UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado
via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas

Richard Saldaña Gonzales

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado
via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas

Richard Saldaña Gonzales

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S162r Saldaña Gonzales, Richard
Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado
via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas / Richard Saldaña
Gonzales. -- São Paulo, 2015.
122p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Stephano, Marco Antônio

1. Vacina : Farmacologia 2. Materiais nanoestruturados I. T. II.
Stephano, Marco Antônio, orientador.

615.372 CDD

Richard Saldaña Gonzales

Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal
em nanopartículas de quitosana liofilizadas.

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano
(Orientador/presidente)

1° Examinador

2° Examinador

São Paulo, ____ de ____ de 2015.

Dedico este trabalho à minha família, por acreditar em mim. Sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antônio Stephano, pela orientação, pelo apoio, pela confiança e, principalmente, pelas conversas que me ajudaram a evoluir como pessoa e profissional.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade de fazer o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra, por disponibilizar os recursos do Laboratório de Centro de Nanotecnologias Aplicadas às Ciências da Saúde.

Ao Laboratório de Filmes Finos, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, no Brasil, por facilitar o SPM.

Ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos I, pelo apoio do uso do aparelho de Calorimetria Exploratória Diferencial.

Ao Dr. Virgílio Tattini Junior, pelo auxílio no aprendizado nos estudos de liofilização.

À mestranda Katherine Curo Melo, pelo amor e pelo apoio incondicional.

À Dra. Márcia Regina Spuri Ferreira e família, pela hospitalidade no Brasil.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

(John F. Kennedy)

GONZALES, R. S. Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas. 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

RESUMO

A nanotecnologia tornou possível estruturar nanopartículas (NPs), utilizando-se polímeros biodegradáveis e atóxicos, como a quitosana (QS) – capaz de carrear e disponibilizar antígenos para a mucosa, devido sua propriedade mucoadesiva. Uma vacina liofilizada, em comparação a uma formulação líquida, possui inúmeras vantagens, tais como melhora na estabilidade do produto e melhor resistência às variações de temperatura, aumentando sua vida de prateleira e possibilitando melhor logística do produto aos locais onde o acesso à rede refrigerada é difícil; ademais, um produto liofilizado tem sua mucoadesividade aumentada, possibilitando maior tempo de permanência na mucosa. O presente trabalho teve como objetivo observar a resposta imune, em camundongos, de uma vacina desenvolvida por um mecanismo de entrega intranasal do HBsAg (Antígeno de superfície da Hepatite B) encapsulado pelo método de incorporação em nanopartículas de quitosana (NPs) liofilizadas. A formação das NPs foi realizada pela interação eletroestática da quitosana e do TPP (tripolifosfato de sódio), utilizando método de geleificação iônica. Formulações de NPs com glicina 5% apresentaram boas características após reconstituição, umidade residual inferior a 1% e processo de liofilização de 13 horas. Foi avaliada a imunogenicidade da inoculação do HBsAg em formulações de NPs de quitosana líquida e liofilizada, verificando-se que a forma líquida produziu anticorpos IgG contra HBsAg.

Palavras-chave: nanopartículas, liofilização, HBsAg, intranasal

GONZALES, R. S. Immune response to hepatitis B surface antigen administered nasally in freeze-dried chitosan nanoparticles. 2015. Master dissertation-Pharmaceutical Science College, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

ABSTRACT

Nanotechnology has become possible to structure nanoparticles (NPs), using non-toxic and biodegradable polymers such as chitosan (CS), capable of carrying and deliver antigens to the mucosa, due to mucoadhesive property. A lyophilized vaccine compared to a liquid formulation, has several advantages, such as improved product stability as well as better resistance to temperature changes, increasing its shelf life allowing better logistics of the product to places where access to the chain cold is difficult and especially a lyophilized product increases muco-adhesiveness providing for longer staying in the mucosa. The work aims to observe the immune response in mice of vaccine developed by an intranasal delivery mechanism of HBsAg (hepatitis B surface antigen) encapsulated by incorporation method in chitosan nanoparticles (NPs) lyophilized. The formation of NPs was performed by electrostatic interaction between the chitosan and TPP (sodium tripolyphosphate) using the ionic gelation. Formulations showed good characteristics after reconstitution, residual humidity lower than 1% and the lyophilization process 15-hour. In this work, was evaluated the immunogenicity of inoculation of HBsAg in lyophilized and liquid formulations of chitosan nanoparticles, which liquid formulation produced anti-HBsAg antibodies.

Keywords: nanoparticles, lyophilization, HBsAg, intranasal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturado vírus da hepatite B.....	4
Figura 2.	Distribuição geográfica da prevalência da infecção por hepatite B em adultos em todo o mundo.....	5
Figura 3.	Fagocitoses de partículas na superfície epitelial de mucosa.....	7
Figura 4.	Expressão de resposta imunológica em mucosa de IgG após diferentes vias de vacinação com a subunidade B da toxina da cólera	9
Figura 5.	(a) Esquema de um corte sagital da cavidade nasal humana. (b) Tipos de células do epitélio nasal.....	10
Figura 6.	Estrutura molecular da celulose, da quitina e da quitosana	12
Figura 7.	Estrutura química da quitosana.....	13
Figura 8.	Desacetilação química da quitina.....	14
Figura 9.	Ilustração esquemática do comportamento da quitosana às variações de pH.....	15
Figura 10.	Análise visual das amostras com aparência de opalescência semelhante das NPs-Vazia, NPs-OVA e NPs-HBsAg	33
Figura 11.	Sínteses de nanogéis por reticulação iônica das cadeias de quitosana com o TPP.....	34
Figura 12.	Gráfico de distribuição do diâmetro hidrodinâmico por DLS das NPs-Vazia, NPs-OVA e NPs-HBsAg.....	35
Figura 13.	Gráfico de distribuição do diâmetro hidrodinâmico por NTA das NPs-Vazia, NPs-OVA e NPs-HBsAg	36
Figura 14.	Amostra fotográfica do vídeo gerado do rastreamento das nanopartículas por NTA. NPs-vazia, NPs-OVA e NPs-HBsAg	36
Figura 15.	Diâmetro hidrodinâmico médio por DLS das nanopartículas carregadas com HBsAg como uma função do pH	37
Figura 16.	Potencial Zeta das nanopartículas carregadas com HBsAg como uma função do pH	38
Figura 17.	Diâmetro hidrodinâmico médio por DLS como uma função da diluição de nanopartículas	39
Figura 18.	Curva da proteína padrão (Proteína Sérica Bovina–BSA/Sigma–Aldrich), para determinar a Eficácia de Encapsulação da ovoalbumina.....	42

Figura 19.	Imagens topográficas detalhadas de AFM das NPs-vazia.....	43
Figura 20.	Imagens topográficas detalhadas de AFM das NPs-OVA.....	44
Figura 21.	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas NPs-Vazia, NPs-OVA e NPs-HBsA	45
Figura 22.	Curva DSC obtida na célula DSC das NPs-OVA.....	46
Figura 23.	Curva DSC obtida na célula DSC das NPs-OVA suplementadas com várias concentrações de glicina.....	47
Figura 24.	Curva DSC obtida na célula DSC das NPs-OVA suplementadas com várias concentrações de glicina.....	48
Figura 25.	Curvas DSC obtidas das NPs-OVA com manitol	49
Figura 26.	Curvas DSC obtidas das NPs-OVA com trealose	50
Figura 27.	Curvas DSC obtidas das NPs-OVA com sacarose	50
Figura 28.	Curvas DSC obtidas das NPs-OVA com lactose	51
Figura 29.	Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA sem glicina	52
Figura 30.	Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA glicina 1%	53
Figura 31.	Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA glicina 2,5%	53
Figura 32.	Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA glicina 5%.....	54
Figura 33.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA sacarose 1%.....	55
Figura 34.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA sacarose 2,5%.....	55
Figura 35.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA sacarose 5%.....	56
Figura 36.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA trealose 1%.....	56
Figura 37.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA trealose 2,5%.....	57

Figura 38.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA trealose 5%.....	57
Figura 39.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA lactose 1%.....	58
Figura 40.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA lactose 2,5%.....	58
Figura 41.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA lactose 5%.....	59
Figura 42.	Curvas DSC das NPs-HBsAg suplementadas com lactose, trealose e sacarose a 5%.....	60
Figura 43.	Curvas DSC obtidas das NPs-HBsAg suplementadas com manitol 5%.....	60
Figura 44.	Curvas DSC obtidas das NPs-HBsAg suplementadas com glicina 5%.....	61
Figura 45.	Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização NPs-HBsAg com glicina 5%.....	62
Figura 46.	Aparência da pastilha liofilizada das formulações. NPs-OVA sem glicina, NPs-OVA glicina 1%, NPs-OVA glicina 2,5%, NPs-OVA glicina 5%.....	63
Figura 47.	Imagem por MEV obtida da vista superior dos sólidos liofilizados das NPs-OVA não suplementadas.	64
Figura 48.	Imagem por MEV obtida da vista superior dos sólidos liofilizados das NPs-OVA suplementadas com glicina 1%.....	64
Figura 49.	Imagem por MEV obtida da vista superior dos sólidos liofilizados das NPs-OVA suplementadas com glicina 2,5%.....	65
Figura 50.	Imagem por MEV obtida da vista superior dos sólidos liofilizados das NPs-OVA suplementadas com glicina 5%.....	65
Figura 51.	Reconstituição das NPs-OVA com formação de precipitado. (a) NPs-OVA sem glicina, (b) NPs-OVA glicina 1%.....	66
Figura 52.	MEV das nanopartículas liofilizadas após de reconstituição. (a) NPs-OVA glicina 2,5%. (b) NPs-OVA glicina 5%.....	67
Figura 53.	Gráfico de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana com ovoalbumina liofilizadas com 2,5 % de glicina e reconstituídas avaliadas por NTA e DLS.	68

Figura 54.	Gráfico de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana com ovoalbumina liofilizadas com 5 % de glicina e reconstituídas avaliadas por NTA e DLS.	68
Figura 55.	Imagem de MEV das NPs-HBsAg suplementadas com glicina 5% liofilizadas após de reconstituição.	74
Figura 56.	Resposta de IgG contra HBsAg na 1ª sangria dos grupos.....	75
Figura 57.	Resposta de IgG contra HBsAg na 2ª sangria dos grupos.....	76
Figura 58.	Camundongo BALB/c sob efeito sedativo (Cloridrato de xilasina associado a cloridrato de quetamina) para imunização intranasal de NP-HBsAg liofilizadas.....	77
Figura 59.	Resposta de IgG contra HBsAg na 3ª sangria dos grupos.....	78
Figura 60.	Resposta de IgA secretado total presente nas secreções nasais dos grupos, coletados durante a 3ª sangria.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Toxicologia da quitosana.....	17
Quadro 2.	Cronograma de imunização e de coleta do sangue em camundongos.....	29
Quadro 3.	Condições de preparo para a formação das nanopartículas de quitosana....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de diâmetro hidrodinâmico medidos por DLS e NTA das nanopartículas	35
Tabela 2.	Medição de potencial ζ das formulações de nanopartículas.....	40
Tabela 3.	Eficiência de Encapsulação das NPs-OVA e NPs-HBsAg.....	42
Tabela 4.	Valores dos eventos térmicos das diferentes formulações das NPs-OVA analisadas por microscopia ótica acoplada à liofilização.....	52
Tabela 5.	Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta das nanopartículas de quitosana com ovoalbumina analisadas por DLS. Diâmetro hidrodinâmico médio e concentração de partículas por mililitros analisadas por NTA	69
Tabela 6.	Medição de potencial ζ das NPs-OVA reconstituídas.....	69
Tabela 7.	Análise comparativa das razões do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das nanopartículas de quitosana carregadas com OVA antes e após liofilização ($DH M_f/DH M_i$) utilizando DLS. Nanopartículas formuladas com diferentes excipientes e em diferentes concentrações.....	70
Tabela 8.	Análise comparativa das razões do índice de polidispersividade (IPd) das nanopartículas de quitosana carregadas com OVA antes e após liofilização ($IP d_f/IP d_i$) utilizando DLS. Nanopartículas formuladas com diferentes excipientes e em diferentes concentrações.....	71
Tabela 9.	Umidade residual das formulações de NPs-OVA analisadas após liofilização e reconstituição. Os valores são apresentados em porcentagem, quantidade de massa de água residual relacionado com o peso total da amostra. As análises foram feitas diretamente da amostra fechada.....	72
Tabela 10.	Análise comparativa das razões do índice de polidispersividade (IPd) NPs-HBsAg antes e após liofilização ($IP d_f/IP d_i$) utilizando DLS. Nanopartículas formuladas com glicina 5%.....	73
Tabela 11.	Análise comparativa das razões do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das NPs-HBsAg antes e após liofilização ($DH M_f/DH M_i$) utilizando DLS. Nanopartículas formuladas com glicina 5%.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QS	Quitosana
IgA	Inmunoglobulina A
IgAs	Inmunoglobulina A secretora
IgG	Inmunoglobulinas G
VHB	Vírus da hepatite B
CHC	Carcinoma hepatocelular
OMS	Organização Mundial de Saúde
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa (<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>)
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino (<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>)
NALT	Tecido linfóide associado aos tecidos nasais e faringianos (<i>Nasal-Associated Lymphoid Tissue</i>)
BALT	Tecido linfóide associado aos brônquios (<i>Bronchus-Associated Lymphoid Tissue</i>)
SALT	Tecido linfóide associado à pele (<i>Skin-Associated Lymphoid Tissues</i>)
CD	Células dendríticas
OPV	Vacina Oral contra Poliomielite
DD	Grau de desacetilação
T_c	Temperatura de colapso
T_g'	Temperatura de transição vítrea
T_{eut}	Temperatura eutética
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FDM	Microscopia Acoplada à Liofilização
OVA	Ovoalbumina
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
E.E.	Eficiência de Encapsulação
BCA	Ácido Bicinconínico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

NPs _(liq.)	Nanopartículas líquidas
NPs-HBsAg _(liq.)	Nanopartículas carregadas com HBsAg líquidas
NPs _(lio)	Nanopartículas liofilizadas
NPs-HBsAg _(lio)	Nanopartículas carregadas com HBsAg liofilizadas
HBsAg IP _(liq.)	HBsAg administrada intraperitoneal
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Pot- ζ	Potencial zeta
TPP	Tri-polifosfato
pI	Ponto isoelétrico
T_d	Temperatura de devitrificação
DHM	Diâmetro Hidrodinâmico Médio
IPd	Índice de Polidispersividade
DHM _f /DHM _i	Diâmetro Hidrodinâmico Médio final (reconstituído) / Diâmetro Hidrodinâmico Médio inicial (antes da liofilização)
IPd _f /IPd _i	Índice de Polidispersividade final (reconstituído) / índice de polidispersividade inicial (antes da liofilização)
APCs	Células apresentadoras de antígeno
IFN- γ	Interferon-gama
IL-4	Interleucina 4
PLGA	Poli(L- ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLA	Ácido Poliláctico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Hepatite B	3
1.2	Organização do sistema imune das mucosas	5
1.3	Imunidade da mucosa	6
1.4	Vacinação de mucosa	8
1.5	Cavidade nasal e mucosa nasal	10
1.6	Vacinação nasal	11
1.7	Quitosana	12
1.7.1	Estrutura química da quitosana	12
1.7.2	Fonte e produção da quitosana	13
1.7.3	Propriedades físico-químicas da quitosana	14
1.7.4	Propriedades mucoadesivas	15
1.7.5	Aplicações da quitosana	15
1.7.6	Toxicologia da quitosana	16
1.8	Liofilização	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Preparação e carregamento das nanopartículas	23
3.2	Caracterização físico-química das nanopartículas	24
3.2.1	Espalhamento dinâmico da luz (<i>Dynamic Light Scattering – DLS</i>)	24
3.2.2	Potencial- ζ (<i>Laser Doppler Velocimetry-LDV</i>)	25
3.2.3	Análise de Rastreamento de Nanopartículas (<i>Nanoparticle Tracking Analysis-NTA</i>)	25
3.2.4	Eficiência de Encapsulação (E.E.)	26
3.2.5	Microscopia de Força Atômica (MFA)	26
3.3	Liofilização	27
3.3.1	Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry - DSC</i>)	27
3.3.2	Microscopia ótica acoplada à liofilização	27
3.3.3	Liofilização	28
3.3.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	28
3.4	Estudo <i>in vivo</i>	29
3.4.1	Imunização em camundongos	29

4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1	Caracterização das nanopartículas de quitosana	32
4.2	Determinação da Eficiência de Encapsulação (E.E.)	41
4.3	Morfologia das nanopartículas	42
4.4	Liofilização	45
4.4.1	Análise térmica das NPs-OVA	46
4.4.2	Análise térmica das NPs-HBsAg	59
4.5	Caracterização dos sólidos liofilizados	62
4.5.1	Caracterização das NPs-OVA liofilizadas	62
4.5.2	Caracterização das NPs-HBsAg liofilizadas	72
4.6	Teste <i>in vivo</i>	75
5	CONCLUSÕES	80
6	REFERÊNCIAS	83
7	ANEXO	93
8	APÊNDICE	95

1 INTRODUÇÃO

Estão bem desenvolvidas as pesquisas para conhecer o funcionamento da imunidade sistêmica dos organismos para prevenir e combater doenças infecciosas. Também é conhecido que o sistema imune de mucosas pode ser estimulado como importante arma de defesa contra tais doenças (TAKAHASHI et al., 2009). Esta defesa pode ser adquirida por vacinas que induzam imunidade ativa, resultando em resposta biológica com produção de imunoglobulinas. A IgA é a imunoglobulina mais abundante produzida nos mamíferos, estando presente no soro e nas secreções de mucosas (MACPHERSON et al., 2001), como saliva, lágrima, colostro, e também nas secreções dos tratos intestinal, respiratório e geniturinário.

A quitosana (QS), quimicamente nomeada α (1-4) 2-amino-2-deoxi- β -D-glucano, é considerada um biopolímero policatiônico (PRABAHARAN, 2008). Está presente naturalmente em alguns fungos, mas é comumente obtida pelo processo de desacetilação alcalina da quitina – um polissacarídeo estrutural abundante na natureza, componente básico do exoesqueleto de insetos e crustáceos como caranguejos, lagostas e camarões (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; BORGES et al., 2007; PRABAHARAN, 2008).

A habilidade da QS em formar sistemas poliméricos coloidais com partículas menores do que um micrômetro (ABDELWAHED et al., 2006; DESAI et al., 1997) tem atraído grande interesse, principalmente na área médica (nanoencapsulação de vacinas, genes ou antioxidantes) (TSAI et al., 2011). As capacidades de incorporação e adesão da QS devem-se às interações eletrostáticas dos grupos de amina primárias de carga positiva com as cargas negativas de outros componentes (TSAI et al., 2011; CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2009; GAN; WANG, 2007). Por isto, as nanopartículas de quitosana podem ser utilizadas para entrega de antígenos via mucosas (nasal, oral, sublingual, vaginal e pulmonar), devido sua capacidade de se aderir à superfície mucosal.

Estudos relatam dificuldades para produzir nanopartículas devido à instabilidade em meio aquoso, porque podem sofrer desintegração ou agregação das nanopartículas após estocagem. Metodologias, como a liofilização, estão sendo desenvolvidas para evitar tais instabilidades (CHACÓN et al., 1999; SCHWARZ; MEHNERT, 1997). Além disso, a liofilização permite a produção de formas farmacêuticas em pó para ser utilizadas por diferentes vias de administração, tais como intravenosa, nasal (ALI; LAMPRECHT, 2014) e pulmonar (MURUGAPPAN et al., 2013).

A liofilização pode ser facilmente definida como sendo a secagem de uma substância previamente congelada, por sublimação; ou seja, remoção de qualquer solvente presente no

estado sólido diretamente para o gasoso, sem passar pelo estado líquido, sendo que, na maioria das formulações, o solvente presente é a água (PITOMBO, 1989).

1.1 Hepatite B

Desde sua descoberta, a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é reconhecidamente uma das principais causas assintomáticas de hepatite aguda, fulminante, crônica, até cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) em todo o mundo (TE; JENSEN, 2010).

O VHB é o menor vírus de DNA conhecido, pertencente à família *Hepadnaviridae* e ao gênero *Orthohepadnavirus* (MANDART; KAY; GALIBERT, 1984; NETTER et al., 1997). O VHB é composto por dois tipos de partículas virais. Partículas de 22 nm de diâmetro, de forma esférica e filamentos incompletos, compostas só do envelope viral e, portanto, não infecciosas. As outras partículas, de 42 nm de diâmetro, de forma esférica, são virais infecciosas, formando o vírion completo (D.S. DANE, C.H. CAMERON, 1970). Esta última é circundada por uma camada externa de lipoproteína que apresenta três glicoproteínas de superfície (Figura 1): HBsAg-S, HBsAg-M e HBsAg-L (LIANG, 2009). A camada interna, denominada nucleocapsídeo, é um icosaedro totalmente constituído por proteínas do núcleo (HBcAg) que circundam o genoma viral e a enzima DNAPolimerase. O HBeAg é outro antígeno da parte central do vírus e está associado ao núcleo viral, diferentemente do HBcAg, que é secretado e detectado no sangue (TIOLLAIS et al., 1985).

Figura 1. Estrutura do vírus da hepatite B. A camada externa apresenta glicoproteínas HBsAg-M, HBsAg-L e HBsAg-S; a camada interna apresenta HBcAg, DNA de VHB, VHB polimerase com a primase (pr), transcriptase reversa (TR) e domínio de proteína celular cinase C alfa (PKC) (modificado de GERLICH, 2013).

As causas da transmissão do VHB abrangem via sexual, transmissão parenteral (hemoderivados, drogas injetáveis, hemodíálises) (ALLAIN, 2004; FRANCO et al., 2012), passagem da mãe infectada para o filho durante a gestação e infecções de primeira infância, pelo contato com pessoas infectadas (SHEPARD et al., 2006).

A infecção pelo VHB pode se manifestar de três formas: hepatite aguda leve, hepatite aguda grave e hepatite crônica, que diferem pelos sintomas pós-infecção. Indivíduos com hepatite aguda podem apresentar sintomas como falta de apetite, náuseas, vômitos, icterícia, com frequência febre e, em casos mais graves, falha aguda do fígado. Na hepatite crônica, podem ocorrer quadros assintomáticos; os indivíduos com sintomas apresentam falta de apetite, cansaço e ligeiro mal-estar na parte superior do abdômen devido à cirrose hepática (LIANG, 2009).

A infecção pelo VHB possui distribuição universal. Uma revisão sistemática com coleção de dados no período de 27 anos (1980-2007) foi publicada, dando uma estimativa da prevalência do VHB em adultos nos anos de 1990 a 2005 (OTT et al., 2012). Podem ser identificadas quatro áreas da prevalência do VHB (Figura 2): área de baixa prevalência, onde menos de 2% da população é portadora da infecção (Estados Unidos, Canadá, Brasil, Paraguai); área de prevalência intermediária baixa, na qual de 2% a 4% dos indivíduos são portadores crônicos do VHB (norte da África, centro e leste da Europa mediterrânea e alguns países da América do Sul); área de alta prevalência intermediária elevada, onde 5-7% da população são

portadores do VHB (África do Sul, África central e leste subsaariana, Ásia central e do leste); e área de prevalência elevada, onde mais do 8% da população está infectada (região da África Ocidental subsaariana) (LOCARNINI et al., 2015).

Figura 2. Distribuição geográfica da prevalência da infecção por hepatite B em adultos em todo o mundo, 2005 (Modificado do LOCARNINI et al., 2015)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de dois bilhões de pessoas no mundo já foram infectadas pelo VHB e cerca de 240 milhões são portadoras crônicas desse vírus. Segundo o Global Burden of Disease Study, estima-se que mais de 780 mil pessoas morrem a cada ano devido às consequências agudas ou crônicas da hepatite B (LOZANO et al., 2012).

Nas Américas, existem entre 8 e 11 milhões de pessoas cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite. O Brasil está situado numa área de prevalência baixa. No entanto, a bacia Amazônica Ocidental, incluindo o Brasil e o Peru, é uma área de alta endemicidade, com taxas de prevalência de VHB superiores a 10 % (CARMO et al., 2014). A prevalência aumenta em direção ao norte do país, sendo a região amazônica considerada uma zona de alta prevalência.

1.2 Organização do sistema imune das mucosas

O sistema imunológico pode ser dividido anatomicamente e funcionalmente em dois compartimentos: o compartimento sistêmico, incluindo ossos, medula óssea, baço e gânglios linfáticos; e o compartimento de mucosa, que compreende tecido linfoide, associado às superfícies de mucosa (MALT- *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*), e glândulas externas secretoras (STAATS et al., 1994).

O termo MALT é utilizado para denominar genericamente os agregados de tecido linfoide associados às mucosas. Na organização do sistema imune, as mucosas apresentam principalmente linfócitos; entretanto, células plasmáticas e macrófagos também estão presentes. Tais células desempenham função importante na regulação da imunidade de mucosa, devido a sua função de apresentadoras de antígenos que superaram a barreira epitelial mucosa (ANACAK et al., 2012).

O MALT pode ser subdividido conforme a localização anatômica dos tecidos linfoides: GALT (tecido linfoide associado ao intestino – *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), NALT (tecido linfoide associado aos tecidos nasais e faringianos – *Nasal-Associated Lymphoid Tissue*), BALT (tecido linfoide associado aos brônquios – *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*) (BRANDTZAEG, 2007; VAN DER LUBBEN et al., 2001), SALT (tecido linfoide associado à pele – *Skin-Associated Lymphoid Tissues*) (ULLRICH, 2010) e criptas sublinguais (OGRA, 2010).

1.3 Imunidade da mucosa

Compartimento sistêmico e de mucosa diferem enquanto a natureza das respostas imunes devido possuírem diferentes atividades humorais. No compartimento sistêmico, os principais anticorpos que têm a função de neutralizar patógenos no sistema circulatório são as imunoglobulinas G (IgG). No compartimento de mucosa, os anticorpos que impedem a entrada de patógenos no organismo são as imunoglobulinas A secretoras (IgAs), que constituem o anticorpo mais abundante presente nos tecidos das mucosas (BRANDTZAEG, 2010; VAN DER LUBBEN et al., 2001). Estes últimos estão presentes em secreções nasal, salival, lacrimal, em leite, mucosas do trato gastrointestinal, trato respiratório e trato geniturinário (JÓNSDÓTTIR, 2007; MCCLUSKIE; DAVIS, 1999).

As superfícies das mucosas, tais como nasal, oral, pulmonar, vaginal, ótico, têm contato com o meio externo; portanto, são as principais portas de entrada de micro-organismos, patogênicos e não patogênicos, dentre os quais parasitas, bactérias, vírus ou até mesmo substâncias ambientais causadoras de alergia (ÇUBURU et al., 2007; HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005; MCCLUSKIE; DAVIS, 1999).

As membranas das mucosas possuem barreiras físicas e químicas, tais como muco, e algumas são capazes de eliminar grande parte dos agentes patogênicos (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

Nas superfícies de mucosa estão as células epiteliais especializadas que possuem microdobras, chamadas de células M (Figura 3a). Estas células não secretam muco ou enzimas, mas são as responsáveis pelo transporte vesicular de substâncias do meio externo para as células dendríticas (CD) subjacentes, os linfócitos intraepiteliais e os tecidos linfoides subepiteliais (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006).

Em algumas regiões da superfície das mucosas, na ausência de tecido linfóide organizado, e, portanto, sem transporte vesicular, as CD podem migrar entre as junções apertadas das células epiteliais até o meio externo (Figura 3b), onde as prolongações da célula podem fagocitar partículas antígenas e patógenos (HOLT; SCHON-HEGRAD; MCMENAMIN, 1990).

Figura 3. Fagocitose de partículas na superfície epitelial de mucosa. (a) Fagocitose mediada por células M. (b) Fagocitose por colaboração de células epiteliais e células dendríticas (Modificado do NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006)

Nos locais indutores do sistema imune de mucosa, os linfócitos T reconhecem antígenos apresentados pelas células dendríticas e ativam a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos. Nos locais efetores, os anticorpos (IgG ou IgA) são secretados (MCCLUSKIE; DAVIS, 1999).

Para concluir, a IgA é a principal classe de anticorpo que pode ser eficientemente secretada através dos epitélios, desempenhando papel crítico na defesa contra patógenos (DIETRICH et al., 2003).

1.4 Vacinação de mucosa

No século XV, as primeiras práticas de vacinação por via mucosa foram nas culturas orientais (BORGES et al., 2007; MCVEY; SHI, 2010). Na China, imunizações contra a varíola foram realizadas em pessoas saudáveis com a ingestão de pulgas das vacas com varíola, ao cheirar ou inserindo em cortes da pele o pó feito das pústulas (BORGES et al., 2007; MITRAGOTRI, 2005).

Em 1796, Edward Jenner usou a mesma técnica, mas de administração diferente, injetando em um menino de 8 anos de idade o conteúdo das pústulas de varíola coletadas das mãos de uma ordenhadeira (HILLEMANN, 2000; MCNALLY, 2001), não sendo pela mucosa. Desse ponto em diante, a ciência voltou-se para estudos sobre vacinação e imunologia (HILLEMANN, 2000).

Nos anos 1960, usou-se o vírus vivo atenuado contra poliomielite (Vacina Oral contra Poliomielite – OPV) para administração oral, considerando-se, porém, como imunização em mucosa gastrointestinal. A vacina foi criada pelo doutor Albert Sabin, responsável pela erradicação da doença, por isso, leva o seu nome (MACLAUGHLIN, 2003; MITRAGOTRI, 2005).

As vacinas, existentes atualmente no mercado farmacêutico, são, na sua maioria, injetáveis. Estas vacinas são focadas em produzir anticorpos séricos, não precisando estimular uma resposta imune em mucosas (ÇUBURU et al., 2007). A vacina contra a poliomielite tem demonstrado que vacina oral pode induzir resposta imunológica mucosa e sistêmica, protegendo o hospedeiro da infecção (KARZON, 1969).

Atualmente, algumas vacinas via mucosa já são utilizadas em humanos, como, por exemplo, a vacina de vírus vivo contra o rotavírus, administrada via oral (DENNEHY, 2007), e a vacina de vírus vivo atenuado contra o vírus da influenza H1N1, administrada via nasal (AZIZ et al., 2007). Em 1985, surgiu uma vacina contra a bactéria causadora de cólera (LEVINE; KAPER, 1993).

Uso de vacinas por via mucosa traz muitas vantagens; por exemplo: possibilidade de neutralização dos patógenos na sua porta de entrada; praticidade no momento da administração, exigindo menor qualificação de pessoas para administração da vacina; maior aceitação dos pacientes, pois não se trata de método invasivo (VAN DER LUBBEN et al., 2001); maior facilidade e rapidez na administração, principalmente se for necessária a vacinação em massa;

diminuição dos riscos de injúrias e contaminação cruzada (PRATELLI et al., 2001), como no caso da aplicação de vacinas por meios de agulhas (MITRAGOTRI, 2005), e, muito importante: indução de resposta imune de mucosa, assim como sistêmica – no entanto, a expressão da resposta imune de mucosa vai depender do tipo de via a administrar a vacina (NEGRI et al., 2010).

Existe evidência de uma regionalização notável no sistema imune das mucosas, bem como da integração da comunicação celular entre os sítios indutivos e efetores (Figura 4), ocorrendo preferência da migração de células B a sítios efetores (BRANDTZAEG, 2007). Portanto, a administração de um antígeno em um sítio de mucosa pode levar à produção de IgA em diferentes mucosas e glândulas.

Figura 4. Expressão de resposta imunológica em mucosa de IgG após diferentes vias de vacinação com a subunidade B da toxina da cólera. Tonalidades indicam força de resposta (Modificado do HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

Todas as vias possíveis de administração por mucosa apresentam inúmeras vantagens, tais como: a possibilidade de neutralização dos patógenos na sua porta de entrada, exigindo menor qualificação de pessoas para administração da vacina; maior aceitação dos pacientes, uma vez que não se trata de um método invasivo (VAN DER LUBBEN et al., 2001); maiores facilidade e rapidez na administração, principalmente se for necessária a vacinação em massa; diminuição dos riscos de injúrias e contaminação cruzada (PRATELLI et al., 2001). Nos últimos anos, aumentaram as pesquisas com transportadores solúveis e particulados baseados em quitosana para entrega de proteínas pelas vias de mucosa (AMIDI et al., 2010).

1.5 Cavidade nasal e mucosa nasal

A cavidade nasal está dividida em duas metades simétricas pelo septo nasal (meio) e estende-se posteriormente para a nasofaringe. A parte mais anterior da cavidade nasal, o vestíbulo nasal, se abre para a face através da narina (Figura 4a). O átrio é uma região intermediária entre o vestíbulo e a região respiratória. A região respiratória, conchas nasais ou cornetos, ocupa a maior parte da cavidade nasal e, portanto, proporciona à cavidade nasal uma área de superfície muito elevada, com paredes laterais dividindo-a em três seções: cornetos nasais superior, médio e inferior (UGWOKE; VERBEKE; KINGET, 2001).

O átrio é uma região de transição epitelial, com células escamosas, células estratificadas e células do tipo colunares, pseudoestratificadas com microvilosidades. Células epiteliais pseudoestratificadas colunares são intercaladas com células caliciformes e dutos seromucosos; as aberturas das glândulas seromucosas subepiteliais cobrem a região respiratória (cornetos) (Figura 4b). Cada célula ciliada contém cerca de 100 cílios. Muitas destas células possuem ativamente cílios com microvilosidades. Células ciliadas e não-ciliadas possuem cerca de 300 microvilosidades; por tal motivo, esta região é permeável, devido a grande área de superfície e a alta vasculatura (UGWOKE et al., 2005).

Figura 5. (a) Esquema de um corte sagital da cavidade nasal humana mostrando vestíbulo nasal (A); átrio (B); região respiratória: corneto inferior (C1), cornetomédio (C2) e corneto superior (C3); região olfativa (D); e nasofaringe (E). (b) Tipos de células do epitélio nasal, mostrando células ciliadas (A), células não-ciliadas (B), células caliciformes (C), camada de muco em gel (D), camada de sol (E), de células basais (F) e da membrana basal (G) (Adpatado de UGWOKE et al., 2005).

Muco nasal é parcialmente produzido pelas células caliciformes intercaladas com as células cilíndricas. Essas células contêm grânulos de secreção com mucina, que é o principal componente de geração de elasticidade e viscosidade da camada de muco (ANTUNES; GUDIS; COHEN, 2009). O muco é constituído por duas camadas: uma fase contínua interna solenoide de baixa viscosidade, constituída por água e eletrólitos, que rodeia os veios de cílios; e uma fase de gel exterior, descontínua, de viscosidade mais elevada, que se desloca ao longo das pontas dos cílios estendidos (ANTUNES; GUDIS; COHEN, 2009). A secreção de muco tem pH ligeiramente ácido, de 5.5 a 6.5. O muco é uma mistura complexa de substâncias que consiste em cerca de $\geq 95\%$ de água, 2% de mucina, $\sim 1\%$ de sais, 0,5 – 1% de outras proteínas, tais como albumina, imunoglobulina, lisozima e lactoferrina, e $<1\%$ de lípidios (HOUTMEYERS; GOSSELINK; DECRAMER, 1999).

A produção de IgA, tanto no tecido adenoide quanto na mucosa nasal, contribui significativamente para a proteção imunitária contra bactérias e vírus inalados (M. BERNSTEIN, M.S. REDDY, F.A. SCANNAPIECO, H.S. FADEN, 1997).

A biodisponibilidade total de peptídeos e proteínas na mucosa nasal é influenciada por uma barreira enzimática composta de exoendopeptidases que clivam peptídeos e proteínas no seu *N*-e *C*-terminais e pela ligação interna peptídica, respectivamente (LEE; YAMAMOTO, 1990). Várias enzimas existem em quantidades substanciais na mucosa nasal, isto é, aldeído desidrogenase, glutatona-transferase, hidrolases de epóxido. Outras enzimas, tais como as aminopeptidases, têm sido relacionadas à degradação de peptídeos e proteínas (LEE; YAMAMOTO, 1990; MITRA; KRISHNAMOORTHY, 1998).

1.6 Vacinação nasal

Dentro de todas as imunizações em mucosas, a imunização intranasal é uma das mais promissoras; tem reduzida atividade enzimática, em comparação com outras vias possíveis de administração, como, por exemplo, a via oral; o seu epitélio é moderadamente permeável e há elevada disponibilidade de locais imunorreativos (CSABA; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2009).

Conforme citado anteriormente, a cavidade nasal apresenta grande área de superfície, em conjunto com rica vascularização, com elevada permeabilidade – de grande importância para a entrega de fármacos via nasal. Apesar da elevada permeabilidade da membrana nasal, a absorção nasal de muitas moléculas, especialmente fármacos hidrofílicos e macromoleculares

(>1.000 Da), tais como peptídeos e proteínas, mostra biodisponibilidade baixa ou mesmo nenhuma absorção (JIANG et al., 2010).

1.7 Quitosana

O polímero de quitosana pode ser encontrado em variedade de formas, diferenciando-se pelo peso molecular e pelo grau de desacetilação. Esses aspectos são importantes, pois irão influenciar no produto final (KEAN; THANOU, 2010).

1.7.1 Estrutura química da quitosana

A molécula da quitosana é um copolímero composto por unidades de *N*-acetil-*D*-glucosamina e *D*-glucosamina disponíveis em diferentes graus, dependendo do grau de porções acetilados (DASH et al., 2011). É um polímero policatiônico, que tem um grupo amino e dois grupos hidróxilo no resíduo glicosídico (Figura 6)(AGRAWAL; STRIJKERS; NICOLAY, 2010).

A quitosana é muito semelhante à celulose, que consiste de unidades *D*-glucosamina unidas por ligações de β -1,4, com grau variável de *N*-acetilação, exceto que o grupo acetilamino substitui o grupo hidróxilo na posição C2; portanto, a quitosana é um copolímero que consiste em *N*-acetil-2-amino-2-oxi-*D*-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-*D*-glucopiranosose (Figura 7), onde os dois tipos de unidades de repetição estão unidos por ligações glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4) (ROBERTS, 1992a).

Figura 6. Estrutura molecular da celulose (a), da quitina (b) e da quitosana (c), em que x representa o grau de desacetilação da quitosana.

Figura 7. Estrutura química da quitosana. Átomos individuais estão numerados. Linhas pontilhadas indicam ligações de hidrogênio O3-O5. Na Figura, são indicados dois ângulos diedros (ϕ , ψ) definem a principal cadeia de conformação e um ângulo diedro (χ) define a orientação O6 (AGRAWAL; STRIJKERS; NICOLAY, 2010).

1.7.2 Fonte e produção da quitosana

A quitina é um polímero natural e o segundo mais abundante polissacarídeo na natureza, sendo a celulose o mais abundante. A fonte natural da quitosana é a quitina, encontrada nas paredes celulares de alguns fungos e insetos e no exoesqueleto de crustáceos, tais como camarões (BERGER et al., 2004; TOAN et al., 2006).

Vários métodos têm sido propostos e desenvolvidos ao longo das últimas décadas para a extração de quitosana pura, tendo sido aplicados com sucesso na produção química em processos industriais para quitosana a partir de resíduos de casca de crustáceo. As principais fontes comerciais de quitina são os resíduos de casca de camarões, lagostas, caranguejos e krill (KAUR; DHILLON, 2014).

A quitina pode ser quimicamente ou enzimaticamente desacetilada para quitosana, um polímero mais flexível e solúvel. No entanto, a desacetilação raramente é completa; daí a cadeia polimérica da quitosana ser geralmente descrita como um copolímero composto por unidades de *N*-acetil-*D*-glucosamina e *D*-glucosamina. A quitosana é obtida por desacetilação parcial da quitina (Figura 8) usando solução básica quente concentrada de NaOH (40-50% w / v) durante várias horas (ROBERTS 1992).

Figura 8. Desacetilação química da quitina

1.7.3 Propriedades físico-químicas da quitosana

As condições utilizadas para a desacetilação determinam a massa molar do polímero e o grau de desacetilação (DD). Estas diferenças na estrutura do polímero dão origem a diversos lotes de quitosana, que se distinguem com base na massa molar e seu DD. O DD e o peso molecular afetam diretamente as propriedades químicas e também biológicas do polímero.

A maioria da quitosana comercializada está disponível em dois graus diferentes de massa molecular: elevada e baixa. A quitosana de baixa massa molar é caracterizada pela massa molar entre 20 kDa e 190 kDa, com DD <75%. A quitosana de alta massa molar é geralmente caracterizada por massa molar entre 190 kDa e 375 kDa, com DD > 75% (DASH et al., 2011).

O quitosana é insolúvel em condições de meio neutro e básico, mas solúvel em meio ácido. A solubilidade da quitosana depende da distribuição de grupos aminos livres e *N*-acetil. Em ácidos diluídos (pH < 6), os grupos aminos livres são protonados e a molécula se torna solúvel (SHI et al., 2006). A solubilização é devido a quaternização dos grupos aminos, que têm valor de pKa de 6.3, permitindo à quitosana ser um polieletrólito catiônico solúvel em água (Figura 9). Sendo o pKa da quitosana próximo da neutralidade, a transição solúvel-insolúvel ocorre em pH 6.5 – um intervalo particularmente conveniente para aplicações biológicas (YI et al., 2005).

Figura 9. Ilustração esquemática do comportamento da quitosana às variações de pH

1.7.4 Propriedades mucoadesivas

Os sistemas de entrega muco-desivos são bastante variados, permitem, como princípio básico, aumentar o tempo de retenção dos antígenos na mucosa, interagir com o epitélio escolhido e aumentar a absorção e a liberação de antígenos (SINGH et al., 2001).

As propriedades mucoadesivas da quitosana estão provavelmente ligadas ao seu caráter catiônico. A camada de gel de muco exibe subestruturas aniônicas sob a forma de ácido siálico e subestruturas de ácidos sulfônicos. A interação é baseada em interações iônicas entre os grupos catiônicos de amins primárias de quitosana e estas subestruturas aniônicas do muco (BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012). Tem se observado que as forças de mucoadesão da quitosana podem ser melhoradas com aplicação de produto liofilizado e com variação do pH das soluções da mesma (GRABOVAC; GUGGI; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005).

1.7.5 Aplicações da quitosana

A quitosana se tornou um produto de múltiplas utilidades, com aplicações na biomedicina, na área farmacêutica, em alimentos ou na agricultura (TSAI et al., 2011). Suas características biológicas de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade são favoráveis a esse amplo uso (GAN& WANG 2007).

A quitosana, na área farmacêutica, vem sendo utilizada em liberação controlada de medicamentos, como excipiente em formulações farmacêuticas e encapsulação de materiais. A natureza policatiónica da quitosana e sua biodegradabilidade consistem em características ideais para a interação como a superfície de tecidos (RAVI KUMAR, 2000).

Na área biomédica, a quitosana é empregada em reconstituição óssea, implantes dentários, pele artificial e membranas renais (DODANE; VILIVALAM, 1998). Além disso, por ser biocompatível, é utilizada em suturas cirúrgicas, reduzindo as reações alérgicas. A quitosana

é empregada na fabricação de lentes de contato que podem ser utilizadas por tempo maior, pois absorvem água, são permeáveis ao ar e são mais confortáveis (DASH et al., 2011).

A quitosana é uma fibra de origem animal, mas possui estrutura química semelhante à celulose; portanto, não pode ser digerida pelas enzimas digestivas (MUZZARELLI, 1997). A quitosana se liga aos ânions dos ácidos graxos devido à alta densidade de cargas positivas do polímero, impedindo sua absorção pelo organismo. Esta propriedade permite-lhe absorver as gorduras durante a passagem pelo estômago, um ambiente ácido, mas, quando chega ao intestino, um ambiente básico, a gordura e a quitosana, ligadas, se solidificam, sendo excretadas junto com as fezes (DEUCHI et al., 1994).

A propriedade da quitosana de formar filmes em superfícies negativamente carregadas e formar hidrogéis é usada como esfoliante, hidratante capilar, no tratamento de acne, como creme dental e nas formulações de xampus não-iônicos, como um agente doador de viscosidade (SANDFORD, 1989).

1.7.6 Toxicologia da quitosana

A toxicidade de dose única da quitosana em ratos ou camundongos é baixa, com valores reportados apresentados no Quadro 1. É importante considerar que a formulação de quitosana com fármacos pode alterar as características farmacocinéticas e os perfis de biodistribuição da quitosana. Além disso, a cinética de captação celular pode ser alterada, devido à interação de cargas. Este equilíbrio, ou redução, de cargas positivas sobre a molécula de quitosana tem efeitos sobre a sua interação com células e o microambiente, muitas vezes levando à diminuição da absorção e à diminuição na toxicidade (KEAN; THANOU, 2010).

Geralmente, dados limitados estão disponíveis para utilização de quitosana como um suplemento dietético. Níveis de 4,5 g de quitosana por dia têm sido administrados por via oral em voluntários humanos, sem efeitos adversos relatados (GADES; STERN, 2005).

Quadro 1. Toxicologia da quitosana (BALDRICK, 2010).

Estudo	Aplicação	Animal	Resultados
Valor de DL₅₀ da quitosana	Oral	Rato	>1.500 mg/kg
	Intraperitoneal	Rato	3.000 mg/k
	Subcutânea	Camundongo	>10,000 mg/kg
	Oral	Camundongo	>16,000 mg/kg
	Intraperitoneal	Camundongo	5.200 mg/kg

1.8 Liofilização

A liofilização é um processo industrial que fornece estabilidade em longo prazo, preservando as propriedades originais de produtos biológicos e farmacêuticos. Produtos no estado seco têm maior estabilidade, devido à redução da mobilidade molecular e pelo retardamento das reações de deterioração mediadas pela água (GRANT; MATEJTSCHUK; DALBY, 2009).

A liofilização está sendo muito utilizada para aumentar a estabilidade de formulações com nanopartículas. Produtos liofilizados com nanopartículas lipídicas sólidas, encapsuladas com tetracaine e etomidato para aplicação intravenosa, foram bem sucedidos (SCHWARZ; MEHNERT, 1997).

Nanocápsulas são formulações que apresentam problemas de instabilidade em meio aquoso devido a agregação e a fusão frequentemente notadas após longo período de armazenamento; por esta razão, tem sido utilizada a liofilização como alternativa para evitar tais problemas (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006a, 2006b). Além disso, a liofilização pode ser aplicada a lipossomas carregadas com budesonida para ser utilizadas como pó para administração nasal (JOSHI; MISRA, 2001).

A literatura sobre nanopartículas liofilizadas sem fármaco é maior do que sobre nanopartículas liofilizadas contendo fármaco. Assim, torna-se necessário estudar as possíveis alterações que podem acontecer num sistema contendo fármaco, pois as características físico-químicas das nanopartículas carregadas podem mudar.

A adição de excipientes na formulação a ser liofilizada é, na maioria das vezes, necessária para evitar alterações do produto. Os excipientes conferem proteção para as

nanopartículas durante a liofilização e são adicionados para amenizar o estresse do processo nas nanoprtículas.

Excipientes podem ser divididos em crioprotetores e lioprotectores, dependendo se a proteção ocorre durante o congelamento ou a secagem, respectivamente. A existência de mecanismo de estabilização por crioprotetores durante a etapa de congelamento é a hipótese de isolamento que permite a separação de nanopartículas individuais dentro da fração não congelada, impedindo a agregação (ALLISON; MOLINA; ANCHORDOQUY, 2000). Os lioprotetores sugerem mecanismo de estabilização, servindo como substitutos da água durante a secagem, hipótese de reposição de água (CROWE JH; CROWE LM, 1993).

Também excipientes podem ser classificados em agentes de volume e estabilizadores. O agente de volume garante estabilidade física por ligação através de ligações de hidrogênio (CARPENTER; CROWE, 1989), formando uma matriz vítrea que preenche o espaço deixado pela remoção de água e impedindo a desestabilização do sistema por agregação (PASSOT et al., 2005).

O processo de liofilização consiste em três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária (WANG, 2000). Na primeira etapa, a parte líquida é congelada e cristais de gelo são formados. Durante o congelamento, o produto torna-se mais concentrado devido à transformação da água numa matriz sólida, mas o aumento da viscosidade impede a adicional cristalização da água (FRANKS, 1992). Na finalização do congelamento, podem-se diferenciar dois tipos de água; a porcentagem de água congelada é denominada “livre” e a outra porcentagem de água, que permanece no estado líquido, é denominada “ligada”.

A etapa da secagem primária baseia-se na sublimação da água livre do produto por meio da redução da pressão dentro da câmara de liofilização. Durante a secagem primária, o calor é transferido, a partir da prateleira, para o frasco, para logo ser conduzido até a superfície da amostra, onde se forma a frente de liofilização. O gelo sublima e o vapor de água formado passa através da porção seca do produto, formando poros que correspondem aos espaços que foram ocupados pelos cristais de gelo. No final, o vapor é condensado na câmara de condensação (ABDELWAHED et al., 2006).

Depois de finalizar a secagem primária, o conteúdo de umidade ainda é suficiente para causar instabilidade e mudar as propriedades do produto. Portanto, é necessária a última etapa, chamada secagem secundária ou desorção, na qual a água ligada é removida por aumento da

temperatura, geralmente maior do que a temperatura de secagem primária, e matendo-se a pressão reduzida até que o produto alcance a umidade residual desejada (CHANG; PATRO, 2004).

Para a otimização, o ciclo de liofilização é projetado para acelerar a secagem primária – já que é a etapa mais longa do processo de liofilização.

Ciclos de liofilização otimizados não só aumentam a estabilidade física do produto, mas também asseguram a eficiência da manufatura do processo. Portanto, a caracterização térmica de formulações é importante para se saber a máxima temperatura do produto permitida – que deverá ser mantida durante a secagem primária. Conhecendo a formulação, é possível desenvolver processo de liofilização com raciocínio científico, ao invés de simplesmente tentativa e erro (WANG, 2004). O valor da temperatura máxima está associado à temperatura de colapso (T_c). Produtos colapsados possuem teor de água residual elevado, longos tempos de reconstituição e podem também apresentar perda de atividade biológica.

A temperatura à qual a amostra congelada sofre colapso foi correlacionada fortemente com a temperatura de transição vítrea (T_g') para materiais amorfos (PIKAL; SHAH, 1990), com temperatura de eutética (T_{eut}) para materiais cristalinos (MACKENZIE, 1975). T_g' e T_{eut} podem ser determinados por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Microscopia Acoplada à Liofilização, respectivamente.

A primeira e talvez mais importante vantagem do processo seja a habilidade de secar o produto, mantendo sua estrutura original e atividade biológica (PITOMBO et al., 1994). As demais seriam: a facilidade de reconstituição (solubilidade), o aumento da vida de prateleira, a dosagem acurada e reproduzível e a possibilidade de manter a esterilidade do produto (MURGATROYD, 1997).

Uma vacina liofilizada, em comparação à líquida, possui inúmeras vantagens, tais como: a melhora na estabilidade do produto às variações de temperatura, aumentando sua vida de prateleira e possibilitando melhor logística do produto nos locais onde o acesso à rede refrigerada é difícil.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Observar a resposta imune verificada nas concentrações de IgG do soro e IgAs dos lavados das cavidades nasais de camundongo imunizado com HBsAg encapsulado em nanopartículas de quitosana liofilizada administradas por mecanismo de entrega intranasal.

2.2 Específicos

- a) Preparar e caracterizar nanopartículas obtidas a partir de quitosana e tri-polifosfato de sódio.
- b) Determinar as concentrações de IgG do soro e IgA dos lavados das cavidades nasais de camundongos imunizados com as nanopartículas.

Neste trabalho, todos os experimentos foram feitos com ovoalbumina, no intuito de treinamento nas técnicas de nanoencapsulamento, bem como na caracterização físico-química e no processo de liofilização, de modo a diminuir os erros de processo de obtenção da vacina de hepatite B não encapsulada. A escolha da ovoalbumina deu-se por sua alta abundância e seu baixo custo. O HBsAg foi minimamente manipulado nesta pesquisa, devido ao seu alto custo. Aliás, mesmo o seu pouco uso só foi viabilizado, neste trabalho, pela doação do Instituto Butantan.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação e carregamento das nanopartículas

Para a preparação das nanopartículas de quitosana, utilizaram-se quitosana de baixo peso molecular (Sigma – Aldrich), com grau de desacetilação de 75 a 85%, tri-polifosfato de sódio 85% (Sigma – Aldrich), antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg, fornecido pelo Instituto de Butantã) e ovoalbumina (OVA) (Sigma – Aldrich), ácido acético glacial (Synth), cloreto de sódio (Synth), hidróxido de sódio 1M (Synth). Em todos os experimentos, foi utilizada água ultrapurificada tipo I para a preparação das soluções.

A formação das nanopartículas foi realizada utilizando o método de geleificação iônica, pelo qual a quitosana é dissolvida em uma solução aquosa ácida para se obter sua forma catiônica. Uma solução do poliânion de TPP é logo agregada, gota a gota, sobre a solução de quitosana, sob constante agitação. Devido à complexação entre as substâncias carregadas opostamente, quitosana e TPP se unem, por interação eletrostática, para formação das nanopartículas (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA, AMINABHAVI 2004; CALVO et al. 1997).

Foi preparada quitosana diluída em uma solução de ácido acético a 1% em solução de cloreto de sódio 0,9% (massa/volume), a 2 mg/ml. A solução resultante foi previamente alcalinizada, com utilização de uma solução de NaOH 1M, para se obterem soluções de pH 5 e 5.5. A solução resultante foi filtrada em filtro Millipore de 0,45µm, para eliminar todo tipo de partículas e quitosana não solubilizada.

Na solução de TPP, à concentração de 1 mg/ml, em solução de cloreto de sódio 0,9% (massa/volume), foi adicionada a proteína modelo (OVA). A solução resultante foi previamente alcalinizada, com a utilização de solução de NaOH 1M, para se obter uma solução de pH 9. A solução resultante foi filtrada em filtro Millipore de 0,22µm, para eliminar partículas.

O processo de geleificação iônica ocorreu a partir da adição de 4 mL da solução de TPP em seringas de 5 mL, por gotejamento, a 6 mL de solução de quitosana em um béquer de 50 mL; foi realizada na proporção 3:1 quitosana/TPP (massa/massa). O gotejamento foi realizado à velocidade aproximada de 0,75 mL/mim, em temperatura ambiente, sob constante agitação magnética. Antes do gotejamento, a velocidade de agitação foi aumentada gradualmente até 750 rpm, para obter um vórtex de solução de quitosana.

Em cada experimento, foram elaboradas nanopartículas não carregadas e nanopartículas carregadas com OVA à concentração de 132 µg/mL. A concentração mencionada refere-se à proteína total na suspensão de nanopartículas (proteínas carregada e não-carregada).

Após a mistura das soluções, a suspensão foi mantida em agitação, a 750 rpm durante 60 minutos, à temperatura ambiente e depois centrifugada a 13.000 x g a 25 °C, durante 30 minutos, em microtubos de 2 mL. O sobrenadante foi guardado, para posterior análise de teor proteico, e o precipitado foi suspenso em água ultrapura.

Outro processo para produzir nanopartículas carregadas com OVA foi realizado. Mesmas concentrações de quitosana e TPP, com pH de 5 e 9, respectivamente, foram utilizadas, mas com a diferença de que o volume de nanopartículas produzido foi de 200 mL em um béquer de 1.000 mL, com agitação de 500 rpm, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Estas nanopartículas foram utilizadas para realizar 15 formulações com excipientes a concentrações diferentes.

3.2 Caracterização físico-química das nanopartículas

3.2.1 Espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS)

A distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi medida usando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), operado em ângulo de 90°. A série Zetasizer Nano realiza medições de tamanho usando um processo chamado espalhamento dinâmico da luz (DLS). As medições foram feitas com atenuador automático, à temperatura controlada de 25 ° C. Para cada amostra, foi realizada leitura com três repetições. O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas foi calculado a partir da intensidade da luz dispersa, com base na teoria de movimento Browniano e a equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h}$$

O DLS mede o movimento Browniano e relaciona isto com o tamanho das partículas. O método ilumina as nanopartículas com luz *laser* para analisar as flutuações de intensidade da luz dispersa. Os diâmetros médios e os índices de polidispersividade (IPD) foram estimados a partir das funções de autocorrelação (dados não mostrados), utilizando a análise cumulativa.

3.2.2 Potencial- ζ (*Laser Doppler Velocimetry-LDV*)

O Zetasizer Nano ZS90 calcula o potencial zeta (ζ), por determinação da mobilidade electroforética (U_E), aplicando a equação de Henry. A mobilidade electroforética é obtida através da realização de um ensaio de eletroforese sobre a amostra e mede a velocidade das partículas a *laser* usando *Laser Doppler Velocimetry* (LDV). O $f(ka) = 1.5$ é referido como a aproximação de Smoluchowski:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(ka)$$

em que η e ε são a viscosidade e a constante dielétrica, respetivamente, do solvente na temperatura de 25°C.

Cada medição do tamanho das nanopartículas e do potencial zeta foi repetida três vezes.

3.2.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis-NTA*)

As medições por NTA foram realizadas com um NanoSightNS300 (NanoSight, Amesbury, UK), equipado com uma câmara de amostra com *laser* de 640 nm. As amostras foram injetadas na câmara de amostras com seringas estéreis de 1 mL, até que o líquido chegasse à ponta do bocal. Todas as medidas foram realizadas à temperatura controlada de 25 °C, durante 90 segundos, e foram diluídas de 1:2.000. O *software* utilizado para capturar e analisar os dados foi a NTA 2.0 Build 127. Este *software* gera um arquivo de vídeo das nanopartículas e, em seguida, simultaneamente, identifica e rastreia o movimento de cada nanopartícula, quadro a quadro. O *software* de análise de imagem a determina a distância média percorrida por cada nanopartícula em direções x e y . O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas (d_h) foi calculado a partir relação com a distância percorrida ao longo de período de tempo definido pela equação de Stokes-Einstein revista:

$$\overline{(x,y)^2} = \frac{4kT}{3\pi\eta d_h}$$

Três medidas da mesma amostra foram realizadas para as nanopartículas de quitosana carregadas com ovoalbumina. As barras de erro mostradas nos gráficos de NTA foram obtidas pelo desvio padrão das medições diferentes de cada amostra. Os valores de diâmetros hidrodinâmicos médios e desvio padrão obtidos pelo *software* NTA correspondem aos valores aritméticos calculados com o tamanho de todas as partículas analisadas pelo *software*. Este

método foi usado para analisar as nanopartículas de quitosana com ovoalbumina antes e após a liofilização.

3.2.4 Eficiência de Encapsulação (E.E.)

A proteína modelo (OVA) foi dissolvida em solução de tri-polifosfato, como foi descrito acima; 4 mL de 1 mg/mL de tri-polifosfato foram lentamente adicionados, por gotejamento, a 6mL de solução de 2mg/mL de quitosana sob agitação magnética, a 750 rpm durante 60 minutos, à temperatura ambiente, para formação das nanopartículas. A seguir, as nanopartículas de quitosana foram separadas por centrifugação, a 13.000 x g a 25°C, por 30 minutos.

A concentração da proteína no sobrenadante foi quantificada, de forma indireta, por ensaio de proteína por BCA (Kit de Ensaio de Proteína BCA-Ácido Bicinconínico), utilizando um leitor de microplacas (Biotek – PowerWave XS2), com comprimento de onda de 562nm. BSA (*Bovine Serum Albumin*) foi utilizada como proteína padrão. A Eficiência de Encapsulação (EE) foi então calculada a partir da equação:

$$E.E. = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

onde *A* é a quantidade total da proteína (µg) inicial, *B* é quantidade livre da proteína (µg) no sobrenadante.

Para eliminar a interferência nas leituras, o sobrenadante das nanopartículas não carregadas foi utilizado como branco.

3.2.5 Microscopia de Força Atômica (MFA)

As imagens das nanopartículas de quitosana não carregadas e das nanopartículas de quitosana carregadas com a proteína modelo (OVA) foram coletadas por um Nanoscope comercial IIIa Multi-Modo de MFA (Veeco Instruments, CA), equipado com um escâner E, que foi operado em modo de contato intermitente, usando cantileverdesilício, com frequência de ressonância de 237,38 kHz.

O volume de 1mL das nanopartículas foi centrifugado a 13.000 x g a 25°C, por 30 minutos, em microtubos de 2 mL; os precipitados foram preparados em diluições para 1:100 com água ultrapurificada tipo I. 5µL de cada suspensão foram colocados sobre placas de silício.

As placas foram secadas por 18 h, à temperatura ambiente, para pronta análise. As análises dos dados foram realizadas com o *software* WSxM v5.0 Develop 6.5 (HORCAS et al., 2007).

3.3 Liofilização

3.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC)

As curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram obtidas através do equipamento marca Perkin Elmer precisely, DSC 4000. As amostras de suspensões de NPs-OVA e NPs-HBsAg foram centrifugadas a 13.000 x *g* a 25 °C, durante 30 minutos. NPs-OVA foram ressuspensos com soluções de glicina, a concentrações de 1%, 2,5% e 5%. NPs-HBsAg foram ressuspensos com soluções de trealose, sacarose, lactose e manitol 1%.

Foram utilizados recipientes (cadinhos) de alumínio contendo aproximadamente 4,5 mg de amostra. As análises foram submetidas a programa de resfriamento e aquecimento de 5 e 10 °C / mim, com isotermas de 3 minutos; as temperaturas iniciais para resfriamento e aquecimento foram de 25 °C e de -55 °C, respectivamente. A calibração do equipamento foi feita utilizando-se água destilada (ponto de fusão a 0°C e $\Delta H_{\text{fusão}} = 335 \text{ J g}^{-1}$). Para cada tipo de cadinho utilizado no experimento, um cadinho vazio foi utilizado como referência.

A análise térmica por DSC foi utilizada para a determinação da T_g' e T_{ent} das suspensões das nanopartículas. Todos os valores de T_g' foram considerados como sendo as temperaturas críticas durante o evento térmico (ponto médio), originadas pelo próprio programa do equipamento de DSC. As variações relativas à capacidade calorífica da T_g' (ΔC_p , in $\text{J g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$) foram calculadas.

3.3.2 Microscopia ótica acoplada à liofilização

A temperatura de colapso (T_c) das nanopartículas foi determinada através de microscópio acoplado a módulo de liofilização, Lyostat 2, modelo FDSCS 196, (Linkam Instruments, Surrey, UK), equipado com sistema de congelamento por nitrogênio líquido (LNP94/2) e controlador de temperatura programável (TMS94, Linkam). A pressão utilizada durante as análises foi de 150 mTorr, através de bomba de vácuo (Edwards E2M1.5, Linkam). Amostras de 0,7 μL foram colocadas sobre placas de quartzo de 16 mm, para minimizar gradientes térmicos, e cobertas com placas de vidro.

As amostras foram congeladas até $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a pressão do sistema reduzida. A observação direta do congelamento e da liofilização foi feita utilizando-se microscópio de luz polarizada Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão).

3.3.3 Liofilização

A liofilização foi realizada em liofilizador FTS Systems, modelo TDS-00209-A microprocessado com secador controlado de bandejas (Dura-Stop, Dura-Dry-MP); 2,0 mL das ressuspensões de nanopartículas de ovoalbumina foram diluídas às concentrações de glicina a 1%, 2,5% e 5% e uma parte das nanopartículas foi ressuspensa em água ultrapurificada tipo I; frascos de vidro de 10 mL foram preenchidos manualmente e parcialmente fechados com tampas de borracha.

Na etapa de congelamento, os frascos foram transferidos para as prateleiras de liofilizador, à temperatura final de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 4 h. A secagem primária foi realizada em $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura do produto), pressão da câmara a 100 mTorr e temperatura do condensador de $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. A secagem secundária foi conduzida a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura do produto), pressão da câmara a 100 mTorr e temperatura do condensador de $-90 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Análises morfológicas das nanopartículas antes de liofilizadas e após reconstituídas das amostras liofilizadas foram realizadas por MEV. 5 uL das nanossuspensões foram colocados sobre uma superfície de placa de silício e revestidos com uma fina camada de ouro. Assim também, as pastilhas das formulações de nanopartículas, com as diferentes concentrações de glicina carregadas de OVA foram analisadas. Micrografias foram obtidas, utilizando um SEM (Quanta 250 FEI com software XT microscópio). As amostras foram examinadas usando-se a voltagem de aceleração de elétrons de 20 keV.

3.4 Estudo *in vivo*

3.4.1 Imunização em camundongos

Na imunização, foram utilizados 30 camundongos BALB/c, do sexo masculino, com 4 semanas de idade, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP, projeto aprovado pela Comissão De Ética No Uso De Animais no dia 11 de novembro de 2014, protocolo CEUA/FCF 111.2014-P483. Os animais foram divididos em grupos:

- NPs_(liq.) - Grupo de 5 animais que receberam somente as nanopartículas de quitosana não carregadas, na forma líquida por via nasal.
- NPs-HBsAg_(liq.) - Grupo de 5 animais que receberam as nanopartículas de quitosana carregadas com HBsAg, na forma líquida por via nasal.
- NPs_(lio) - Grupo de 5 animais que receberam somente as nanopartículas de quitosana não carregadas, na forma liofilizada por via nasal.
- NPs-HBsAg_(lio) - Grupo de 5 animais que receberam as nanopartículas de quitosana com HBsAg, na forma liofilizada por via nasal.
- Crioprotetor_(lio) - Grupo de 5 animais que receberam somente crioprotetor, na forma liofilizada por via nasal.
- HBsAg IP_(liq.) - Grupo de 5 animais que receberam HBsAg por via intraperitoneal.

Os grupos receberam três imunizações por via nasal com intervalo de 2 semanas entre as imunizações. Nas imunizações via nasal, foram administradas as nanopartículas liofilizadas contendo 10 µg de antígeno, 5 µg em cada narina. Nas inoculações intraperitoneais, foram aplicados 100 µL de HBsAg a 100 µg/mL

3.4.2 Coleta

As coletas de sangue, para a obtenção do soro, e da secreção nasal ocorreram de acordo com o **Quadro 2**.

Quadro 2. Cronograma de imunização e de coleta do sangue em camundongos

Dia	0	7	14	21	28	35
Inoculação	x		x		x	
Coleta (sangue)		x		x		x
Coleta (muconasal)						x

3.4.2.1 Sangue

Para obtenção do soro, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (100mg/Kg) e cloridrato de xilasina (10mg/Kg) intraperitoneal. O sangue foi coletado pelo plexo mandibular e via pulsão cardíaca ao final do experimento. Após a obtenção do soro, este foi armazenado em freezer para análises de IgG, IgG1 e IgG2a pelo método colorimétrico de Elisa (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*).

3.4.2.2 Secreção nasal

A secreção nasal foi coletada pela lavagem da cavidade nasal com solução de 200 µL de albumina sérica bovina (BSA-*bovine serum albumin*) a 1%, em PBS, com 0,1 % inibidores de protease, a qual foi forçada a passar da traqueia até as narinas do animal, submetidos, previamente, a eutanásia por dióxido de carbono. Posteriormente, o lavado foi centrifugado em 6.000 x g por 15 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante armazenado em freezer para análise de IgA por Elisa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização das nanopartículas de quitosana

A metodologia de geleificação iônica, aplicada para a obtenção de suspensões de nanopartículas de quitosana (CALVO et al., 1997), mostrou-se eficiente após as análises da determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (HDM) e dos índices de polidispersividade (IPd) e potencial ζ (Pot- ζ) que foram obtidos por leitura no Zetasizer Nano ZS90.

Pela análise visual, as suspensões de nanopartículas formadas podem ser classificadas como soluções claras, agregadas e suspensões opalescentes (Quadro 3). Soluções claras se formam quando as concentrações de quitosana e TPP são muito pequenas. Os agregados são formados quando as concentrações são muito grandes.

Todas as formulações de quitosana foram preparadas com 2 mg/mL de quitosana. Nanopartículas preparadas com 1 e 1,3 mg/mL de TPP formaram suspensões opalescentes.

O diâmetro hidrodinâmico foi medido por DLS. Nanopartículas de quitosana com diâmetro hidrodinâmico médio de $186,4 \pm 1,6$ nm foram obtidas quando a concentração de quitosana e TPP foi de 2 e 1 mg/mL, respectivamente. Potencial ζ de $+16,4 \pm 0,3$ mV.

Apesar de ter se obtido suspensão opalescente, com concentrações de quitosana e TPP de 2 e 1,3 mg/mL, respectivamente, os resultados não foram os esperados. O diâmetro hidrodinâmico médio de $486,4 \pm 8,7$ nm, com IPd de $0,355 \pm 0,05$, indica distribuição de diâmetro bimodal. Além disso, o potencial ζ foi afetado pela pequena redução a $+13,3 \pm 1$ mV.

Concentrações superiores de TPP formaram agregados de partículas devido ao aumento de ligações cátions de TPP com os grupos aminos livres da cadeia de quitosana. Com a diminuição das cargas da quitosana, as nanopartículas sofrem redução da repulsão eletroestática, produzindo agregados.

Quadro 3. Condições de preparo para a formação das nanopartículas de quitosana.

QS (mg/mL)	TPP (mg/mL)					
	1	1,3	1,75	2,2	2,65	3,1
2	✓	✓	✗	✗	✗	✗

✓, suspensões opalescentes; ✗, agregados

As suspensões opalescentes (Figura 10) são encontradas quando a quitosana e as concentrações TPP são adequadas para formação de partículas coloidais (LIU; GAO, 2009).

Estas características são devido à formação de nanogéis. O termo “nanogéis” define dispersões aquosas de partículas coloidais formadas por redes de polímeros reticulados fisicamente ou quimicamente de tamanho nanométrico (KABANOV; VINOGRADOV, 2009).

Figura 10. Análise visual das amostras com aparência opalescência semelhante (opalescência só foi estimada visualmente). (a) NPs-vazia. (b) NPs-OVA. (c) NPs-HBsAg.

As nanopartículas de quitosana de aparência opalescente, carregadas com OVA e HBsAg, e as nanopartículas não carregadas foram formadas espontaneamente, por adição de 4 mL de solução de tri-polifosfato de sódio/proteína em 6 mL da solução catiônica de quitosana a 23 ± 1 °C, sob agitação magnética.

Nanopartículas com quitosana e TPP formam nanogéis reticulados ionicamenteme, diante ligações de hidrogênios com as aminas livres das moléculas de quitosana (GAN; WANG, 2007). Então, interações iônicas entre as cargas negativas do TPP, como agente de reticulação, e grupos carregados positivamente da quitosana são as principais interações dentro da rede (Figura 11). Além disso, interações adicionais podem ocorrer dentro da rede, tais como interações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio intercadeias, devido a repulsão eletrostática reduzida após a neutralização da quitosana por TPP (BERGER et al., 2004).

Figura 11. Sínteses de nanogéis por reticulação iônica das cadeias de quitosana com o TPP

A Tabela 1 apresenta resultados de diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de diâmetro hidrodinâmico, medidos por DLS e NTA, das nanopartículas. As NPs-vazias mostraram diâmetros hidrodinâmicos médios de 193 ± 12 nm; NPs-OVA mostraram diâmetros hidrodinâmicos médios de $206,8 \pm 2$ nm e NPs-HBsAg mostraram diâmetros hidrodinâmicos médios de $243,1 \pm 5$ nm.

As NPs-OVA, pelo método de incorporação, incrementaram o diâmetro médio hidrodinâmico medido por DLS em alguns nanômetros em comparação as NPs-vazia. A presença da OVA teve pequena influência no diâmetro das partículas, aumentando-as em alguns poucos nanômetros (RAMPINO et al., 2013). Resultados diferentes foram obtidos com as NPs-HBsAg com variação do diâmetro de 50 nm.

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de diâmetro hidrodinâmico, medidos por DLS e NTA das nanopartículas.

NPs	DLS		NTA		
	DHM (nm)	IPd	DHM (nm)	D.P.	Concentração (E9 NPs/mL)
Vazia	193 ± 12	0,15 ± 0,01	193,7 ± 4,2	84,1 ± 4,7	2,10 ± 0,03
OVA	206,8 ± 2	0,16 ± 0,01	210 ± 10,2	75,0 ± 3,2	1,03 ± 0,01
HBsAg	243,1 ± 5	0,15 ± 0,02	243,5 ± 1,8	75,2 ± 2,9	3,34 ± 0,10

DHM Diâmetro hidrodinâmico médio; IPd Índice de polidispersidade; D.P. desvio padrão calculado pelo *software* NTA *Nanoparticle Tracking Analysis*; NPs Nanopartículas; DLS *Dynamic Light Scattering*; OVA Ovoalbumina; HBsAg Antígeno de superfície da Hepatite B. Os números representam valores médios ± desvio padrão (n = 3 medições).

Figura 12. Gráfica de distribuição do diâmetro hidrodinâmico por DLS das nanopartículas vazias (NPs-Vazia), nanopartículas carregadas com ovoalbumina (NPs-OVA) e nanopartículas carregadas com antígeno de superfície da hepatite B (NPs-HBsAg).

Figura 13. Gráfica de distribuição do diâmetro hidrodinâmico por NTA das nanopartículas vazias (NPs-Vazia), nanopartículas carregadas com ovoalbumina (NPs-OVA) e nanopartículas carregadas com antígeno de superfície da hepatite B (NPs-HBsAg)

Resultados similares, por DLS, foram obtidos por NTA (Figuras 12 e 13). Ambas as técnicas mostram bom dimensionamento e distribuição estreita. Ao contrário do DLS, NTA permite visualização da amostra indireta (Figura 14) e determina as concentrações aproximadas de nanopartículas. As NPs-vazias, com diâmetro hidrodinâmico médio de $193,7 \pm 4,2$ nm, medidos por NTA, mostraram picos de 135, 185, e 275 nm. Três picos foram observados com NTA, enquanto DLS mostrou apenas um pico. Resultados similares obtidos mostram alta resolução. NTA tem muito maior poder de resolução para amostras multimodais e polidispersas (TROIBER et al., 2013).

Figura 14. Amostra fotográfica do vídeo gerado no rastreamento das nanopartículas por NTA. (a) NPs-vazia. (b) NPs-OVA. (c) NPs-HBsag

Foi analisada a influência do pH no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana. A Figura 15 mostra o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas carregadas com HBsAg em relação ao pH do meio. O diâmetro das nanopartículas mostrou aumento quando o pH mudou de 6.5 para 9.7. Este aumento é devido à diminuição da protonação da quitosana; portanto, induz a diminuição da densidade de reticulação, permitindo o inchamento das nanopartículas.

O aumento do diâmetro hidrodinâmico médio pode ser explicado também por redução do potencial zeta e, por conseguinte, pela aglomeração das nanopartículas. Essa aglomeração forma nanopartículas maiores, que são detectadas pelo aparelho. Isto é evidenciado pelo aumento do índice de polidispersividade de 0,139 a 0,449. O aumento deste valor indica mudança da distribuição do diâmetro, de hidrodinâmico para bimodal. Valores de IPd acima de 0,2 mostram distribuição de diâmetro hidrodinâmico médio bimodal ou com desvio padrão da curva aumentado.

Figura 15. Diâmetro hidrodinâmico médio por DLS das nanopartículas carregadas com HBsAg como uma função do pH

Contrariamente, evidente diminuição do diâmetro se deu quando o pH mudou de 9.7 para 12,6, que pode ser observado na Figura 16, que mostra o aumento do pH do meio com a diminuição do potencial zeta. O potencial zeta negativo de nanopartículas de quitosana foi

devido a deprotonação dos grupos hidróxilos presentes na cadeia de quitosana, transformando as nanopartículas com carga de superfície negativa. A mudança, a princípio, causou instabilidade das nanopartículas. Com maior aumento do pH do meio, as nanopartículas alcançaram o equilíbrio, evidenciado por diminuição do diâmetro hidrodinâmico médio e do IPd (Figura 15). As nanopartículas aglomeradas, ao estarem carregadas negativamente, produzem repulsão entre si; por conseguinte, diminuição do diâmetro hidrodinâmico médio.

Segundo a Figura 16, as nanopartículas apresentam ponto isoelétrico próximo (pI) a 6.4 – este resultado é similar ao $pK_a = 6.5$ da quitosana, em que os grupos aminos protonados e não protonados das cadeias de quitosana localizadas na superfície das nanopartículas são os principais grupos que brindam a natureza positiva dependente de pH. Portanto, à medida que a rede de quitosana contém grupos ionizáveis, uma alteração do pH vai modificar o estado da rede elétrica e, assim, o comportamento do inchamento.

Figura 16. Potencial Zeta das nanopartículas carregadas com HBsAg como uma função do pH.

Experimento adicional foi realizado sobre a influência da diluição das nanopartículas na determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (Figura 17). No experimento, as formulações de nanopartículas foram diluídas sucessivamente, à razão de 1:2, com água ultrapura. A Figura

16 mostra o aumento exponencial do diâmetro hidrodinâmico médio com o aumento da diluição das nanopartículas.

O diâmetro hidrodinâmico por DLS é obtido utilizando-se uma variação da equação de Stokes-Einstein, desenvolvida sobre o pressuposto de esferas rígidas hipotéticas. O coeficiente de difusão (D) é calculado. Então, com o aumento da diluição, as nanopartículas ficam mais livres para se movimentar. Com maiores concentrações de nanopartículas, existe maior interação partícula-partícula – o que produz uma difusão restrita das mesmas. Conforme a equação, o coeficiente de difusão aumenta e, portanto, o diâmetro hidrodinâmico será maior.

A despeito do acima exposto, isso não aconteceu nos resultados apresentados da Figura 17, já que ocorreu aumento do diâmetro hidrodinâmico.

Lembrando os componentes da formulação, esta possui, como diluente, cloreto de sódio 0,9 %. Essa concentração salina é uma solução isotônica, mas, quando foram realizadas as diluições seriadas, a concentração de cloreto de sódio diminuiu. A presença de TPP dentro das nanopartículas gera diferencial de osmoralidade; o crescimento no tamanho das partículas, possivelmente, contribuiu para o influxo de água para as nanopartículas por osmose – o que fez as nanopartículas expandirem a matriz polimérica (TSAI et al., 2011).

Figura 17. Diâmetro hidrodinâmico médio por DLS como uma função da diluição de nanopartículas.

Partículas com cargas na superfície desenvolvem migração de contra íons (íons de carga oposta à da partícula) na região interfacial da superfície. Assim, uma dupla camada elétrica existe ao redor de cada partícula. A primeira camada, onde os contra íons estão unidos fortemente à partícula, é denominada *Stern layer* e; a segunda camada difusa, região onde os contra íons estão menos firmemente ligados, é chamada *outer layer*.

Dentro da camada difusa, há um limite teórico dentro do qual os íons e as partículas formam uma entidade estável, chamada de cisalhamento hidrodinâmico. Quando uma partícula se move, íons dentro do limite teórico viajam com ele, mas quaisquer íons, além do limite, não viajam com a partícula. O potencial que existe neste limite é conhecido como o potencial ζ .

O potencial ζ , que é a carga da dupla camada de uma partícula, pode influenciar fortemente sua estabilidade em suspensão, por meio de repulsão eletrostática entre elas. Além disso, pode determinar a interação *in vivo* de nanopartículas com a membrana celular, que é carregada negativamente.

Os resultados de potencial ζ das diferentes formulações mostraram que as superfícies das nanopartículas de quitosana têm carga positiva de $+ 16,3 \pm 0,9$, $+ 15,5 \pm 0,4$, $+20,6 \pm 0,2$ mV para NPs-vazia, NPs-OVA e NPs-HBsAg (Tabela 2), respectivamente, sob as condições de medição investigadas. A solução das formulações contém cloreto de sódio 0,9%, um sal com íons monovalentes. Pode-se observar que, ao aumentar a diluição das nanopartículas, portanto, diminuição da força iônica, há aumento do potencial ζ . Estudos realizados por outros autores concluíram que existe relação linear entre o potencial ζ e a concentração salina de íons monovalentes em formulações (KIRBY; HASSELBRINK, 2004). Portanto, o potencial ζ resultante é influenciado pelo pH e pela força iônica do meio – parâmetros importantes a se considerar quando se quer estabilidade de formulações farmacêuticas.

Tabela 2. Medição de potencial ζ das formulações de nanopartículas.

NPs	Pot- $\zeta \pm$ D.P. (mV)
Vazia	$+ 16,3 \pm 0,9$
OVA	$+ 15,5 \pm 0,4$
HBsAg	$+ 20,6 \pm 0,2$

NPs Nanopartículas; Pot- ζ Potencial zeta; D.P. desvio padrão;
OVA Ovoalbumina; HBsAg Antígeno de superfície da hepatite B.

4.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação (E.E.)

Duas proteínas diferentes foram carregadas em nanopartículas de quitosana: ovoalbumina (OVA) e antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). Como foi dito, as proteínas usadas aumentaram em poucos nanômetros o diâmetro hidrodinâmico médio; isto pode ser atribuído pela interação iônica entre a quitosana carregada positivamente e as proteínas carregadas negativamente, sob as condições de preparação das nanopartículas (quitosana pH ~ 5). Cargas opostas geram redução na repulsão elétrica entre os biopolímeros de quitosana e, portanto, estas alterações do estado elétrico fazem com que as nanopartículas encolham (RAMPINO et al., 2013).

Para determinação da Eficiência de Encapsulação, se realizou curva padrão com BSA (Figura 18). A encapsulação da OVA e do HBsAg mostrou eficiências de $31 \pm 1 \%$ e $81,6 \pm 2 \%$, respectivamente (Tabela 3). Resultados maiores de Eficiência de Encapsulação (48, 57 e 76 %) foram obtidos por outros autores (RAMPINO et al., 2013), com concentrações maiores de OVA (200, 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$).

Uma possível hipótese para melhora a Eficiência de Encapsulação é aumentando o pH da quitosana de 5.0 para 5.5. Neste pH a quitosana ainda será solúvel e não se precipitará, porque está longe do $\text{pK}_a = 6.5$. Em pH 5.5 da solução de quitosana, o pH do meio ficará mais distante do pI da OVA, com, portanto, menor neutralização de algumas cargas superficiais da proteína; assim, a maior atração elétrica entre proteína-quitosana gerará aumento da Eficiência de Encapsulação.

Resultados de Eficiência de Encapsulação entre OVA e HBsAg foram muito diferentes. NPs-HBsAg mostraram resultados superiores. O método de encapsulação foi o mesmo para as duas proteínas e a concentração com pequenas diferenças. As diferenças de resultados podem ser devidas porque as massas molares das proteínas foram diferentes (HBsAg 24 kDa e OVA 43 kDa), apesar de que os pI das proteínas são próximos a 4,5. Alguns autores (JARUDILOKKUL; TONGTHAMMACHAT; BOONAMNUAYVITTAYA, 2011) demonstraram que a Eficiência de Encapsulação diminui com o aumento das massas molares de proteínas.

Tabela 3. Eficiência de Encapsulação das NPs-OVA e NPs-HBsAg.

NPs	Proteína inicial	Proteína no sobrenadante (µg)	EE (%) ± D.P.
	(µg)	± D.P.	
OVA	132	79,4 ± 1,7	31,0 ± 1
HBsAg	140	25,8 ± 2,3	81,6 ± 2

NPs Nanopartículas; D.P. desvio padrão; OVA Ovoalbumina; HBsAg Antígeno de superfície da hepatite B; EE Eficiência de Encapsulação.

Figura 18. Curva da proteína padrão (Proteína Sérica Bovina – BSA/Sigma-Aldrich), para determinar a Eficácia de Encapsulação da ovoalbumina.

4.3 Morfologia das nanopartículas

Foram analisadas as estruturas topográficas das nanopartículas por MFA, para se compreender a configuração exata e, também, para se verificar se as nanopartículas eram mais ou menos homogêneas em tamanho e se eram de forma esférica. Não foram observadas aglomerações entre nanopartículas. A análise topográfica permite a visualização em três dimensões. Para análises de NPs-Vazia e NPs-OVA, foram realizados MFA no modo de contato intermitente.

As amostras foram analisadas em estado seco sobre placas de silício. Os resultados mostraram que a diferença dimensional entre as nanopartículas de quitosana foram reais e não um artefato das análises de DLS (NASTI et al., 2009); esta discrepância no tamanho das nanopartículas de quitosana em meio aquoso, mediante o método de DLS, proporciona dados de diâmetro hidrodinâmico; por enquanto, o MFA proporciona dados do diâmetro das nanopartículas no estado seco.

As imagens indicaram uma morfologia pseudoesférica nas NPs-vazia (Figura 19)(LI; HUANG, 2012); em contrapartida, as NPs-OVA foram afetadas nas suas estruturas morfológicas (Figura 20). As Figuras 19c e 20c mostram análises de perfil de *cross section* mediante os programas WSxM v5.0 Develop 6.5 e Gwyddion 2.36 e indicam alta relação de dimensões entre a varredura rápida e a varredura lenta de todas as nanopartículas. A diferença é devida ao colapso das nanopartículas no estado seco sobre a superfície da placa de silício. Além disso, o perfil das NPs-OVA mostra uma superfície mais rugosa e irregular, quando comparado com o perfil de *cross section* das NPs-vazia – que possui uma superfície mais lisa.

Figura 19. Imagens topográficas detalhadas de MFA das NPs-vazia. A medição foi realizada em modo contato intermitente. (a) Imagem 3D com *descan size* 1 μm x 1 μm . (b) Imagem 3D de uma nanopartícula. (c) Perfil de *cross section* das nanopartículas.

Figura 20. Imagens topográficas detalhadas de MFA das NPs-OVA. A medição foi realizada em modo contato intermitente. (a) Imagem 3D com *descan size* 3 μm x 3 μm . (b) Imagem 3D de uma nanopartícula. (c) Perfil de *cross section* das nanopartículas.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostra também análises de tamanho e morfologia das nanopartículas no estado seco, onde a variação de tamanho foi menor do que 1 μm ; o tamanho médio das NPs corresponde bem ao diâmetro hidrodinâmico médio encontrado com DLS e NTA (Figura 21). NPs-Vazia (Figura 21a) apresentaram estrutura morfologia uniforme e definida; resultados contrários foram obtidos quando as nanopartículas foram encapsuladas com as proteínas. Foi evidente a mudança da morfologia das NPs-OVA e, mais ainda, das NPs-HBsAg. NPs-Vazia e NPs-OVA (Figura 21a e 21b) mostraram superfícies lisas, mas encapsulação de HBsAg tornou as superfícies das nanopartículas rugosas (Figura 21c). Todos os resultados microscópicos das nanopartículas não formaram agregados.

Portanto, é evidente que as nanopartículas de quitosana sofrem alterações da estrutura morfológica e da superfície quando são encapsuladas com proteínas; estes resultados são evidenciados por estudos microscópicos, tais como MFA e MEV. É de vital importância estes tipos de análises, porque são estudos confirmatórios das escalas nanométricas das formulações que foram analisadas por DLS ou por NTA; mais importantes ainda, porque nos brindam com informações quanto à estrutura das nanopartículas.

Figura 21. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas. (a) NPs-Vazia. (b) NPs-OVA. (c) NPs-HBsAg.

4.4 Liofilização

A etapa de secagem primária da liofilização é o passo mais demorado e de maior gasto de energia. Por isso, é feita a tentativa de minimizar a sua duração, ao realizar a secagem primária à temperatura mais elevada possível (KUMAR; BAHETI; BANSAL, 2013). Portanto, a temperatura de secagem primária deve ser menor do que a temperatura de transição vítrea (T_g), para assegurar a integridade do produto, pois a secagem acima dessa temperatura poderia conduzir ao colapso do liofilizado. Por conta disso, a determinação da T_g' é necessária para se desenvolver um ciclo de liofilização energeticamente eficiente e otimizado.

O colapso durante o processo de liofilização de um produto impede a passagem da água sublimada da interface; como resultado, o produto final tende a reter mais conteúdo de umidade do que o produto liofilizado sem colapso. Além disso, este colapso pode possivelmente perturbar a estruturas de proteínas.

Foi encontrada uma forte relação da T_g' com a temperatura na qual um produto congelado colapsa (CHANG; PATRO, 2004); portanto, para a boa liofilização, são necessárias formulações com uma alta T_g' . A T_g' de uma formulação pode ser incrementada por adição de excipientes com maior T_g' .

A T_g' pode ser determinada por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Esta técnica termoanalítica monitora a variação de entalpia da amostra em relação a um material de referência termicamente inerte sob uma programação controlada de temperatura.

Para os experimentos, foram obtidas curvas de DSC por compensação de potência, no qual a amostra e a referência sofrem troca de calor com o forno. Este procedimento é necessário

para observar transições de fases de baixa energia e eventos de recristalização associados a produtos que serão submetidos à liofilização em condições de temperatura diversas.

Na etapa do congelamento, do processo de liofilização, caso o soluto apresente cristalização total na solução, a temperatura máxima permitida durante a secagem primária é a temperatura eutética (T_{eut}). Caso contrário, ocorrerá a fusão (passagem para a fase líquida) da matriz congelada, ocasionando, consequentemente, a perda do produto.

4.4.1 Análise térmica das NPs-OVA

As amostras de NPs-OVA foram resfriadas até temperatura final de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. A Figura 22 mostra um pico endotérmico não resolvido perto de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$; esse evento pode ser devido à fusão dos cristais de gelo (T_m). Entende-se por temperatura de fusão àquela na qual os cristais de gelo passam ao estado líquido.

Figura 22. Curva DSC obtida na célula DSC com fluxo de calor até $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 de NPs-OVA.

A Figura 22 mostra as determinações da T_g' das NPs-OVA. Diferentes temperaturas podem ser consideradas para a determinação da T_g' . O ponto inicial do evento térmico (T_{g0}), o ponto médio (T_{gm}) ou ponto final (T_{ge}). Dos resultados obtidos, a T_g' foi expressa como sendo o ponto médio.

Durante a etapa de aquecimento, nas amostras de NPs-OVA, observou-se mudança na linha base da curva de DSC a $-53,7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta mudança está relacionada com a T_g' .

A Figura 23 mostra a curva de DSC das NPs-OVA que foram suplementadas com três concentrações de glicina (1%, 2,5 % e 5%). A curva DSC apresentou dois picos endotérmicos. O maior pico representa a temperatura da fusão dos cristais de gelo (T_m). Outro pico, menor, mostra uma T_{eut} ; este evento térmico é característico da glicina, de acordo com dados da literatura (CHONGPRASERT; KNOPP; NAIL, 2001). Nanopartículas suplementadas com as diferentes concentrações de glicina apresentaram picos próximos da T_{eut} entre si.

Figura 23. Curva DSC obtida na célula DSC de NPs-OVA suplementadas com várias concentrações de glicina. As amostras foram esfriadas até -60°C a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e posteriormente aquecidas até 25°C com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 .

As formulações com glicina foram analisadas para determinar outros eventos durante o aquecimento. A Figura 24 mostra as curvas de aquecimento de DSC das formulações com glicina. As amostras foram congeladas a -60°C e logo aquecidas até 20°C . Durante o aquecimento, as formulações de NPs-OVA glicina 1% e 2,5% apresentaram temperaturas de devitrificação (T_d) a $-24,1^{\circ}\text{C}$ e $-25,8^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Contrariamente, nas NPs-Ova glicina 5%, esta temperatura de devitrificação desapareceu.

O sinal de devitrificação aparece quando um excipiente forma um vidro metastável ou duplamente instável, durante o processo de congelamento, mas cristaliza durante um processo de reaquecimento (CHANG; PATRO, 2004). Após o processo de *annealing*, é possível que a T_g' dos compostos amorfos incremente-se.

Nanopartículas formuladas com glicina mostraram T_g' em média de $-15,7^\circ\text{C}$, os resultados de T_g' foram próximos. Nessas concentrações, as formulações apresentam as características térmicas próprias da glicina e, portanto, não têm interação com as nanopartículas.

Figura 24. Curva DSC obtida na célula DSC de NPs-OVA suplementadas com várias concentrações de glicina. As amostras foram esfriadas até -60°C a $5^\circ\text{C}/\text{min}$ e posteriormente aquecidas até 25°C , com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 .

As NPs-OVA formuladas com manitol (1%, 2,5% e 5%) não só mostraram T_g' em média de -31°C , como também mostraram um sinal de devitrificação (Figura 25), localizada após a transição, chamada temperatura de devitrificação (T_d). Mesmo evento ocorreu com glicina 1% e 2,5%.

Figura 25. Curvas DSC obtidas na célula DSC com fluxo de calor até 25 °C e razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂ de NPs-OVA com manitol.

Estudo complementar de excipientes a diferentes concentrações para liofilização de NPs-OVA foi realizado. Análises térmicas por DSC das nanopartículas de quitosana carregadas com OVA foram formuladas com manitol, sacarose, trealose e lactose a diferentes concentrações. Para os estudos de liofilização, foram preparadas três concentrações (1%, 2,5% e 5%) de cada excipiente. As curvas de DSC apresentaram transição vítrea a diferentes temperaturas, segundo o excipiente utilizado. Cada formulação mostrou T_g' superiores a -36°C e, portanto, como foi mencionado, a secagem primária deve ser realizada abaixo desta temperatura (Figuras 26, 27 e 28).

Figura 26. Curva DSC obtida na célula DSC com fluxo de calor até 25 °C e razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂ de NPs-OVA com trealose.

Figura 27. Curva DSC obtida na célula DSC com fluxo de calor até 25 °C e razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂ de NPs-OVA com sacarose.

Figura 28. Curva DSC obtida na célula DSC com fluxo de calor até 25 °C e razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂ de NPs-OVA com lactose.

A microscopia ótica acoplada à liofilização (FDM) é uma excelente ferramenta para comparação dos resultados de DSC. A vantagem é que proporciona imagens em tempo real, as quais podem ser vistas por nossos próprios olhos, durante as etapas de congelamento e secagem (WANG, 2004).

Foi realizada a microscopia ótica acoplada à liofilização para determinar a temperatura de colapso (T_c) das NPs-OVA não formuladas; obtiveram-se temperaturas de microcolapso e macrocolapso de -46,6 e -44,4 °C, respectivamente (Figura 29).

As NPs-OVA glicina 1 % mostraram temperaturas de microcolapso de -28,5 °C e macrocolapso de -25,2 °C (Figura 30). As NPs-OVA glicina 2,5 % mostraram temperaturas de microcolapso de -10,6 °C e macrocolapso de -7,3 °C (Figura 31) e as NPs-OVA glicina 5 % mostraram temperaturas de microcolapso de -7,5 °C e macrocolapso de -6,5 °C (Figura 32).

O aumento das concentrações de glicina permitiu o aumento das temperaturas de micro e macrocolapso (Tabela 4). Houve aumento significativo com as formulações de 2,5% e 5% de glicina. Estes valores superiores de T_g' permitiram temperaturas de trabalho para liofilização muito altas para a secagem primária.

As imagens obtidas permitiram visualizar, em tempo real, o que acontece com as formulações submetidas à razão de aquecimento constante. As variações de temperatura à baixa pressão permitiram a formação da frente de liofilização. Apesar das altas temperaturas, as formulações de glicina formaram uma matriz sólida estável (região escura).

Tabela 4. Valores dos eventos térmicos das diferentes formulações das NPs-OVA analisadas por microscopia ótica acoplada à liofilização.

NPs-OVA	Eventos térmicos (°C)		
	Cristalização	Microcolapsos	Macrocolapsos
Sem glicina	-21,0	-46,6	-44,4
Glicina 1%	-23,5	-28,5	-25,2
Glicina 2,5%	-24,2	-10,6	-7,3
Glicina 5%	-19,5	-7,5	-6,5

NPs Nanopartículas.

Figura 29. Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA sem glicina. (a) Cristalização da amostra. (b) Formação da frente da liofilização, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (c) Microcolapsos. (d) Microcolapsos bastante visíveis. (e) Macrocolapsos. (f) Completo colapso da amostra.

Figura 30. Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA glicina 1%. (a) Amostra no estado líquido. (b) Cristalização da amostra. (c) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (d) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (e) Microcolapsos. (f) Macrocolapsos.

Figura 31. Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA glicina 2,5%. (a) Amostra no estado líquido. (b) Cristalização da amostra. (c) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (d) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (e) Microcolapsos. (f) Macrocolapsos.

Figura 32. Imagens das diferentes etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA glicina 5%. (a) Amostra no estado líquido. (b) Cristalização da amostra. (c) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (d) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (e) Microcolapsos. (f) Macrocolapsos.

As Figuras 33-41 mostram a aparência macroscópica das formulações com sacarose, trealose e lactose. Nas formulações de 1% dos excipientes, a matriz congelada apresenta-se mais clara, isto é devido ao conteúdo menor de sólidos totais comparado às formulações de 2,5% e 5% de excipientes. Assim, a matriz congelada e a matriz liofilizada apresentam mais espaços brancos quando formuladas com excipientes a 1%.

Um evento importante durante o processo foi que algumas formulações, durante a sublimação da água, mostraram pequenos encolhimentos da amostra. Isto foi intensificado quando se sobrepassava a temperatura de colapso da amostra. Tal evento acontece quando as pastilhas liofilizadas não acompanham o bom processo de liofilização – como se verá mais adiante.

Figura 33. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA sacarose 1%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

Figura 34. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA sacarose 2,5%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

Figura 35. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA sacarose 5%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

Figura 36. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA trealose 1%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

Figura 37. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA trealose 2,5%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

Figura 38. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA trealose 5%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

Figura 39. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA lactose 1%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

Figura 40. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA lactose 2,5%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

Figura 41. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização das NPs-OVA lactose 5%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

4.4.2 Análise térmica das NPs-HBsAg

Foram realizados estudos térmicos para as NPs-HBsAg. Diferentes excipientes foram usados para as caracterizações. Foram realizadas análises térmicas por dissacarídeos, como lactose, trealose e sacarose, que foram suplementados na concentração de 5%. Razão de aquecimento a 10 °C/mim (Figura 42). Resultados similares foram obtidos nas formulações de NPs-OVA suplementadas com lactose, trealose e sacarose à concentração de 5%.

A suplementação dos dissacarídeos mostrou aumento das T_g' para cada formulação. Pode-se evidenciar que os resultados obtidos são iguais às formulações de NPs-OVA.

Um tratamento térmico em DSC, chamado de *annealing*, foi utilizado na formulação de NPs-HBsAg suplementadas com manitol. Este tratamento é empregado na etapa de congelamento, onde a amostra congelada é reaquecida até temperatura específica, por tempo específico, geralmente acima da T_g' do material congelado, mas abaixo da temperatura de fusão dos cristais de gelo na amostra. O *annealing* é utilizado porque confere maior homogeneidade na distribuição de tamanho dos compostos cristalinos.

Figura 42. Curvas DSC obtidas na célula DSC com fluxo de calor até 25 °C e razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂ das NPs-HBsAg suplementadas com lactose, trealose e sacarose a 5%.

Figura 43. Curvas DSC obtidas na célula DSC com fluxo de calor até 25 °C e razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de N₂ das NPs-HBsAg suplementadas com manitol 5%.

O *annealing* de NPs-HBsAg manitol 5% foi realizado com razão de aquecimento de 10 °C/min (Figura 43). A amostra foi aquecida à temperatura de -17 °C, durante 10 minutos, e

logo esfriada até -50°C para logo reaquecer. Observou-se aumento de 21°C no valor da T_g após a utilização do *annealing*. O tratamento térmico utilizado permite o aumento da T_g , conseguindo que as temperaturas da secagem primária sejam mais altas, por isso, o processo fica mais eficiente.

Continuaram-se os estudos de formulação com glicina 5% para as NPs-HBsAg. Como nas formulações de NPs-OVA, foram obtidas as mesmas características de T_g , T_{eut} e T_m (Figura 44). Assim, estudos de FDM mostraram T_{coll} próximos aos obtidos com a formulação de NPs-OVA. O aquecimento da formulação congelada apresentou sublimação do gelo a partir do canto superior da imagem, deixando uma região seca escura estruturalmente ordenada (Figura 45).

Por conta disso, a glicina é um dos principais candidatos para nossa formulação intranasal. Os experimentos prévios demonstraram que, com a glicina, é possível utilizar mais altas temperaturas na secagem primária, para evitar processos poucos eficientes e problemas com as características do produto.

Figura 44. Curvas DSC obtidas na célula DSC com fluxo de calor até 25°C e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 das NPs-HBsAg suplementadas com glicina 5%.

A glicina é o excipiente mais utilizado em formulações liofilizadas pois pode ser utilizada como *bulking agent* (PASSOT et al., 2005), permitindo uma matriz muito mais estável ao estresse do processo de liofilização, ademais, é um aminoácido altamente solúvel, não tóxico. Por ser composta por sólidos amorfos ou cristalinos, a glicina pode ser utilizada como crioprotetor ou lioprotetor (AKERS et al., 1995). Em formulações, a glicina também é utilizada

como ajustador da tonicidade, porque permite obter solução isotônica e ajuda a controlar a pressão osmótica numa formulação.

Figura 45. Imagens das etapas da simulação do processo de liofilização NPs-HBsAg com glicina 5%. (a) Formação da frente da liofilização da amostra, matriz liofilizada (região escura) e matriz congelada (região clara). (b) Matriz liofilizada mantém a sua estrutura. (c) Microcolapsos. (d) Macrocolapsos.

4.5 Caracterização dos sólidos liofilizados

4.5.1 Caracterização das NPs-OVA liofilizadas

A observação da aparência macroscópica do produto normalmente inclui a observação do volume final e a aparência do *cake*. Uma das características de uma forma farmacêutica liofilizada desejada inclui um *cake* intacto ocupando o mesmo volume que a massa congelada de origem (ABDELWAHED et al., 2006). As formulações suplementadas com glicina apresentaram mesmo volume de trabalho inicial (Figura 46b,c,d), mas aparência diferente foi verificada nas NPs-OVA sem suplementação, com, portanto, evidente encolhimento da pastilha, possivelmente devido ao colapso das pastilhas (Figura 46a).

Figura 46. Aparência da pastilha liofilizada das formulações. (a) NPs-OVA sem glicina. (b) NPs-OVA glicina 1%. (c) NPs-OVA glicina 2,5%. (d) NPs-OVA glicina 5%.

As Figuras 47-50 mostram imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da vista superior das formulações das NPs-OVA sem suplemento e com suplemento de glicina. As imagens demonstram que as NPs-OVA sem glicina sofreram colapso total da estrutura, da mesma forma que as NPs-OVA glicina 1%; apesar de mostrar boa aparência macroscópica, a estrutura microscópica mostrou colapso devido a falta de porosidade da superfície.

Contrariamente, as NPs-OVA glicina 2,5 % e 5% indicaram conservação da estrutura porosa com formação de lâminas intactas próprias de liofilizado. A formação de poros dos produtos liofilizados se deu porque foram previamente ocupados pelos cristais de gelo. Além disso, em cada imagem é possível observar as nanopartículas imobilizadas nas lâminas dos liofilizados. A Figura 47 mostra algumas poucas nanopartículas na superfície das lâminas. Nas Figuras 48-50, são mais observáveis as nanopartículas: todas foram separadas devido a formação de uma matrix cristalina, consequência da suplementação com glicina.

Figura 47. Imagem por MEV obtida da vista superior dos sólidos liofilizados das NPs-OVA não suplementada, revestida com uma camada de ouro

Figura 48. Imagem por MEV obtida da vista superior dos sólidos liofilizados das NPs-OVA suplementadas com glicina 1%, revestida com uma camada de ouro

Figura 49. Imagem por MEV obtida da vista superior dos sólidos liofilizados das NPs-OVA suplementadas com glicina 2,5%, revestida com uma camada de ouro.

Figura 50. Imagem por MEV obtida da vista superior dos sólidos liofilizados das NPs-OVA suplementadas com glicina 5%, revestida com uma camada de ouro.

As amostras liofilizadas de NPs-OVA sem adição e com adição de diferentes concentrações de glicina (1 %; 2,5 % e 5%) foram reconstituídas com o mesmo volume de água perdida após liofilização. O tempo de reconstituição dos quatro liofilizados, após a adição da água, foi rápido, mas com diferenças quanto à aparência das nanossuspensões. As NPs-OVA sem suplementação de glicina (Figura 51a) e com suplementação de glicina 1 % (Figura 51b) mostraram evidentes aglomerados formados logo após a reconstituição das pastilhas.

Figura 51. Reconstituição das NPs-OVA com formação de precipitado. (a) NPs-OVA sem glicina, (b) NPs-OVA glicina 1%.

As NPs-OVA glicina 2,5 % e 5 % mostraram suspensões opalescentes sem formação de aglomerados. Estas mesmas formulações foram reconstituídas e analisadas por MEV no estado seco. A Figura 52a mostra as NPs-OVA glicina 2,5% com forma e superfície irregular, com tamanhos acima de 400 nm. A Figura 52b mostra que as NPs-OVA glicina 5%, depois de serem reconstituídas, mantiveram sua estrutura, mas podem ser observadas algumas nanopartículas aglomeradas representando estruturas superiores a 350 nm; caso contrário, ao analisar as estruturas menores de cada aglomerado, poderá se observar que cada nanopartícula apresenta estruturas menores, entre 130 e 180 nm dentro delas, com morfologia pseudoesférica. Assim também, um processo de análise em seco pode influenciar na aglomeração das estruturas nanométricas; por conseguinte, estas fórmulas foram analisadas por DLS e os resultados foram comparados com NTA.

O método por NTA permitiu a visualização das nanopartículas e a determinação da concentração aproximada (Figura 12b). A Figura 53 (NPs-OVA glicina 2,5 %) mostra as distribuições nos dois métodos. No método de DLS, as monodispersas e, no NTA, as polidispersas com nanopartículas de diâmetros maiores a 1 μm .

Figura 52. MEV das nanopartículas liofilizadas após de ressuspensão. (a) NPs-OVA glicina 2,5%. (b) NPs-OVA glicina 5%.

As NPs-OVA glicina 2,5 % mostraram valor médio de $186,3 \pm 17\text{nm}$ por NTA, muito menor do que o valor de $396,7 \pm 10,7\text{nm}$ por DLS – o que é devido ao intervalo de tamanho detectável por NTA, de 30 – 1.000 nm, motivo pelo qual o gráfico de distribuição finaliza perto de 1.000 nm, por conseguinte, com resultado menor.

Na Figura 54, os resultados tanto de NTA quanto de DLS mostram distribuições monodispersas relativamente estreitas. As NPs-OVA glicina 5 % mostraram valor médio $165,3 \pm 22,2\text{ nm}$, por NTA, e $248,1 \pm 0,8\text{ nm}$, por DLS.

Os diâmetros hidrodinâmicos médios obtidos por método de NTA são menores do que os valores por DLS (Tabela 5). No entanto, para as distribuições monodispersas, é possível observar uma cauda na distribuição de tamanho por DLS em relação a tamanhos maiores, principalmente devido à imensa contribuição de algumas partículas grandes para a dispersão total (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010).

Figura 53. Gráfico de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana com ovoalbumina liofilizadas com 2,5 % de glicina e ressuspensas avaliadas por NTA e DLS.

Figura 54. Gráfico de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana com ovoalbumina liofilizadas com 5 % de glicina e ressuspensas avaliadas por NTA e DLS.

Valores de NTA e DLS, antes (Tabela 1) e após (Tabela 5) a liofilização (NPs-OVA glicina 5 %), indicam variação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e que o potencial ζ (Tabela 6) teve queda, mas manteve a carga positiva o suficiente para se manter estável. Essas

características são suficientemente aceitáveis para os fins do projeto, porque são consideradas bom indicador de um ciclo de liofilização bem-sucedido. Contrariamente, o aumento do valor (NPs-OVA glicina 2,5 %) de diâmetro hidrodinâmico ($396,7 \pm 10,7\text{nm}$), a diminuição de número de nanopartículas ($7,0 \pm 0,1 \text{ E8 partículas / mL}$) e a mudança de aparência (NPs-OVA glicina e NPs-OVA glicina 1 %) indicam agregação de nanopartículas; além disso, o índice de polidispersividade aumentou ($\text{IPd} = 0,71 \pm 0,05$), por conta do aumento da distribuição.

Tabela 5. Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta das nanopartículas de quitosana com ovalbumina analisadas por DLS. Diâmetro hidrodinâmico médio e concentração de partículas por mililitros analisadas por NTA.

NPs-OVA	DLS		NTA		
	DHM (nm)	IPd	DHM (nm)	D.P.	Concentração (E8/mL)
Glicina 2,5%	$396,7 \pm 10,7$	$0,71 \pm 0,05$	$186,3 \pm 17$	$98,7 \pm 24$	$0,7 \pm 0,01$
Glicina 5%	$248,1 \pm 0,8$	$0,19 \pm 0,01$	$165,3 \pm 22,2$	$65,3 \pm 9,9$	$1,1 \pm 0,30$

DHM Diâmetro hidrodinâmico médio; IPd Índice de polidispersidade; D.P. desvio padrão calculado pelo software NTA *Nanoparticle Tracking Analysis*; NPs Nanopartículas; DLS *Dynamic Light Scattering*; OVA Ovoalbumina. Os números representam valores médios $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ medições).

Tabela 6. Medição de potencial ζ das NPs-OVA reconstituídas.

NPs-OVA	Pot- ζ (mV)
Glicina 2,5%	$29,5 \pm 0,4$
Glicina 5%	$35,6 \pm 0,6$

NPs-OVA Nanopartículas carregadas com ovoalbumina; Pot- ζ Potencial zeta.

Outro estudo comparou os resultados de DHM das NPs-OVA antes e após a liofilização com diferentes excipientes, como lactose, manitol, sacarose e trealose, com diferentes concentrações (Tabelas 7 e 9). Análise sobre o excipiente ideal para a composição de liofilização foi baseada na razão entre o diâmetro hidrodinâmico médio (DHM_f), após a reconstituição de amostras liofilizadas, e o diâmetro hidrodinâmico médio inicial (DHM_i) das nanopartículas antes do processo de liofilização, determinados por DLS. Os valores de IPd foram avaliados da mesma forma, determinando sua razão. Algumas formulações, na presença de excipientes, podem ser facilmente dispersas. A medição do DHM revelou valores próximos antes e após a liofilização, que ocorreu quando as concentrações dos excipientes foram formuladas a 5%, assim como com os valores de IPd.

No caso de lactose 5%, após reconstituição, DHM de $455,1 \pm 4,1$ foi determinado que foi comparável com o DHM_i das nanopartículas ($472,2 \pm 4,0$). Na presença sacarose 5%, DHM_i ($466,0 \pm 5,4$) manteve-se muito próximo após liofilização ($447,5 \pm 7,2$). Em todas as concentrações de excipientes empregadas não houve diferença significativa entre DHM_i e DHM_f, exceto o manitol. Portanto, valor mínimo de 5% de excipiente é adequado para preservar as características das NPs-OVA liofilizadas.

No entanto, algumas das preparações registraram aumento no DHM das partículas após liofilização e reconstituição, que pode ser atribuído à formação de populações de partículas de agregado. A liofilização na presença de manitol levou ao aumento da dimensão das partículas significativamente, após a reconstituição, independentemente das concentrações utilizadas de manitol. Esses resultados também foram obtidos por outros autores (HOLZER et al., 2009). Uma razão para este comportamento diferente de manitol pode ser pelo comportamento térmico analisado por DSC. Pela análise, o manitol deve ter apresentado um evento exotérmico de devitrificação, durante o processo de liofilização; porém, a secagem primária foi trabalhada acima deste evento – o que pode ter influenciado nos resultados inadequados de DHM. Por último, verificou-se que tanto a lactose 1% como a sacarose 1% foram insuficientes para conservar o DHM das NPs-OVA.

Tabela 7. Análise comparativa das razões do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das nanopartículas de quitosana carregadas com OVA antes e após liofilização (DHM_f/DHM_i) utilizando DLS. Nanopartículas formuladas com diferentes excipientes e a diferentes concentrações.

Excipientes	Concentração	DHM $\pm$ DP (nm)		DHM _f /DHM _i
		Antes de liofilizar	Depois de liofilizar	
Lactose	1,0%	$429,0 \pm 3,6$	$623,4 \pm 5,1$	1,45
	2,50%	$450,3 \pm 7,3$	$442,7 \pm 15,4$	0,98
	5,0%	$472,2 \pm 4,0$	$455,1 \pm 4,1$	0,96
Manitol	1,0%	$438,8 \pm 13,8$	N.D.	N.D.
	2,50%	$436,7 \pm 5,8$	$4901 \pm 497,7$	11,22
	5,0%	$478,3 \pm 4,5$	$5086 \pm 1403,0$	10,63
Sacarose	1,0%	$426,9 \pm 4,4$	$566,6 \pm 27,6$	1,33
	2,50%	$445,3 \pm 9,1$	$430,3 \pm 11,1$	0,967
	5,0%	$466,0 \pm 5,4$	$447,5 \pm 7,2$	0,96
Trealose	1,0%	$450,9 \pm 4,5$	N.D.	N.D.
	2,50%	$440,7 \pm 7,2$	N.D.	N.D.
	5,0%	$473,6 \pm 6,8$	$458,4 \pm 4,9$	0,97

DHM Diâmetro hidrodinâmico médio; D.P. desvio padrão; DHM_f Diâmetro hidrodinâmico médio final; DHM_i Diâmetro hidrodinâmico médio inicial. Os números representam valores médios $\pm$ desvio padrão (n = 3 medições).

Tabela 8. Análise comparativa das razões do índice de polidispersividade (IPd) das nanopartículas de quitosana carregadas com OVA antes e após liofilização (IPd_f/IPd_i) utilizando DLS. Nanopartículas formuladas com diferentes excipientes e a diferentes concentrações.

Excipientes	Concentração	IPd ± DP		IPd _f /IPd _i
		Antes de liofilizar	Depois de liofilizar	
Lactose	1,0%	0,208 ± 0,036	0,541 ± 0,049	2,60
	2,50%	0,198 ± 0,013	0,224 ± 0,027	1,13
	5,0%	0,233 ± 0,019	0,242 ± 0,023	1,04
Manitol	1,0%	0,215 ± 0,030	N.D.	N.D.
	2,50%	0,228 ± 0,012	0,588 ± 0,061	2,58
	5,0%	0,232 ± 0,002	0,770 ± 0,385	3,32
Sacarose	1,0%	0,230 ± 0,011	0,494 ± 0,038	2,15
	2,50%	0,221 ± 0,028	0,220 ± 0,040	1,00
	5,0%	0,214 ± 0,004	0,220 ± 0,028	1,03
Trealose	1,0%	0,254 ± 0,025	N.D.	N.D.
	2,50%	0,204 ± 0,021	N.D.	N.D.
	5,0%	0,228 ± 0,008	0,210 ± 0,009	0,92

IPd Índice de Polidispersividade; D.P. desvio padrão; IPd_f Índice de Polidispersividade final; IPd_i Índice de Polidispersividade inicial. Os números representam valores médios ± desvio padrão (n = 3 medições).

O teor de umidade residual das formulações liofilizadas e reconstituídas com boa aparência macroscópica foi medido diretamente após o processo de liofilização. Imediatamente após o processo de liofilização, todas as formulações mostraram teor de umidade residual inferior variável (Tabela 9). O teor de água de NPs-OVA com lactose excedeu 5%. No entanto, para as formulações contendo manitol, as leituras de DHM evidenciaram aglomeração. No caso contrário, as formulações suplementadas com glicina apresentaram porcentagens mais baixas de umidade residual, mais uma característica para ser o excipiente a escolher.

Tabela 9. Umidade residual das formulações de NPs-OVA analisadas após liofilização e reconstituição. Os valores são apresentados em porcentagem, quantidade de massa de água residual relacionada com o peso total da amostra. As análises foram feitas diretamente da amostra fechada.

NPs-OVA	UR (%)
Lactose 1%	10,87
Lactose 2,5%	4,33
Lactose 5%	4,79
Manitol 2,5%	1,75
Manitol 5%	1,29
Sacarose 1%	10,73
Sacarose 2,5%	3,21
Sacarose 5%	3,36
Trealose 5%	6,75
Sem glicina	8,59
Glicina 1%	1,19
Glicina 2,5%	0,89
Glicina 5%	0,33

NPs Nanopartículas; UR Umidade Residual

4.5.2 Caracterização das NPs-HBsAg liofilizadas

Para propósitos desta pesquisa, foi escolhida a glicina como principal excipiente para liofilização, por ter apresentado boas características dos sólidos liofilizados das NPs-OVA, quando foi utilizada na concentração de 5%. Esta formulação foi utilizada para os testes *in vivo*.

O processo de liofilização gera uma variedade de estresse; portanto, o uso de excipiente é necessário. Por conta disso, as nanopartículas formuladas com 5% de glicina foram analisadas para caracterizações. O índice de polidispersividade de 0,18 depois da liofilização indicou nanopartículas monodispersas (Tabela 10), também conservação potencial ζ com valor de $+22,4 \pm 2,1$ mV. O sólido liofilizado apresentou-se com umidade residual de 0,44 %. Esta umidade representa ótimo processo, já que, para produtos biológicos, valores menores do que 5% são utilizados como referência.

Tabela 10. Análise comparativa das razões do índice de polidispersividade (IPd) NPs-HBsAg antes e após liofilização (IP_d/IP_d_i) utilizando DLS. Nanopartículas formuladas com glicina 5%.

NPs-HBsAg	IPd ± DP (nm)		IP _d /IP _d _i
	Antes de liofilizar	Depois de liofilizar	
Glicina 5%	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,10	1,2

NPs-HBsAg Nanopartículas carregadas com antígeno de superfície da hepatite B; IPd Índice de Polidispersividade; IP_d Índice de Polidispersividade final; IP_d_i Índice de Polidispersividade inicial; D.P. desvio padrão.

A relação de DHM e IPd antes e depois da liofilização confirmar a conservação das nanopartículas após constituição, quando foi utilizada glicina 5% como excipiente (Tabela 11). Estes resultados indicaram liofilização de nanopartículas bem-sucedida.

Tabela 11. Análise comparativa das razões do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das NPs-HBsAg antes e após liofilização (DHM_f/DHM_i) utilizando DLS. Nanopartículas formuladas com glicina 5%.

NPs-HBsAg	DHM ± DP (nm)		DHM _f /DHM _i
	Antes de liofilizar	Depois de liofilizar	
Glicina 5%	243,1 ± 5	285 ± 6	1,17

NPs-HBsAg Nanopartículas carregadas com antígeno de superfície da hepatite B; DHM Diâmetro hidrodinâmico médio; D.P. desvio padrão; DHM_f Diâmetro hidrodinâmico médio final; DHM_i Diâmetro hidrodinâmico médio inicial.

A Figura 55 mostra imagem MEV das NPs-HBsAg liofilizadas após reconstituição. Está claro na imagem que as nanopartículas apresentaram estruturas pseudoesféricas em forma, algumas nanopartículas aglomeradas e também algumas isoladas. Tais resultados de tamanho, analisados por MEV, são muito importantes para conhecer a conformação estrutural.

Figura 55. Imagem de MEV das NPs-HBsAg suplementadas com glicina 5% liofilizadas após reconstituição. Para obtenção da imagem, a amostra foi coberta com uma camada de ouro.

A regulação do tamanho de partícula de formulações para vacinação é um importante fator para a modulação da resposta imune através de interações diferenciais com células apresentadoras de antígeno (APCs). Nanopartículas de 20 nm de DHM demonstraram ser mais eficientes na ativação de células dendríticas. Nanopartículas de PLA (200-600 nm) foram associadas com maiores níveis de produção de IFN- γ relacionados com resposta imune do tipo Th1. Contrariamente, nanopartículas de PLA (2-8 μ m) promoveram a secreção de IL-4 relacionados com a resposta imune do tipo Th2 (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012). Há relatos de que nanopartículas de PLA (200-600 nm) foram eficientemente fagocitadas por macrófagos em comparação com micropartículas (2-8 μ m).

Estudos de fagocitoses de partículas por células caco-2 mostram dependência significativa sobre o DHM. Nanopartículas de 100 nm tiveram 2,5 vezes mais fagocitoses do que as partículas de 1 μ m e 6 vezes mais do que as partículas de 10 μ m de DHM (TSAI et al., 2011). Partículas de PLGA carregadas com BSA (1.000 nm) demonstraram maior resposta de de IgG no soro quando comparadas com as nanopartículas de 200 a 500 nm, quando foram administradas via subcutânea e oral – o que fundamenta a importância de que nanopartículas sejam bem caracterizadas.

Pesquisadores identificaram que a forma da nanopartícula teve efeito significativo na fagocitose das partículas. Foi demonstrado que as partículas em forma de verme, com proporções elevadas, exibiram fagocitose insignificante quando comparadas com partículas esféricas,

sugirindo que fagocitoses por APCs dependem da geometria da partícula (CHAMPION; MITRAGOTRI, 2006).

4.6 Teste *in vivo*

Para avaliar a resposta de anticorpos IgG específicos contra o antígeno HBsAg, foi realizado o teste imunoenzimático. A produção de IgG na primeira sangria dos camundongos foi analisada. Os resultados entre os grupos imunizados com NPs-HBsAg líquida, NPs-HBsAg liofilizada, NP Vazia líquida, NP Vazia liofilizada e glicina 5% foram comparados. Os valores de protetores de anti-HBsAg IgG foram encontrados e estão representados nas Figuras 56-58.

As nanopartículas carregadas com HBsAg liofilizadas e líquidas apresentam, no Gráfico 56, tendência no aumento dos valores de anti-HBsAg IgG, embora a análise estatística por ANOVA *one-way* tenha mostrado que não há diferença estatística entre os grupos (valor $p=0,175$). Há uma tendência por que na maioria das observações a média da primeira imunização aparece bem mais elevada e com um grande desvio padrão. Ao observarmos este efeito na análise da curva de titulação (Figura 56), as diferenças e a variabilidade das médias fazem com que a observação do primeiro ponto da curva de titulação seja igual ou não tenha diferença significativa em relação aos tipos de antígenos usados na imunização.

Figura 56. Resposta de IgG contra HBsAg na 1ª sangria dos grupos. A primeira sangria ocorreu após 7 dias a primeira imunização.

Na primeira imunização podemos observar uma tendência da resposta imune elevada a diluição 1:50 e 1:100, mas os valores de absorbância em 492nm são muito baixos, menor que 0,100, de modo que não podemos considerar como uma resposta imune específica.

De certo modo isto é esperado, já que a resposta primária a um antígeno, seja ele introduzido por mucosa ou por inoculação parenteral, é predominante a presença de IgM e não de IgG. A IgM não foi dosada devido ao seu valor científico ser muito baixo, e não contribuir significativamente para o trabalho, principalmente por que uma das suas características é a baixa afinidade e especificidade.

Valores de anti-HBsAg IgG da segunda sangria mostram aumento na formulação de NPs-HBsAg líquida e, da mesma forma, os valores a formulação de NPs-HBsAg liofilizada, representados na Figura 57. Assim, o teste de ANOVA *one-way* foi feito para os grupos. Demonstrou-se que há diferença significativa entre os grupos (valor $p=0,001$). Mediante o método de Turkey, foi analisado o grupo ou os grupos que eram diferentes. Determinou-se que o grupo das NP-HBsAg líquida mostrou-se ser diferente entre os outros grupos; e, no caso contrário, o grupo da formulação de NPsHBsAg liofilizada não mostrou diferença significativa entre os grupos controle negativo.

Figura 57. Resposta de IgG contra HBsAg na 2ª sangria dos grupos. A segunda sangria ocorreu após 7 dias da 2ª imunização.

É importante observar que houve um aumento da resposta imunológica sistêmica após a segunda imunização. Este fenômeno já é esperado pois faz parte do ciclo secundário da imunização, onde no soro do animal há uma predominância da classe de IgG e não mais da

IgM. Podemos observar que a o antígeno de HBsAg associado a nanopartícula de quitosana na forma líquida é que apresentou o melhor resultado.

Este resultado não era esperado, pois acreditavasse que a nanopartícula liofilizada deveria apresentar uma maior mucoadesividade e consequentemente uma carga maior de antígeno melhoraria a resposta imune.

Mas o fato é que o mecanismo de imunização em camundongo, principalmente devido a estática do pêlo perinatal fez com que parte do antígeno não chegasse na região da mucosa nasal, como podemos observar na Figura 58. A falta de instrumento adequado para imunização nasal, neste momento, comprometeu a comparabilidade entre a nanopartícula líquida e liofilizada, porém, mesmo que parte do antígeno tenha ficado retido na região perinatal, podemos observar que houve indução da resposta imune sistêmica.

Figura 58. Camundongo BALB/c sob efeito sedativo (Cloridrato de xilasina associado a cloridrato de quetamina) para imunização intranasal de NP-HBsAg liofilizadas.

Na última sangria, após 7 dias da 3ª imunização (Figura 58), determinou-se a diferença significativa entre os grupos (valor $p=0.0001$). Embora a formulação de NPs-HBsAg líquidas tenha mostrado valores de anti-HBsAg, não há diferença significativa com os grupos controle negativo.

Uma análise de Teste-t pareado dos resultados da 2ª e da 3ª formulações de NPsHBsAg líquida foi realizada. Verificou-se que houve diferença significativa (valor $p=0,018$) entre os resultados, ou seja, uma terceira imunização com fórmula NPsHBsAg líquidas permitiu o aumento nos valores de anti-HBsAg IgG sérico.

Figura 59. Resposta de IgG contra HBsAg na 3ª sangria dos grupos. A terceira sangria ocorreu após 7 dias da 2ª imunização.

Resposta de IgG na 3ª sangria

A terceira titulação confirma as observações encontradas na segunda imunização, porém com títulos mais elevados, quando comparamos a imunização da NPHBsAg líquida com as outras formulações.

Efetivamente, a vacinação nasal induz anticorpos IgA no epitélio da mucosa. A presença de IgA nas lavagens nasais indica a estimulação pela vacina nas células do NALT de IgA secretoras. Os resultados da análise por ANOVA *one-way* dos valores de IgAs indicam que não há diferença significativa entre os grupos (valor $p=0,684$). Os valores de IgAs representam os valores de anticorpos totais em camundongos, não os anti-HBsAg IgAs (Figura 59).

Pode-se observar uma tendência no aumento dos valores de IgAs dos lavados nasais coletados após 7 dias da última imunização dos camundongos vacinados com as NPs-HBsAg líquida, assim como dos camundongos vacinados com as NPs-HBsAg liofilizadas, mas valores não significativos.

Figura 60. Resposta de IgA secretado total presente nas secreções nasais dos grupos, coletados durante a 3ª sangria.

5 CONCLUSÕES

A formulação de nanopartículas de quitosana pode ser obtida em concentrações adequadas de CS e TPP. Nanopartículas de quitosana, com diâmetros hidrodinâmicos médios, por volta de 150 a 250 nm, podem ser obtidas. As concentrações de quitosana e TPP foram definidas como 2 e 1 mg/mL, respectivamente, a pH 5.

Neste trabalho, comparamos várias técnicas, DLS, NTA, MEV e MFA, para caracterizar DHM, distribuição de diâmetro e forma das nanopartículas: vazia, carregada com OVA e HBsAg.

Determinaram-se as propriedades térmicas e físicas, T_g' , T_{eut} , T_{coll} das formulações congeladas, com o propósito de otimizar o processo de liofilização. As diferentes técnicas de análise utilizadas no presente estudo mostraram que adição de glicina 5 % como excipiente das NPs-OVA para liofilização permitiu a melhora no aspecto do liofilizado e manteve as características iniciais.

Dissacádeos utilizados, como lactose, trealose e sacarose, aumentaram as temperaturas de transição vítrea T_g' em ~ 10 °C, quando comparadas às nanopartículas não formuladas.

Adicionalmente, verificou-se que o *annealing* é um tratamento térmico que pode ser utilizado para as formulações suplementadas com manitol 5%, para alcançar formulações com T_g' superiores. Formulações de nanopartículas de quitosana suplementadas com glicina 5% permitiram um ciclo de liofilização bem-sucedido, tendo em vista que o processo durou 13 horas para alcançar a umidade residual inferior a 1% – mantendo as características após reconstituição.

As formulações líquidas de nanopartículas de quitosana carregadas com HBsAg e administradas por via intranasal conseguiram estimular o sistema imune em camundongos, devido as concentrações de IgG sérico. Contrariamente, as formulações liofilizadas de nanopartículas de quitosana carregadas com HBsAg não mostraram respostas imunes adequadas – a razão da possível falta de resposta pode ser que o mecanismo de entrega intranasal da fórmula liofilizada foi inadequado.

Portanto, seria necessário um novo sistema, que permita a entrega completa do liofilizado e a distribuição uniforme na mucosa nasal. Apesar de as respostas imunes de IgA secretora total não terem sido significativas, há tendência de aumento das formulações carregadas com HBsAg. Para atender este requisito, a chegada de um equipamento específico

para imunização nasal em camundongos foi adquirido, e este experimento deverá ser repetido nos próximos três meses, porém com número de grupo reduzido.

6 REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–713, 30 dez. 2006.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. **International journal of pharmaceutics**, v. 309, n. 1-2, p. 178–88, 17 fev. 2006a.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 63, n. 2, p. 87–94, jun. 2006b.

AGNIHOTRI, S. A; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 100, n. 1, p. 5–28, 5 nov. 2004.

AGRAWAL, P.; STRIJKERS, G. J.; NICOLAY, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 42–58, 31 jan. 2010.

AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems : Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. **Adv Polym Sci**, n. 247, p. 31–64, 2012.

AKERS, M. J. et al. Glycine crystallization during freezing: the effects of salt form, pH, and ionic strength. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 10, p. 1457–61, out. 1995.

ALI, M. E.; LAMPRECHT, A. Spray freeze drying for dry powder inhalation of nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, mar. 2014.

ALLAIN, J.-P. Occult hepatitis B virus infection. **Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine**, v. 11, n. 1, p. 18–25, fev. 2004.

ALLISON, S. D.; MOLINA, M. D. .; ANCHORDOQUY, T. J. Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1468, n. 1-2, p. 127–138, set. 2000.

AMIDI, M. et al. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 59–82, 31 jan. 2010.

ANACAK, Y. et al. Primary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the salivary glands: a multicenter Rare Cancer Network study. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 82, n. 1, p. 315–20, 1 jan. 2012.

ANTUNES, M. B.; GUDIS, D. A; COHEN, N. A. Epithelium, cilia, and mucus: their importance in chronic rhinosinusitis. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 631–43, nov. 2009.

AZIZ, M. A. et al. Oral vaccines: new needs, new possibilities. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 29, n. 6, p. 591–604, jun. 2007.

BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 56, n. 3, p. 290–9, abr. 2010.

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

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 81, n. 3, p. 463–9, ago. 2012.

BORGES, O. et al. 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 : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4-5, p. 278–90, dez. 2007.

BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467–84, 26 jul. 2007.

BRANDTZAEG, P. **The mucosal immune system and its integration with the mammary glands.** **The Journal of pediatrics**, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105666>>

CALVO, P. et al. **Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines.** **Pharmaceutical research**, out. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358557>>

CARMO, R. A. et al. Correlates of hepatitis B among patients with mental illness in Brazil. **General hospital psychiatry**, v. 36, n. 4, p. 398–405, jan. 2014.

CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, v. 28, n. 9, p. 3916–22, 2 maio 1989.

CHACÓN, M. et al. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 99–107, maio 1999.

CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Role of target geometry in phagocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 4930–4, 28 mar. 2006.

CHANG, B. S. .; PATRO, S. Y. Freeze-drying Process Development for Protein Pharmaceuticals. In: **Lyophilization of Biopharmaceuticals**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 113–138.

CHONGPRASERT, S.; KNOPP, S. A.; NAIL, S. L. Characterization of frozen solutions of

- glycine. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 11, p. 1720–8, nov. 2001.
- CROWE JH, CROWE LM, C. J. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. **BioPharm**, n. 28, p. 31, 1993.
- CSABA, N.; GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Nanoparticles for nasal vaccination. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 2, p. 140–57, 27 fev. 2009.
- CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, M. J. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 382, n. 1-2, p. 205–14, 1 dez. 2009.
- ÇUBURU, N. et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 51, p. 8598–610, 12 dez. 2007.
- D.S. DANE, C.H. CAMERON, M. B. VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS. **The Lancet**, v. 295, n. 7649, p. 695–698, 1970.
- DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, ago. 2011.
- DENNEHY, P. H. Rotavirus vaccines--an update. **Vaccine**, v. 25, n. 16, p. 3137–41, 20 abr. 2007.
- DESAI, M. P. et al. **The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent.** **Pharmaceutical research**, nov. 1997.
- DEUCHI, K. et al. Decreasing Effect of Chitosan on the Apparent Fat Digestibility by Rats Fed on a High-fat Diet. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 9, p. 1613–1616, 1994.
- DIETRICH, G. et al. Experience with registered mucosal vaccines. **Vaccine**, v. 21, n. 7-8, p. 678–83, 30 jan. 2003.
- DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 6, p. 246–253, set. 1998.
- FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. NTA. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, maio 2010.
- FRANCO, E. et al. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. **World journal of hepatology**, v. 4, n. 3, p. 74–80, mar. 2012.
- FRANKS, F. Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions. **Developments in biological standardization**, v. 74, p. 9–18; discussion 19, jan. 1992.
- GADES, M. D.; STERN, J. S. Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, n. 1, p. 72–7, jan. 2005.

- GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 24–34, 1 set. 2007.
- GERLICH, W. H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 239, jan. 2013.
- GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1713–23, 3 nov. 2005.
- GRANT, Y.; MATEJTSCHUK, P.; DALBY, P. A. Rapid optimization of protein freeze-drying formulations using ultra scale-down and factorial design of experiment in microplates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 104, n. 5, p. 957–64, 1 dez. 2009.
- HILLEMANN, M. R. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. **Vaccine**, v. 18, n. 15, p. 1436–47, 14 fev. 2000.
- HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature medicine**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S45–53, abr. 2005.
- HOLT, P. G.; SCHON-HEGRAD, M. A.; MCMENAMIN, P. G. Dendritic cells in the respiratory tract. **International reviews of immunology**, v. 6, n. 2-3, p. 139–49, jan. 1990.
- HOLZER, M. et al. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 428–437, jun. 2009.
- HORCAS, I. et al. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **The Review of scientific instruments**, v. 78, n. 1, p. 013705, jan. 2007.
- HOUEN, G. et al. Conjugation to preadsorbed preactivated proteins and efficient generation of anti peptide antibodies. **Journal of immunological methods**, v. 206, n. 1-2, p. 125–34, 7 ago. 1997.
- HOUTMEYERS, E.; GOSSELINK, R.; DECRAMER, M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. **Eur Respir J.**, v. 13, p. 1177–1188, 1999.
- JARUDILOKKUL, S.; TONGTHAMMACHAT, A.; BOONAMNUAYVITTAYA, V. Preparation of chitosan nanoparticles for encapsulation and release of protein. **Korean J. Chem. Eng**, v. 28, n. 5, p. 1247–1251, 2011.
- JIANG, L. et al. The application of mucoadhesive polymers in nasal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 3, p. 323–336, 2010.
- JÓNSDÓTTIR, I. Maturation of mucosal immune responses and influence of maternal antibodies. **Journal of comparative pathology**, v. 137 Suppl , p. S20–6, jul. 2007.
- JOSHI, M. R.; MISRA, A. Liposomal budesonide for dry powder inhaler: Preparation and stabilization. **AAPS PharmSciTech**, v. 2, n. 4, p. 44–53, 1 dez. 2001.

KABANOV, A. V; VINOGRADOV, S. V. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 48, n. 30, p. 5418–29, jan. 2009.

KARZON, P. L. O. AND D. T. Distribution of Poliovirus Antibody in Serum , Nasopharynx and Alimentary Tract Following Segmental Immunization of Lower Alimentary Tract with Poliovaccine Information about subscribing to The Journal of. **The Journal of Immunology**, v. 102, p. 1423–1430, 1969.

KAUR, S.; DHILLON, G. S. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 2, p. 155–75, maio 2014.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 31 jan. 2010.

KIRBY, B. J.; HASSELBRINK, E. F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. **Electrophoresis**, v. 25, n. 2, p. 187–202, jan. 2004.

KUMAR, L.; BAHETI, A.; BANSAL, A. K. Determination of glass transition of the freeze concentrate for lyophilization using novel ex situ supersaturation technique. **Thermochimica Acta**, v. 559, p. 82–85, maio 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, n. 227, p. 680 – 685, 1970.

LEE, V. H. L.; YAMAMOTO, A. Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 4, p. 171–207, 1990.

LEVINE, M. M.; KAPER, J. B. Live oral vaccines against cholera: an update. **Vaccine**, v. 11, n. 2, p. 207–12, jan. 1993.

LI, J.; HUANG, Q. Rheological properties of chitosan–tripolyphosphate complexes: From suspensions to microgels. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1670–1677, jan. 2012.

LIANG, T. J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 49, n. 5 Suppl, p. S13–21, maio 2009.

LIU, H.; GAO, C. Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 20, n. 7, p. 613–619, jul. 2009.

LOCARNINI, S. et al. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 1, p. S76–S86, abr. 2015.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–128, 15 dez. 2012.

M. BERNSTEIN, M.S. REDDY, F.A. SCANNAPIECO, H.S. FADEN, M. B. **The microbial**

ecology and immunology of the adenoid: implications for otitis media. New York: [s.n.].

MACKENZIE. Collapse during freeze-drying-qualitative and quantitative aspects. **Freeze Drying and Advanced Food Technology**, p. 277–307, 1975.

MACLAUGHLIN, S. Dr. Albert Sabin. **Primary Care Update for OB/GYNS**, v. 10, n. 3, p. 129–130, maio 2003.

MACPHERSON, A J. et al. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 3, n. 12, p. 1021–35, out. 2001.

MANDART, E.; KAY, A.; GALIBERT, F. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences . Nucleotide Sequence of a Cloned Duck Hepatitis B Virus Genome: Comparison with Woodchuck and Human Hepatitis B Virus Sequenc. v. 49, n. 3, 1984.

MCCLUSKIE, M. J.; DAVIS, H. L. Mucosal immunization with DNA vaccines. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 1, n. 9, p. 685–98, jul. 1999.

MCNALLY, J. Biography: A brief life of Dr Edward Jenner. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 81–84, jan. 2001.

MCVEY, S.; SHI, J. Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 40, n. 3, p. 381–92, maio 2010.

MITRA, A.; KRISHNAMOORTHY, R. Prodrugs for nasal drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 29, n. 1-2, p. 135–146, 5 jan. 1998.

MITRAGOTRI, S. Immunization without needles. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 12, p. 905–16, dez. 2005.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 307–10, 1 nov. 1981.

MURGATROYD, K. . The freeze-drying process. In: PRESS, I. (Ed.). . **Good pharmaceutical freeze-drying practice**. [s.l: s.n.]. p. 1–23.

MURUGAPPAN, S. et al. Physical and immunogenic stability of spray freeze-dried influenza vaccine powder for pulmonary delivery: comparison of inulin, dextran, or a mixture of dextran and trehalose as protectants. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 85, n. 3 Pt A, p. 716–25, nov. 2013.

MUZZARELLI, R. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 53, n. 2, p. 131–40, fev. 1997.

NASTI, A. et al. Chitosan / TPP and Chitosan / TPP-hyaluronic Acid Nanoparticles :

Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, p. 1918–1930, 2009.

NEGRI, D. R. M. et al. Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. **Vaccine**, v. 28, n. 25, p. 4175–80, 7 jun. 2010.

NETTER, H. J. et al. Sequence heterogeneity of heron hepatitis B virus genomes determined by full-length DNA amplification and direct sequencing reveals novel and unique features. **The Journal of general virology**, v. 78 (Pt 7), p. 1707–18, jul. 1997.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 2, p. 148–58, fev. 2006.

OGRA, P. L. Ageing and its possible impact on mucosal immune responses. **Ageing research reviews**, v. 9, n. 2, p. 101–6, abr. 2010.

OTT, J. J. et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2212–9, 9 mar. 2012.

PASSOT, S. et al. Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 60, n. 3, p. 335–48, ago. 2005.

PIKAL, M. J.; SHAH, S. The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 62, n. 2-3, p. 165–186, jul. 1990.

PITOMBO, R. N. et al. **Effect of moisture content on the invertase activity of freeze-dried S. cerevisiae.** *Cryobiology*, ago. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7924395>>

PITOMBO, R. N. M. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. Ciência e Cultura (SBPC). In: **Ciência e Cultura**. [s.l.: s.n.]. p. 427–431.

PRABAHARAN, M. Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. **Journal of biomaterials applications**, v. 23, n. 1, p. 5–36, jul. 2008.

PRATELLI, A. et al. Canine Parvovirus (CPV) Vaccination : Comparison of Neutralizing Antibody Responses in Pups after Inoculation with CPV2 or CPV2b Modified Live Virus Vaccine. v. 8, n. 3, p. 612–615, 2001.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **International journal of pharmaceutics**, v. 455, n. 1-2, p. 219–28, 15 out. 2013.

RAVIKUMAR, M. N. . A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, nov. 2000.

ROBERTS, G. A. F. Structure of chitin and chitosan. In: **Chitin Chemistry**. Houndmills ed. [s.l.] Macmillan Publishers Limited, 1992a. p. 1–53.

- ROBERTS, G. A. F. Solubility and solution behaviour of chitin and chitosan. In: **Chitin chemistry**. Macmillan ed. London: [s.n.]. p. 85–91.
- SANDFORD, P. A. Chitosan: commercial uses and potencial applications. In: GUDMUND SKJÅK-BRAEK, THORLEIF ANTHONSEN, P. A. S. (Ed.). . **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties, and applications**. New York: [s.n.]. p. 51–70.
- SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, n. 2, p. 171–179, nov. 1997.
- SHEPARD, C. W. et al. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. **Epidemiologic reviews**, v. 28, p. 112–25, jan. 2006.
- SHI, C. et al. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. **The Journal of surgical research**, v. 133, n. 2, p. 185–92, 15 jun. 2006.
- SINGH, M. et al. Mucosal immunization with HIV-1 gag DNA on cationic microparticles prolongs gene expression and enhances local and systemic immunity. **Vaccine**, v. 20, n. 3-4, p. 594–602, 12 nov. 2001.
- STAATS, H. F. et al. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. **Current opinion in immunology**, v. 6, n. 4, p. 572–83, ago. 1994.
- TAKAHASHI, I. et al. New horizon of mucosal immunity and vaccines. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 3, p. 352–8, jun. 2009.
- TE, H. S.; JENSEN, D. M. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. **Clinics in liver disease**, v. 14, n. 1, p. 1–21, vii, fev. 2010.
- TOAN, N. VAN et al. Production of high-quality chitin and chitosan from preconditioned shrimp shells. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 7, p. 1113–1118, jul. 2006.
- TROIBER, C. et al. Comparison of four different particle sizing methods for siRNA polyplex characterization. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 84, n. 2, p. 255–64, jun. 2013.
- TSAI, M.-L. et al. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 756–761, 1 mar. 2011.
- UGWOKE, M. I. et al. Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1640–65, 3 nov. 2005.
- UGWOKE, M. I.; VERBEKE, N.; KINGET, R. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 3–21, jan. 2001.

ULLRICH, S. E. Skin Immunology and Immunotoxicity. In: **Comprehensive Toxicology (Second Edition)**. [s.l: s.n.]. p. 217–234.

VAN DER LUBBEN, I. M. et al. Chitosan for mucosal vaccination. **Advanced drug delivery reviews**, v. 52, n. 2, p. 139–44, 5 nov. 2001.

WANG, D. Q. Formulation Characterization. In: **Freeze-drying/ Lyophilization of pharmaceutical and biological products**. [s.l: s.n.].

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International journal of pharmaceutics**, v. 203, n. 1-2, p. 1–60, 10 ago. 2000.

YI, H. et al. Biofabrication with chitosan. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 2881–94, 2005.

7 ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 111.2014-P483

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas**" (Protocolo CEUA/FCF/483), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Richard Saldaña Gonzales**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Marco Antonio Stephano**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **7 de novembro de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 11 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

8 APÊNDICE

CONJUGADO DO HBsAg COM PEPTÍDEO P10 ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASES

MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 Preparo do Antígeno HBsAg associado a peptídeo P10 contra candidíase

Este experimento é parte do projeto em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), onde se pesquisa a imunização contra hepatite B e candidíase, através da utilização de um peptídeo sintético denominado P10. Durante o projeto, foram realizados a conjugação do peptídeo ao HBsAg e o encapsulamento em nanopartícula de quitosana, como já descrito anteriormente, além de algumas análises físico-químicas.

Este trabalho é uma complementação da dissertação de mestrado, mas não faz parte dos seus objetivos.

8.1.1 Conjugação com glutaraldeído

O método feito foi adaptado do Houenet al. (1997). Uma solução foi preparada contendo 795 µg de Antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg) e 159 µg da proteína P10 numa relação de 5:1 (peso/peso); foram dissolvidos em 2 mL de solução salina tamponada, à concentração de tampão de fosfato 0,01 M e à concentração de cloreto de sódio 0,154 M, com pH da solução de 7.4. Na mistura, foram adicionados 10µL de solução de glutaraldeído a 10% (diluída em solução salina tamponada com fosfato de 0,0154M, pH 7.4); esta mistura foi agitada por 18h a 700 rpm, à temperatura de 4°C (HOUEN et al., 1997).

A solução resultante foi centrifugada em tubos Millipore de 10.000 MWCO, para lavagem com água ultrapura a 4.000-g a 25°C, durante 20 minutos, em três repetições. O volume da solução sobrenadante foi ajustado ao volume de 1,5 mL com solução salina 0,9%.

8.1.2 Dosagem do conjugado

A determinação da concentração do conjugado foi feita por ensaio de proteína por BCA (Kit de Ensaio de Proteína BCA – Ácido Bicinconínico, Sigma – Aldrich®), utilizando um leitor de microplacas (Biotek – PowerWave XS2), com comprimento de onda de 562nm. Se utilizaram diluições seriadas de uma ampola de 1mL de proteína albumina de soro bovino (BSA) na concentração 1mg/mL (Sigma – Aldrich®) como padrão de proteína da molécula.

A curva padrão de BSA foi elaborada nas concentrações de 30 a 1,875 µg/mL por triplicata.

8.1.3 Eletroforese (SDS-Page)

O método de eletroforese SDS-Page é uma modificação do método desenvolvido por Laemmli. Géis de poliacrilamida 0,75 mm foram dispostos em placas de vidro de 9 x 6,5 cm. Gel de corrida a 9% de poliacrilamida e gel do pente a 4% de poliacrilamida foram preparados. O gel foi corrido em corrente constante de 150 V, 50mA, 8 W durante 90 minutos, num tanque de eletroforese vertical, Bio-Rad. Para identificar o peptídeo conjugado, se utilizaram proteínas marcadoras de baixo peso molecular contendo fosforilase (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa) e de alto peso molecular contendo miosina (220 kDa), α_2 -macroglobulina, β -galactosidase (116 kDa), transferrina (76 kDa) e desidrogenase glutâmico (53 kDa) – que foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Antes de carregar as amostras nos géis, os marcadores de peso molecular e as amostras foram tratados durante 5 min a 100 ° C, com o mesmo volume de tampão de amostra contendo 0,0625 M de Tris-HCl, 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Cerca de 3, 2, e 1 µg do conjugado foram carregadas em cada poço e, como comparativo, foi utilizado HBsAg. As proteínas foram coradas com nitrato de prata, seguindo a técnica descrita por Morrissey.

8.2 Preparação e carregamento das nanopartículas

Mesmo método citado na seção 3.1. Nanopartículas carregadas com o conjugado do peptídeo P10, nas concentrações de 16,8µg/mL e 33,6 µg/mL, e nanopartículas carregadas com o peptídeo P10, à concentração de 16,8µg/mL.

8.3 Caracterização física-química das nanopartículas

8.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico por espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering – DLS) e Potencial Zeta (ζ)

A distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e o potencial zeta (ζ) foram medidos usando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK). A série Zetasizer Nano realiza medições de tamanho usando um processo chamado espalhamento dinâmico da luz (DLS).

8.3.2 Determinação da Eficácia de Encapsulação (E.E.)

As proteínas modelos (HBsAg conjugada e peptídeo P10) foram dissolvidas em solução de tri-polifosfato, como foi descrito na seção 4.2. Concentração das proteínas no sobrenadante foram quantificadas de forma indireta, por ensaio de proteína por BCA (Kit de Ensaio de Proteína BCA – Ácido Bicinconínico), utilizando um leitor de microplacas (Biotek – PowerWave XS2), com comprimento de onda de 562nm.

8.3.3 Microscopia de Força Atômica (MFA)

As imagens das nanopartículas de quitosana carregadas com as proteínas modelo (HBsAg conjugada e peptídeo P10) foram coletadas por um Nanoscope comercial IIIa Multi-Modo de MFA (VeecoInstruments, CA) equipado com um escâner E.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.4 Quantificação de proteínas totais pelo método do ácido bicinconínico (BCA) do conjugado do peptídeo P10

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, foi elaborada uma curva padrão com a proteína BSA (Figura 1), se obteve o resultado de aproximadamente 403 µg/mL de proteínas totais. A leitura da placa foi feita no espectrofotômetro operado no comprimento de onda de 562nm (Figura 2). A banda do peptídeo conjugado foi evidenciada, por eletroforese (Figura 3), na parte superior, no gel de 4 %, pois, devido seu alto peso molecular, não atravessa o gel de 9%.

Figura 1. Foto do microensaio de BCA em placas de microtitulação. Resultado onde os poços H1/H2 e H3 representam o controle do teste (branco), os poços A1/A2 e A3 foram colocados a proteína padrão (Proteína Sérica Bovina – BSA/ Sigma – Aldrich) e nos poços A4/A5 e A6 estão as amostras do peptídeo conjugado. Tanto a proteína padrão como o peptídeo conjugado foram submetidos à diluição seriada nos poços seguintes.

Figura 2. Curva da proteína padrão (Proteína Sérica Bovina – BSA/ Sigma – Aldrich), para determinar a concentração da reação de complexação com glutaraldeído do HBsAg com peptídeo P10.

Figura 3. Eletroforese SDS – Page com marcador de alto peso molecular (coluna esquerda) e de baixo peso molecular (coluna direita). A coluna A mostra os resultados da reação de complexão do peptídeo P10 e HBsAg (quadro vermelho mostra o conjugado do P10). A coluna B mostra eletroforese do HBsAg.

8.5 Caracterização das nanopartículas de quitosana

Para estudo do conjugado, se prepararam nanopartículas com peptídeo P10 com diâmetro hidrodinâmico médio de $217,4 \pm 2,4$ nm e com potencial zeta de $37,2 \pm 0,6$ mV (Tabela 1). Nanopartículas com o conjugado do peptídeo P10 foram preparadas em duas diferentes concentrações, 16,8 e 33,6 μ g/mL; as de menor concentração de conjugado obtiveram diâmetro hidrodinâmico médio de $203,3 \pm 1,71$ nm e com potencial zeta de $38,7 \pm 1,1$ mV; enquanto, para a de maior concentração de conjugado, o diâmetro hidrodinâmico médio foi de $230,2 \pm 1,2$ nm e o potencial zeta de $37,8 \pm 0,7$ mV (Tabela 2).

As NP com o conjugado da proteína P10 (>220 KDa), à concentração de 33,6 μ g/mL, foram maiores que as nanopartículas com ovoalbumina (42,8 KDa), provavelmente devido ao alto peso molecular da proteína e ao tamanho da molécula (GAN; WANG, 2007). A variação da concentração do conjugado da proteína P10 resultou no aumento considerável no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.

A diminuição do potencial zeta das nanopartículas carregadas com a proteína P10 e do seu conjugado pode ser devida ao método de incorporação de proteínas em nanopartículas, pelo qual pode ocorrer deposição da proteína dentro e na superfície das partículas; esta deposição parcial de proteínas na superfície reduz a carga líquida total e, nas condições finais de preparo, provavelmente as proteínas estarão ainda carregadas negativamente.

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade (IPD) das nanopartículas de quitosana com a proteína P10, obtidas pela geleificação iônica da solução de quitosana 2 mg/ml pH 4.97 com a solução de TPP 1 mg/ml pH 9.06.

Experimento	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
1°	$217,4 \pm 2,4$	$0,185 \pm 0,022$	$37,2 \pm 0,6$

Figura 4. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico por (A) intensidade, (B) potencial zeta das nanopartículas de quitosana com a proteína P10.

Tabela 2. Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade (IPD) das nanopartículas de quitosana com conjugado do peptídeo P10, obtidas pela geleificação iônica da solução de quitosana 2 mg/ml pH 4.97 com a solução de TPP 1 mg/ml pH 9.08.

Experimentos	Conjugado inicial (ug/mL)	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
1°	16,8	203,3 ± 1,7	0,167 ± 0,037	38,7 ± 1,1
2°	33,6	230,2 ± 1,2	0,173 ± 0,024	37,8 ± 0,7

Figura 5. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico por (A) intensidade, (B) potencial zeta das nanopartículas de quitosana como conjugado do peptídeo P10, Experimento 1° (—) e experimento 2° (—).

8.6 Determinação da Eficácia de Encapsulação (EE)

A Eficácia de Encapsulação aumenta com a diminuição da massa molecular das proteínas com os mesmos pontos isoelétricos. Além disso, verificou-se que o aumento da concentração de proteínas também reduziu a Eficácia de Encapsulação (JARUDILOKKUL;

TONGTHAMMACHAT; BOONAMNUAYVITTAYA, 2011), mas a adsorção e o encapsulamento de proteínas por interações eletrostáticas normalmente exibem cinética de saturação que atinge valor de pico em altas concentrações de proteínas (GAN; WANG, 2007). O aumento da concentração do conjugado da proteína P10 durante a encapsulação de 16,8 ug/mL a 33,6 ug/mL incrementou a Eficácia de Encapsulação de $55,57 \pm 3,74$ % a $85,67 \pm 1,06$ % (Tabela 3), isto ocorreu provavelmente porque, nestas concentrações do conjugado, não se chega à cinética de saturação da nanopartícula de quitosana. Nanopartículas carregadas para a concentração de 16,8 ug/mL do peptídeo P10 mostraram Eficácia de Encapsulação de $81,92 \pm 5,55$ %.

Tabela 3. Eficácia de Encapsulação das proteínas modelo com as nanopartículas de quitosana obtidas por reação de geleificação iônica utilizando 2 mg/mL de quitosana pH 5 e TPP mg/mL pH 9.

	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Proteína inicial (µg)	Proteína no sobrenadante (µg)	Eficácia de encapsulação (%)
NP P10	$21,4 \pm 2,4$	16,80	$3,0 \pm 0,9$	$81,92 \pm 5,55$
NP conjugado P10	$203,3 \pm 1,7$	16,80	$7,3 \pm 0,6$	$55,57 \pm 3,74$
	$230,2 \pm 1,2$	33,60	$4,8 \pm 0,4$	$85,67 \pm 1,06$

8.7 Morfologia das nanopartículas

Nanopartículas de quitosana carregadas foram afetadas nas suas estruturas morfológicas (Figuras 6 e 7). As Figuras 8 e 9 mostram análises de perfil de *cross section* mediante o programa livre WSxM v5,0 Develop 6,5, que indicam a alta relação de dimensões entre a varredura rápida e a varredura lenta de todas as nanopartículas; isto provavelmente foi devido ao colapso das nanopartículas no estado seco sobre a superfície da placa de silício; além disso, o perfil das nanopartículas carregadas com as proteínas mostra uma superfície mais rugosa e irregular, quando comparado com o perfil de *cross section* das nanopartículas não carregadas que possuem superfície mais lisa.

Figura 6. Imagens topográficas detalhadas de MFA das nanopartículas de quitosana-tripolifosfato carregadas com a proteína P10. A medição foi efetuada em modo contato intermitente. **(A)** Imagem bidimensional com de 1 μm x 1 μm . **(B)** Imagem tridimensional com de 1 μm x 1 μm .

Figura 7. Imagens topográficas detalhadas de MFA das nanopartículas de quitosana-tripolifosfato carregadas com o conjugado da proteína P10; a medição foi efetuada em modo contato intermitente. **(A)** Imagem bidimensional com de 1 μm x 1 μm . **(B)** Imagem tridimensional com de 1 μm x 1 μm .

Figura 8. Imagens topográficas detalhadas de MFA no modo intermitente das nanopartículas de quitosana-tripolifosfato carregadas com a proteína P10. As amostras foram colocadas em placas de silício secadas durante 18 horas. **(A)** Imagem bidimensional com de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ **(B)** imagem bidimensional *top view* com *zoom* de uma nanopartícula. **(C)** Imagem tridimensional da imagem **(B)**. **(D)** Perfil de *cross section* de uma nanopartícula da imagem **(B)**.

Figura 9. Imagens topográficas detalhadas de MFA, no modo intermitente, das nanopartículas de quitosana-tripolifosfato carregadas com o conjugado da proteína P10. As amostras foram colocadas em placas de silício e secadas durante 18 horas. **(A)** Imagem bidimensional com *zoom* de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. **(B)** imagem bidimensional *top view* com *zoom* de uma nanopartícula. **(C)** Imagem tridimensional da imagem **(B)**. **(D)** Perfil de *cross section* da nanopartícula da imagem **(B)**.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 7930421/1 - Richard Saldaña Gonzales

Email: srichard21@usp.br
Data de Nascimento: 21/12/1987
Cédula de Identidade: RNE - V801561-L - SP
Local de Nascimento: Peru
Nacionalidade: Peruana
Graduação: Farmácia Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Peru - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula: 29/05/2013
Início da Contagem de Prazo: 29/05/2013
Data Limite para o Depósito: 30/11/2015
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Adalberto Pessoa Junior - 29/05/2013 até 22/09/2013. Email: pessoajr@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Marco Antonio Stephano - 23/09/2013 até o presente. Email: stephano@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 29/05/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 05/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 29/05/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 14/07/2015

Impresso em: 27/11/2015 00:25:59

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 7930421/1 - Richard Saldaña Gonzales

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5810-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos, Espectroscopias Raman e no Infravermelho Próximo Associadas à Quimiometria: Aplicação no Desenvolvimento e no Controle em Processo de Medicamentos com Base Nanotecnológica	24/06/2013	30/06/2013	30	2	100	A	N	Concluída
PGF5205-3/1	Microscopia de Força Atômica e Tunelamento (Instituto de Física - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	29/11/2013	150	10	100	A	N	Concluída
EDM5102-3/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	20/08/2013	30/09/2013	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBT5768-4/3	Princípios de Fermentação Contínua	07/02/2014	13/03/2014	75	5	100	A	N	Concluída
FBT5773-7/3	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	18/02/2014	28/04/2014	30	2	90	A	N	Concluída
FBT5706-3/1	Estratégias e Gerenciamentos de Processos Farmacêuticos e Biotecnológicos	10/03/2014	11/05/2014	45	3	100	A	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5813-1/1	Tecnologias de Caracterização de Sistemas Nanoestruturados	04/09/2014	15/10/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5805-1/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	80	A	N	Concluída
FBA5706-2/2	Planejamento Experimental para Otimização de Produtos e Processos em Alimentos	26/02/2015	21/06/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
QFL5714-7/1	Introdução à Análise Térmica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/08/2015	04/10/2015	90	0	-	-	N	Aguardando avaliação

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	39
Estágios:			
Total:	0	25	39

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

27/11/2015

Última ocorrência: Matrícula Regular em 14/07/2015

Impresso em: 27/11/2015 00:25:59

Richard Saldana Gonzales

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5157290086022290>

Última atualização do currículo em 27/11/2015

Resumo informado pelo autor

Mestrando em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica na Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo. Possui graduação em Farmácia e Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos (2011) e graduação sanduíche em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo (2012). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Produção de bioprodutos.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Richard Saldana Gonzales

Filiação Luzmen Mirando Saldana Saldana e Carmen Rosa Gonzales Perez

Nascimento 21/12/1987 - Moyobamba - Peru

Carteira de Identidade V801561L PF - SP - 12/03/2012

CPF 235.394.258-02

Passaporte 5493126

Endereço residencial Rua Abílio Brenha da Fontoura 11 A CASA 1
VILA UNIVERSITARIA - São Paulo
05359130, SP - Brasil
Telefone: 11 35698272
Celular 11 991864548

Endereço eletrônico E-mail para contato : srichard21@usp.br
E-mail alternativo srichard21@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas.
Orientador: Marco Antonio Stephano
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Áreas do conhecimento: Imunobiologia e Biofármacos
Setores de atividade: Fabricação de produtos farmacêuticos e farmacêuticos
- 2012 - 2012** Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
com período sanduíche em Universidade de São Paulo (Orientador: Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira)
Título: Crescimento celular e bioprodução bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* ST16Pa em agitador rotativo utilizando caldo MRS
Orientador: Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira
- 2007 - 2011** Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, UNMSM, Peru

Formação complementar

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Workshop U.S. Pharmacopeia, Bioensaios: Desenvolvi. (Carga horária: 16h).
Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos, SINDUSFARMA, Brasil
Bolsista do(a): Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Aspectos Práticos da Implementação do QbD na Indús. (Carga horária: 16h).
Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos, SINDUSFARMA, Brasil
Bolsista do(a): Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em 12º Programa de Certificação de Empresas COFIDE. (Carga horária: 27h).
Corporación Financiera de Desarrollo S.A., COFIDE, Peru
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em I Curso Taller "Investigación Clínica y Administra. (Carga horária: 20h).
Sociedad Nacional de Industrias, SNI, Peru
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Boas Práticas de Vendas e Dispensação Farmacêutica. (Carga horária: 30h).
Rede de Bólicas Torres de Limatambo, BTL, Peru

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo
institucional

27/11/2015

Currículo Lattes

- 2013 - Atual** Vínculo: Mestrando , Enquadramento funcional: Mestrando , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
- 2012 - 2012** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2. Hospital Nacional Dos de Mayo - HNDM

Vínculo institucional

- 2011 - 2011** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Assistente de Farmacotécnica e Dose Unitária , Carga horária: 30, Regime: Parcial

3. Boticas Mifarma - MIFARMA

Vínculo institucional

- 2013 - 2013** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Bachiller QF , Carga horária: 48, Regime: Integral

4. Rede de Boticas Torres de Limatambo - BTL

Vínculo institucional

- 2009 - 2011** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Estudante QF-Vendedor multifuncional , Carga horária: 24, Regime: Parcial

5. Farma Internacional S.A.C. - F.I.

Vínculo institucional

- 2008 - 2008** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Atendimento ao cliente , Carga horária: 30, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2013 - Atual** Desenvolvimento do processo de liofilização de uma vacina estável em pó para aplicação por meio de um mecanismo de entrega nasal da OVA encapsulado em nanopartículas de quitosana
- Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
- Integrantes: Richard Saldana Gonzales, Marco Antônio Stephano (Responsável)
- 2013 - Atual** Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas
- Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
- Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);
- Integrantes: Richard Saldana Gonzales, Marco Antônio Stephano (Responsável)
- 2012 - 2013** Crescimento celular e bioprodução bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* ST16Pa em agitador rotativo utilizando caldo MRS
- Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
- Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2);
- Integrantes: Richard Saldana Gonzales (Responsável); Fabio Andrés Castillo Martinez; Katherine Jasmine Curo Melo; Eduardo Marcos Balciunas

Áreas de atuação

1. Liofilização
2. Nanotecnologia
3. Imunobiológicos e Biofármacos
4. Produção de bioprodutos
5. Farmácia Hospitalaria

Idiomas

- Inglês** Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem
- Espanhol** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
- Português** Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Prêmios e títulos

- 2012** Reconhecimento ao Becarios SANMARQUINOS, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, DECANIA DE AMERICA, OGCRI.
- 2011** Primeiro lugar na categoria Desempenho Excelente, sendo o melhor Estudante QF em volume de vendas totais., Boticas Limatambo (BTL)

Produção

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. BENITES, C. I., Leal, F.S., Lima T.S., BEXIGA, N. M., **GONZALES, R. S.**, STEPHANO, M. A., Orsi, M.A.
DETECTION OF RESIDUAL MOISTURE IN AVIAN VIRAL LYOPHILIZED VACCINES SUBMITTED TO OFFICIAL QUALITY CONTROL, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : *Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: http://www.sbv.org.br/site/livro_anais_cbv_XXVI.pdf; Local: Resort Costão do Santinho; Cidade: Florianópolis; Evento: XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Virologia*
2. **GONZALES, R. S.**, BOU-CHACRA, N., OLIVEIRA-NASCIMENTO, L., TENORIO, E. C. N., STEPHANO, M. A.
DEVELOPMENT OF FREEZE-DRIED CHITOSAN NANOPARTICLES CARRYING HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN, 2015. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : *Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: <http://www.uem.br/sisif/index.php/pages/abab>; Local: Universidade Estadual de Maringá; Cidade: Maringá; Evento: I International Symposium on Drug Delivery Systems; Inst.promotora/financiadora: Universidade Estadual de Maringá*
3. BEXIGA, N. M., **GONZALES, R. S.**, OLIVEIRA-NASCIMENTO, L., STEPHANO, M. A.
PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF OVALBUMIN LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : *Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Outro; Local: Centro de Convenções Frei Caneca; Cidade: São Paulo; Evento: XVIII Congresso Farmacêutico de São Paulo, X Seminário Internacional de Ciências Farmacêuticas e Exporfar 2015; Inst.promotora/financiadora: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo (CRF-SP)*
4. **GONZALES, R. S.**, NASCIMENTO, L. O., STEPHANO, M. A.
A Comparative Evaluation of Methods to Determine the Physico-Chemical Characteristics for Chitosan Nanoparticle: Atomic Force Microscopy, Nanoparticle Tracking Analysis and Dynamic Light Scattering, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Áreas do conhecimento : Nanopartículas, Vacinas
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Cidade Universitária; Cidade: São Paulo; Evento: XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas*
5. CHIPANA, M. M. T., **GONZALES, R. S.**, STEPHANO, M. A.
Effect of storage time on physical-chemical properties of CSNPs different concentrations of ovalbumin at 4 C and 25 C, 2014. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : *Brasil/Português. Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Cidade Universitária; Cidade: São Paulo; Evento: XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas*

Produção artística/cultural

Outra produção artística/cultural

1. **GONZALES, R. S.**
Evento: **42 ABAV Expo Internacional de Turismo**, 2014. Local Evento: Palácio das Convenções do Anhembi. Cidade do evento: São Paulo. País: Brasil. Instituição promotora: PromPeru. Duração: 2400. Tipo de evento: Turismo.
Atividade dos autores: Expositor. Data da estreia: 24/09/2014. Home-page: <http://www.anhembi.com.br/oportunidades-de-negocio-se-misturam-com-lazer-na-42a-edicao-da-abav-expo-internacional-de-turismo/?lang=en>.
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro. Home page: <http://www.anhembi.com.br/oportunidades-de-negocio-se-misturam-com-lazer-na-42a-edicao-da-abav-expo-internacional-de-turismo/?lang=en>*

Inovação

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2013 - Atual** Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Richard Saldana Gonzales; Marco Antônio Stephano (Responsável)
- 2012 - 2013** Crescimento celular e bioprodução bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* ST16Pa em agitador rotativo utilizando caldo MRS
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2);
Integrantes: Richard Saldana Gonzales (Responsável); ; Fabio Andrés Castillo Martinez; Katherine Jasmine Curo Melo; Eduardo Marcos Balciunas

Educação e Popularização de C&T

Outra produção artística/cultural

1. **GONZALES, R. S.**
Evento: **42 ABAV Expo Internacional de Turismo**, 2014. Local Evento: Palácio das Convenções do Anhembi. Cidade do evento: São Paulo. País: Brasil. Instituição promotora: PromPeru. Duração: 2400. Tipo de evento: Turismo.
Atividade dos autores: Expositor. Data da estreia: 24/09/2014. Home-page: <http://www.anhembi.com.br/oportunidades-de-negocio-se-misturam-com-lazer-na-42a-edicao-da-abav-expo-internacional-de-turismo/?lang=en>.
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro. Home page: <http://www.anhembi.com.br/oportunidades-de-negocio-se-misturam-com-lazer-na-42a-edicao-da-abav-expo-internacional-de-turismo/?lang=en>*

Eventos

Eventos

Participação em eventos

27/11/2015

Currículo Lattes

1. Apresentação Oral no(a) I International Symposium on Drug Delivery Systems, 2015. (Simpósio) DEVELOPMENT OF FREEZE-DRIED CHITOSAN NANOPARTICLES CARRYING HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN".
2. Conferencista no(a) II Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, 2015. (Outra) Liofilização de sistemas nanoestruturados.
3. Mini Curso de Nanotecnologia, 2013. (Outra)
4. Empreendedorismo Farmacêutico Start Up e Casos de Sucesso, 2013. (Outra)
5. Atualizações em imunizações, 2013. (Outra)
6. Curso de Bioestatística, 2013. (Outra)
7. Simpósio de Inovação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, 2012. (Simpósio)
8. Marketing Farmacêutico: Propaganda, Planejamento estratégico, pesquisa de mercado e promoção, 2012. (Seminário)
9. Desenvolvimento de Perfume, 2012. (Oficina)
10. Pesquisa clínica e gestão de ensaios clínicos, 2011. (Oficina)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Apresentações de trabalhos (Congresso)	3
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	2

Eventos

Participações em eventos (seminário)	1
Participações em eventos (simpósio)	2
Participações em eventos (oficina)	2
Participações em eventos (outra)	5

Produção artística/cultural

Outra produção artística/cultural	1
-----------------------------------	---

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 27/11/2015 às 00:23:38.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP