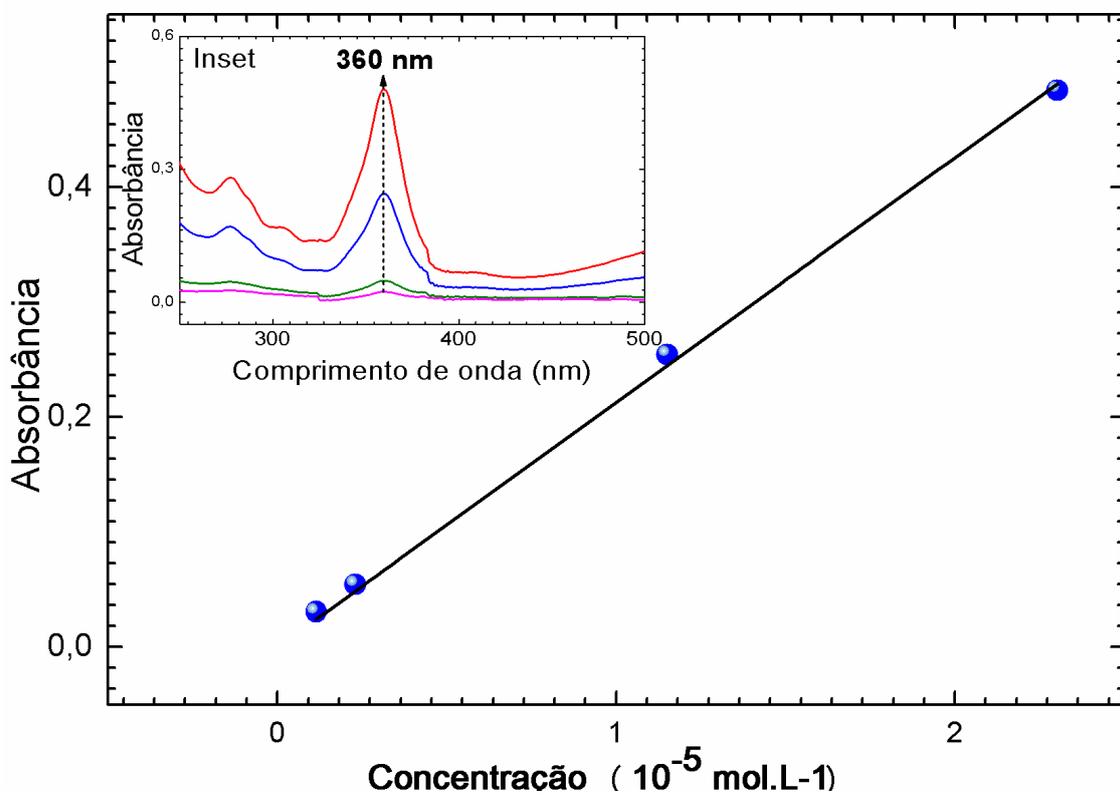
BM (0,1 g) foi previamente dissolvida em 5 mL de tampão pH 7,0. A solução resultante foi incorporada a 20 mL de álcool benzílico. O sistema foi mantido sob atmosfera inerte de Argônio durante 30 minutos. Em seguida, 0,01 g de vitamina B<sub>12</sub> (10% em massa), 52 µL de DMAA, 0,02 g de persulfato de amônio (iniciador) e 12,5 µL de TEMED foram incorporados. A mistura, ainda sob atmosfera de Argônio a 20 °C, foi agitada durante 15 minutos a 750 rpm para formar emulsão. O material obtido foi precipitado em etanol gelado, separado por centrifugação a 9500 rpm, a 2° C, e seco por liofilização a -55 °C. Guardou o sobrenadante para verificar a eficiência de encapsulamento.

### **3.2.5 Construção da curva de calibração da vitamina B<sub>12</sub> por UV-vis**

Para calcular a concentração de vitamina B<sub>12</sub> a fim de se obter a eficiência de encapsulamento bem como para determinar o perfil de liberação, construiu-se uma curva de calibração relacionando a absorbância no UV versus a concentração de vitamina B<sub>12</sub> (**Figura 3.1**). As varreduras de absorbância foram obtidas em um espectrômetro UV-vis, marca Biochron, modelo Libra S12, e as concentrações de soluções de vitamina B<sub>12</sub> em água

destilada-deionizada foram de  $1,15 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>,  $2,3 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>,  $1,15 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> e  $2,3 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>.

O *Inset* da **Figura 3.1** mostra que o máximo de absorção da vitamina B<sub>12</sub> ocorre em 360 nm, por isto este foi o comprimento de onda utilizado para as medidas de absorbância. A equação relacionando absorbância (**Abs**) e a concentração em mol.L<sup>-1</sup> (**c**) é dada na **equação 3.1**, sendo o coeficiente de correlação,  $r^2$ , igual a 0,999.



**Figura 3.1** - Curva de calibração de vitamina B<sub>12</sub> em água com pico de referência em 360 nm.

**Inset:** Região de máximo de absorção de vitamina B<sub>12</sub>.

$$\text{Abs} = 2,13 \cdot 10^3 \cdot c \quad \text{Equação 3.1}$$

### 3.2.6 Cálculo da eficiência de encapsulamento de vitamina B<sub>12</sub> pelas microesferas

A partir da curva de calibração calculou-se a média da concentração de vitamina B<sub>12</sub> remanescente no sobrenadante, a partir de quatro experimentos de encapsulamento. Sabendo-se o volume exato do sobrenadante, pelo valor médio de concentração, calculou-se o número médio de mol de vitamina B<sub>12</sub> (MM = 1355,29 g mol<sup>-1</sup>) que não foi encapsulado (**N<sub>n</sub>**). Através da **equação 3.2** calculou-se a eficiência de encapsulamento (**E%**), sendo **N<sub>i</sub>** o número total de mol de vitamina B<sub>12</sub> inicialmente colocado (0,01 g).

Também calculou-se a porcentagem (massa/massa) de fármaco no sistema (**%M**) através da **equação 3.3**.

$$\%E = \frac{(N_i - N_n) \cdot 100}{N_i} \quad \text{Equação 3.2}$$

$$\%M = \frac{(M_{enc} \cdot 100)}{(M_{inc} + M_{enc})} \quad \text{Equação 3.3}$$

### 3.2.7 Teste de liberação *in vitro* da vitamina B<sub>12</sub>

O perfil de liberação de vitamina B<sub>12</sub> a partir das microesferas foi obtido por meio de medidas da absorvância de luz no comprimento de onda de máxima absorção da vitamina B<sub>12</sub>. Os valores de absorvância foram convertidos para concentração através da **equação 3.1** referente à curva de calibração que correlaciona absorvância e concentração de vitamina B<sub>12</sub>. As

medidas de absorvância foram obtidas em um espectrofotômetro UV-vis marca Biochron, modelo Libra S12. Os testes de liberação foram feitos em tampões de pH 2, 4, 6, 8 e 10.

Para os testes de liberação, 0,1 g da amostra BRDMAA(15min), carregada com vitamina B<sub>12</sub>, foi transferido para uma membrana de diálise junto com 30 mL de solução tampão. A membrana foi imersa em um reator contendo 220 mL do mesmo tampão, que foi agitado constantemente, a aproximadamente 300 rpm, a temperatura de 37 °C. Em seguida, alíquotas (aproximadamente 5 mL) foram coletadas em tempos específicos para leituras de absorvância. Após as leituras as alíquotas foram devolvidas ao reator, afim de evitar mudanças no volume.

### **3.2.8 Estudo do perfil de liberação e mecanismo de liberação de vitamina B<sub>12</sub> a partir das microesferas**

Para verificar o perfil de liberação de vitamina B<sub>12</sub> a partir das microesferas construiu-se curvas relacionando a fração de fármaco liberado (concentração no tempo *t* dividido pela concentração no equilíbrio) e o tempo.

Para análise do mecanismo de liberação do fármaco, os dados experimentais das concentrações em tempos específicos foram ajustados aplicando a **equação 3.4**, que é a equação mais abrangente e simples, utilizada para descrever o comportamento geral de liberação de fármacos a partir de dispositivos poliméricos <sup>[61] - [65]</sup>.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Equação 3.4}$$

onde  $M_t$  e  $M_\infty$  são, respectivamente, as quantidades acumulada de fármaco liberadas no tempo  $t$  e no equilíbrio,  $k$  é uma constante de proporcionalidade que incorpora características estruturais e geométricas do dispositivo e  $n$  é o coeficiente difusional ou expoente de liberação [61]-[64].

Esta equação pode ser utilizada para analisar a liberação a partir de dispositivos de geometrias diferentes (filmes, cilindros, esferas, discos e esferas) e é aplicada apenas até 60% do soluto liberado [61], [62]. Aplicando a função logarítmica na **equação 3.4**, obtém-se a forma linear desta equação, descrita na **equação 3.5**.

$$\log \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = n \log t + \log k \quad \text{Equação 3.5}$$

Através do gráfico relacionando o **log** da fração de soluto liberado *versus* o **log** do tempo, obtém-se o coeficiente angular da reta, que corresponde ao  $n$ . O valor de  $n$  depende da geometria da matriz, como descrito previamente, e está relacionado com o mecanismo envolvido na liberação do soluto a partir de matrizes poliméricas, como especificado na **Tabela 3.2**.

O mecanismo de liberação por difusão Fickiana é o mecanismo pelo qual o fármaco se difunde através das camadas da matriz, ou seja, é controlado pela difusão. O mecanismo de transporte Caso II é controlado pelo intumescimento/relaxação das cadeias poliméricas e independe do tempo. No caso de transporte anômalo (não-Fickiano), ambos os processos, difusão e intumescimento ocorrem simultaneamente. No super caso II de transporte ocorre uma contribuição simultânea dos processos de difusão, relaxação/intumescimento e erosão da matriz [62], [64], [66], [67].

**Tabela 3.2** - Expoente difusional e mecanismo de liberação a partir de matrizes de diferentes formas geométricas.

Expoente difusional, $n$			Mecanismos de liberação
Filmes finos	Cilindros	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo (não- Fickano)
1,0	0,89	0,85	Caso II de transporte
$> 1,0$	$> 0,89$	$> 0,85$	Super caso II de transporte

**Fonte:** RITGER, P.L. e PEPPAS, N.A. (1987), SIEPMANN, J. e PEPPAS, N.A. (2001) e PRAJAPATI, S.K. *et al.* (2012).

### 3.2.9 Análise morfológica das microesferas após intumescimento

Microesferas BRDMAA(15min) (0,05g) foram colocadas em 5 mL dos tampões pH 2.0, pH 4.0, pH 6.0, pH 8.0 e pH 10.0. O sistema foi mantido fechado a temperatura de 37 °C durante 24 horas. Após esse período as amostras foram secas por liofilização a -55 °C e as propriedades morfológicas foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu, modelo SS 550) operando a 12 kV. Para esta análise foi depositada uma fina camada de ouro sobre as amostras pela técnica sputtering.

### 3.2.10 Estudo da influência da membrana de diálise no perfil de liberação

Com a finalidade de verificar a influência da membrana de diálise no perfil de liberação colocou-se 0,01 g de vitamina B<sub>12</sub> dentro da membrana de

diálise junto com 30 mL de tampão. Os meios testados foram pH 2.0, pH 4.0, pH 6.0, pH 8.0 e pH 10.0. A membrana foi imersa em um reator contendo 220 mL da mesma solução tampão. O sistema foi agitado a aproximadamente 300 rpm e mantido a temperatura de 37 °C. Em tempos específicos coletou-se alíquotas (aproximadamente 5 mL) para leituras de absorbância. Após as leituras as alíquotas foram devolvidas ao reator, afim de evitar mudanças no volume.

Os valores de absorbância foram convertidos para concentração através da curva de calibração da **Figura 3.1** e construiu-se curvas relacionando a concentração acumulada (%) de fármaco (concentração no tempo  $t$  dividido pela concentração no equilíbrio) e o tempo.

### ***3.2.11 Carregamento (loading) das microesferas com antígenos da hepatite B***

0,3 g de partículas BRDMAA(15min) foram colocadas juntamente com 3 ampolas de vacina contra Hepatite B, totalizando 60 µg de antígeno e 3 mL de solução aquosa. As partículas foram incubadas durante 6 horas, a 37 °C, sob agitação lenta constante. Após esse período as partículas foram precipitadas com 3 mL de acetona e separadas do sobrenadante por centrifugação. O sobrenadante foi reservado para quantificação do antígeno remanescente.

### ***3.2.12 Construção da curva de calibração de proteína total para quantificação de antígeno***

Foi construída uma curva de calibração relacionando a absorbância e a concentração em massa de proteína total por mililitro de solução (**Figura 3.2**), sendo a equação da reta correspondente mostrada na **equação 3.6**, com coeficiente de correlação,  $r^2$ , igual a 0,998.

Esta curva foi obtida a partir da quantificação de proteína total (BSA) utilizando-se o reagente Bio-Rad Protein Assay. Este ensaio é baseado no método de Bradford, um procedimento para determinação da concentração de proteína solúvel <sup>[68]</sup>. Envolve a adição de uma solução ácida do corante Coomassie® Brilliant Blue G-250 na solução de proteína. O corante se liga primariamente aos resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos, especialmente a arginina. Ocorre a formação de um complexo de coloração azul, alterando a cor da solução que é medida através da absorbância em 595 nm.

A lei de Beer é aplicada para a quantificação de proteína através da seleção de uma proporção adequada do volume de corante e a concentração da amostra. No presente trabalho utilizou-se o procedimento de microensaio, onde a faixa de linearidade para solução padrão de albumina é em torno de 1,2-10 g/mL, segundo manual do fabricante do reagente.

Preparou-se 6 diluições de um padrão de BSA (12, 10, 8, 6, 4 e 2 µg/mL). Em duplicata, pipetou-se 800 µl de cada solução padrão para um tubo de ensaio. Adicionou-se a cada tubo 200 µl do reagente Bio-Rad Protein Assay. Transferiu-se a mistura para microplaca, onde manteve-se incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Mediu-se a absorbância em 595 nm utilizando um leitor ELISA (Bio-TEK).

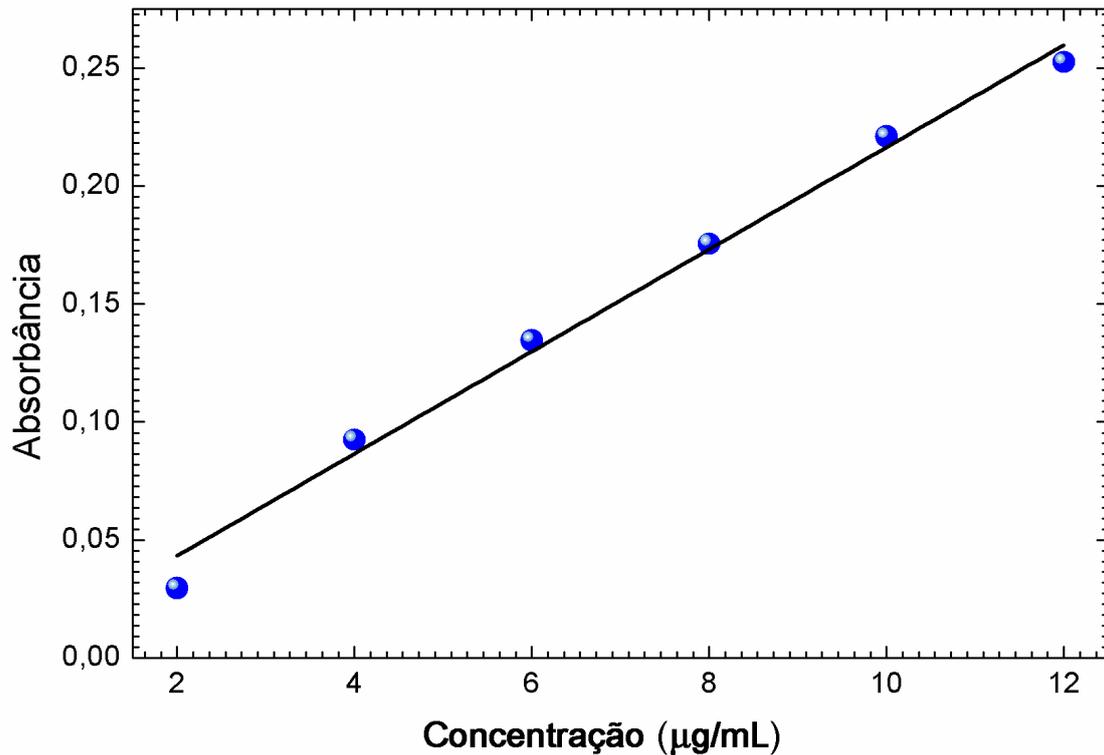


Figura 3.2 – Curva de calibração de proteína total.

$$\text{Abs} = 2,1 \cdot 10^4 \cdot c$$

Equação 3.6

### 3.2.13 Cálculo da eficiência de encapsulamento de antígeno da hepatite B pelas microesferas de BSA

A quantidade de antígeno encapsulado foi obtida indiretamente pela quantificação de proteína remanescente no sobrenadante através da curva de calibração e equação da reta corresponde (Figura 3.2 e equação 3.6).

Como para construção da curva de calibração utilizou-se o reagente Bio-Rad Protein Assay. Em duplicata, pipetou-se 800 µL do sobrenadante para um tubo de ensaio. Adicionou-se a cada tubo 200 µL do reagente Bio-Rad

Protein Assay. Transferiu-se a mistura para microplaca, onde manteve-se incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Mediu-se a absorvância em 595 nm utilizando um leitor Elisa (Bio-TEK) e através da curva de calibração, se obteve a concentração de proteína (proveniente dos antígenos) no sobrenadante.

Sabendo-se o volume exato do sobrenadante e o valor médio de concentração, calculou-se a massa média de antígeno que não foi encapsulado. Através da **equação 3.2**, substituindo-se o número de mol pela massa, calculou-se a eficiência de encapsulamento (**E%**),

#### **3.2.14 Verificação do efeito da BSA na determinação de antígeno**

Afim de verificar se a albumina das micropartículas interferiria na quantificação de antígeno (por determinação de proteína total), incubou-se 0,2 g de micropartículas BRDMAA(15min) em 2 mL de água destilada, também por 6 horas a 37 °C, sob agitação lenta. Da mesma forma, as partículas foram precipitadas com acetona e separadas por centrifugação e a proteína do sobrenadante foi quantificada como descrito anteriormente.

## **CAPÍTULO 4**

# ***Resultados e Discussão***

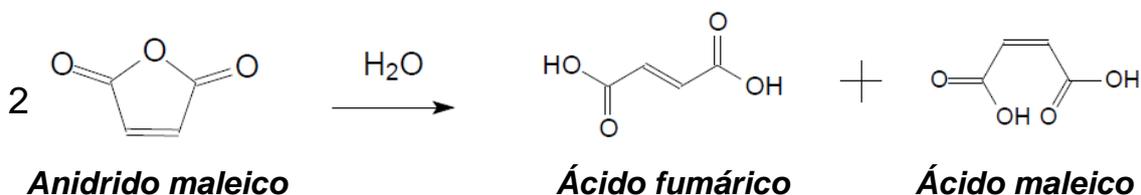
#### **4.1 MODIFICAÇÃO DE BSA COM AM**

Apenas algumas proteínas sustentam sua dissolução em solvente orgânico sem a perda de propriedades de reconhecimento molecular <sup>[69]</sup>, portanto neste trabalho utilizou-se meio reacional aquoso, para manutenção da estrutura da BSA, além da possibilidade do uso desta metodologia para modificar qualquer outra estrutura protéica.

As condições de modificação da BSA com AM foram baseadas no trabalho de LADAVIÈRE e colaboradores (1999), com algumas modificações.

No trabalho desenvolvido por estes autores a BSA foi imobilizada em poli(metilviniléter co-anidrido maleico) entre os tampões testados (fosfato de sódio, 0.1M, pH 5.5; tris, 0.05M, pH 7; tris, 0.05M, pH 7.6; fosfato de sódio, 0.1 M, pH 8; carbonato de sódio, 0.1 M, pH 9.1; borato de sódio, 0.1 M, pH 9.2; tris, 0.05 M, pH 9.3; carbonato de sódio, 0.1 M, pH 10.75) o tampão fosfato de sódio, 0.1 M, pH 5.5 mostrou-se o meio mais eficiente para a reação covalente de imobilização, pois a hidrólise da parte da cadeia derivada do anidrido foi mais lenta do que em qualquer um dos outros meios mais básico, o que pode explicar o rendimento superior obtido sob essas condições. Outro fator favorável para a imobilização, a um pH próximo do ponto isoelétrico de BSA (pI 4.9) é que o efeito de interações eletrostáticas deve ser reduzido uma vez que a carga líquida de BSA em pH 5.5 é perto de zero ou ligeiramente negativa, o que também pode gerar forças repulsivas que previne a formação de dímeros de moléculas de BSA que desfavorecem a reação <sup>[69]</sup>.

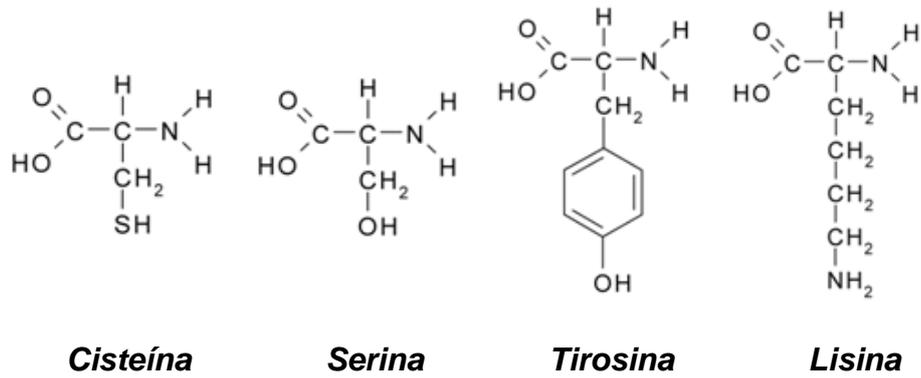
A reação de hidrólise do AM (**Figura 4.1**) é concorrente à reação de modificação e tem como produtos os ácidos trans-butenodióico (ácido fumárico) e principalmente cis-butenodióico (ácido maleico).



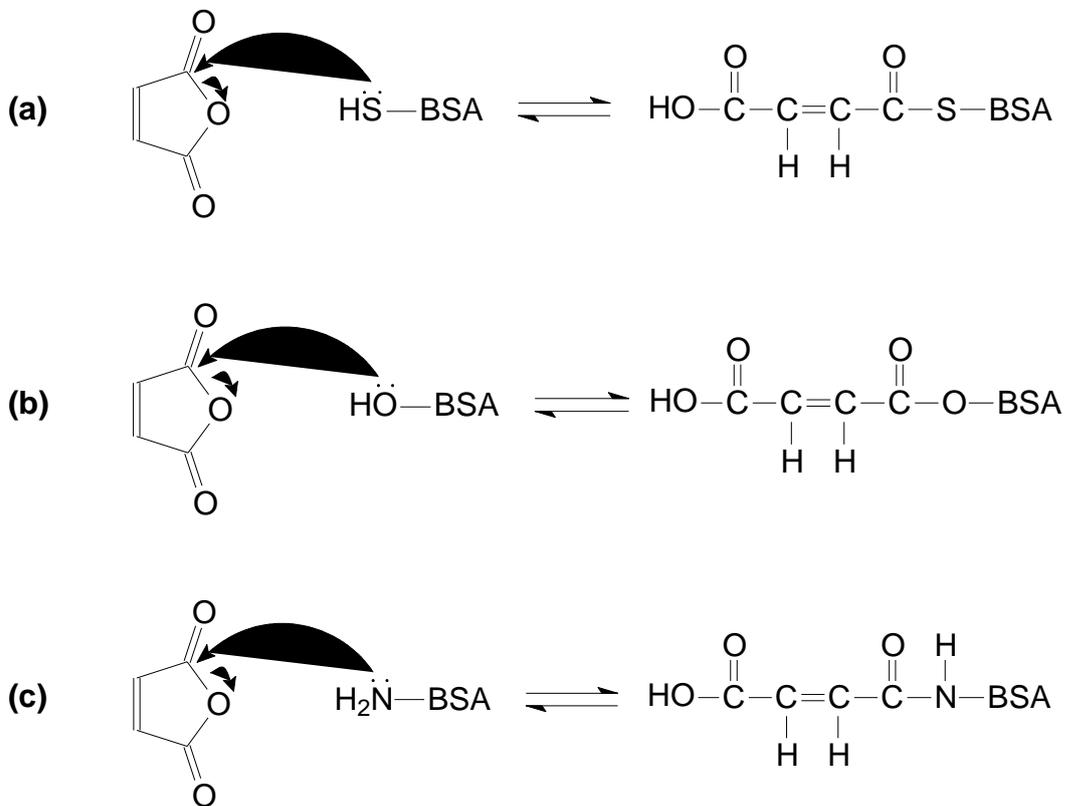
**Figura 4.1** - Reação de hidrólise do AM resultando nos ácidos fumárico e maleico.

O tempo de agitação de 3 horas e a temperatura de 37 °C também foram fixados baseando-se neste trabalho de LADAVIÈRE e colaboradores (1999).

Propõe-se que a modificação química da BSA com AM ocorra por ataque nucleofílico da BSA ao AM. Os grupos nucleofílicos de BSA, que poderiam reagir com AM, são os grupos tiol do resíduo cisteína, grupos hidroxilas dos resíduos serina e tirosina e grupos amins da cadeia lateral de resíduos de lisina<sup>[26]</sup> (**Figura 4.2**), conforme reações propostas na **Figura 4.3**. Porém os grupos tíois (17 deles) estão envolvidos em ligações dissulfeto, ajudando a manter a estrutura terciária da proteína, exceto cys-34, que é o único livre e as hidroxilas são menos nucleofílicas e não reagem em condições experimentais suaves<sup>[6], [26]</sup> como no presente trabalho, onde a temperatura de reação foi controlada em 37 °C e mantido o pH 5,5. Por isto, sob condições brandas, somente grupos amino estericamente acessíveis da cadeia lateral do resíduo lisina reagem<sup>[6], [26]</sup>.

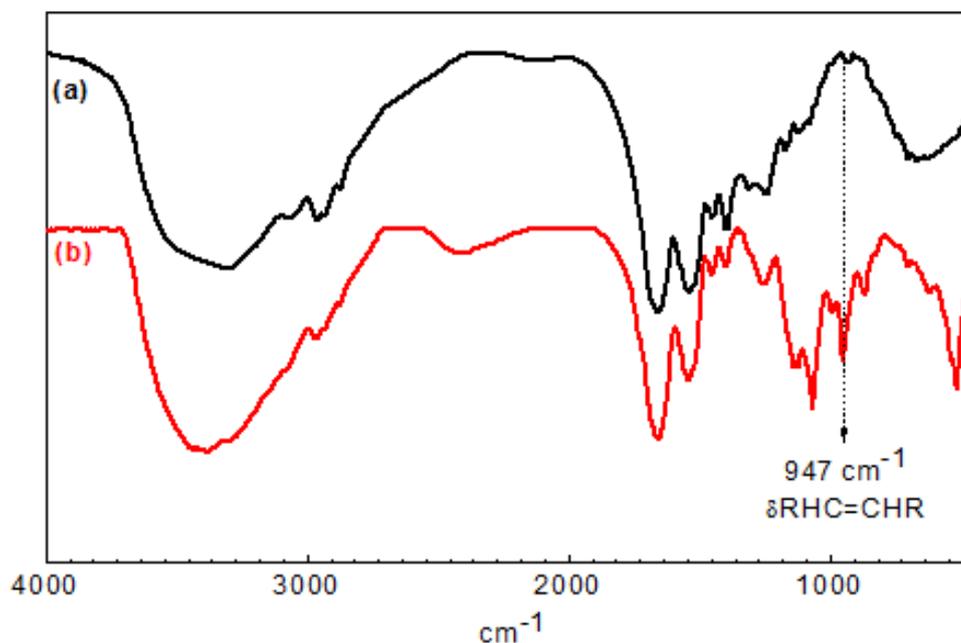


**Figura 4.2** - Estruturas dos aminoácidos cisteína, serina, tirosina e lisina.



**Figura 4.3** - Esquema para reações de ataque nucleofílico dos grupamentos (a) tiol do resíduo cisteína, (b) hidroxila dos resíduos serina e tirosina, e (c) amino do resíduo lisina ao AM.

Na **Figura 4.4** estão representados os espectros de FTIR de BSA e BM na região espectral de 4000-450  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 4.4** - Espectros de FTIR de BSA (a) e BM (b).

As atribuições das bandas dos espectros de BSA e BM estão apresentadas na **Tabela 4.1**.

A banda em  $947 \text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação angular de dupla dissubstituída, é um indicativo da reação de modificação (inclusão da dupla ligação) de BSA. Se a conformação da dupla ligação fosse cis, no espectro se observaria uma banda intensa entre  $730\text{-}665 \text{ cm}^{-1}$  [70]. Contudo, a banda intensa em  $947 \text{ cm}^{-1}$  corresponde à dupla ligação em conformação trans [70], indicando que ocorre mudança de conformação de cis para trans após a abertura do anel de AM. No caso de produção de ácido fumárico (isômero trans) a partir do ácido maleico (isômero cis), a isomerização é por via térmica ou catalítica [71], sendo que os catalisadores mais comuns para este caso são ácidos minerais, peróxidos e tiouréia [72].

A reação de modificação foi feita em tampão fosfato 0,1 M de pH 5,5. Por esta razão, na solução havia ácido mineral ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ), o que explica a mudança do arranjo espacial com a abertura do anel de cis para trans, visto que a conformação trans é a mais estável por ser menos impedida estericamente, o que é importante no caso da BSA, uma macromolécula bastante complexa.

**Tabela 4.1** - Números de onda e atribuições das bandas dos espectros de FTIR de BSA e BM.

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
3500-3060	$\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ e $\nu_{\text{as}}\text{N-H}$ (amida) <sup>[70]</sup>
3550-3200	$\nu\text{O-H}$ (ácido carboxílico e $\text{H}_2\text{O}$ ) <sup>[70]</sup>
3080	$\nu\text{C}_{\text{sp}2}\text{-H}$ (anel aromático) <sup>[70]</sup>
2960 e 2874	$\nu\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ (metila e metileno) <sup>[70]</sup>
1660	$\nu\text{C=O}$ e $\delta\text{N-H}$ (amida I) <sup>[73]</sup>
1645	$\delta\text{H-O-H}$ <sup>[73]</sup>
1630	$\nu\text{C=C}$ (anel aromático (tirosina) e grupo vinílico incluído) <sup>[73]</sup>
1538	$\delta\text{N-H}$ e $\nu\text{C-N}$ (amida II) <sup>[73]</sup>
1453	$\delta\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ (metileno) <sup>[70]</sup>
1395	$\nu\text{C-N}$ (amida I) <sup>[70]</sup>
1310-1230	$\delta\text{N-H}$ e $\nu\text{C-N}$ <sup>[73]</sup>
1150-1050	$\delta\text{C-O}$ <sup>[70]</sup>
947	$\delta\text{RHC=CHR}$ <sup>[70]</sup>
800-600	$\delta\text{N-H}$ (amida e amina) <sup>[70]</sup>

Na **Figuras 4.5** estão representados os espectros de  $^1\text{H}$  RMN de BSA e BM e na **Tabela 4.2** estão apresentados deslocamentos químicos e atribuições dos sinais dos respectivos espectros. Os picos em  $\delta 5,8$  ppm e  $\delta 6,2$

ppm são referentes aos hidrogênios ligados a grupos vinílicos incorporados a molécula de BSA, comprovando a modificação da proteína com AM.

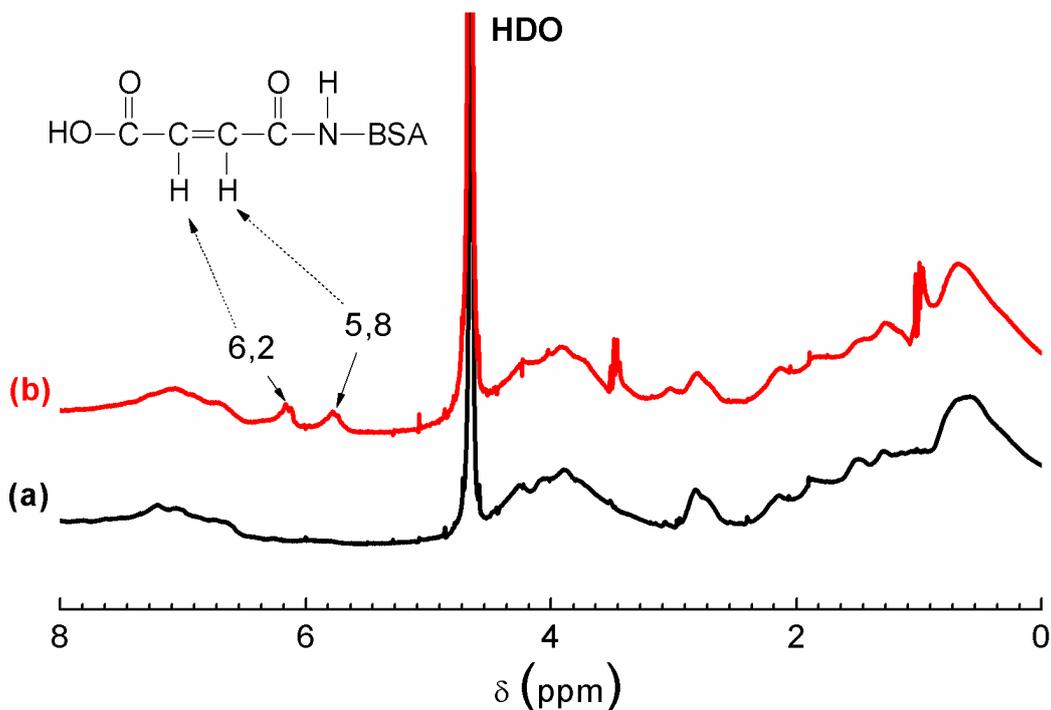


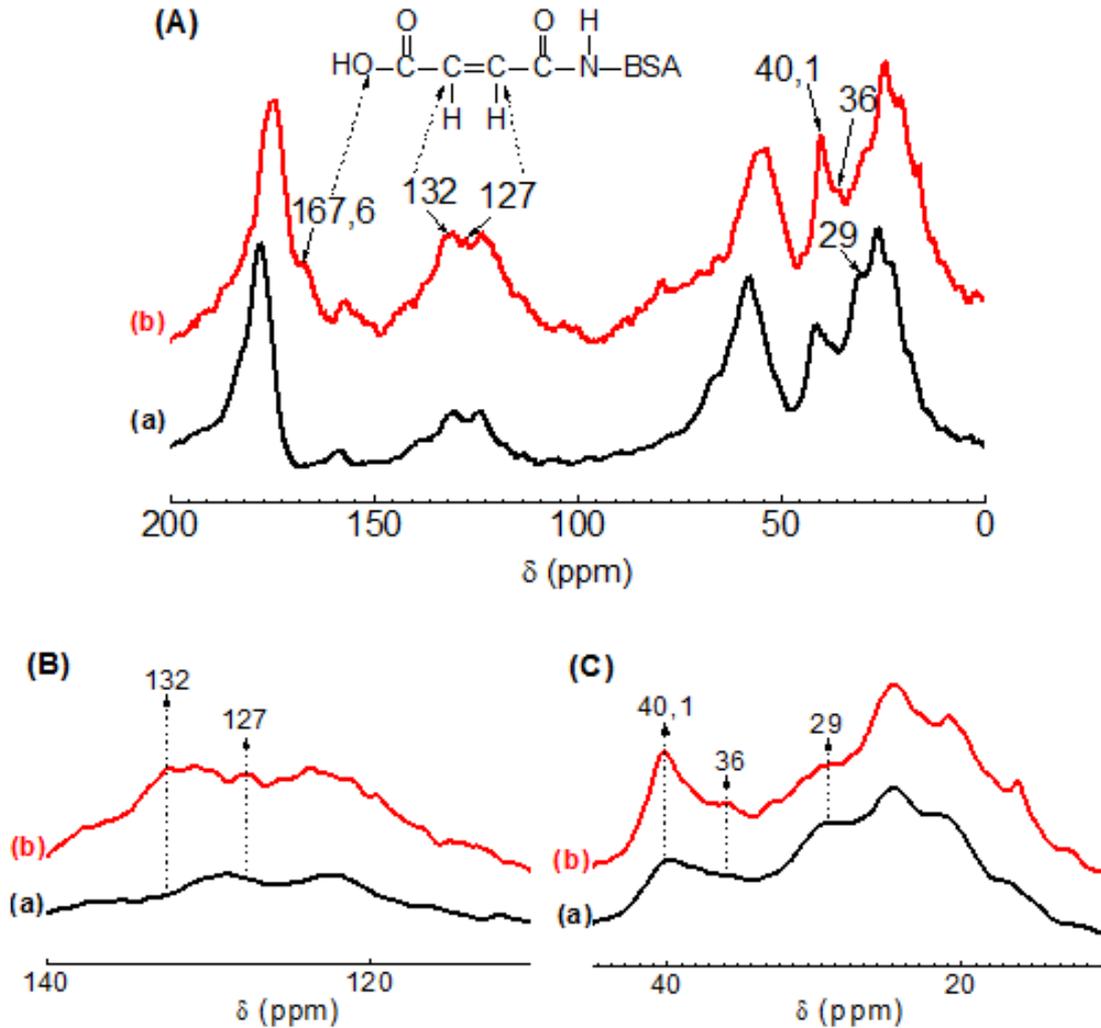
Figura 4.5 - Espectros de <sup>1</sup>H RMN de BSA (a) e BM (b).

**Tabela 4.2** - Deslocamentos químico e atribuições de sinais dos espectros de <sup>1</sup>H RMN da BSA e BM.

δ (ppm)	Atribuição
0,5-3,0	NH <sub>2</sub> e NHR (alquil aminas)
5,0-8,8	NH <sub>2</sub> e NHR (amidas)
1,0	-CH <sub>3</sub> (etanol)
3,5	-CH <sub>2</sub> - (etanol)
4,0	-OH (etanol)
4,7	HDO
6,6-7,3	-HC=CH- (anéis aromáticos dos aminoácidos)
3,5-4,4	-CH-NR e -CH <sub>2</sub> -NH
5,8 e 6,2	-HC=CH- (grupo vinílico incluído)

Fonte: SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE (2005).

Os espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN CP-MAS de BSA e BM estão apresentados na **Figura 4.6** e as atribuições dos picos estão apresentadas na **Tabela 4.3**.



**Figura 4.6** - Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN CP-MAS de BSA (a) e BM (b): (A) de 200 a 0 ppm; (B) de 140 a 110 ppm; (C) de 45 a 10 ppm.

Os picos em  $\delta 127$  ppm e  $\delta 131$  ppm (ampliados na **Figura 4.6 (B)**) são referentes as carbonos de dupla ligação e o pico em  $\delta 167,6$  ppm é atribuído à carbono de carbonila de ácido em sistemas conjugados. Estes grupos não estão presentes na albumina pura, e por esta razão, confirmam a reação de modificação da proteína. Neste caso, grupos vinil ácido ( $-\text{HC}=\text{CH}-\text{COOH}$ ) são

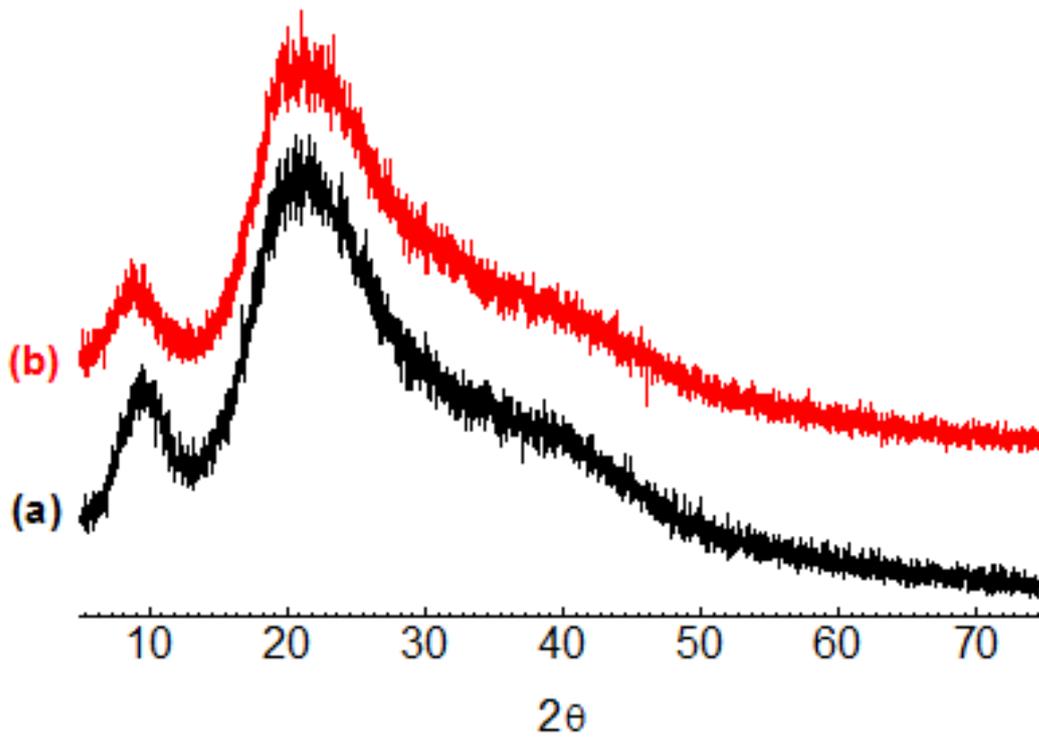
formados na estrutura protéica. A diminuição da intensidade do pico em  $\delta 29$  ppm no espectro da BM, referente a carbono ligado amina primária, o aumento da intensidade do pico em  $\delta 40,1$  ppm no espectro de BM, referente a carbono ligado a amins terciárias, e a banda em  $\delta 36$  ppm presente somente no espectro da BM, devido a carbono ligado a amins secundárias (ampliações nas **Figura 4.6 (C)**), também confirmam a modificação, pois, indicam que parte dos grupos amins reagiram formando novos grupamentos amins secundárias e terciárias.

**Tabela 4.3** - Deslocamentos químico e atribuições de sinais dos espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN CP-MAS da BSA e BM .

$\delta$ (ppm)	Atribuição
16,1	$>\text{CH-COOH}$
21	$-\text{CH}_2\text{-COOH}$
24,5	$\text{C}-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$
29	$-\text{H}_2\text{C-NH}_2$
36	$-\text{H}_2\text{C-NHR}$
40,1	$\text{C-NR}_2$
54,9	$\text{C-N}$
$127_{(\alpha)}, 131_{(\beta)}$ e $167,6_{(\gamma)}$	$\text{HC}_{(\beta)}=\text{C}_{(\alpha)}\text{H-C}_{(\gamma)}\text{OOH}$
174,7	$\text{NH}_2\text{-HC=O}$

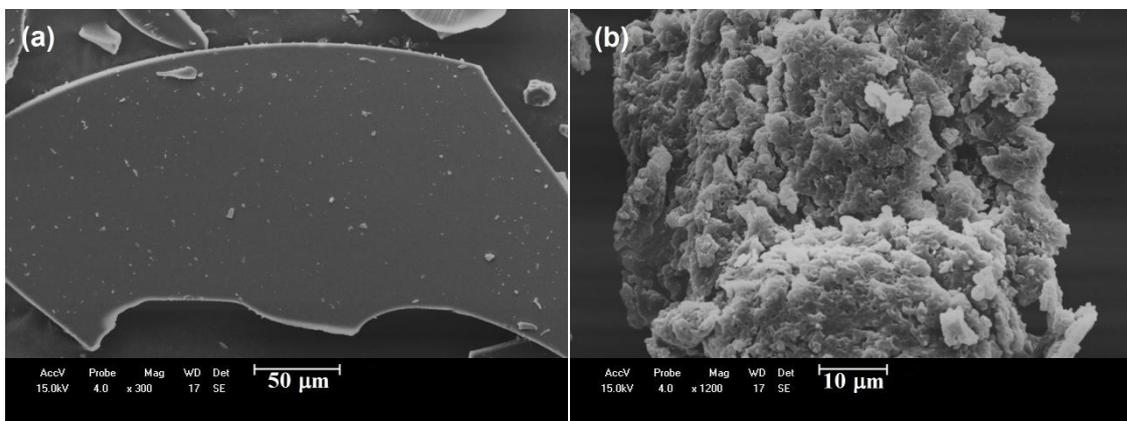
**Fonte:** SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE (2005).

No difratograma de raios-X (**Figura 4.7**) de BSA e BM não foram observados sinais definidos. Houve apenas o aparecimento de halos, que são característicos de estruturas amorfas, indicando que a modificação não altera a estrutura amorfa de BSA que pode indicar uma manutenção da estrutura tridimensional.



**Figura 4.7** - Difratomogramas de raios-X de BSA (a) e BM (b).

A morfologia da superfície de BSA e BM pode ser observada nas micrografias de MEV apresentadas na **Figura 4.8**. A morfologia de BSA pura é caracterizada pela presença de placas, claramente diferente de BM que é formada por estruturas não definidas e porosas.

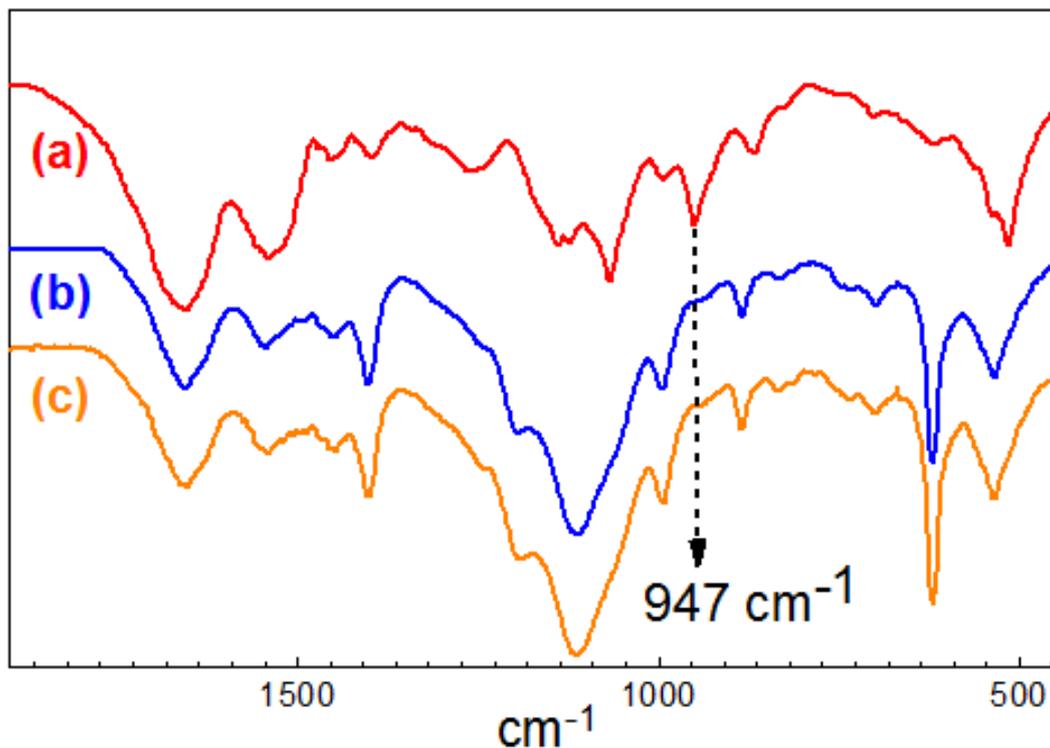


**Figura 4.8** - Micrografias de MEV: (a) BSA e (b) BM.

## 4.2 RETICULAÇÃO DE BM

Foi apresentada a verificação da reticulação da BM com e sem DMAA somente das amostras preparadas com agitação de 15 minutos, sem PVA, visto que se neste intervalo de tempo é observado a reticulação, para tempos maiores, espera-se o mesmo resultado e o PVA não influencia na reticulação, pois na reação tem apenas a função de melhorar a estabilidade da emulsão, afetando, portanto somente as características morfológicas.

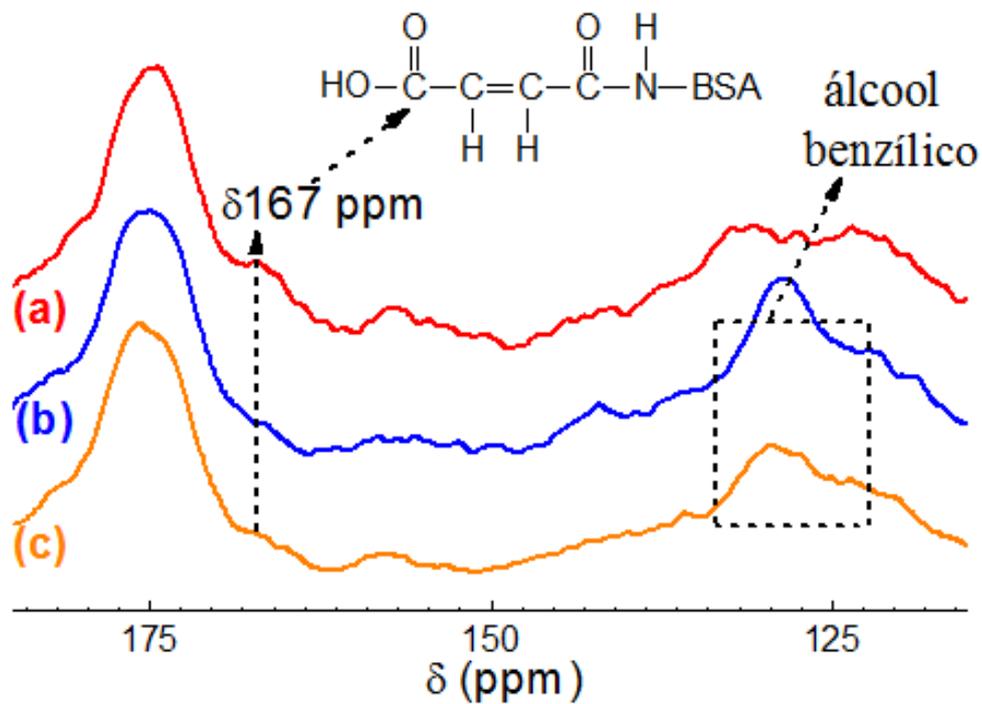
O persulfato de amônio na presença de TEMED se dissocia em radicais livres que atacam as duplas ligações de BM e de DMAA promovendo a reação de reticulação radicalar. Na **Figura 4.9** estão representados os espectros de FTIR de BM, BR(15min) e BRDMAA(15min).



**Figura 4.9** – Espectros de FTIR de BM (a), BR(15min) (b) e BRDMAA(15min) (c).

A diminuição de intensidade da banda em  $947\text{ cm}^{-1}$  nos espectros de BR(15min) e BRDMAA(15min) referente a deformação angular dos hidrogênios da dupla trans substituída, são evidências da reação reticulação/polimerização. Isto indica que DMAA não é determinante para que a reação ocorra. DMAA foi selecionado como co-mônômero com a finalidade de promover a reticulação da matriz.

Na **Figura 4.10** estão apresentados os espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN CP-MAS no estado sólido de BM, BR(15min) e BRDMAA(15min).

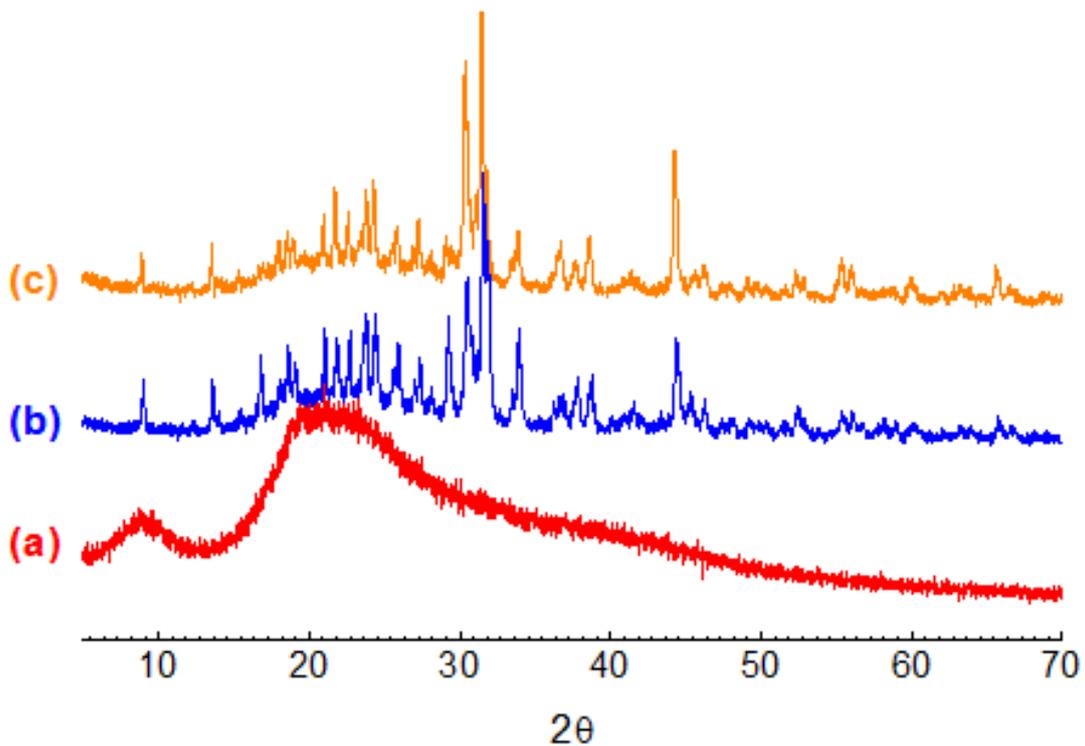


**Figura 4.10** – Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN CP-MAS de BM (a), BR(15min) (b) e BRDMAA(15min) (c).

A diminuição de intensidade da banda nos espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN CP-MAS de BR(15min) e BRDMAA(15min) em  $\delta 167\text{ ppm}$  referente ao carbono da carbonila de ácido de sistema conjugado, observadas no espectro da BM, confirmam a reação polimerização/reticulação de BM para ambos os casos,

com e sem DMAA. Os picos referentes à dupla ligação em  $\delta 127$  ppm e  $\delta 131$  ppm não podem ser observadas pois esta região é encoberta por bandas referentes a duplas ligações do álcool benzílico que não foi completamente removido pelo processo de lavagem<sup>[70]</sup>.

Como representado nos difratogramas de raios-X na **Figura 4.11**, após a reticulação, observou-se o aparecimento de picos definidos em um halo, isto mostra que houve a formação de regiões cristalinas ainda dispersas em uma matriz amorfa, indicando que a reticulação induziu a organização, em partes, do material para ambas a amostra. Considerando as posições e intensidades dos picos do DRX de BR(15min) e BRDMAA(15min), pode-se verificar que a adição de DMAA não influenciou na cristalinidade do material reticulado.



**Figura 4.11** - Difratograma de raio-X de BM (a), BR(15min) (b) e BRDMAA(15min) (c).

O objetivo de empregar o método de emulsão água/óleo para produção das partículas de BSA quimicamente reticulada foi desenvolver partículas esféricas, pois as esferas apresentam distribuição de massa uniforme, o que evita intumescimento anisotrópico (associado a outras morfologias) e afastamento do perfil de liberação ideal<sup>[8], [74]</sup>.

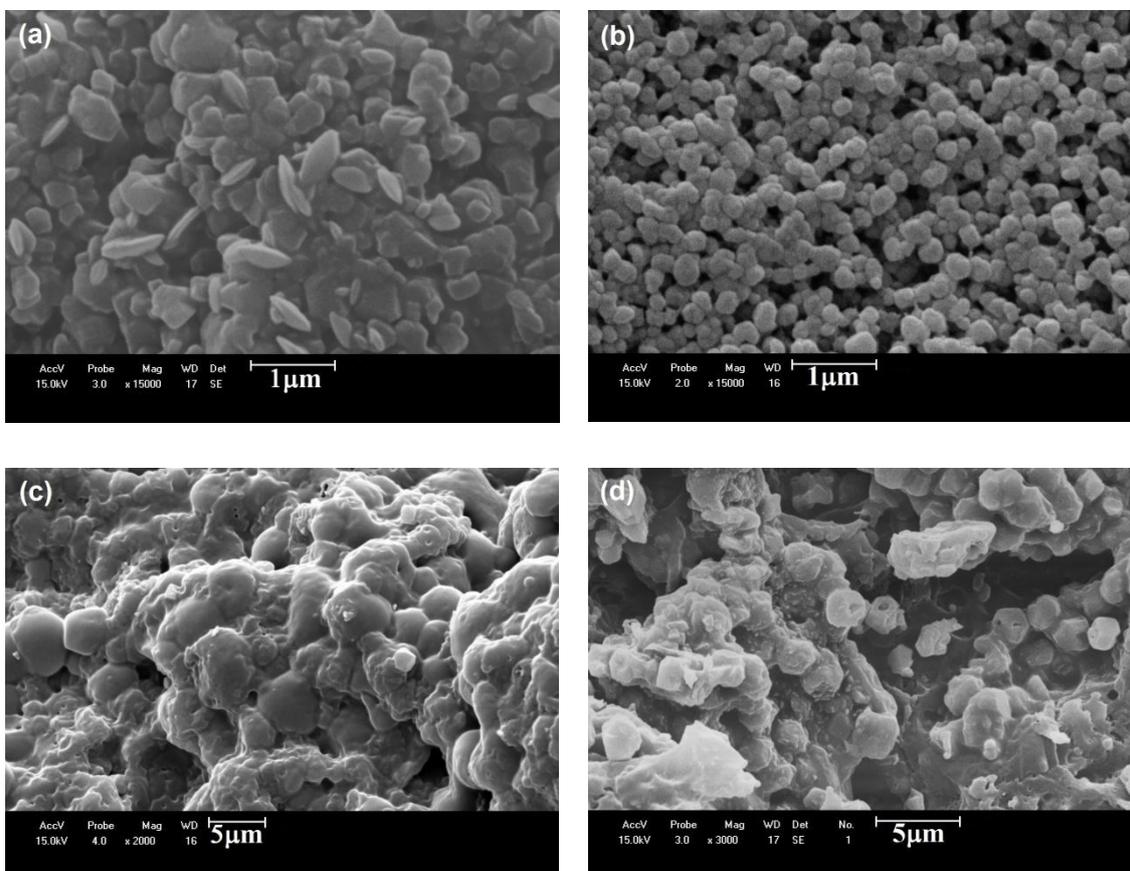
O PVA parcialmente hidrolisado foi selecionado como tensoativo, pois é o mais utilizado por propiciar a formação de microesferas menores<sup>[75]</sup>. A adição de surfactante reduz a tensão superficial, o que faz diminuir o tamanho das partículas e evita tanto a coalescência quanto a aglomeração das gotículas, estabilizando a emulsão<sup>[75]</sup>.

Neste método, a velocidade, tempo de agitação e a quantidade de tensoativo afetam a morfologia e tamanho das partículas obtidas, pois isto depende do tamanho das gotículas e estabilidade da emulsão.

Comparando-se com outros trabalhos, a velocidade de agitação utilizada no presente trabalho foi relativamente baixa (750 rpm). MacAdam *et al.* (1997) sintetizaram micropartículas de BSA utilizando agitação de 6100 rpm<sup>[33]</sup>. Larionova *et al.* (1999) sintetizaram partículas reticuladas de amido/BSA com agitação de 1500 rpm<sup>[76]</sup> e Iema *et al.* (2004, 2006, 2009) prepararam microesferas de albumina com agitação de 1000 rpm<sup>[6], [8], [26]</sup>. No presente trabalho, a velocidade de agitação foi fixada a uma velocidade relativamente baixa para manter a integridade estrutural da proteína e ainda promover a emulsificação.

A morfologia da superfície dos materiais reticulados, com 15, 30, 60 e 120 minutos de agitação pode ser observada nas micrografias de MEV

apresentadas na **Figura 4.12**, **Figura 4.13**, **Figura 4.14** e **Figura 4.15**, respectivamente.



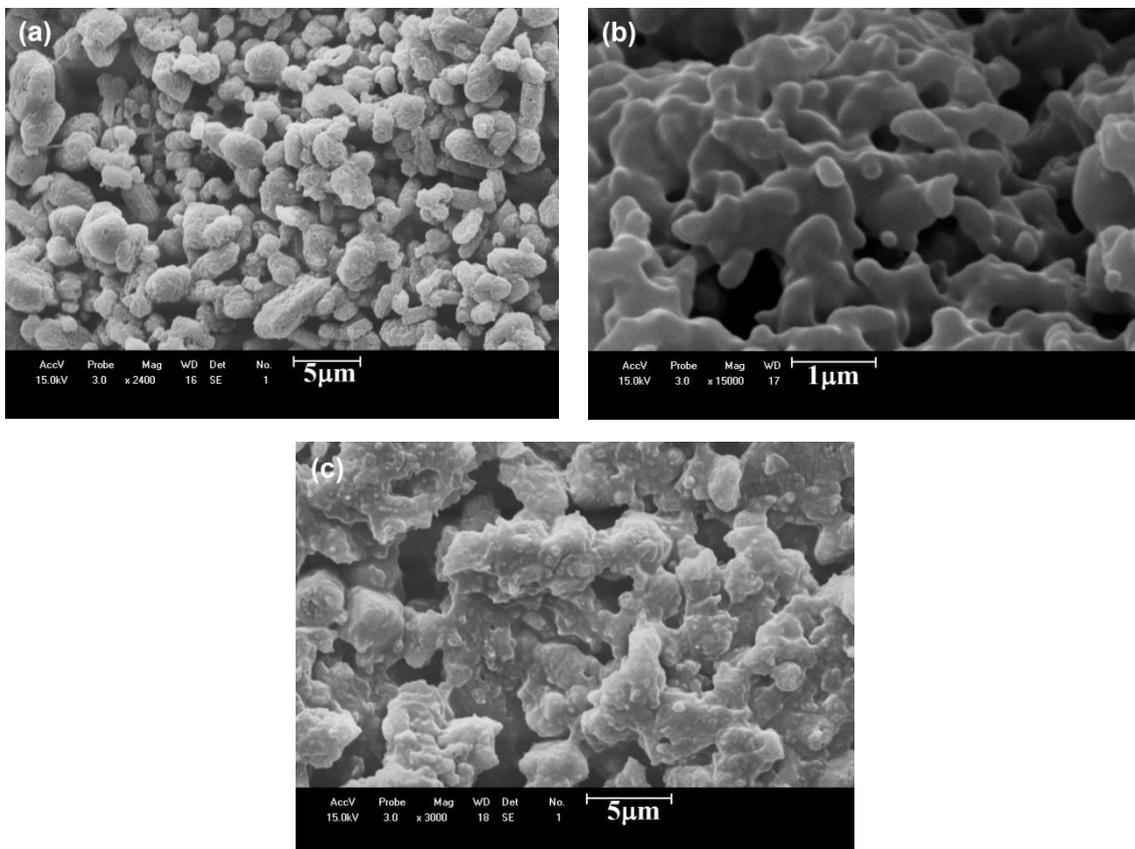
**Figura 4.12** - Micrografias de MEV: **(a)** BR(15min); **(b)** BRDMAA(15min); **(c)** BRDMAA(15min)1%P; e **(d)** BRDMAA(15min)2%P.

As micropartículas formadas por agitação de 15 minutos com DMAA sem PVA (**Figura 4.12(b)**) são predominantemente esféricas, homogêneas e regulares, já com acréscimo de PVA de 1% ou 2% (**Figuras 4.12(c)** e **(d)**, respectivamente), nota-se, que para este tempo de agitação, a forma das partículas é prejudicada com a presença de micropartículas entre as placas, provavelmente de PVA, em ambos os casos.

As micropartículas formadas com 15 minutos de agitação sem DMAA (**Figura 4.12(a)**) apresentaram formato de discos, o que indica a contribuição

de DMAA como monômero suporte para a rede polimérica aumentando a uniformidade e esfericidade das partículas.

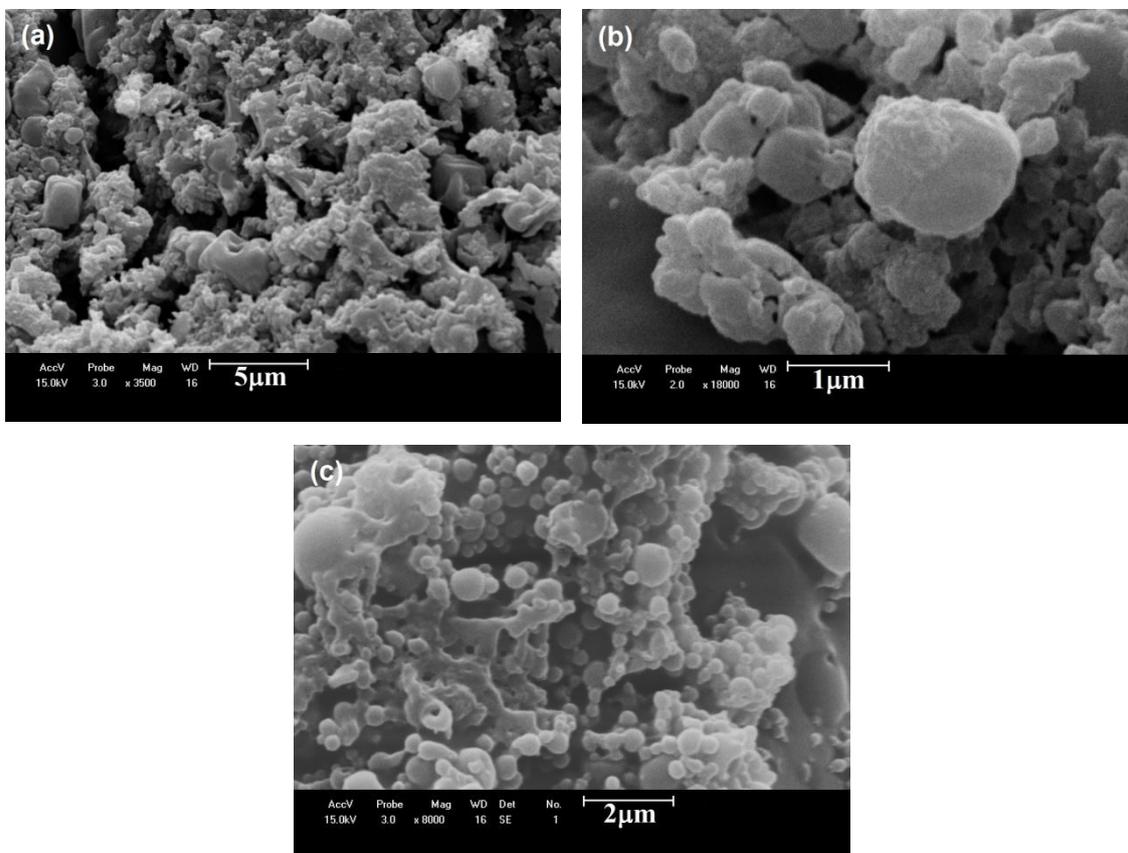
Para o tempo de 30 minutos de agitação, sem PVA (**Figura 4.13(a)**), as micropartículas são rugosas e não homogêneas, já com acréscimo de 1% e 2% de PVA (**Figuras 4.13(b)** e **(c)**, respectivamente), há formação discreta de micropartículas, porém estas aparecem entre as placas, como no caso observado para 15 minutos de agitação.



**Figura 4.13** - Micrografias de MEV: **(a)** BRDMAA(30min); **(b)** BRDMAA(30min)1%P; e **(c)** BRDMAA(30min)2%P.

Com 60 minutos de agitação, sem PVA (**Figura 4.14(a)**), não são formadas micropartículas. Com acréscimo de PVA, observa-se a formação de

micropartículas, sendo que para 2% de PVA, houve uma maior homogeneidade (Figuras 4.14 (b) e (c)).

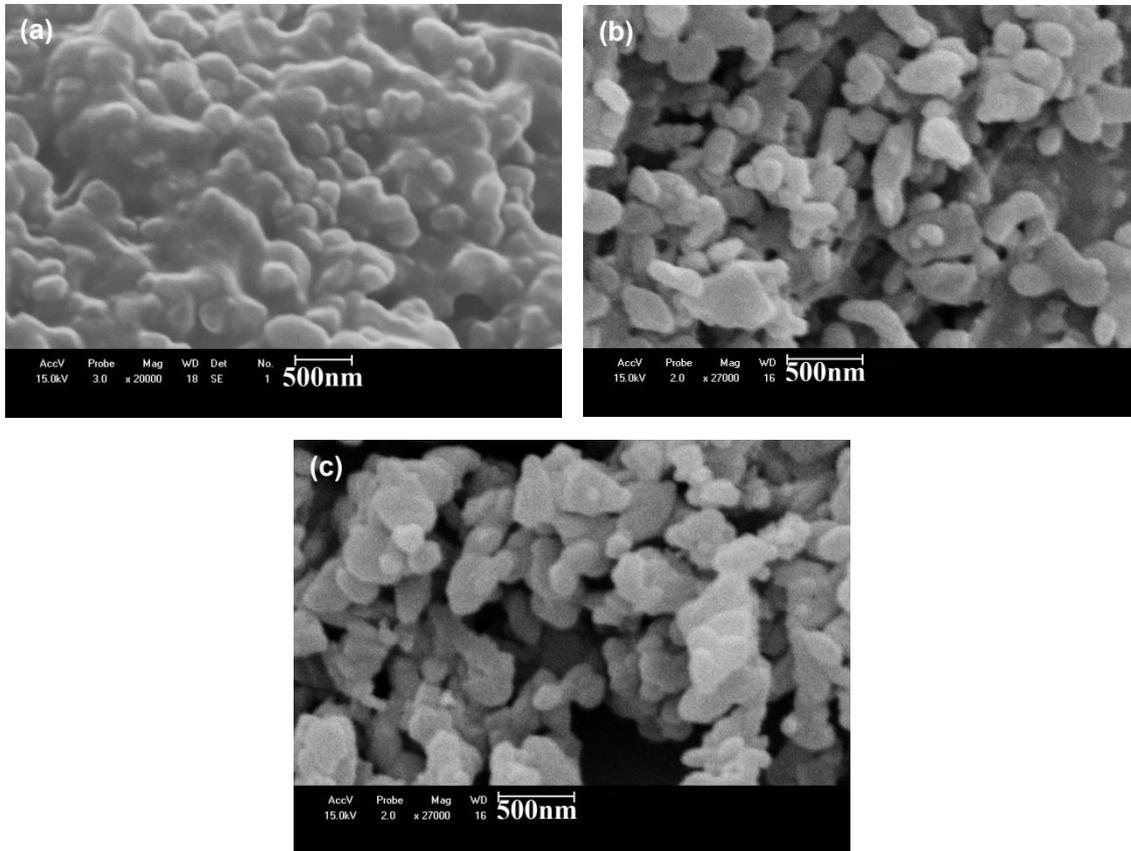


**Figura 4.14** - Micrografias de MEV: **(a)** BRDMAA(60min); **(b)** BRDMAA(60min)1%P; **(c)** BRDMAA(60min)2%P.

Para 120 minutos de agitação, sem PVA (**Figura 4.15(a)**), não há formação de micropartículas, mas sim de uma superfície rugosa. Com 1 e 2% de PVA (**Figuras 4.15(b)** e **(c)**), nestas condições de agitação, são formadas micropartículas pouco homogêneas.

As partículas formadas na ausência de PVA são mais homogêneas quando comparadas com as formadas na presença de PVA. Um fator importante é que as proteínas apresentam propriedade emulsificante,

adsorvendo na interface óleo-água e formando uma barreira nas gotículas, o que impede a coalescência e melhora a estabilidade de emulsões [77].



**Figura 4.15** - Micrografias de MEV: **(a)** BRDMAA(120min); **(b)** BRDMAA(120min)1%P; e **(c)** BRDMAA(120min)2%P.

Durante a adsorção na interface óleo/água em uma emulsão as proteínas mudam sua conformação de modo a maximizar o número de interações favoráveis e minimizar o número de interações desfavoráveis [78], [79].

A extensão e velocidade do rearranjo das proteínas em interfaces de emulsões é influenciado por vários fatores, como a flexibilidade da cadeia, a distribuição de domínios hidrofóbicos/hidrofílicos dentro da sequência da proteína e também da hidrofobicidade da fase oleosa. Sendo que quanto maior

a hidrofobicidade da fase oleosa, maiores são as mudanças conformacionais (maior desdobramento) da proteína<sup>[79]</sup>.

Em geral, as proteínas perdem muito de sua estrutura terciária na adsorção na interface óleo/água e tem quantidades consideráveis de estrutura secundária não-nativa<sup>[78], [80]</sup>.

Até 30 minutos de agitação, a propriedade emulsificante da albumina provavelmente é preservada, então, ao se adicionar PVA, há um excesso de emulsificante. Nessas condições com a adição de PVA pode haver a adsorção competitiva na interface entre as moléculas de proteína e do surfactante. Essa adsorção competitiva na área interfacial pode desestabilizar a emulsão<sup>[81]</sup>.

Estudos sobre adsorção competitiva e interações entre sistemas de mistura entre proteínas e surfactantes nas interfaces são relatados na literatura<sup>[81]- [83]</sup>.

As proteínas e emulsificantes estabilizam emulsões por diferentes mecanismos. As proteínas formam uma camada adsorvida com interações laterais entre as moléculas de proteína que impede que as gotas da emulsão coalesçam. Já os emulsificantes podem reduzir a tensão interfacial para valores mais baixos e dependem de repulsão de cargas ou repulsão estérica entre os grupos polares. Embora cada um destes mecanismos isoladamente seja eficaz na estabilização de uma emulsão, quando proteínas e surfactantes estão presentes estes mecanismos são antagonistas, o que pode levar a uma ruptura/desestabilização da emulsão<sup>[81]</sup>.

Dependendo da concentração, os surfactantes penetram nos defeitos na película interfacial de proteína e enfraquecem as interações laterais entre as moléculas de proteína, ao passo que as moléculas de proteína inibem a

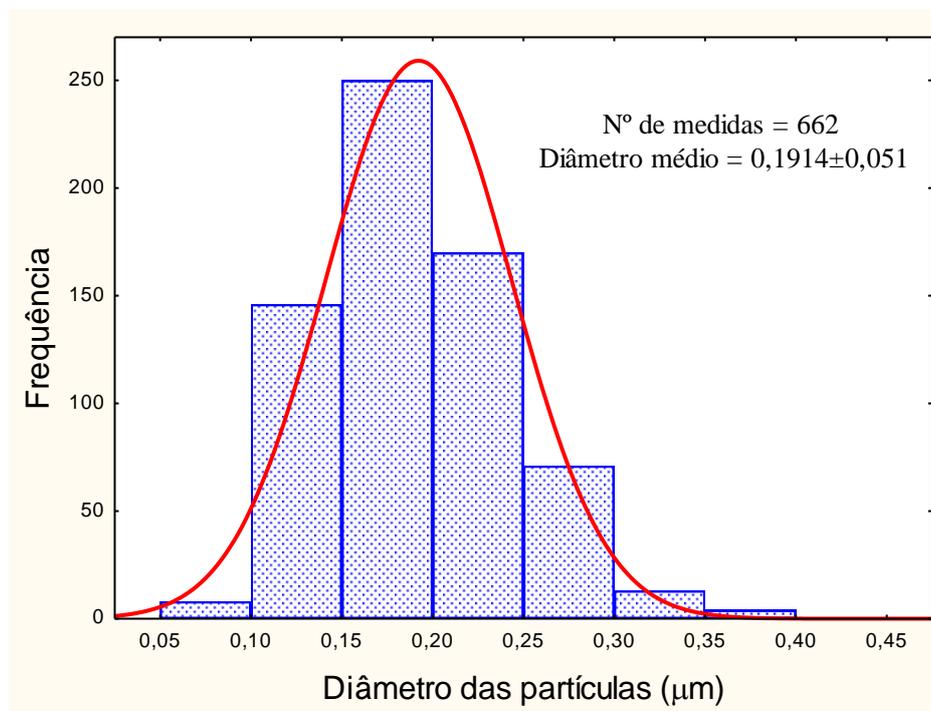
migração lateral de moléculas de surfactante. Assim, nenhuma das espécies é capaz de estabilizar a emulsão em conjunto de forma tão eficiente quanto uma das espécies isoladamente. Uma vez que a integridade do filme de proteína tenha sido enfraquecida, moléculas de surfactante continuam a absorver na superfície formando na interface domínios ricos em surfactante e ricos em proteínas. Quando uma quantidade suficiente de surfactante é adsorvida (concentração crítica) de tal modo que a pressão de superfície no domínio rico em surfactante é maior do que a pressão de superfície e resistência elástica do domínio rico em proteína, o filme de proteína é deformado, tem sua espessura aumentada e acaba sendo deslocado a partir da interface. Os detalhes desse mecanismo geral variam de acordo com a proteína<sup>[81]</sup>.

A eficiência da proteína em estabilizar emulsões depende de vários fatores, tais como: concentração, pH, força iônica, tratamento térmico, agitação, entre outros<sup>[77]</sup>. Logo, aumentando-se o tempo de agitação para 60 e 120 minutos, a propriedade emulsificante de BSA é afetada devido às mudanças em sua estrutura tridimensional, assim, somente PVA desempenha a função de emulsificante. Por isso para estes tempos de agitação o acréscimo de PVA melhora significativamente a esfericidade e homogeneidade das partículas quando comparado as obtidas sem PVA.

Comparando-se todas as morfologias em termos de tamanho, homogeneidade da amostra e esfericidade das micropartículas, conclui-se que a melhor condição testada para a formação das micropartículas é a reticulação com DMAA, sem PVA com tempo de agitação de 15 minutos. Somado às questões morfológicas, aumentando-se o tempo de agitação, é possível que ocorram maiores mudanças na estrutura tridimensional de BSA devido a

rompimentos das interações que mantém esta estrutura, afetando a capacidade de ligação e transporte de fármacos. Por isto também as micropartículas obtidas com 15 minutos de agitação são, possivelmente, mais adequadas à aplicação desejada no presente trabalho.

O tamanho médio das partículas BRDMAA(15min), calculado utilizando-se o analisador de imagens *Image-Pro Plus*, foi de  $0,191 \pm 0,0510 \mu\text{m}$  e o histograma com a distribuição, obtido pelo programa *Statistica*, está apresentado na **Figura 4.16**.

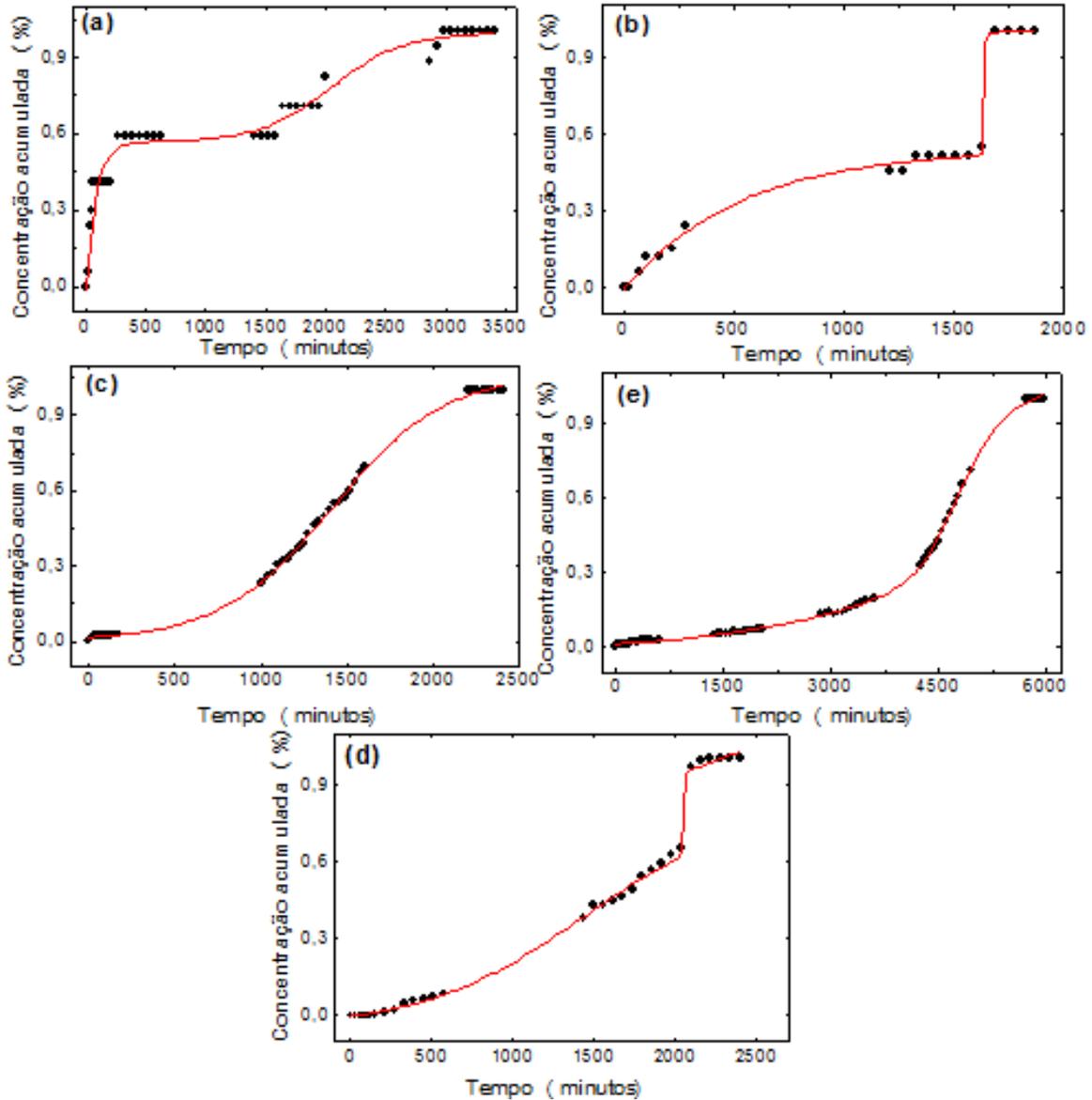


**Figura 4.16** - Histograma com a distribuição de tamanho das partículas BRDMAA(15min).

O tamanho regular e uma estreita distribuição de tamanho são interessantes, pois possibilitam liberação do fármaco de forma mais previsível e estável<sup>[75]</sup>.

### 4.3 ESTUDO DO PERFIL E MECANISMO DE LIBERAÇÃO IN VITRO DE VITAMINA B<sub>12</sub> PELAS MICROPARTÍCULAS DE BSA

Na **Figura 4.17** estão representados os perfis de liberação de vitamina B<sub>12</sub> em diferentes valores pH.



**Figura 4.17** - Perfis de liberação de vitamina B<sub>12</sub> pela amostra

BRDMAA(15min) em **(a)** pH 2.0; **(b)** pH 4.0; **(c)** pH 6.0; **(d)** pH 8.0; **(e)** pH 10.0.

Os perfis de liberação em pH 2.0 (**Figura 4.17 (a)**) e pH 4.0 (**Figura 4.17 (b)**) apresentam inicialmente liberação mais rápida, seguida de uma fase *lag* e outra fase de liberação rápida. Os perfis de liberação em tampões de pH 6.0 (**Figura 4.17 (c)**), de pH 8,0 (**Figura 4.17 (d)**) e de pH 10 (**Figura 4.17 (e)**) diferem do perfil de liberação em meio ácido e indicam uma fase *lag*, onde menos de 30% do total da concentração acumulada é liberada, seguida de uma liberação mais rápida (região que corresponde a maior inclinação da curva) até atingir o equilíbrio. As diferenças nos perfis de liberação são atribuídas às mudanças estruturais e de carga que os diferentes pH do meio geram nos segmentos estruturais da rede polimérica.

A partir das absorvâncias dos sobrenadantes de onde foram precipitadas as nanopartículas já carregadas com vitamina B<sub>12</sub>, calculou-se que a média do fármaco encapsulado, ou a eficiência de encapsulação, foi de 78,4 ± 1,5%, correspondendo a uma porcentagem de 9,1 ± 0,9% de fármaco no sistema.

Os tempos para atingir o equilíbrio entre vitamina B<sub>12</sub> adsorvida e liberada, os coeficientes difusionais, os valores da constante de proporcionalidade *k*, os coeficientes de correlação das retas, bem como as porcentagens de fármaco liberada para os diferentes pH, estão apresentados na **Tabela 4.4**.

Em pH extremo (2 e 10) (**Figuras 4.17(a)** e **(d)**) foram observados os maiores  $t_{\infty}$ . Já para o pH mais próximo ao ponto isoelétrico da proteína (pH 4,0) (**Figura 4.17(b)**) o tempo para atingir o equilíbrio foi o menor, o que pode ser explicado pela menor carga líquida da proteína próximo a esse pH, resultando em menor interação eletrostática entre grupos da proteína e o fármaco.

**Tabela 4.4** - Tempos para liberação de vitamina B<sub>12</sub> atingir o equilíbrio ( $t_{\infty}$ ), coeficientes difusionais ( $n$ ), constantes de proporcionalidade ( $k$ ), coeficientes de correção das retas ( $r^2$ ) e porcentagens de fármaco liberada para os diferentes meios.

	pH				
	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
$t_{\infty}/\text{min}$	2988	1688	2198	2214	5720
$n$	0,44	0,62	1,00	1,75	0,78
$k$	$3,46 \cdot 10^{-2}$	$5,48 \cdot 10^{-3}$	$2,94 \cdot 10^{-4}$	$1,15 \cdot 10^{-6}$	$3,27 \cdot 10^{-4}$
$r^2$	0,70	0,97	0,94	0,97	0,85
% liberada	2,70	6,70	47,70	43,10	58,53

A porcentagem de fármaco liberada foi menor nos pHs 2,0 e 4,0 o que é interessante pois ao se aplicar essa partícula *in vivo*, provavelmente a porcentagem de vitamina B<sub>12</sub> liberada no estômago seria muito pequena, especialmente devido ao curto espaço de tempo de transito neste órgão que é entre 2 e 3,5 horas. Nos testes de liberação *in vitro*, até cerca de 3,5 horas (210 minutos) a porcentagem de fármaco liberada foi apenas de 1,1% para o pH 2.0 e 3,2% para o pH 4.0.

O modelo aplicado para verificar a mecanismo de liberação do fármaco a partir da matriz teve um bom ajuste para a maioria dos pH testados. Os valores de coeficiente difusional obtido em pH 2.0 ( $n = 0,44$ ), pH 4.0 ( $n = 0,62$ ) e pH 10.0 ( $n = 0,78$ ) sugerem que o mecanismo de transporte do fármaco à partir da matriz para a solução, nestes pHs é governado por transporte anômalo (ambos os fenômenos, difusão e relaxamento das cadeias, contribuem para a liberação do fármaco), mas com maior contribuição da difusão para o pH 2.0 e do relaxamento das cadeias para pH 4.0 e pH 10.0. Em

pH 6.0 (n = 1,00) e pH 8.0 (n = 1,75), o mecanismo é de super caso II de transporte, ocorrendo uma contribuição simultânea dos processos de difusão, relaxação/intumescimento e erosão da matriz polimérica.

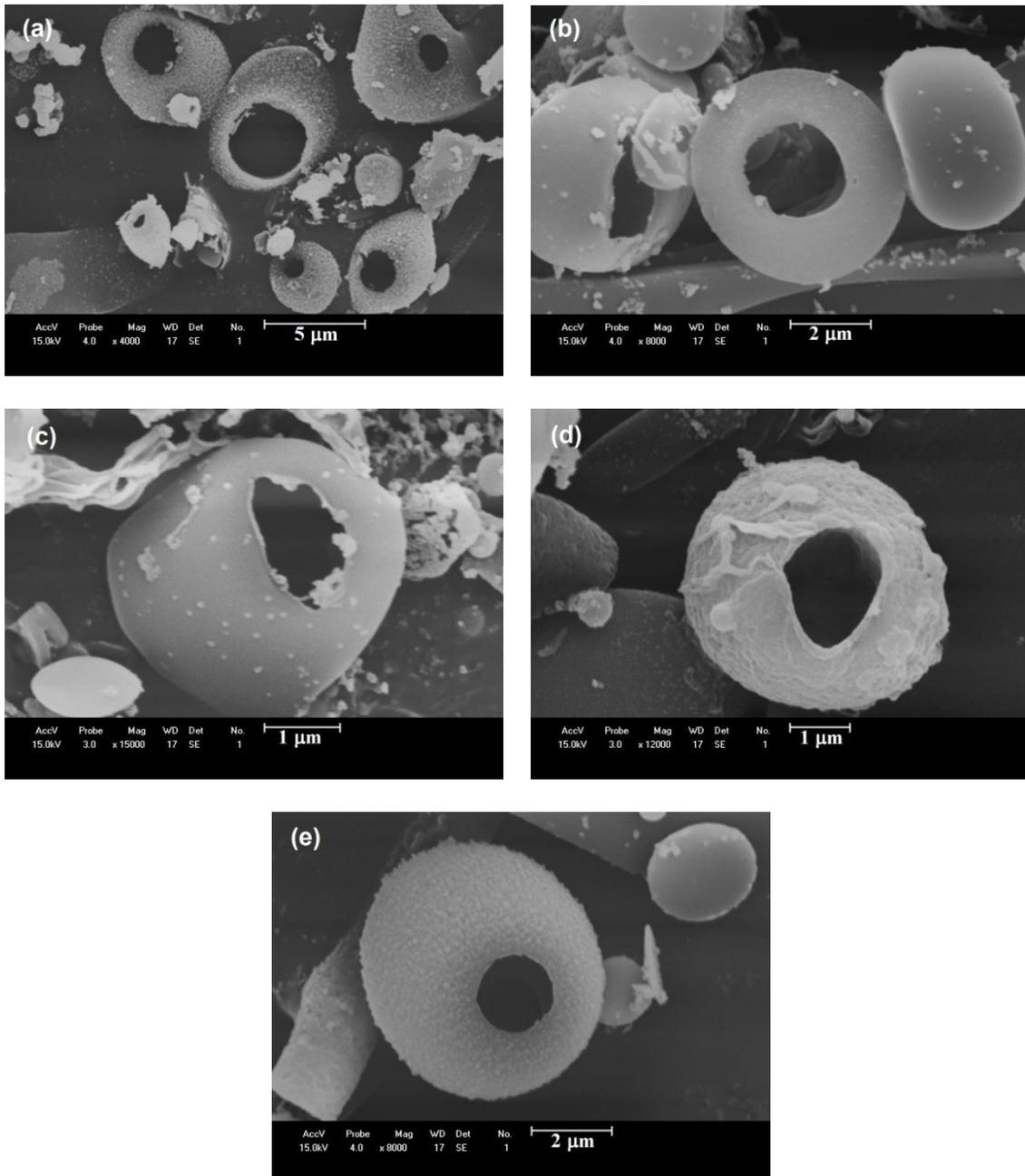
Este resultado está de acordo com a literatura, já que sabe-se que em geral a liberação do fármaco a partir de matrizes hidrofílicas é baseado na transição do polímero do estado vítreo para o estado maleável pela penetração da água no interior pela matriz<sup>[84], [85]</sup>. Os dois fatores que mais influenciam tais sistemas intumescíveis são a taxa de penetração da água na matriz (envolvendo hidratação, gelatinização ou intumescimento) e a taxa de erosão da matriz<sup>[84]</sup>.

Como pode ser observado na **Figura 4.18**, após a incubação de 24 horas da amostra BRDMAA(15min) verificou-se que em todos os pHs testados as partículas aumentaram de tamanho e estouraram provavelmente devido ao processo de secagem.

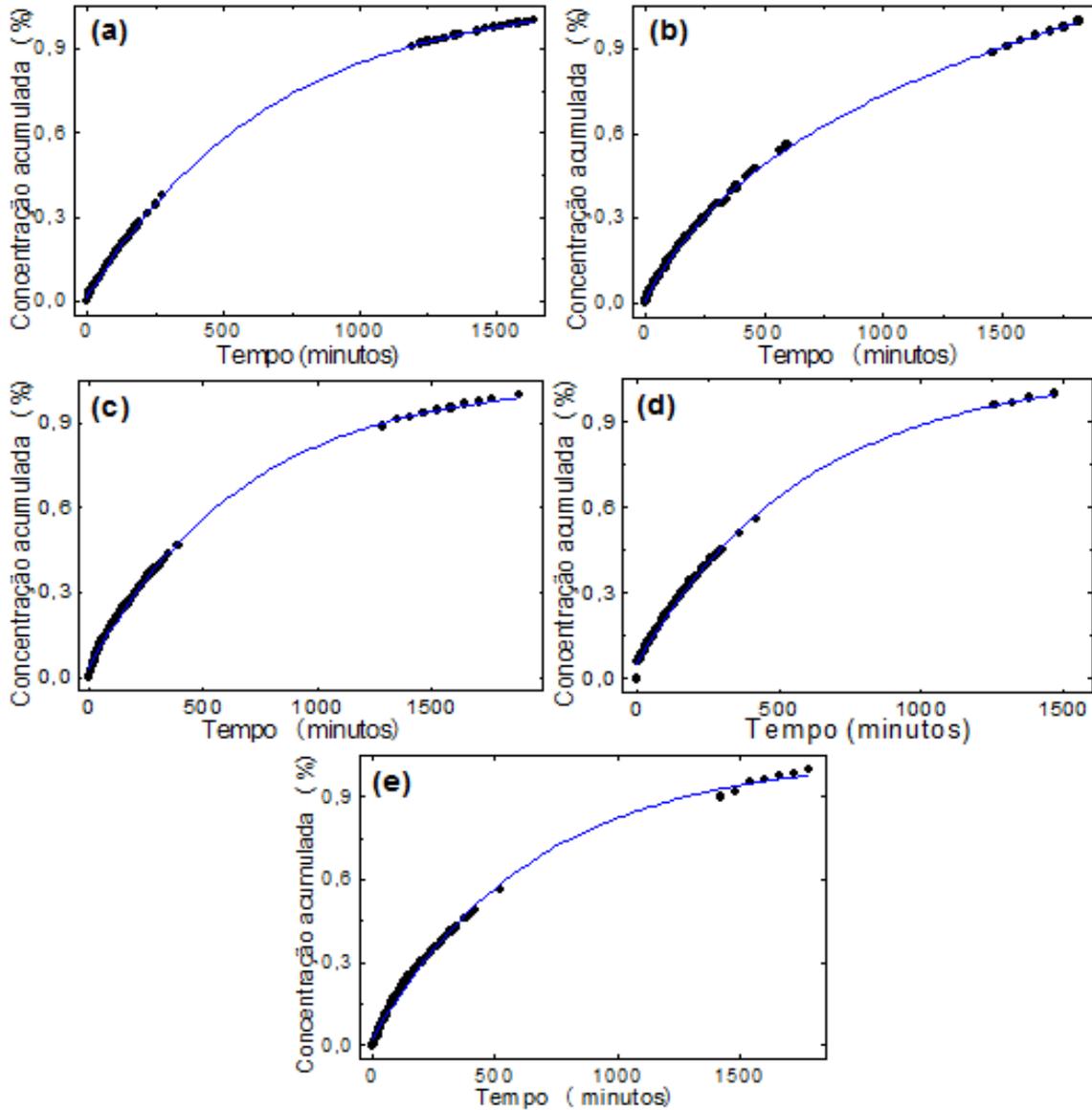
Esta análise morfológica não quantifica o efeito do intumescimento em diferentes valores de pH, mas reforça o resultado obtido de que em todos os meios testados o relaxamento/intumescimento das cadeias contribui para o mecanismo de liberação do fármaco. Este aumento de tamanho é causado pela entrada de água na matriz, solvatando grupos polares da cadeia polimérica altamente hidrofílica, reduzindo a interação polímero-polímero, aumentando a mobilidade das cadeias, permitindo uma expansão das mesmas.

Com relação à formação das fases *lag*, esta poderia ser atribuída à retenção do fármaco no interior da membrana de diálise devido à formação de aglomerados. Porém como mostram os perfis de liberação da vitamina B<sub>12</sub> a partir da membrana, representado na **Figura 4.19**, isto não foi verificado. Logo,

esse período de liberação mais lenta é característico do próprio material desenvolvido e varia com o meio.



**Figura 4.18** - Micrografias de MEV da amostra BRDMAA(15min) intumescida em (a) pH 2.0, (b) pH 4.0, (c) pH 6.0, (d) pH 8.0 e (e) pH 10.0.



**Figura 4.19** - Perfis de liberação de vitamina B<sub>12</sub> diretamente da membrana em (a) pH 2.0, (b) pH 4.0, (c) pH 6.0, (d) pH 8.0 e (e) pH 10.0.

Outra observação a que se pode chegar através dos perfis de liberação representados na **Figura 4.17** é que o aumento da porcentagem liberada de vitamina B<sub>12</sub> a partir de BRDMAA(15min) não é devido a degradação do fármaco em meios ácidos, já que não se observou este efeito na liberação do fármaco sem o encapsulamento.

#### 4.4 ENCAPSULAMENTO DE ANTÍGENO DA HEPATITE B

Para o encapsulamento do antígeno foi escolhido o método de incubação na tentativa de manter a estrutura do antígeno intacta e, conseqüentemente, manter a ação da vacina.

A quantificação de antígeno foi feita por determinação de proteína total, uma vez que o antígeno é formado por estrutura protéica. Estratégia semelhante para determinação de antígeno foi utilizada por Borges *et al.* (2007)<sup>[58]</sup> e Borges *et al.* (2008)<sup>[59]</sup>.

Foi calculado que a eficiência de encapsulamento de antígenos pelas micropartículas foi de 74,2%, valor relativamente elevado, considerando-se que o antígeno foi incorporado nas microesferas apenas pela incubação de 6 horas e não durante a síntese das mesmas.

A proteína remanescente no sobrenadante das micropartículas incubadas sem o antígeno foi inferior ao limite de detecção da técnica que é de aproximadamente 1,2 µg/mL, mostrando que a proteína quantificada após a incubação das micropartículas com o antígeno, não foi significativamente proveniente da BSA das microesferas, mas sim do antígeno.

## **CAPÍTULO 5**

***Conclusões, Considerações***

***Finais e Perspectivas Futuras***

A área de desenvolvimento de sistemas para liberação controlada de fármacos tem passado por grandes avanços nos últimos 50 anos e embora existam inúmeras pesquisas nesta área ainda há muitos desafios a serem superados para que o uso clínico desses dispositivos seja mais expressivo em números.

O presente trabalho procurou desenvolver um dispositivo polimérico com potencial para aplicação em liberação controlada de fármacos e antígenos baseado em micro/nanopartículas de BSA. A técnica selecionada para formação de micro/nanopartículas foi a reticulação em emulsão W/O, já bastante utilizada para preparação de micropartículas de materiais hidrofílicos. Para isto modificou-se BSA com AM, a fim de incluir duplas ligações na molécula, para posterior reação de polimerização/reticulação radicalar. Como foi comprovado por espectroscopia de FTIR,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN, a modificação de BSA com AM foi efetiva. A morfologia da superfície da proteína, observada por micrografias de MEV, também difere após a modificação passando de uma estrutura formada por placas para uma estrutura não definida e porosa.

Na reação de reticulação testou-se a influência de DMAA, da presença do surfactante PVA parcialmente hidrolisado (1% e 2%) do tempo de agitação (15, 30, 60 e 120 minutos). O DMAA foi selecionado para atuar como monômero reticulante, e melhorou a esfericidade das partículas. Até 30 minutos de agitação, sem PVA foram formadas micropartículas relativamente homogêneas, especialmente para 15 minutos de agitação, com a adição de 1% e 2% PVA, não se observou a formação de micropartículas. Para 60 e 120 minutos de agitação, sem PVA não foram formadas micropartículas, já com

acréscimo de PVA, a uniformidade das partículas é aumentada, especialmente para 60 minutos de agitação e 1% de PVA.

Verificou-se que a reticulação com e sem DMAA induziu a organização das amostras, indicando que a adição de DMAA não influenciou na cristalinidade do material reticulado.

Entre as condições testadas, a que se obteve maior uniformidade e esfericidade das partículas foi a amostra reticulada com 15 minutos de agitação, com DMAA, sem PVA (BRDMAA(15min)). O tamanho médio das partículas obtidas nesta condição foi  $0,19 \pm 0,05 \mu\text{m}$ . Esta condição foi selecionada para testes de liberação *in vitro* de vitamina B<sub>12</sub>.

A quantidade de vitamina B<sub>12</sub> encapsulada foi em média  $78,4 \pm 1,5\%$ , correspondendo a uma porcentagem de  $9,1\% \pm 0,9$  de fármaco no sistema.

Diferenças nos perfis de liberação em meio ácido e meio próximo a neutralidade e básico foram observadas, mostrando que as partículas formadas são sensíveis a variações de pH.

Os coeficientes difusionais obtidos para os tampões de pH 2, 4, 6, 8 e 10 foram, respectivamente, 0.44, 0.62, 1.00, 1.75, 0.78, mostrando a grande influencia do relaxamento/intumescimento da matriz polimérica na liberação da vitamina B<sub>12</sub>.

A porcentagem de fármaco liberado em meio ácido não passou de 7%, o que é um fator interessante para a liberação de vitamina B<sub>12</sub>, que é absorvida no intestino, onde o pH é básico.

Constatou-se que a eficiência de encapsulamento de antígenos HBsAg pelas micropartículas de albumina reticulada BDMAA(15min) foi

aproximadamente 74%. Este valor foi considerado satisfatório levando-se em conta o tempo de apenas 6 horas de incubação.

Os antígenos encapsulados nas micropartículas de albumina são uma alternativa de adjuvante para vacinação das mucosas, visando esta aplicação, mais testes deverão ser realizados para verificação da integridade estrutural do antígeno.

As micropartículas de BSA desenvolvidas neste trabalho constituem um material versátil, que pode ainda ser utilizado para encapsular outros fármacos, além da possibilidade de variação do co-monômero ser uma alternativa para se obter materiais com características diferentes.

A continuidade do trabalho desenvolvido, com o intuito de verificar a aplicabilidade do material *in vivo* deverá obrigatoriamente envolver ensaios biológicos adicionais.

## REFERÊNCIAS

1. JAHANSHAHI, M.; BABAEI, Z. Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. **African Journal of Biotechnology**, 7, 2008. 4926-4934.
2. MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 5, julho 2006. 561-573.
3. CURRY, S. et al. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. **Nature Structural Biology**, 5, setembro 1998. 827-835.
4. WOLF, F.A. DE; BRETT, G.M. Ligand-Binding Proteins: Their Potential for Application in Systems for Controlled Delivery and Uptake of Ligand. **Pharmacological Reviews**, 52, junho 2000. 207-236.
5. JITHAN, AV.; MADHAVI, K; MADHAVI, M.; PRABHAKAR, K. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. **International Journal Pharmaceutical investigation**, 1, abril 2011.
6. IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.G.; MUZZALUPO, R.; PUOCI, F.; TROMBINO, S.; PICCI, N. Spherical hydrophilic microparticles obtained by the radical copolymerization of functionalised bovine serum albumin. **Colloid and Polymer Science**, 283, 2004. 250–256.
7. SAHIN, S.; SELEK, H.; PONCHEL, G.; ERCAN M. T.; SARGON, M.; HINCAL, A.A.; KAS, S.H. Preparation, characterization and in vivo distribution of terbutaline sulfate loaded albumin microspheres. **Journal of Controlled Release**, 82, 2002. 345–358.
8. IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U. G.; PUOCI, F.; MUZZALUPO, R. TROMBINO, S.; CASSANO, R.; LETA, S.; PICCI, N. pH-Sensitive hydrogels based on bovine serum albumin for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 312, 2006. 151–157.
9. HAN, Y.; LI, S.; WANG, X.; CAO, X.; JIA, L.; LI, J. Preparation and characterization of calcium phosphate–albumin colloidal particles by high ultrasonic irradiation. **Colloid Polym Sci**, 284, novembro 2005. 203–207.
10. TORRADO, J.J.; ILLURN, L.; DAVIS, S.S. Particle size and size distribution of albumin microspheres produced by heat and chemical stabilization.

- Internatinal Journal of Pharmaceutics**, 51, 1989. 85-93.
11. MOHASEN, J.; BABAEI, Z. Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. **African Journal of Biotechnology**, Dezembro 2008. 4926-4934.
  12. RAMESH, D. V. Comparison of Oil-in-Oil, Water-in-Oil-in-Water and Melt Encapsulation Techniques for the Preparation of Controlled Release B12 Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Microparticles. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, 23, 2009. 21-33.
  13. REYNOLDS, E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. **The Lancet Neurology**, 5, 2006. 949-960.
  14. ANDRÉS, E.; AFFENBERG, S.; VINZIO, S.; KURTZ, J.E.; NOEL, E.; KALTENBACH, G.; MALOISEL, F.; SCHLIENGER, J.L.; BLICKLÉ, J.F. Food-cobalamin malabsorption in elderly patients: Clinical manifestations and treatment. **The American Journal of Medicine**, 118, 2005. 1154-1159.
  15. SARTI, F.; IQBAL, J.; MULLER, C.; SHAHNAZ, G.; RAHMAT, D.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Poly(acrylic acid)–cysteine for oral vitamin B12 delivery. **Analytical Biochemistry**, janeiro 2012. 13-19.
  16. MAGISTRIS, M. T. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 58, 2006. 52-67.
  17. LEVINE, M. M. Can needle-free administration of vaccines become the norm in global immunization?, 9, 2003. 99-103.
  18. O'HAGAN, D. T. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines.. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 34, 1998. 305–320.
  19. PARK, K.; MRSNY, R. J. Controlled drug delivery: present and future. In: PARK, K. E. A. **Controlled drug delivery**. Washington: American Chemical Society, 2000. p. 2-12.
  20. TIMKO, B.P.; WHITEHEAD, K.; GAO, W.; KOHANE, D.S.; FAROKHZAD, O.; ANDERSON, D.; LANGER, R. Advances in Drug Delivery. **Annual Review of Materials Research**, 41, 2011. 1-20.
  21. KUMAR, A. N. V. R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 3, 2000. 234-258.
  22. KUMAR, R.; KUMAR, S. M.; MAHADEVAN, N. Multiple Emulsions: A Review. **International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical**

- Research.**, 2, 2012. 9-19.
23. CHOONARA, Y. E.; PILLAY,V.; NDESENDO, V. M. K.; TOIT, L. C.; KUMAR, P.; KHAN, R. A.; MURPHY, C. S.; JARVIS, D-L. Polymeric emulsion and crosslink-mediated synthesis of super-stable nanoparticles as sustained-release anti-tuberculosis drug carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 87, 2011. 243-254.
  24. MUNDARGI, R. C.; BABU, V.R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T.M. Nano/microtechnologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, 125, 2008. 193-209.
  25. JITHAN, A.V.; MADHAVI, K.; MADHAVI, M.; PRABHAKAR,K. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, 1, 2012. 119-125.
  26. IEMA, F.; SPIZZIRRI, U.G.; PUOCI, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O.I.; PICCI, N. Synthesis and release profile analysis of thermo-sensitive albumin hydrogels. **Colloid and Polymer Science**, 287, 2009. 779–787.
  27. SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, 70, 2001. 1-20.
  28. MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. **International Journal of Pharmaceutics**, 187, 1999. 143–152.
  29. HOFF, B.M.E.V.D. Kinetics of Emulsion Polymerization. In: PLATZER, N. **Polymerization and Polycondensation Processes**. Washington, DC: Advances in Chemistry; American Chemical Society, v. 34, 1962. p. 6-31.
  30. REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2, 2006. 8-21.
  31. ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**. 6 ed. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997. 500-516 p.
  32. SHI, A.; LI, D.; WANG, L.; LI, B.; ADHIKARI, B. Preparation of starch-based nanoparticles through high-pressure homogenization and miniemulsion cross-linking: Influence of various process parameters on particle size and

- stability. **Carbohydrate Polymers**, 83, 2011. 1604-1610.
33. MACADAM, A.B.; SHAFT, Z.B.; JAMES, S.L.; MARRIOTT, C.; MARTIN, G.P. Preparation of hydrophobic and hydrophilic albumin microspheres and determination of surface carboxylic acid and amino residues. **International Journal of Pharmaceutics**, 151, 1997. 47-55.
  34. REIS, A.V.; GUILHERME, M.R.; PAULINO, A. T.; MUNIZ, E.C.; MATTOSO, L.H.C.; TAMBOURGI, E.B. Synthesis of Hollow-Structured Nano- and Microspheres from Pectin in a Nanodroplet Emulsion. **Langmuir**, 25, 2009. 2473-2478.
  35. MALAFAYA, P. B.; STAPPERS, F.; REIS, R. L. Starch based microspheres produced by emulsion crosslinking with a potential media dependent responsive behavior to be used as drug delivery carriers, 17, 2006. 371-377.
  36. GUILHERME, M. R.; REIS, A. V.; ALVES, B. R. V.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; TAMBOURGI, E. B.. Smart hollow microspheres of chondroitin sulfate conjugates and magnetitenanoparticles for magnetic vector.. **Journal of Colloid and Interface Science**, 352, 2010. 107-113.
  37. GELAMO, E.L.; SILVA, C.H.T.P.; IMASATO, H.; TABAK, M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modeling. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1594, 2002. 84-99.
  38. KAZEMI, S.Y.; ABEDIRAD, S. M. Effect of Human and Bovine SerumAlbumin on kinetic Chemiluminescence ofMn (III)-Tetrakis (4-Sulfonatophenyl) Porphyrin-Luminol-Hydrogen Peroxide System. **The ScientificWorld Journal**, 2012.
  39. CARTER, D.C.; HE, X-M.; MUNSON, S.H. MUNSON, TWIGG, P.D.; GERNERT, K.M.; BROOM, B.; MILLER, T.Y. Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin. **SCIENCE**, 244, 1989. 1195-1198.
  40. ZUNSZAIN, P.A.; GHUMAN, J.; KOMATSU, T. TSUCHIDA, E.; CURRY, S. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. **BMC Structural Biology**, 2003.
  41. ELSADEK, B.; KRATZ, F. Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release*, 157, 2012. 4-28.
  42. CHOI, J-K.; HO, J.; CURRY,S.; QIN, D.; BITTMAN, R.; HAMILTON, J.A. Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin.

- Journal of Lipid Research**, 43, 2002. 1000-1010.
43. KOURY, M.J.; PONKA, P. New insights into erythropoiesis: The roles of folate, vitamina B12, and iron. **Annual Review of Nutrition**, 24, 2004. 105-131.
  44. ÍGUEZ, G.P. Ácido fólico e vitamina B12 em La nutrición humana. **Revista Cubana de Alimentación y Nutrición**, 12, 1998. 107-119.
  45. LINDENBAUM, J. et al. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 60, 1994. 2-11.
  46. BERG, H.V.D.; BRANDSEN, L.; SINKELDAM, B.J. Vitamin B-12 content and bioavailability of spirulina and nori in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2, 1991. 314-318.
  47. SOHIER, J.; DIJKHUIZEN-RADERSMA, R.V.; GROOT, K. DE; BEZEMER J.M. Release of small water-soluble drugs from multiblock copolymer microspheres: a feasibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 5, 2003. 221-228.
  48. MCGHEE, J.R.; MESTECKY, J.; DERTZBAUGH, M.T.; ELDRIDGE, J.H.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, 10, 1992. 75-88.
  49. HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine Supplement**, 11, 2005. 45-53.
  50. NEUTRA, M. R.; FREY, A.; KRAEHENBUHL, J-P. Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. **Cell**, 86, 1996. 345-348.
  51. NAGLER-ANDERSON, C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. **Nature Reviews Immunology**, 1, 2001. 59- 67.
  52. LEMOINE, D.; PREÁT, V. Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins. **Journal of Controlled Release**, 54, 1998. 15-27.
  53. KRAMER, A.; HERTH, D.; KEYSERKLINGK, H-J. V.; LUDWIG, W-D.; HAMPL, H.; SOMMER, D.; HAHN, E.G.; RIECKEN, E-O. Revaccination and Immunogenetic Typing, 66, 1988. 670-674.

54. HEPATITIS B. **WHO**, julho, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>>. Acesso em: 19 mar. 2013.
55. GOLDSTEIN, S.T.; ZHOU, F.; HADLER, S.C.; BELL, B.P.; MARGOLIS, H.S. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. **International Journal of Epidemiology**, 34, 2005. 1329-1339.
56. SHHEPARD, C.W.; SIMARD, E.P.; FINELLI, L.; FIORE, A.E.; BELL, B.P. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. **Epidemiologic Reviews**, 28, 2006. 112-125.
57. DEPARTEMENTE OF IMMUNIZATION, VACCINES AND BIOLOGICALS. Documenting the Impact of Hepatitis B Immunization: Best Practices for Conducting a Serosurvey. , Geneva, Switzerland, novembro 2011. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO\\_IVB\\_11.08\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO_IVB_11.08_eng.pdf)>. Acesso em: 19 mar. 2013.
58. BORGES, O.; TAVERES, J.; SOUZA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** , 32, 2007. 278–290.
59. BORGES, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen.. **International Immunopharmacology** , 8, 2008. 1773–1780.
60. WEERATNA, R.D.; BRAZOLOT, M. C. L; MCCLUSKIE, M.J., DAVIS, H.L. CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. 2001;32(1). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 32, 2001. 65–71.
61. RITGER, P. L.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, 5, 1987. 23-36.
62. RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description os solute release II. Fickian anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, 5, 1987. 37-42.

63. KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of soluterelease from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, 15, 1983. 25-35.
64. SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, 48, 2001. 139-157.
65. LANGER, R. Biomaterials and biomedical engineering. **Chemical Engineering Science**, 50, 1995. 4109-4121.
66. PRAJAPATI, S.K.; RICHHAIYA, R.; SINGH, V.K.; SINGH, A.K.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, R.K. FORMULATION AND EVALUATION OF ONCE DAILY SUSTAINED RELEASE MATRIX TABLET OF ACECLOFENAC USING NATURAL GUMS. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, 2, 2012. 16-24.
67. SINHA, D.; ROHERA, B.D. Comparative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and HPC and study of drug release from their matrices. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 16, 2002. 193-199.
68. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 19. 248-254.
69. LADAVIÈRE, C; DELAIR, T; DOMARD, A.; PICHOT, C.; MANDRAND, B. Covalent Immobilization of Bovine Serum Albumin onto (Maleic Anhydride–alt-Methyl Vinyl Ether) Copolymers. **Journal of Applied Polymer Science**, 72, 1999. 1565–1572.
70. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7 ed. Somerset : Wiley, 2005.
71. GONZALEZ-VELASCO, J.R.; GUTIERREZ-ORTIZ, M.A.; GUTIERREZ-ORTIZ, J.I.; GONZALEZ-MARCOS, M.P.; GONZALEZ-MARCOS, J.A.T. Techno-economic Optimization of Isomerization of Maleic Acid to Fumaric Acid Using Ammonium Bromide as a Soluble Catalyst. **Chemical Engineering and processing: Process Intensification**, 30, 1991. 15-21.
72. ENGEL, C.A.R.; STRAATHOF, A.J.J.; ZIJLMANS, T.W.; GULIK, W.M.V.; WIELEN, L.A.M.V.D. Fumaric acid production by fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 78, 2008. 379-389.

73. KONG, J.; YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinic**, 39, 2007. 549-559.
74. IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.G.; PUOCI, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O.I.; PICCI, N. Synthesis and release profile analysis of thermo-sensitive albumin hydrogels. **Colloid and Polymer Science**, 287, 2009. 779-789.
75. LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, 2008. 26-39.
76. LARIONOVA, N.V.; PONCHEL, G.; DUCHÊNE, D.; LARIONOVA, N.I. Biodegradable cross-linked starch:protein microcapsules containing proteinase inhibitor for oral protein administration. **International Journal of Pharmaceutics**, 189, 1999. 171-178.
77. RANGSARID, J.; FUKADA, K. Factors affecting the stability of O/W emulsion in BSA solution: Stabilization by electrically neutral protein at high ionic strength. **Journal of Colloid and Interface Science**, 316, 2007. 779-786.
78. DAMODARAN, S. Food proteins: an overview. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 1-24.
79. MCCLEMENTS, D. J. Protein-stabilized emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 9, 2004. 305-313.
80. ZHAI, J.L.; DAY, L.; AGUILAR, M.-I.; WOOTES, T.J. Protein folding at emulsion oil/water interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 18, 2013. 257-271.
81. DAY, J. P. R.; PUDNEY, P.D.A.; BAIN, C.D. Ellipsometric study of the displacement of milk proteins from the oil/water interface by the non-ionic surfactant C10E8. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 12, 2010. 4590-4599.
82. DICKINSON, E. Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. **Food Hydrocolloids**, 25, 2011. 1966-1983.
83. KOTSMAR, C.; PRADINES, V.; ALAHVERDJIEVA, V.S., AKSENEKO, E.V., FAINERMAN, V.B.; KOVALCHUK, V.I., ET AL. Thermodynamics, adsorption kinetics and rheology of mixed protein-surfactant interfacial

- layers. **Advances in Colloid and Interface Science**, 150, 2009. 41-54.
84. JUANG, R- H.; STOREY, D. Correlation of characteristics of gel extrusion module (GEM) tablet formulation and drug dissolution rate. **Journal of Controlled Release**, 89, 2003. 375-385.
85. COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, A.; ASCENTIIS, A.; PEPPAS, N.A. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. **Journal of Controlled Release**, 39, 1996. 231-237.

