UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Avaliação do uso de óleos de origem vegetal para formulação de adjuvantes vacinais

Marnen Almeida Carvalho

São Paulo
2012

Marnen Almeida Carvalho

Avaliação do uso de óleos de origem vegetal para formulação de adjuvantes vacinais

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE.

Orientador:
Prof. Dr. Marco Antonio Stephano.

São Paulo
2012

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

Carvalho, Marnen Almeida
C331a Avaliação do uso de óleos de origem vegetal para formulação de adjuvantes vacinais / Marnen Almeida Carvalho. -- São Paulo, 2012.
102p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Stephano, Marco Antonio

1. Vacinoterapia 2. Imunização : Saúde pública 3. Raiva : Controle : Saúde pública I. T. II. Stephano, Marco Antonio, orientador.

615.372 CDD

Marnen Almeida Carvalho

Avaliação do uso de óleos de origem vegetal para formulação de adjuvantes vacinais

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Orientador/presidente

_____
1º. Examinadora

_____
2º. Examinadora

São Paulo, _____ de _____.

A minha esposa Sandra,

aos meus pais, Valter e Cleusa Márcia, com gratidão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Sandra Santos Cardoso Carvalho, a melhor parte de mim, meu maior apoio, presença viva de Deus.

A minha família pelo apoio, especialmente aos meus pais Valter José Carvalho e Cleusa Márcia de Almeida Carvalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Stephano, pela paciência e por acreditar em mim.

A equipe do Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, Patrícia Barros, Laura de Oliveira Nascimento, Jony Takao Yoshida, Fernanda Abdulack, Patrícia Matias Guglielmi, Mary Ellen Martioli.

A equipe do Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários, do Instituto Butantan, especialmente a Aline Tojeira Prestia Caricati e a Celso Caricati, pelo apoio e ajuda.

Ao professor Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo pela disponibilidade de equipamentos imprescindíveis para realização do grande número de testes ELISA feitos neste trabalho.

Às professoras Dra. Irene da Silva Soares e Dra. Flávia Saldanha Kubrusly pelas contribuições na qualificação.

Ao professor Dr. Luiz Antonio Gioielli pelas contribuições no exame de qualificação e pelo empréstimo dos equipamentos para registro das imagens microscópicas e análise estatística das mesmas.

Ao professor Dr. André Rolim Baby pelas contribuições na discussão do método de elaboração de emulsões e possibilidades de desenvolvimento de adjuvantes a partir de óleos vegetais.

À professora Dra. Neuza Maria Frazatti Gallina, Instituto Butantan, pelo fornecimento do vírus rábico inativado.

À professora Dra. Marina Ishii, pela ajuda com viscosímetro.

A Luiz Morais, e sua empresa Amazon Oil pela doação de óleos amazônicos.

À Brenntag Química Brasil Ltda, na pessoa de Luzia Aparecida Gomes da Silva, pela doação dos surfactantes.

“Não é o muito saber
que sacia e satisfaz o coração,
mas o sentir e saborear as coisas internamente.”

St. Inácio de Loyola

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS **XII**

LISTA DE GRÁFICOS **XIII**

LISTA DE TABELAS **XIV**

LISTA DE ABREVIATURAS **XV**

RESUMO **XVII**

ABSTRACT **XVIII**

1. INTRODUÇÃO **18**

1.1 ADJUVANTES 18
1.1.1 Função dos adjuvantes 19
1.1.2 Classificações 20
1.1.3 Tipos de adjuvantes 23
1.1.3.1 Sais minerais 23
1.1.3.2 Compostos tensoativos 24
1.1.3.3 Adjuvantes derivados de micro-organismos 24
1.1.3.4 Partículas antigênicas no sistema das APCs 24
1.1.3.5 Emulsões 25
Emulsões de óleos minerais 25
1.1.3.6 Uso de óleos vegetais como adjuvantes 27
1.1.4 Perspectivas futuras dos adjuvantes 30
1.2 VACINAS 31
1.2.1 Vacina da Raiva 32
1.3 JUSTIFICATIVA.....33

2. OBJETIVO **36**

3. MATERIAIS E MÉTODOS **37**

3.1 AMOSTRAS.....37
3.2 SURFACTANTES 37
3.3 ANTÍGENO 37
3.4 TESTES DE TOXICIDADE DOS ÓLEOS 37

3.5 PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES 38
3.5.1 Sistema EHL - Equilíbrio hidrofílico lipofílico 38
3.5.2 Teste de formação de emulsão 39
3.6 TESTES DE EMULSÕES 41
3.6.1 Testes de estabilidade de emulsões 41
3.6.2 Análise microscópica do tamanho das partículas 41
3.6.3 Teste de viscosidade 41
3.6.4 Imunogenicidade por teste ELISA 42
3.6.5 Ensaio imunoenzimático para determinação da imunogenicidade do vírus rábico nas emulsões estáveis e não tóxicas 43
3.6.6 Ensaio imunoenzimático para determinação da relação dos subtipos de IgG (1 e 2a) no soro 43
3.6.7 Ensaio imunoenzimático para determinação da produção de IgE total no soro 44
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 45

4. RESULTADOS 46

4.1 TESTES DE TOXICIDADE 46
4.2 PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES 47
4.2.1 Sistema EHL - Equilíbrio hidrofílico lipofílico 47
4.2.2 Teste de formação de emulsão 48
Procedimento padronizado para a preparação de emulsões 48
4.3 TESTES DE EMULSÕES 50
4.3.1 Testes de estabilidade de emulsões 50
4.3.2 Principais formulações 51
4.3.3 Análise microscópica do tamanho das partículas 52
4.3.4 Viscosidade 58
4.3.5 Imunogenicidade 58
4.3.6 Ensaio imunoenzimático para determinação da imunogenicidade do vírus rábico nas emulsões estáveis e não tóxicas 59
4.3.7 Relação IgG1 e IgG2a 70
4.3.8 Ensaio imunoenzimático para indicação de níveis séricos de IgE total 70

5. DISCUSSÃO 72

6. CONCLUSÕES 81

REFERÊNCIAS 82

APÊNDICE 1 - TABELA DE CÁLCULO DE EHL 96

ANEXO 1 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA BUTANTAN 98

ANEXO 2 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA USP 99

ANEXO 3 - PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE 100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Reação vacinal à vacina oleosa em bovino. 33

FIGURA 2 - Reação vacinal à vacina oleosa em bovino. 34

FIGURA 3 - Gráfico da evolução anual do abate de bovinos – Brasil – 2002 – 2011. 35

FIGURA 4 - Imagem ilustrativa do teste de determinação to tipo de emulsão. 40

FIGURA 5 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação Gs (girassol), ... 53

FIGURA 6 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação Gs.Q (girassol com saponina) 54

FIGURA 7 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação GsCl.Q (girassol, canola com saponina). 55

FIGURA 8 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação GsClBt.Q (girassol, canola, buriti com saponina) 56

FIGURA 9 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação GsBt (girassol, buriti) 57

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol. 60
GRÁFICO 2 - Resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de canola 61
GRÁFICO 3 - Resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol e óleo de buriti. 62
GRÁFICO 4 - Resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol e óleo de canola 63
GRÁFICO 5 - Resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol, óleo de canola e óleo de buriti. 64
GRÁFICO 6 - Cinética da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol 65
GRÁFICO 7 - Cinética da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de canola. 66
GRÁFICO 8 - Cinética da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol e óleo de canola 67
GRÁFICO 9 - Avaliação comparativa da cinética da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol e óleo de buriti 68
GRÁFICO 10 - Cinética da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol, óleo de canola e óleo de buriti. 69
GRÁFICO 11 - Avaliação comparativa dos níveis séricos de IgE total das composições adjuvantes 71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Média de peso de lesões removidas em frigoríficos comerciais	35
TABELA 2 -	Referência para cálculo de EHL requerido	39
TABELA 3 -	Resultados dos testes de toxicidade de óleos vegetais	46
TABELA 4 -	Referência para cálculo de EHL requerido;	48
TABELA 5 -	Número de testes realizados por amostra de óleo por faixa de valor de EHL	50
TABELA 6 -	Estabilidade dos óleos com melhor formação de emulsão	51
TABELA 7 -	Principais formulações	52
TABELA 8 -	Dados das imagens microscópicas da formulação Gs (Girassol),	53
TABELA 9 -	Dados das imagens microscópicas da formulação Gs.Q (Girassol e saponina),	54
TABELA 10 -	Dados das imagens microscópicas da formulação GsCl.Q (Girassol, canola e saponina)	55
TABELA 11 -	Dados das imagens microscópicas da formulação GsClBt.Q (Girassol, canola, buriti e saponina)	56
TABELA 12 -	Dados das imagens microscópicas da formulação GsBt (Girassol, e buriti)	57
TABELA 13 -	Viscosidade	58
TABELA 14 -	Relação IgG1 e IgG2a	70

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descrição
ADS	Sistema de fornecimento de antígeno
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
CD11c	Marcador de célula mieloide
CD4+	Receptor 4 de linfócitos T auxiliar
CD40	Receptor 40 das células apresentadoras de antígeno
CD8+	Receptor de linfócito T citotóxico
CO_2	Dióxido de carbono
CTLs	Linfócito t citotóxico
DC-SIGN	Molécula de adesão de célula endotelial
DE_{50}	Dose efetiva 50%
DEC-205	Receptor endocítico de fagocitose e processamento
DL_{50}	Dose letal 50%
DO	Densidade ótica
Fcε	Receptor para fração Fc da imunoglobulina E
Fcα	Receptor para fração Fc da imunoglobulina G
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
ICAM -2	Receptor de célula endotelial
ICAM-1	Receptor de célula endotelial
ICAM-3	Receptor de célula endotelial
IgD	Imunoglobulina D
IgM	Imunoglobulina M

Abreviatura	**Descrição**
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF-α	Interferon alfa
INF-γ	Interferon gama
INF-β	Interferon beta
MAP	Proteinoquinase ativada por mitógenos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NADP	Nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato
NFκB	Fator nuclear κB
NK	Células *natural killer*
OMS	Organização mundial de saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salina
PEG	Polietileno glicol
Th1	Células T auxiliar 1
Th2	Células T auxiliar 2
TLRs	Receptores *toll-like*
TNBS	Ácido sulfúrico trinitrobenzeno
TNF -α	Fator de necrose de tumor alfa

RESUMO

CARVALHO, M. A. **Avaliação do uso de óleos de origem vegetal para formulação de adjuvantes vacinais**. 2012, 102f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

Os óleos vegetais são matérias primas de fontes renováveis. São metabolizáveis, biodegradáveis, de fácil disponibilidade e baixo custo. A necessidade de adjuvantes vacinais seguros e que possam modular a resposta imunológica Th1/Th2, favorece a busca por novas substâncias que assim se comportem. Este trabalho tem o objetivo de avaliar e identificar óleo vegetal capaz de mimetizar ação adjuvante dos óleos minerais comercialmente usados e modular a resposta imune. Foram realizados testes de toxicidade aguda *in vivo*, testes de formação de emulsões, de estabilidade, de qualidade e, por fim, de imunogenicidade com formulações com o vírus rábico. Algumas formulações derivadas dos óleos de girassol, canola e buriti se mostraram não tóxicas, estáveis e de boa qualidade. Os grupos de camundongos inoculados com estas formulações obtiveram respostas imunológicas que apoiam sua capacidade adjuvante, não diferenciando significativamente ($p<0,05$) dos resultados do óleo mineral comercial. Concluiu-se que é possível elaborar emulsões estáveis não tóxicas a partir de óleos vegetais para sua utilização como veículos e adjuvantes vacinais. Formulações vacinais em forma de emulsões de óleos vegetais, compostas na sua maior parte pelos óleos de girassol e de canola possuem potência e atividade adjuvante semelhantes e tão eficientes quanto aos do óleo mineral. Os óleos vegetais devem estar em seu estado bruto ou semirrefinado, sem a adição de antioxidantes e conservantes. Por último, parece haver uma tendência de equilíbrio de resposta Th1/Th2 para as formulações com óleos vegetais.

Palavras-chave: adjuvante, óleo vegetal, vacina, raiva

ABSTRACT

CARVALHO, M. A. **Assessment of the use of vegetable oils for formulation of vaccine adjuvant.** 2012, 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

Vegetable oils are renewable raw materials. These substances are metabolizable, biodegradable, of easy availability and low cost. The need for safe vaccine adjuvants that can modulate the Th1/Th2 immune response drives the search for new substances with similar behavior. This study aims to evaluate and identify a vegetable oil able to mimic the adjuvant action of the mineral oils used commercially, and modulate the immune response. There were performed tests of *in vivo* acute toxicity, emulsion formation, stability, quality and immunogenicity with formulations with rabies virus. Some formulations derived from the sunflower, canola and buriti oils proved to be non-toxic, stable and of good quality. Groups of mice inoculated with these formulations had immune responses supporting their adjuvant capacity, not differing significantly ($p < 0.05$) from the results of the commercial mineral oil. It was concluded that it is possible to prepare stable non-toxic emulsions from vegetable oils to be used as vaccine adjuvants and vehicles. Vaccine formulations as emulsions from vegetable oil, composed mostly by the oils of sunflower and canola had adjuvant activity and potency similar to and as effective as the mineral oil. The vegetable oils should be in its raw state or semi refined, without the addition of antioxidants and preservatives. Finally, there seems to be a tendency to balance Th1/Th2 response by formulations with vegetable oils.

Key words: adjuvant, vegetable oil, vaccine, rabies

1. INTRODUÇÃO

1.1 Adjuvantes

Adjuvantes são moléculas, compostos ou complexos macromoleculares que impulsionam a potência e longevidade de uma resposta imune específica a antígenos, mas que causam toxicidade mínima ou efeitos imunológicos duradouros por si mesmos (WACK; RAPPUOLI, 2005). Adjuvantes são também definidos como um grupo de substâncias estruturalmente heterogêneas usadas para induzir ou aumentar a resposta imunológica a um antígeno (GUPTA *et al.*, 1993). São essenciais na indução e modificação da resposta imune e, por isso, uma variedade de substâncias está disponível para esta finalidade.

Classicamente, exemplos conhecidos são sais de alumínio ou cálcio, emulsões, saponinas, blocos de polímeros não iônicos, derivados de lipopolissacarídeos, micobactérias e muitos outros, capazes de favorecer ou amplificar uma etapa particular dos eventos imunológicos e finalmente iniciar uma resposta mais eficiente. Os mecanismos moleculares e celulares in vivo, necessários para a geração da resposta imune efetora, que dependem também da cooperação de um adjuvante, ainda são pouco compreendidos principalmente no requerimento estrutural do que seria um adjuvante (MARCIANI, 2003; STORNI *et al.*, 2005; VILLINGER, 2003).

Tradicionalmente as vacinas são classificadas de várias formas, contudo uma classificação usual é a capacidade dos componentes vacinais se replicarem no hospedeiro ou não, ou seja, vacinas vivas atenuadas ou patógenos inativados, respectivamente. Na segunda categoria estão incluídas as vacinas derivadas de subunidades. Estas, por sua vez, são bem mais seguras do que os outros tipos de vacinas, porém, devido a sua fraca imunogenicidade, requerem com frequência a utilização de adjuvantes para obter uma resposta imune desejada. Na ausência de um adjuvante, a carência da resposta imunológica pode ser grave, levando as células T imaturas antígeno-específico a reconhecer o antígeno não eficientemente, podendo levar a uma tolerância (MITCHISON, 1964).

1.1.1 Função dos adjuvantes

Os adjuvantes podem ser utilizados para aumentar a imunogenicidade de um antígeno recombinante ou altamente purificado; reduzir a quantidade de antígenos ou o número de imunizações necessárias para uma imunidade protetora; aumentar a eficácia de uma vacina em recém-nascidos, idosos ou pessoas imunologicamente comprometidas; atuar como sistema de fornecimento de antígeno para estes serem absorvidos por mucosas (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Diversos fatores estão envolvidos na resposta imune para que um adjuvante seja caracterizado. Entre estes fatores estão o antígeno, a espécie a ser vacinada, a via de administração e, provavelmente, o efeito adverso que pode causar. O adjuvante ideal é aquele que possui estabilidade, biodegradabilidade, baixo custo de produção, que não tem como principal efeito adverso a indução de doenças autoimunes e que produz uma resposta imune celular ou humoral apropriada.

O maior problema que pode ocorrer pela adição de um adjuvante numa formulação de vacina está na possibilidade de induzir reações adversas, que podem ser locais ou sistêmicas.

As reações locais geralmente se caracterizam por dor, inflamação local, edema, necrose, linfoadenopatia, granuloma, úlcera e a geração de abscessos estéreis. As reações sistêmicas incluem náuseas, febre, artrite, uveíte, eosinofilia, alergia, anafilaxia, toxicidade em órgãos específicos (fígado e pulmão) e imunotoxicidade (ex: liberação de citocinas imunossupressoras ou doenças autoimunes) (ALLISON, BYARS, 1991; KURODA *et al.*, 2004; VOGEL, 2000; WATERS, TERRELL, JONES, 1986; WOODWARD, 2005).

Para uma avaliação completa da toxicidade de um adjuvante, implica em avaliar parâmetros farmacológicos e toxicológicos, tais como a observação de reações no local de inoculação, de febre ou outros efeitos sistêmicos (mesmo os mediados pelo sistema imunológico), teratogenicidade, genotoxidade, de efeitos adjuvantes na resposta imune, além de estudos da reação de hipersensibilidade para toxicidade de doses repetidas e de distribuição corporal do adjuvante (SESARDIC; DOBBELAER, 2004).

1.1.2 Classificações

Os adjuvantes podem ser classificados pela sua natureza química, origem ou propriedades físico-químicas (COX; COULTER, 1997). Uma classificação importante baseia-se no seu modo de ação: imunoestimulante ou baseado em um sistema de fornecimento antigênico ou, pela sigla em inglês *antigen delivery system* (ADS) (MARCIANI, 2003). Outra classificação que se sobressai toma referência dos receptores semelhantes ao *Toll* (TLR), os adjuvantes classificados como agindo por meio de receptores TLRs (TLR-dependente) ou com mecanismo de ação independente aos TRLs (TLR-independente).

Imunoestimulantes

Os imunoestimulantes referem-se à capacidade em modificar a rede de citocinas (COX, COULTER, 1997; EBENSEN, GUZMÁN, 2008; WILSON-WELDER *et al.*, 2009), podendo resultar em um aumento da regulação de todo sistema imunológico, porém com mais frequência há predominância de alguma citocina em detrimento de outras.

Existem vários subtipos de células T CD4+, entre eles se destacam Th1 e Th2. O subtipo Th1 responde tipicamente induzindo a ativação de células T CD8+ e secretando principalmente INF-γ, IL-2 e IL-12, levando a uma resposta imune celular, ao passo que a ação do Th2 resulta na secreção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, levando à resposta imune humoral (CHERWINSKI *et al.*, 1987; MOSMANN, CHERWINSKI, BOND, 1986; ROMAGNANI, 1991).

A seleção de um adjuvante imunomodulador apropriado não só conduz a um aumento da resposta imunológica como também pode determinar o isotipo de IgG. A resposta imune oscila totalmente em uma direção ou em outra. As oscilações mais notáveis são produzidas por sais de alumínio, onde há a predominância de células Th2 (> 90%) em relação a Th1 (MANCINO, OVARY, 1980) e por endotoxinas bacterianas e seus derivados (lipídio A e monofosforil lipídio A) que induzem uma resposta predominantemente por Th1 (JOHNSON; TOMAI, 1990).

Sistema de fornecimento antigênico

Os adjuvantes que atuam como sistema de fornecimento (ADS) têm basicamente um denominador comum: são de natureza particulada. Em contraste com muitos antígenos solúveis, que são muitas vezes ignorados pelo sistema imune, as partículas são reconhecidas como estranhas e também nocivas. Portanto, o ponto inicial quando se estipula um novo sistema de fornecimento de antígeno vacinal deve basear-se na estrutura da partícula que será requerida (BRAMWELL, PERRIE, 2006; KERSTEN, HIRSCHBERG, 2004). Este tipo de adjuvante é frequentemente obtido por agregação e formação de ligações entre proteínas antigênicas ou, convencionalmente, por adsorção ou precipitação do antígeno com sais de alumínio. Alternativamente o imunógeno pode ser quimicamente complexado a uma partícula carreadora (JEGERLEHNER *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2000), ou, ainda, sobre partículas parcialmente organizadas (KERSTEN, CROMMELIN, 2003; NALLET *et al.*, 2009; ZURBRIGGEN, 2003). Qualquer tipo de partícula facilita o reconhecimento do antígeno por uma APC profissional de forma a aumentar totalmente ou parcialmente a concentração intracelular do antígeno.

O conceito de localização em função da reatividade imunogênica está na razão de poucas células que capturam e transportam os antígenos para os linfonodos. As células dendríticas que estão residentes em todos os tecidos são as mais potentes ativadoras de células T. Elas migram para os tecidos linfoides secundários e apresentam antígenos que foram ingeridos originalmente nos sítios periféricos de infecção ou inoculação. Portanto, um adjuvante ideal para início da resposta deve preferencialmente direcionar o antígeno para as células dendríticas (COQUERELLE, MOSER, 2010; ZINKERNAGEL *et al.*, 1997).

O direcionamento do antígeno para as células dendríticas pode ser feito por inoculação do antígeno em regiões onde há maior concentração dessas células, como na epiderme, onde existem células de Langerhans; ou direcionando o antígeno por meio de moléculas alvo, tais como marcador mieloide CD11c, molécula de adesão DC-SIGN, receptor endocítico de fagocitose e processamento de antígeno DEC-205; ou moléculas ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, que são receptores de célula endotelial, complementar à célula T (ENGERING *et al.*, 2002; MAHNKE *et al.*, 2000) Com o mesmo

propósito foi demonstrado também que CLT podem ser ativadas após uma única inoculação de antígeno, sem a necessidade de adjuvante específico, pois as células T CD4 quando ativadas ajudam a sinalizar por meio da molécula CD40.

TLR-dependente

Outro mecanismo de ação importante está na ligação de PAMP a TLR sobre as APCs, levando a uma série de eventos e iniciando uma resposta adaptativa com amadurecimento destas, com aumento consequente da regulação de moléculas coestimuladoras (família B7) e migração para a rede linfática.

A ligação de TLR através de PAMP ou seus similares imunoestimulantes induz à produção de uma série de mediadores importantes para a resposta imune inata, cujas citocinas e quimiocinas produzem moléculas coestimulatórias essenciais para indução da resposta imune adaptativa (STORNI *et al.*, 2003).

TLR-independente

Os mecanismos de ação TLR-independentes trazem novo entendimento sobre os sistemas de fornecimento antigênico para além de sua ação de multimerização e internalização de antígenos. Eles podem realizar a ativação da imunidade inata ao agirem em células do estroma e outras células do sangue e estes, por sua vez, produzem citocinas ativadoras de células dendríticas ou mesmo se diferenciam nelas. Também podem agir diretamente nas células dendríticas ou por meio de outras células acessórias como a iNKT ou mastócitos (DE GREGORIO; D'ORO; WACK, 2009).

O hidróxido de alumínio foi descrito como tendo pelo menos três modos de ação TLR-independente, como por causar necrose local de células do estroma provocando a liberação de ácido úrico, um sinal de perigo endógeno que ativa o complexo inflamasomo NLRP3. Como o MF59, o alumínio age também estimulando o recrutamento de macrófagos, granulócitos e monócitos para o local de inoculação e os estimula a produzir citocinas para gerar ambiente imunoestimulatório local que posteriormente levará a ativação de células dendríticas (KOOL *et al.*, 2008; MOSCA *et al.*, 2008). Quil-A (saponina)

e quitosana ativam o NLRP3 por meio de IL1β e o alumínio ainda por meio da protease lisossomal Catepsina B (HORNUNG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008).

O entendimento da ativação da imunidade inata TLR-dependente e TLR-independente pelos diversos adjuvantes será de vital importância para o controle de respostas adaptativas a uma vacina e também dos modos de se contornar as possíveis reações indesejáveis a ela (ISHII, AKIRA, 2007; KRIEG, 2007).

1.1.3 Tipos de adjuvantes

1.1.3.1 Sais minerais

Historicamente, os sais de alumínio, especialmente o hidróxido e o fosfato de alumínio, foram os adjuvantes mais usados em vacinas para humanos e para animais de interesse veterinário, devido ao grau de segurança e ao baixo custo (ALLISON; BYARS, 1991). São pouco significativos para indução de respostas imunes celulares. Recentemente, foi constatado que sais de alumínio desencadeiam uma via primitiva de reconhecimento inato de cristais em monócitos e desencadeia sua mudança para células dendríticas. Diversos adjuvantes desses sais também acionam células do estroma, levando à produção de quimiocinas necessárias na atração de células da imunidade inata para o local da injeção. (LAMBRECHT *et al.*, 2009)

Vacinas contendo adjuvante à base de hidróxido de alumínio causam o desenvolvimento de granulomas em suínos, provocando grandes prejuízos. (VALTULINI *et al.*, 2005). Ainda, provocam função renal reduzida, com potencial de grande toxicidade, quando acumulado no organismo, podendo causar uma síndrome neurológica fatal e demência associada a distúrbios nervosos, além do potencial de desenvolvimento de esclerose amiotrófica e da doença de Alzheimer e outras enfermidades. (FROST *et al.*, 1985; GOTO *et al.*, 1993; MOYLETT, HANSON, 2004)

1.1.3.2 Compostos tensoativos

Uma mistura de saponinas obtidas a partir de um extrato aquoso da *Quillaja saponaria* é um exemplo de composto tensoativo: o Quil-A. Produto natural composto de mais de 23 saponinas diferentes, demasiadamente tóxico para o uso humano, uma vez que promove reações locais severas, como granulomas. Suas frações purificadas por cromatografia de fase geram o QS-21, menos tóxico, que induz fortes respostas celulares contra vários antígenos derivados de patógenos (ALLISON, BYARS, 1991; FRANCIS *et al.*, 2002; MBAWUIKE, ZANG, COUCH, 2007).

1.1.3.3 Adjuvantes derivados de micro-organismos

Alguns componentes bacterianos ou fúngicos constituem uma fonte de potenciais adjuvantes devido a sua potente capacidade imunoestimulante: peptidioglicanos ou lipopolissacarideos (LPS) – bactérias - realçam interação com TLRs. As diferentes espécies de bactérias usadas como uma fonte de adjuvantes incluem *Mycobacterium spp., Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* e *Neisseria meningitidis*. A principal atividade adjuvante delas é mediada pelo N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamine, muramil dipeptídio (MDP). O MDP estimula sozinho a imunidade humoral, associado em lipossomo ou com glicerol induz forte imunidade celular (AUDIBERT; LISE, 1993).

1.1.3.4 Partículas antigênicas no sistema das APCs

Partículas antigênicas no sistema de APCs: lipossomos, polímero de microesferas, nanogrânulos, complexo de imunoestimulação (ISCOMs), e partículas víricas (VLPs). Esses adjuvantes são utilizados como suporte de subunidades de proteínas e em vacinas de DNA. Suas interações biológicas e o seu mecanismo de ação imunológico pode estar relacionado ao seu tamanho

e à diversidade da natureza química do produto (AGUILAR, RODRÍGUEZ, 2007; CHRISTENSEN *et al.*, 2009; SHAHIWALA, VYAS, AMIJI, 2007).

1.1.3.5 Emulsões

Com a descoberta dos adjuvantes de Freund em 1956, as emulsões estiveram com frequência nos procedimentos de imunização. Um dos mais potentes adjuvantes descritos para diversos antígenos, o adjuvante completo de Freund (CFA), composto de óleo mineral e micobactérias mortas, é extensamente utilizado em procedimentos experimentais com animais de laboratório. Sua formulação original é bastante tóxica para uso em humanos. O uso frequente de vacinas com adjuvantes à base de óleo mineral resulta em reações adversas indesejáveis, como a formação de granulomas e cistos. Muitos dos efeitos adversos dos adjuvantes completo e incompleto de Freund são creditados ao óleo mineral, pelo fato de não ser biodegradável, podendo formar lesões ulcerativas no local da injeção (GUPTA *et al.*, 1993; MÁLAGA *et al.*, 2004).

Emulsões de óleos minerais

Dentre as categorias de adjuvantes, a emulsões tem sido largamente utilizadas na medicina veterinária e crescem mais e mais em importância na vacinação em humanos (AUCOUTURIER; ASCARATEIL; DUPUIS, 2006). Emulsão é a mistura de duas substâncias (ou tipos de substâncias) imiscíveis. Uma substância é dispersa noutra substância de fase contínua e estabilizada por uma ou diversas substâncias surfactantes ou emulsificadoras, presentes na interface das duas fases (GUY, 2007). Os agentes surfactantes podem ser definidos pelo valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) que informa suas relativas afinidades às diferentes fases: dos diferentes surfactantes (e valores) aos diferentes tipos de emulsões (VOLD, 1965).

Aqueles com baixo valor EHL, com maior afinidade a fases oleosas se inclinam a emulsões água em óleo, onde o antígeno se encontra diluídas em partículas dispersas em uma fase contínua de óleo. Outros surfactantes com alto valor EHL têm maior afinidade para fases aquosas gerando emulsões óleo

em água, onde o óleo constitui uma fase dispersa na fase contínua de água. Já no caso de um valor EHL intermediário, dispersões água em óleo em água podem ser obtidas. Neste caso, uma fase oleosa contendo pequenas partículas de solução aquosa está dispersa numa fase contínua de água (AUCOUTURIER, ASCARATEIL, DUPUIS, 2006; AUCOUTURIER, DUPUIS, GANNE, 2001; GUY, 2007). Ainda, surfactantes compondo adjuvantes vacinais demonstraram ter uma possível ação própria importante ao causar morte celular como fator de indução de imunogenicidade (JANSEN *ET AL.*, 2005; WU, YANG, 2004; YANG, WU, MORROW, 2004). Jansen (2005) afirma que a emulsão água em óleo se mostra como o sistema de entrega mais aconselhável para compor uma vacina de dose única para alcançar altos títulos duradouros de anticorpos. Outras composições como — óleo em água — e água em óleo em água — parecem também demonstrar bons resultados imunogênicos, mas com maior estabilidade, menor viscosidade, maior facilidade de administração e menor ocorrência de granulomas. (AGUILAR; RODRÍGUEZ, 2007).

As emulsões são elaboradas, levando em consideração principalmente a estabilidade, a capacidade de carreamento de antígenos, a aplicabilidade na indústria e os efeitos no local de aplicação do medicamento ou vacina (CHUNG *et al.*, 2001). O modo de liberação está estreitamente relacionado com as características dos óleos e da estabilidade das emulsões e os agentes surfactantes. Destes, os ésteres de sorbitol 20 e 80, apontam pistas para menor toxicidade e menores efeitos indesejáveis quando de origem vegetal que seus pares de origem mineral. (DAUGHERTY; MRSNY, 2006).

A maioria dos óleos utilizados para produção de vacinas é de origem mineral, hidrocarbonetos derivados de petróleo. Apesar do alto grau de pureza em relação aos óleos de origem animal usados no início do século passado como a lanolina, os óleos de origem mineral possuem um tempo residual o organismo extremamente elevado, além de diversos indícios de toxicidade e de origem de reações autoimunológicas (KURODA *et al.*, 2004). Os óleos vegetais parecem não apresentar este problema.

As emulsões são recomendadas para bovinos, pequenos ruminantes e aves, em seu uso veterinário (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001). No caso da febre aftosa, emulsões contendo o óleo mineral podem proteger o

bovino por um ano, enquanto que as formulações baseadas no hidróxido de alumínio requerem dois ou mais reforços. Em caprinos, utilizando o montanide ISA 206 (óleo mineral e mannideoleate) em formulações de vacinas contra febre aftosa, mostraram uma resposta imune mais rápida e mais elevada do que a estimulada por formulações com o hidróxido de alumínio (PATIL *et al.*, 2002).

Despontando como um dos maiores e mais bem sucedidos exportadores mundiais do setor de carnes, o Brasil enfrenta diversas limitações referentes à sanidade dos animais, doenças infecciosas, rastreabilidade (RUBIN; ILHA; WAQUIL, 2008). Nesse contexto e devido às exigências por parte dos países importadores, notadamente a Comunidade Europeia, fez-se necessária a melhoria na qualidade dos insumos envolvidos na produção, destacando-se as vacinas. Contudo, ainda hoje, as reações inflamatórias oriundas da vacinação em bovinos são causas de preocupação entre os criadores e empresários que atuam no segmento de carnes e derivados, em decorrência das significativas perdas econômicas devido à presença de extensos abscessos na musculatura (FRANÇA, 2006).

1.1.3.6 Uso de óleos vegetais como adjuvantes

As primeiras contribuições científicas do uso de óleos vegetais, mesmo sem especificação de sua identidade e natureza, para elaboração de emulsões oleosas em formulação de vacinas foram em 1916, Le Moignic e Pinoy, e em 1917, Tribondeau, que suspenderam bacilo tifoide e bacilos paratifoide A e B, respectivamente (OLITSKY, 1918). Ainda em 1916, com Le Moignic e Pinoy, houve a primeira evidencia do uso de emulsões oleosas na formulação de vacinas. *Salmonella typhimurium* inativada foi inoculada em camundongos com uma emulsão de água e óleo de vaselina (LE MOIGNIC; PINOY, 1916).

Em 1918, Olitsky testou óleo de oliva e de amêndoas com o objetivo de determinar um método prático de vacinação contra a disenteria bacilar. Mesmo não fazendo propriamente uma emulsão, elaborou suspensões de massa bacteriana em óleos puros, em misturas de óleos, com adição de lanolina (origem animal) ou não. Ele entendeu que seus melhores resultados de vacinas

em coelhos foram obtidos com o óleo de amêndoas (purificado) e o mesmo princípio poderia também se aplicar a quaisquer outros óleos não irritantes e absorvíveis, com a superação das desvantagens relacionadas às reações adversas e com potencial como veículo vacinal (OLITSKY, 1918).

O adjuvante 65 foi descrito composto de óleo de amendoim (86%), surfactante Arlacel A (10%) e monoesterato de alumínio (4%), com ação adjuvante descrita em testes experimentais com animais e humanos com vacina contra gripe (HILLEMAN, 1966; HILLEMAN *et al.*, 1972; WOODHOUR *et al.*, 1964). Outro grupo utilizou óleo vegetal (gergelim) com a vacina da gripe e encontrou menor capacidade imunogênica que a vacina com óleo mineral (FUKUMI, 1967).

Noutra tentativa de agregar a ação adjuvante do óleo de amendoim e uma suposta localização de ação do óleo de milho em macrófagos, um grupo desenvolveu uma emulsão adicionada a coadjuvantes glicerol e lecitina para uso com vacinas virais inativadas: Encefalite Equina Venezuelana, Encefalite Equina do Oeste, Febre do Vale do Rift. Foram evidenciadas as características vantajosas dos componentes em relação a outros adjuvantes por serem de origem natural em animais e de óleos vegetais metabolizáveis (REYNOLDS; HARRINGTON; CRABBS, 1980). Foram vacinados e posteriormente desafiados com vírus homólogos camundongos, hamsters, ovelhas e duas espécies de primatas não-humanos com expressão de potente ação adjuvante e com demonstração de segurança significativamente melhor quando comparado com adjuvantes de sais de alumínio ou elaborados com óleo mineral (LASAROW; WILLIAMS; THEIS, 1992).

Ainda, foram testados os óleos vegetais (amendoim, de soja, gergelim, algodão, girassol, damasco, abacate, amêndoa), óleos de peixe (tubarão), óleo de fígado de bacalhau, óleo de Olho-de-vidro-laranja (*Hoplostethus atlanticus*), óleo de vison (marta) e óleo de banha de suíno, óleo de gordura de frango e óleo triglicéride, para ver sua capacidade adjuvante. Tanto óleos vegetais quanto animais não formaram emulsões estáveis com os surfactantes escolhidos no trabalho e foram emulsionados com cera de abelhas (bruta, amarela e purificada). Todos os óleos vegetais e animais apresentaram reação tecidual indesejada significativamente menor que das emulsões com óleo mineral e com boa resposta protetora, contudo, somente o óleo de amendoim

apresentou tanta eficácia de resposta antigênica para Influenza aviária e Doença de Newcastle quanto o óleo mineral utilizado como controle (STONE, 1993).

O mesmo grupo testou outros surfactantes com os seguintes óleos: de canola, de amêndoa, de milho, de semente de algodão, de jojoba, de amendoim, de oliva, de flor de cártamo, de gergelim, de soja, de girassol, de germe de trigo, de linhaça, esqualeno, esqualano, de banha de suíno, de gordura de frango, de Olho-de-vidro-laranja, de Menhadem (STONE, 1997). Foram encontradas respostas imunológicas importantes em todos e com significativa melhora na viscosidade dos óleos não minerais comparado com estudo anterior (STONE, 1993) dando boas perspectivas de utilização de óleos não minerais com menor incidência de reações vacinais, ainda que sem imunogenicidade equiparável aos óleos minerais.

Os óleos de amendoim e de coco também foram utilizados em comparação com os efeitos dos adjuvantes completo e incompleto de Freund em macacos (*Erhythrocebus patas*) em composições vacinais contra sarampo, demonstrando resultados equiparáveis de capacidade adjuvante humoral e celular com o mínimo de reações adversas (EGHAFONA, 1996). Mais recentemente, foi evidenciado que os óleos de amendoim, algodão, milho, soja, arroz e o azeite de oliva, são todos passíveis de serem utilizados em emulsões estáveis com ação positiva adjuvante na produção de anticorpos em camundongos da linhagem Swiss (SILVA *et al*., 2001; MOTA, 2006; *apud* SARTOR, COLODEL, ALBUQUERQUE, 2011).

Vacinas monovalentes e polivalentes elaboradas com óleo mineral contra as doenças de aves têm sido utilizadas amplamente com grande eficácia, contudo, persistem nos tecidos animais por longo tempo, possuem potencial cancerígeno e podem causar excessiva reação tecidual (STONE; XIE, 1990).

Esqualeno é um precursor de hidrocarbonetos lineares de colesterol encontrado em muitos tecidos, especialmente do fígado de tubarões (Squalus) e de outros peixes, pode ser extraído de plantas e sintetizado quimicamente. Esqualano é produzido pela hidrogenação de esqualeno e é totalmente saturado, podendo ser encontrado naturalmente em pequenas quantidades em secreções sebáceas de diversos animais. Ambos são metabolizáveis e não-tóxicos e têm sido utilizados em diversos trabalhos, demonstrando ação

adjuvante satisfatória para doença de Newcastle (ALLISON, BYARS, 1986; BENISEK *et al.*, 2004; BRUGH, STONE, LUPTON, 1983; FOX, 2009; STONE, XIE, 1990; STONE, 1993, 1997; SÜLI *et al.*, 2004).

1.1.4 Perspectivas futuras dos adjuvantes

O princípio do direcionamento e governabilidade da proteção ao organismo é o sucesso da indução a uma resposta imunológica protetora e potente. Foi iluminadora a descoberta da presença de receptores nas células da imunidade inata, que reconhecem características e componentes padronizados sobre os patógenos. E o resultado é a geração de novas perspectivas de identificação dos receptores existentes nos patógenos, capazes de ativarem a resposta imune inata e levar a uma resposta antígeno-específica. Por conseguinte, novas classes de adjuvantes surgem a cada publicação, que potencializa as possibilidades de controle da resposta imune, por diversos mecanismos diferentes (NORDLY *et al.*, 2009; SIMERSKA *et al.*, 2009). Esta potencialidade dos novos adjuvantes, contudo, necessita de averiguação cuidadosa, pois as suas reações sobre o sistema imunológico poderão determinar danos irreversíveis. Nesta sequência, os adjuvantes que atuam como sistema de fornecimento pode apresentar uma função importante para a distribuição e administração do antígeno, de modo a interagir apropriadamente com células imunocompetentes, induzindo a resposta desejada (PICHICHERO, 2008).

Como nova perspectiva existe uma busca cada vez maior por adjuvantes que demonstrem uma sequência de uso e que não levem a uma resposta inflamatória nociva ao organismo; habilitando o sistema imune a estimular uma imunidade inata e a induzir imunidade adaptativa com a formação de anticorpos e células de memória, atuando de forma a mimetizar, com antígenos recombinantes ou purificados, a resposta imune que o patógeno desencadearia (AGUILAR, RODRÍGUEZ, 2007; DUPUIS *et al.*, 2009; EBENSEN, GUZMÁN, 2008; HARANDI, MEDAGLINI, SHATTOCK, 2010; O'HAGAN, VALIANTE, 2003; REED *et al.*, 2009; SINGH, O'HAGAN, 2003; WILSON-WELDER *et al.*, 2009).

1.2 Vacinas

Desenvolver vacinas eficientes e eficazes, desde os seus primórdios, tornou-se um desafio de grandes proporções. Uma vacina é eficiente quando gera anticorpos específicos em testes com animais de laboratório. É eficaz quando gera resposta tal em uma população que diminui a incidência da doença que foi desenhada para combater.

O hábito de inoculação com substâncias advindas da varíola tem registros sugestivos na literatura chinesa do século onze (Plotkin, 2005). Durante a revolução americana foi bastante utilizada tanto por ingleses quanto por americanos (FENN, 2003), contudo, somente com as observações de Jenner foi notado que pessoas acometidas por varíola bovina (infecção branda em humanos) estavam prevenidas contra a varíola humana. A associação de causa e efeito foi inferida a partir das substâncias dos agentes infecciosos responsáveis pela geração da proteção imunológica no organismo inoculado (FEIJÓ, SÁFADI, 2006; PASHINE, VALIANTE, ULMER, 2005; PLOTKIN, ORENSTEIN, OFFIT, 2008).

A utilização maciça da vacinação na prática médica a partir do início do século 19 é considerada entre as mais importantes causas do declínio das doenças de maior morbidade e mortalidade (junto com o fornecimento de água potável à população). Vacinação em massa nos rebanhos animais ainda constitui o método de maior sucesso na prevenção de perdas na produção animal por doenças infecciosas (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001).

Como atividade de imunização que promove a humanos e animais proteção contra determinada doença infecciosa, a vacinação decresce no mundo, como prática de intervenção na profilaxia de doenças, mesmo antes de atingir significativa parte da população de países pobres (EHRETH, 2003; MOSSONG, MULLER, 2000; SCHIJNS, 2003). Em países mais desenvolvidos, há uma tendência da população em subestimar a gravidade das doenças infeccionas, bem como das autoridades em relação à economia das ações em medicina preventiva. Consideradas como verdadeiros milagres, os processos de erradicação das epidemias de varíola e poliomielite, somente foram possíveis pela utilização da vacinação em larga escala. Somente metade das

crianças no mundo, cerca de três milhões, fica prevenida de morrer de hepatite B, sarampo, tétano e febre amarela (BREIMAN, 2001).

1.2.1 Vacina da Raiva

Raiva é uma zoonose viral que acomete especialmente os mamíferos. A transmissão se dá normalmente em estreita relação com animais infectados por mordeduras, lambeduras, arranhaduras e aerossóis em cavernas, contudo, existem relatos de transmissão relacionadas a más práticas de laboratório, transplantes de órgãos, infecção hospitalar por trabalhadores da área de saúde que estiveram em contato com paciente de caso fatal (BRONNERT *et al.*, 2007; MAHAMAT *et al.*, [S.d.]).

Epidemiologicamente, o ciclo urbano é composto pelo cão como principal reservatório e maior transmissor, seguido do gato. Animais silvestres mais comuns que compõem o ciclo silvestre são: canídeos na Europa, América do Norte; morcegos hematófagos e insetívoros na América Latina, e ainda outros como macaco, raposa, coiote, chacal, gato do mato, jaritataca, guaxinim e mangusto. Doença que relatada desde o antigo EGITO, ainda é responsável por cerca de 55.000 mortes de seres humanos a cada ano, sem contar dos animais, e mobiliza ações globais em seu controle (HAIDER, 2008; JOHNSON; CUNNINGHAM, FOOKS, 2010; VOELKER, 2007).

1.3 Justificativa

A primeira justificativa refere-se à utilização de matéria prima de fontes renováveis. Os óleos vegetais advêm especialmente de grãos, e podem ser produzidos segundo a necessidade específica de uma possível composição adjuvante. Os óleos de plantas amazônicas e do cerrado podem contribuir para preservação dessas espécies e do bioma de modo geral, contribuindo também para as comunidades que fazem cultivo e coleta dos frutos destas plantas. Os óleos vegetais também são metabolizáveis, biodegradáveis, de fácil disponibilidade e baixo custo.

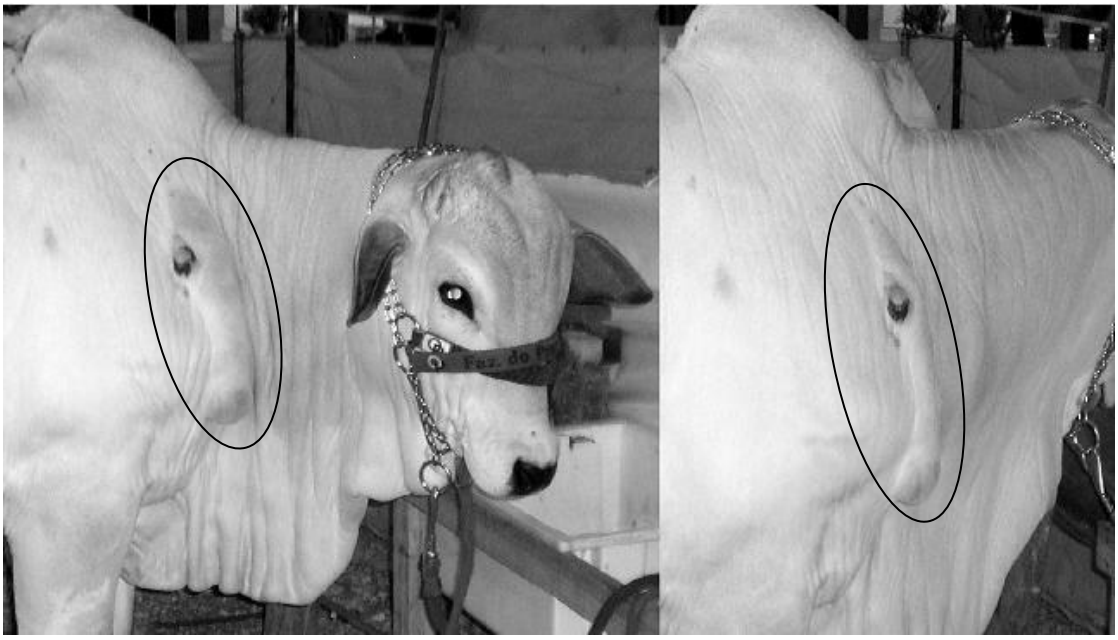

FIGURA 1 - Reação vacinal à vacina oleosa. Foto de um bovino da raça nelore de 12 meses de alta linhagem genética em feira internacional de raças bovinas para produção de carne. Reação vacinal na base do pescoço.

Na indústria frigorífica e de tecnologia de carnes, o abate dos animais é determinante para o bom aproveitamento das carcaças e produtividade da cadeia produtiva. No abate de bovinos, no acompanhamento na etapa de esfola (retirada da pele) é comum visualizar na base do pescoço dos animais uma substância oleosa escorrer sob o tecido subcutâneo, na região anatômica indicada para serem inoculadas as vacinações obrigatórias e eletivas. Esta

substância é o óleo mineral, por ele não ser metabolizável. Este óleo não é separado e é descartado como efluente de frigorífico (poluente). Outra evidência de alta incidência é a formação de abscessos e granulomas, como demonstrados nas FIGURAS 1 e 2. Tal fato gera um ganho econômico considerável em virtude da diminuição da perda de carne, tecido animal e couro.

Por ocasião do abate, as reações vacinais dos tecidos adjacentes são descartadas com nenhum ou baixíssimo aproveitamento – subproduto de baixo valor agregado (comumente decorrentes de vacinas que utilizam óleo mineral) (FRANÇA, 2006). O peso médio das lesões pode variar significativamente, como descrito na TABELA 1.

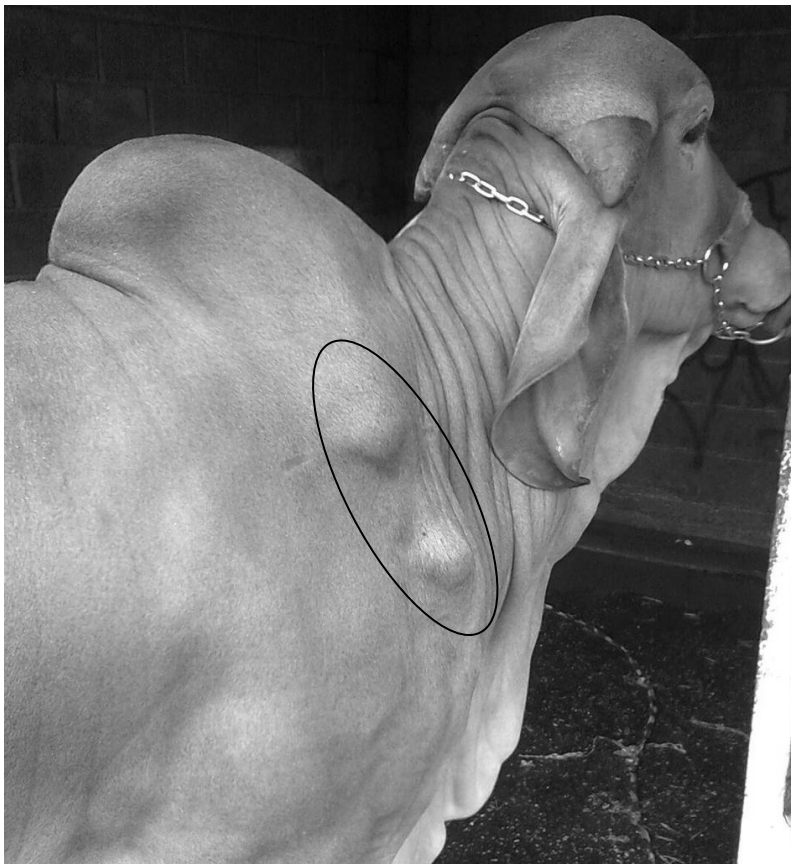

FIGURA 2 - Reação vacinal à vacina oleosa. Foto de um bovino da raça gir de 12 meses de alta linhagem genética em feira internacional de raças bovinas para produção de leite. Reação vacinal na base do pescoço.

TABELA 1 - Média de peso de lesões removidas em frigoríficos comerciais

Média kg/animal	Publicação
0,278	Moro; Junqueira (1999) *apud* (FRANÇA, 2006)
0,459	Moro; Junqueira; Umehara (2001) *apud* (FRANÇA, 2006)
0,405	Braggion; Silva (2004) *apud* (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011)
0,213	(FRANÇA, 2006)
0,630	Amorim et al. (2009) *apud* (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011)
1,280	(ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011)

Mas, se dentre os trabalhos supracitados for calculada uma média simples das lesões removidas e rejeitadas (0,544 kg/animal) e multiplicada pelo número total de bovinos abatidos no Brasil em 2011, 28,814 milhões de cabeças (IBGE) (FIGURA 3), pode-se sugerir uma estimativa de perda de 15 mil toneladas de carne bovina para reações vacinais.

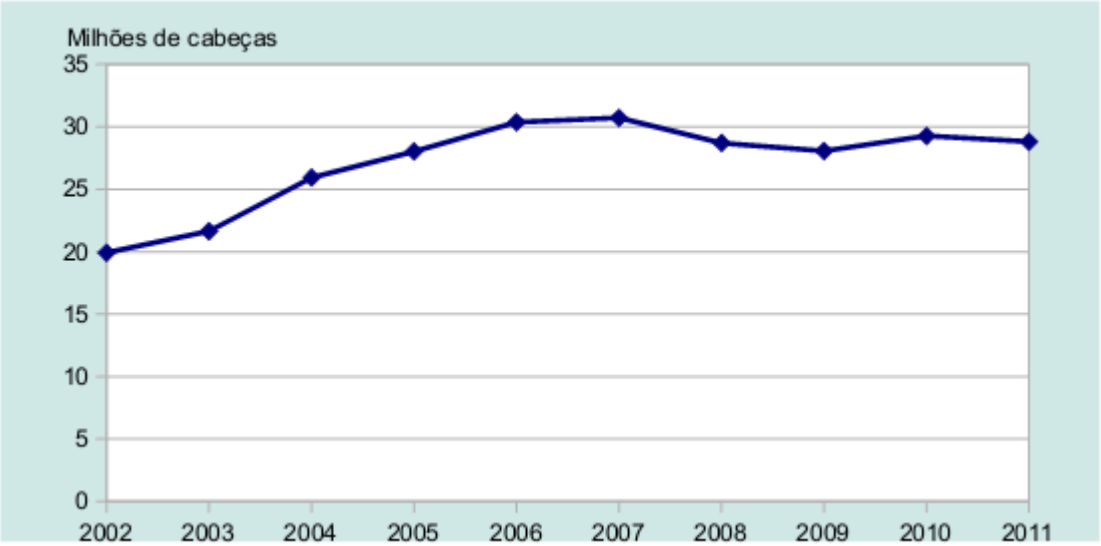

FIGURA 3 - Gráfico da evolução anual do abate de bovinos – Brasil – 2002 – 2011. **Fonte**: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral de Abate de Animais 2011.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar e selecionar óleo de origem vegetal que pudesse mimetizar a ação adjuvante de um óleo branco mineral farmacêutico (hidrocarboneto parafínico) comercial na elaboração de emulsões para vacinas de uso animal. Para isto, este óleo vegetal deve dar origem a emulsão estável não tóxica. Deve ainda possuir potencial custo-efetivo, viabilidade industrial e comercial para possível adjuvante como produto para o mercado. Finalmente, identificar um óleo de origem vegetal que possa modular satisfatoriamente a resposta imunológica uma resposta humoral (Th2) a um antígeno específico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

As amostras foram compostas por óleos comerciais adquiridos junto a empresas certificadas de óleos vegetais. Foram utilizados os óleos de: amêndoas, arroz, canola, girassol, milho, semente de uva, soja, andiroba, maracujá, copaíba, açaí, jojoba, castanha do pará, buriti, cupuaçu e outros.

3.2 Surfactantes

Foram utilizados os surfactantes não iônicos de origem vegetal de comprovada ação no aperfeiçoamento da estabilidade de sistemas dispersos (YANG; WEI; SHEN, 2005). São eles os ésteres de sorbitol (tween) 20 e 80 (ALKEST TW 20 e 80, OXITENO), e ésteres de ácidos graxos (span) 20 e 80 (ALKEST SP 20 e 80, OXITENO).

3.3 Antígeno

O antígeno utilizado foi uma suspensão de vírus da raiva inativado por β-propiolactona (Instituto Butantan), obtido de células VERO cultivadas livre de soro fetal bovino (ATCC-CCL81) e infectadas com vírus fixo da cepa PV/RV/VERO Stock I (Institute Pasteur) (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004), contendo 8 UI/ml e 1mg de proteínas totais. O instituto testou a suspensão para vírus adsorventes, micoplasma, DNA residual, esterilidade e inativação de agentes adventícios, obtendo aprovação em todos os testes.

3.4 Testes de toxicidade dos óleos

Para os testes de toxicidade aguda *in vivo* foram inoculados 0,5ml de óleo na cavidade peritoneal de camundongos de peso inicial de 18 a 25 g. Foram utilizados 5 animais da linhagem Swiss por grupo para cada óleo e um

para grupo controle. Foi observada a toxicidade aguda e óbitos nas primeiras 72h. Os animais foram observados pelo total de 7 dias para observação de sinais de intoxicação.

3.5 **Preparação das emulsões**

As emulsões foram preparadas a partir da fração oleosa composta de óleos, puros ou *blends* (mistura de um ou mais óleos) adicionadas a surfactantes de 9:1, 8:2 e no máximo 7:3, bem como algumas concentrações intermediárias entre essas. Os óleos e *blends* que resultaram em emulsões estáveis (mínimo de 7 dias a 25°C) nas distintas formulações resultantes foram submetidos a outros testes.

3.5.1 Sistema EHL - Equilíbrio hidrofílico lipofílico

Introduzido por GRIFFIN (1949), é um sistema de escala numérica adimensional de valores entre 1 a 20, utilizada para descrever a natureza do agente tensoativo, sendo que os valores aumentam de acordo com a hidrofilia da molécula. O EHL de um emulsificante está sempre relacionado com a sua solubilidade. Substâncias a serem emulsificadas podem ser caracterizadas por um valor de EHL Requerido, que é o valor aproximado onde a substância é mais provável de formar emulsão estável (determinado pela experiência).

Cada óleo a ser emulsificado possui um valor de EHL chamado Requerido (EHL Req), o qual varia de acordo com cada lote de extração de óleo e beneficiamento posterior, mantendo, contudo, uma pequena faixa de valores que podem sem focados para resultados esperados satisfatórios.

O EHL Resultante de uma mistura de surfactantes deve aproximar-se ao máximo do EHL Req e pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$A + B = 100$

$EHL\text{-}A \times 0{,}01A + EHL\text{-}B \times 0{,}01B = EHL\ Resultante$

Sendo: A = porcentagem de tensoativo hidrofílico;

B = porcentagem de tensoativo lipofílico;
EHL-A = equilíbrio hidrofílico lipofílico de A;
EHL-B = equilíbrio hidrofílico lipofílico de B;

Os testes para se descobrir o EHL Req de cada óleo seguem a referência dos valores de EHL dos surfactantes, como exemplificados para o Span 80 e o Tween 80 na TABELA 2.

TABELA 2 - Referência para cálculo de EHL requerido

Span80 - EHL 4,3 %	**Tween80 - EHL 15 %**	**EHL Resultante**
93	7	5,05
84	16	6,01
75	25	6,98
65	35	8,05
56	44	9,01
46	54	10,08
37	63	11,04
28	72	12,00
19	81	12,97
9	91	14,04
0	100	15,00

3.5.2 Teste de formação de emulsão

Os óleos puros e *blends* foram dispostos para a formação de emulsões misturados a agentes emulsificadores. As emulsões foram preparadas de acordo com procedimentos padrão para sistemas dispersos (Jansen *et al.*, 2005). As emulsões foram realizadas com alta força laminar entre 11.000 e 20.000 rpm, utilizando o Ultra Turrax® T25 basic (IKA, EUA), por cerca de 20 minutos, em temperatura entre 2 a 8°C para manutenção das características

antigênicas do vírus da raiva, com o objetivo de alcançar partículas de aproximadamente 1µm (haste específica do equipamento).

A mistura é deixada em repouso por 5 minutos e em seguida examinada ao microscópio para verificação da formação de partículas delimitadas. Uma parte da mistura é colocada em duas partes de óleo para confirmação de formação da emulsão água em óleo e agitadas manualmente em um pequeno tubo falcon. Se a mistura mantiver uma delimitação coesa com o óleo fica confirmada a formação da emulsão (falcon à direita). Quando misturada na mesma proporção com água, o sistema emulsivo se desfaz (falcon à esquerda), conforme ilustrada na FIGURA 4.

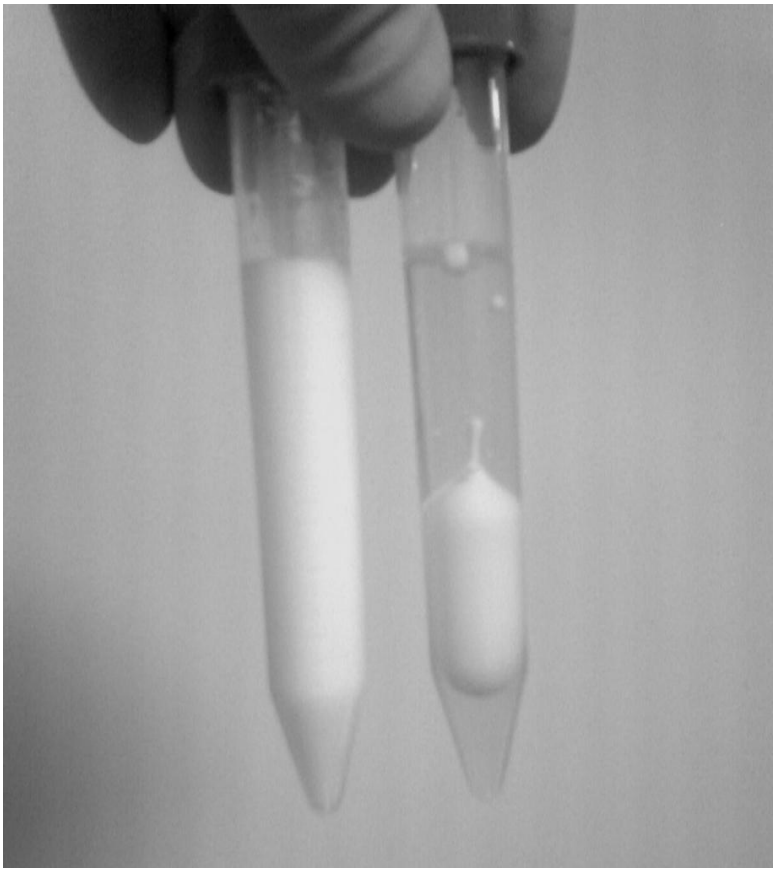

FIGURA 4 - Imagem ilustrativa do teste de determinação to tipo de emulsão. É feita a mistura de uma parte de uma emulsão para três partes de óleo ou água para verificar de modo simples e inequívoco a formação de emulsão e o tipo de emulsão formada. Neste exemplo, o sistema emulsivo permaneceu estável e delimitado quando misturado em três partes de óleo (falcon à direita), e sistema desfeito na mistura com três partes de água (falcon à esquerda). Esta é uma emulsão Água-em-Óleo.

3.6 Testes de emulsões

Nas emulsões propriamente ditas, foram feitas observações e testes específicos e, para efeito comparativo, foi utilizada a mistura óleo branco mineral (Marcol - Exxon, Itália): Montanide ISA50V (SEPPIC, França) (9:1).

3.6.1 Testes de estabilidade de emulsões

Testes de estabilidade física dos sistemas emulsivos foram realizados pela determinação da aparência macro e microscópica após estocagem a temperatura ambiente (25°C). As emulsões foram analisadas com 24hs e aos 7 dias através de microscopia, para observação de estabilidade.

3.6.2 Análise microscópica do tamanho das partículas

Para a análise dos sistemas emulsivos e medição do tamanho médio das partículas da emulsão foram feitas 10 imagens de distintos pontos em 2 lâminas preparadas para cada formulação (5 imagens por lâmina) pelo microscópio ótico Olympus BX50 adaptado com câmera CoolSNAP-Pro cf color (Media Cybernetics) e processadas pelo software Image-Pro Plus (versão 4.5.1.29). Com imagem aumentada em 200x, foi medido o diâmetro médio das partículas e o desvio padrão do diâmetro médio. Depois foi calculada a média dos diâmetros médios das 10 imagens de cada formulação e calculado o desvio padrão da média dos diâmetros médios.

3.6.3 Teste de viscosidade

A viscosidade foi medida com viscosímetro capilar RHEOTEST® LK (RHEOTEST Messgeräte Medingen GmbH), com o capilar no. 2 (faixa aproximada de 5 a 100 mPas).

3.6.4 Imunogenicidade por teste ELISA

Vacinas da raiva foram elaboradas com as emulsões que obtiverem resultados favoráveis nos testes de toxicidade e de estabilidade. A imunogenicidade do vírus rábico inativado foi realizada pela imunização de camundongo por via intraperitoneal de 2 UI por mL. A revacinação dos camundongos foi efetuada com 15 dias do estimulo primário. Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia submandibular. Após a obtenção do sangue, este foi centrifugado e separado o soro para ensaio imunoenzimático, utilizando o teste de ELISA indireto (JANSEN *et al.*, 2006).

O experimento com vírus rábico foi realizado com camundongos não isogênicos, linhagem Swiss. Foram divididos 8 animais por grupo, totalizando 104 camundongos, sendo 10 grupos testados com formulações com óleos vegetais, um grupo com adjuvante óleo branco mineral comercial, um grupo controle (positivo) que recebeu somente o vírus rábico e um grupo controle (negativo) que recebeu somente uma solução tampão fosfato (PBS).

O adjuvante mineral comercial foi o ISA50® (marcol montanide, SEPPIC, França) proveniente do Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários, do Instituto Butantan.

Período (dias)	**Inoculação/evento**
T0	Emulsão + Vírus Rábico inativado (2 U/ml), dose 0,5 ml
T15	Emulsão + Vírus Rábico inativado (2 U/ml), dose 0,5 ml
	1ª. sangria
T21	2ª. sangria
T28	3ª. sangria
T35	Desafio – Vírus Rábico inativado (2 U/ml), dose 0,5 ml
	4ª. sangria
T42	5ª. sangria
	Sacrifício dos animais

3.6.5 Ensaio imunoenzimático para determinação da imunogenicidade do vírus rábico nas emulsões estáveis e não tóxicas

Os títulos individuais de anticorpos contra o vírus rábico, em camundongos, foram determinados pela técnica de reação imunoenzimática (ELISA) indireta (Engvall, 1980; Hashida; Hashinaka; Ishikawa, 1995). Microplacas de 96 cavidades (Corning® cat. n.° 3590, Acton, MA, EUA) foram sensibilizadas com o vírus, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 na concentração de 10µg/mL, foi colocado em cada cavidade 100µL e incubado durante uma noite a 4°C. Os sítios livres de cada cavidade foram bloqueados com 100µl, por duas horas à temperatura ambiente, com uma solução de gelatina a 1% em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6. Após a adição de 100µl das diluições em série (diluição inicial 1/40, razão 10) dos soros de camundongo e incubação a 37°C por 2 horas, foi utilizado anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma®, cat. n.° A3673, St. Louis, MO, EUA). Como substrato, foi utilizado O-phenylenediamine (Sigma®, cat n.° P9187, St. Louis, MO, EUA) e peróxido de hidrogênio a 0,03% (Synth®, São Paulo, Brasil). A reação foi interrompida até 15 minutos da reação com o cromógeno, pela adição de ácido sulfúrico a 2,5N, e a densidade óptica foi medida, usando-se um leitor de ELISA (Stat Fax® Awareness Technology) com filtro de 492nm. (LEINIKKI; PASSILA, 1977).

3.6.6 Ensaio imunoenzimático para determinação da relação dos subtipos de IgG (1 e 2a) no soro

Os títulos individuais de anticorpos contra o vírus rábico, em camundongos, foram determinados pela técnica de reação imunoenzimática (ELISA) indireta (ENGVALL, 1980)(HASHIDA; HASHINAKA; ISHIKAWA, 1995). Microplacas de 96 cavidades (Corning® cat. n.° 3590, Acton, MA, EUA) foram sensibilizadas com o vírus, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 na concentração de 10µg/mL, foi colocado em cada cavidade 100µL e incubado durante uma noite a 4°C. Os sítios livres de cada cavidade foram bloqueados com 100µl, por duas horas à temperatura ambiente, com uma solução de

gelatina a 1% em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6. Após a adição de 100µl das diluições em série (razão 2) dos soros de camundongo e incubação a 37°C por 2 horas, foi utilizado anticorpo de cabra anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma®, cat. n.° A3673, St. Louis, MO, EUA). Como substrato, foi utilizado O-phenylenediamine (Sigma®, cat n.° P9187, St. Louis, MO, EUA) e peróxido de hidrogênio a 0,03% (Synth®, São Paulo, Brasil). A reação foi interrompida até 15 minutos da reação com o cromógeno, pela adição de ácido sulfúrico a 2,5N, e a densidade óptica foi medida, usando-se um leitor de ELISA (Stat Fax® Awareness Technology) com filtro de 492nm. (LEINIKKI; PASSILA, 1977).

3.6.7 Ensaio imunoenzimático para determinação da produção de IgE total no soro

Os títulos individuais de anticorpos contra o vírus rábico, em camundongos, foram determinados pela técnica de reação imunoenzimática (ELISA) indireta (ENGVALL, 1980; HASHIDA, HASHINAKA, ISHIKAWA, 1995). Microplacas de 96 cavidades (Corning® cat. n.° 3590, Acton, MA, EUA) foram sensibilizadas com o vírus, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 na concentração de 10µg/mL, foi colocado em cada cavidade 100µL e incubado durante uma noite a 4°C. Os sítios livres de cada cavidade foram bloqueados com 100µl, por duas horas à temperatura ambiente, com uma solução de gelatina a 1% em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6. Após a adição de 100µl das diluições em série (razão 2) dos soros de camundongo e incubação a 37°C por 2 horas, foi utilizado anticorpo de cabra anti-IgE de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma®, cat. n.° A3673, St. Louis, MO, EUA). Como substrato, foi utilizado O-phenylenediamine (Sigma®, cat n.° P9187, St. Louis, MO, EUA) e peróxido de hidrogênio a 0,03% (Synth®, São Paulo, Brasil). A reação foi interrompida até 15 minutos da reação com o cromógeno, pela adição de ácido sulfúrico a 2,5N, e a densidade óptica foi medida, usando-se um leitor de ELISA (Stat Fax® Awareness Technology) com filtro de 492nm. (LEINIKKI; PASSILA, 1977).

3.7 Análise Estatística

Para as variáveis contínuas estimou-se a média, e o desvio-padrão, sendo a significância estatística entre as diferenças testada por meio de teste T-pareado com o programa PWSS statistics.

Algumas análises matemáticas, principalmente na dosagem de proteínas e ensaio imunoenzimático onde a relação da concentração ou diluição em relação ao efeito (absorbância) foi utilizado o programa Prisma versão 5.

Para tabulação de dados e análises preliminares como média, desvio padrão e coeficiente de variação foi utilizado o programa Microsoft Excel 2007.

4. RESULTADOS

4.1 Testes de toxicidade

Os camundongos, peso inicial de 18 a 25 g, foram inoculados com 0,5 ml de óleo na cavidade peritoneal, volume máximo possível para esta espécie.

TABELA 3 - Resultados dos testes de toxicidade de óleos vegetais por via intraperitoneal de 0,5 ml de amostra estéril de óleo vegetal em camundongos

Amostra de óleo	Densidade	mg máxima injetada	Tempo de ocorrência de morte	Sinais de intoxicação com 7 dias
Açaí	0,920	460,0	Ausência	Ausentes
Amêndoas doce	0,916	458,0	Ausência	Ausentes
Andiroba	-	-	24h, todos os animais	-
Arroz bruto	0,917	458,5	Ausência	Ausentes
Buriti bruto	0,940	470,0	Ausência	Ausentes
Buriti	0,910	455,0	Ausência	Ausentes
Canola bruto	0,915	457,5	Ausência	Ausentes
Castanha do Pará	0,910	455,0	Ausência	Ausentes
Copaíba destilado	0,900	450,0	Ausência	Ausentes
Girassol bruto	0,916	458,0	Ausência	Ausentes
Jojoba	0,860	430,0	Ausência	Ausentes
Maracujá bruto	0,910	455,0	24h, todos os animais	-
Maracujá	0,915	457,5	Ausência	Ausentes
Milho bruto	0,920	460,0	Ausência	Ausentes
Semente de Uva	0,920	460,0	Ausência	Ausentes
Soja bruto	0,920	460,0	Ausência	Ausentes
Urucum	0,915	457,5	Ausência	Ausentes

Legenda: todos os óleos utilizados estavam em estado refinado, senão aqueles designados de outra forma. Bruto: óleo no estado de extração, sem refino ou adição de antioxidantes e conservantes. Os distintos óleos são denominados pelo vegetal de origem.

Foi observada a toxicidade aguda e óbitos nas primeiras 72h, o que ocorreu somente nos grupos dos óleos de semente de maracujá bruto e de andiroba, nas primeiras 24h. Todos os animais vivos foram observados por 7 dias e nenhum outro sinal de toxicidade foi observado para os outros óleos durante o período, conforme TABELA 3.

Somente os óleos sem qualquer evidência de toxicidade foram escolhidos para dar continuidade nos testes e experimentos. Assim, não houve necessidade de testes de toxicidade de frações mais diluídas dos óleos ou da emulsão vacinal. Outros componentes das formulações são comprovadamente atóxicos nas concentrações utilizadas.

4.2 **Preparação das emulsões**

4.2.1 Sistema EHL - Equilíbrio hidrofílico lipofílico

Para a realização de testes de preparação de emulsões, as porcentagens das misturas de óleos vegetais, *blends* de óleos vegetais e surfactantes foram organizadas em tabelas de cálculos de EHLs, como demonstrada na TABELA 3 e constante no APÊNDICE 1.

Na TABELA 3 está exemplificada a aplicação dos princípios de cálculo do EHL Requerido para uma mistura com óleo cuja fração total dos surfactantes combinados comporá 3 g. Nesta massa os surfactantes comporão 15% de uma mistura oleosa final de 20 g. Esta é a massa da parte oleosa mais utilizada neste trabalho para realização de cada teste de formação de emulsão e, posteriormente, de estabilidade. Esta medida foi escolhida por ser a mínima passível de ser emulsionada, dada a pequena disponibilidade de amostras e reagentes para execução do trabalho.

TABELA 4 - Referência para cálculo de EHL requerido;

EHL Req.	% Span80 4,3	Massa Surf. g	% Tween80 15,0	Massa Surf g	EHL Result.
7,40	71	2,13	29	0,87	7,40
7,30	72	2,16	28	0,84	7,30
7,19	73	2,19	27	0,81	7,19
7,08	74	2,22	26	0,78	7,08
6,98	75	2,25	25	0,75	6,98
6,87	76	2,28	24	0,72	6,87
6,76	77	2,31	23	0,69	6,76
6,65	78	2,34	22	0,66	6,65
6,55	79	2,37	21	0,63	6,55
6,44	80	2,4	20	0,6	6,44
6,33	81	2,43	19	0,57	6,33

Legenda: EHL do Span 80 = 4,3; EHL do Tween 80 = 15,0.

4.2.2 Teste de formação de emulsão

Os óleos puros ou *blends* foram dispostos para a formação de emulsões misturada a agentes emulsificadores. As emulsões foram preparadas de acordo com procedimentos padrão para sistemas dispersos (JANSEN *et al.*, 2005). Segue o procedimento padronizado para este estudo

Procedimento padronizado para a preparação de emulsões

1. Misturar o óleo com o surfactante, medidos pela massa (peso), nas proporções próprias de cada óleo ou mistura de óleos, como de 9:1, a 60°C com auxílio de agitador magnético. Em seguida, deixa-se a mistura resfriar a temperatura ambiente.
2. Para a fração aquosa pode ser utilizado tampão fosfato salina (PBS) na temperatura de 2 a 8°C (ou outra solução aquosa adequada ao antígeno e à vacina, como meio de cultura). Se a natureza da solução com o

antígeno for hidrofóbica, esta solução pode ser adicionada logo antes do início da adição da parte aquosa sendo que sua quantidade percentual na formulação total ainda será considerada como parte aquosa.

3. A mistura oleosa (óleo+surfactante) deve ser resfriada até aproximadamente 15°C em sistema com água e gelo. Em seguida, a mistura oleosa deve ser posta em agitação de 11.000 rpm em um misturador. Adicionando-se lentamente a parte aquosa com o antígeno, sem interromper a agitação e aumentando-a paulatinamente até 20.000 rpm.
4. Em 20.000 rpm, faz-se a uniformização lenta da mistura, observando a temperatura cerca de 2 ou 3 minutos, com o auxílio de um termômetro para a temperatura não ultrapassar o limite de integridade e viabilidade do antígeno, e interromper o misturador.
   - Terminada a mistura, a emulsão final deve ser deixada resfriada (2 a 8°C) enquanto são feitos os testes de verificação da formação da emulsão.

Na TABELA 5 está descrita a quantidade de testes realizados para cada óleo e para os *blends* (misturas de óleos). Para os óleos que apresentaram resultados positivos de formação de emulsão, deu-se a continuidade dos testes para a busca de um valor de EHL Req mais preciso, a partir da maior estabilidade encontrada em cada faixa de EHL da mistura oleosa. Houve um maior número de testes para os óleos mais promissores na formação de emulsão estável com os surfactantes disponíveis.

TABELA 5 - Número de testes realizados por amostra de óleo por faixa de valor de EHL

	Faixas de EHL						
	4 a 5	**6 a 7**	**8 a 9**	**10 a 11**	**12 a 13**	**14 a 16**	**Total**
Açaí	1	1	1	4	3	1	11
Amêndoas doce	1	1	1	1	1	1	6
Andiroba	1	1	1	1	3	1	8
Arroz bruto	1	41	1	3	6	3	55
Buriti bruto	1	4	8	1	3	3	20
Canola bruto	1	30	5	1	3	1	41
Castanha do Pará	1	6	1	1	1	2	12
Copaíba destilado	1	5	3	2	1	2	14
Girassol bruto	1	44	2	11	27	1	86
Maracujá bruto	1	2	3	11	13	1	31
Maracujá	1	3	4	14	36	25	83
Milho bruto	1	4	18	5	7	1	36
Semente de Uva	1	1	1	1	1	1	6
Soja bruto	4	26	1	1	3	3	38
Urucum	1	3	1	1	3	1	10
Jojoba	1	1	1	1	1	1	6
Blends (bruto)	4	89	7	0	2	1	103
						TOTAL	566

Legenda: todos os óleos utilizados estavam em estado refinado, senão aqueles designados de outra forma. Bruto: óleo no estado de extração, sem refino ou adição de antioxidantes e conservantes. Os distintos óleos são denominados pelo vegetal de origem.

4.3 **Testes de emulsões**

4.3.1 Testes de estabilidade de emulsões

Testes de estabilidade física dos sistemas emulsivos foram realizados pela determinação da aparência macro e microscópica após estocagem a temperatura ambiente (25°C). As emulsões foram analisadas com 24hs e aos 7 dias através de microscopia, para observação de estabilidade. Sempre que foi observada evidência microscópica de separação de fases, a mesma era

observada macroscopicamente no dia seguinte. A estabilidade mínima verificada em pelo menos 5 repetições de teste de formação de emulsão de uma mesma formulação, dotava esta mistura de potencial para seleção para o teste de imunogenicidade. A TABELA 6 informa a estabilidade para cada óleo do estudo que atingiu os parâmetros acima descritos. Todos os resultados de testes a seguir se referem a óleos vegetais em estado bruto, ou semirrefinado, quer dizer, sem adição de antioxidantes.

TABELA 6 - Estabilidade dos óleos com melhor formação de emulsão

Óleos vegetais	**EHL Req.**	**EHL Req. ótimo**	**Dias estáveis a 25°C**
Girassol	5,0 – 7,5	6,90	10
Canola	5,5 – 8,0	7,30	11
Arroz	6,0 – 8,0	7,40	10
Milho	8,5 – 10,5	9,86	7
Buriti	7,0 – 10,0	8,37	7
Blends de Gs/Cl	5,5 – 8,2	7,0-7,8	7-10

Legenda: *Blends* de Gs/Cl são formulações que utilizam óleos de girassol e de canola como principais constituintes em diferentes proporções e misturados.

4.3.2 Principais formulações

Este trabalho constituiu a base para a elaboração de pedido de patente (INPI nº.018110040020, conforme Anexo 3). Em decorrência disto, as formulações exatas das principais composições adjuvantes de óleos vegetais não serão expostas neste texto. Na TABELA 7 são demonstradas faixas de concentração de constituintes que compõem tais formulações. As proporções dos óleos nos *blends* tampouco estão descritas pela razão de proteção do pedido de patente supracitado.

TABELA 7 - Principais formulações

Composições adjuvantes	EHL Req. ótimo	% parte aquosa	% óleos	% surf
Gs	6,9 - 7,15	30-34	50-63	6-12
Gs.Q	7,0 - 7,2	32-35	50-63	6-12
Cl	7,3 - 7,85	36-39	50-63	6-12
Cl.Q	7,36 - 7,9	37-40	50-63	6-12
GsCl	7,2 - 7,35	36-39	50-63	6-12
GsCl.Q	7,25 - 7,45	37-40	50-63	6-12
GsClBt	7,36 - 7,6	36-39	50-63	6-12
GsClBt.Q	7,40 - 7,7	37-40	50-63	6-12
GsBt	7,1 - 7,3	30-34	50-63	6-12
GsBt.Q	7,1 - 7,4	31-35	50-63	6-12

Legenda: GsCl, formulação composta pelos óleos de Girassol e de Canola mais surfactante na composição da fração oleosa; Q: representa adição de saponina na concentração de 20µg/ml; Gs: óleo de girassol; Cl: óleo de canola; Bt: óleo de Buriti; %surf: percentual da mistura de surfactantes.

As principais formulações, indicadas na TABELA 7 correspondem aos resultados mais satisfatórios ao se considerar os fatores de formação de emulsão, de estabilidade mínima da emulsão, de uniformidade das partículas emulsivas, de custo dos óleos (viabilidade econômica de um possível adjuvante). Há de se notar que, na verdade, são cinco pares de formulações, onde a diferença fundamental no par está na adição ou não de 20µg/ml e consequente alteração na proporção da fração aquosa na composição do sistema.

4.3.3 Análise microscópica do tamanho das partículas

As cinco formulações escolhidas estão dentre as principais formulações supracitadas. Foram realizadas 10 imagens de cada formulação adjuvante analisada. Cada imagem foi processada pelo software Image-Pro Plus (versão 4.5.1.29), gerando dados demonstrados nas TABELAS 8 a 12 (cf item 3.5.2).

TABELA 8 - Relação do número de partículas nas imagens microscópicas da formulação Gs (Girassol), seus diâmetros médios e desvio padrão dos diâmetros médios, FIGURA 5

Imagem	nº de partículas	Diâmetro médio	Desvio padrão do diâmetro médio
1	7283	1,863	1,051
2	8154	1,848	0,885
3	7704	1,784	1,061
4	7331	1,859	1,016
5	8179	1,802	1,012
6	7166	1,933	1,082
7	7644	1,827	1,037
8	7559	1,830	1,043
9	8737	1,757	1,007
10	9900	1,597	1,067
médias	7966	1,810	1,026

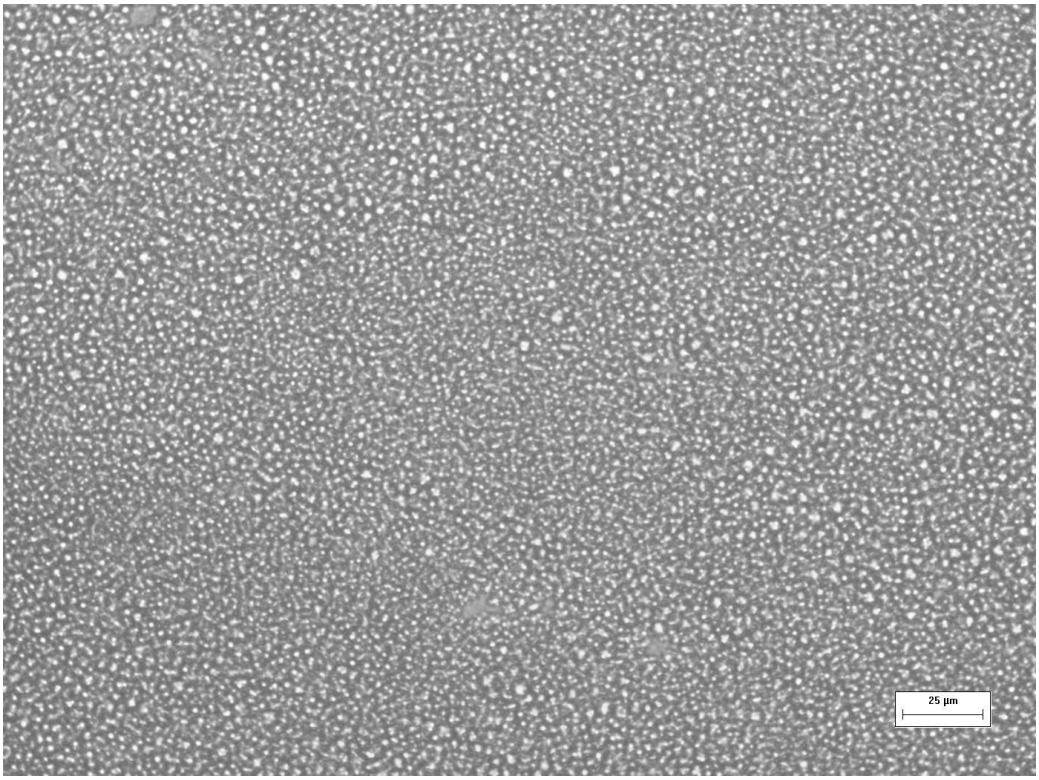

FIGURA 5 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação Gs (girassol), aumento 200x. Escala 25µm.

TABELA 9 - Relação do número de partículas nas imagens microscópicas da formulação Gs.Q (Girassol e saponina), seus diâmetros médios e desvio padrão dos diâmetros médios, FIGURA 6

Imagem	nº de partículas	Diâmetro médio	Desvio padrão do diâmetro médio
1	11058	1,629	1,105
2	11415	1,579	1,047
3	10728	1,640	1,050
4	7420	1,878	1,082
5	6657	1,844	1,064
6	10682	1,555	0,955
7	8886	1,729	1,003
8	6921	1,984	1,053
9	7277	1,768	1,083
10	10214	1,587	0,973
médias	9125,8	1,719	1,042

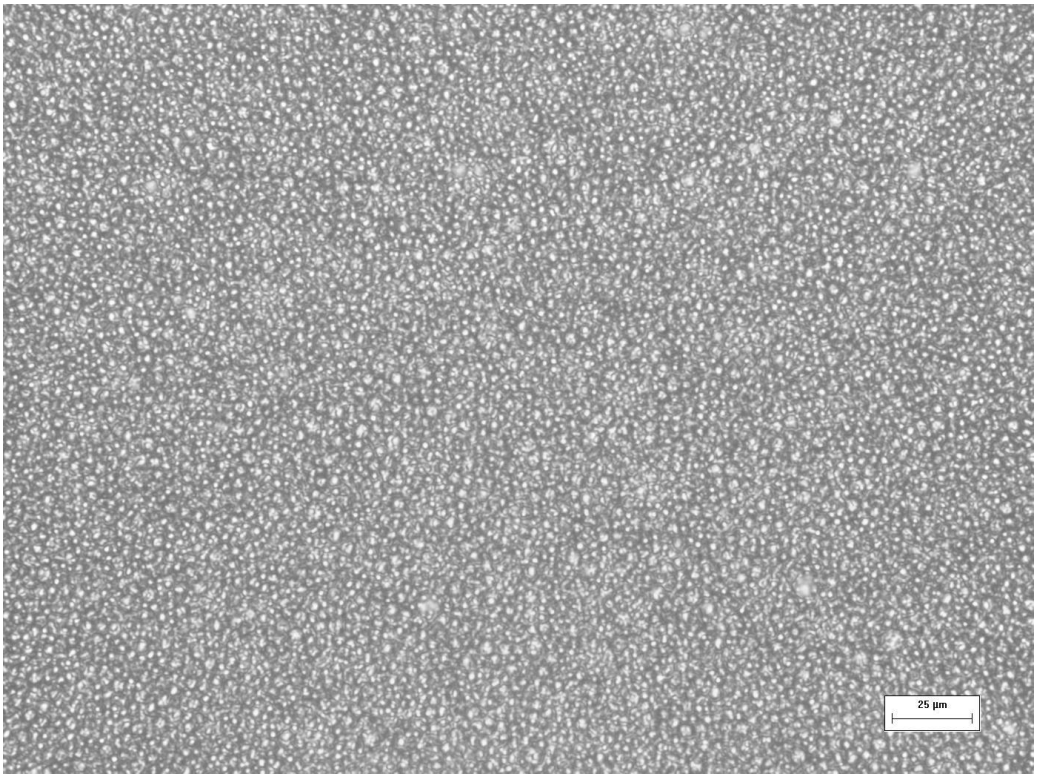

FIGURA 6 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação Gs.Q (girassol com saponina), aumento 200x. Escala 25µm.

TABELA 10 - Relação do número de partículas nas imagens microscópicas da formulação GsCl.Q (Girassol, canola e saponina), seus diâmetros médios e desvio padrão dos diâmetros médios, FIGURA 7

Imagem	nº de partículas	Diâmetro médio	Desvio padrão do diâmetro médio
1	7283	1,757	0,766
2	6586	1,543	0,652
3	6652	1,841	0,855
4	9991	1,580	0,932
5	8138	1,637	0,913
6	9157	1,539	0,867
7	9579	1,738	0,962
8	8717	1,734	0,969
9	6438	2,116	0,967
10	8878	1,798	1,005
médias	8142	1,728	0,889

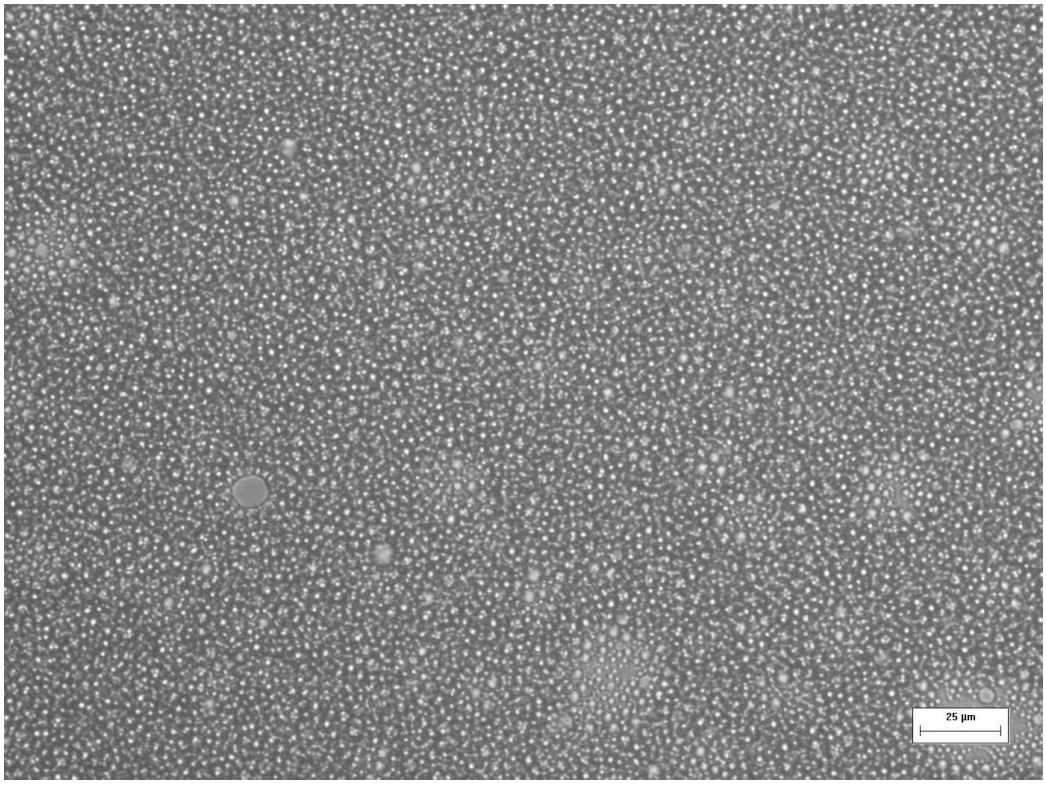

FIGURA 7 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação GsCl.Q (girassol, canola com saponina), aumento 200x. Escala 25µm.

TABELA 11 - Relação do número de partículas nas imagens microscópicas da formulação GsClBt.Q (Girassol, canola, buriti e saponina), seus diâmetros médios e desvio padrão dos diâmetros médios, FIGURA 8

Imagem	nº de partículas	Diâmetro médio	Desvio padrão do diâmetro médio
1	7714	1,927	0,938
2	10152	1,844	0,936
3	9115	1,963	0,998
4	10516	1,738	0,968
5	8614	1,739	0,823
6	9613	1,699	0,921
7	10432	1,606	0,985
8	10385	1,601	0,891
9	10976	1,632	1,010
10	11044	1,616	0,908
médias	9856	1,736	0,938

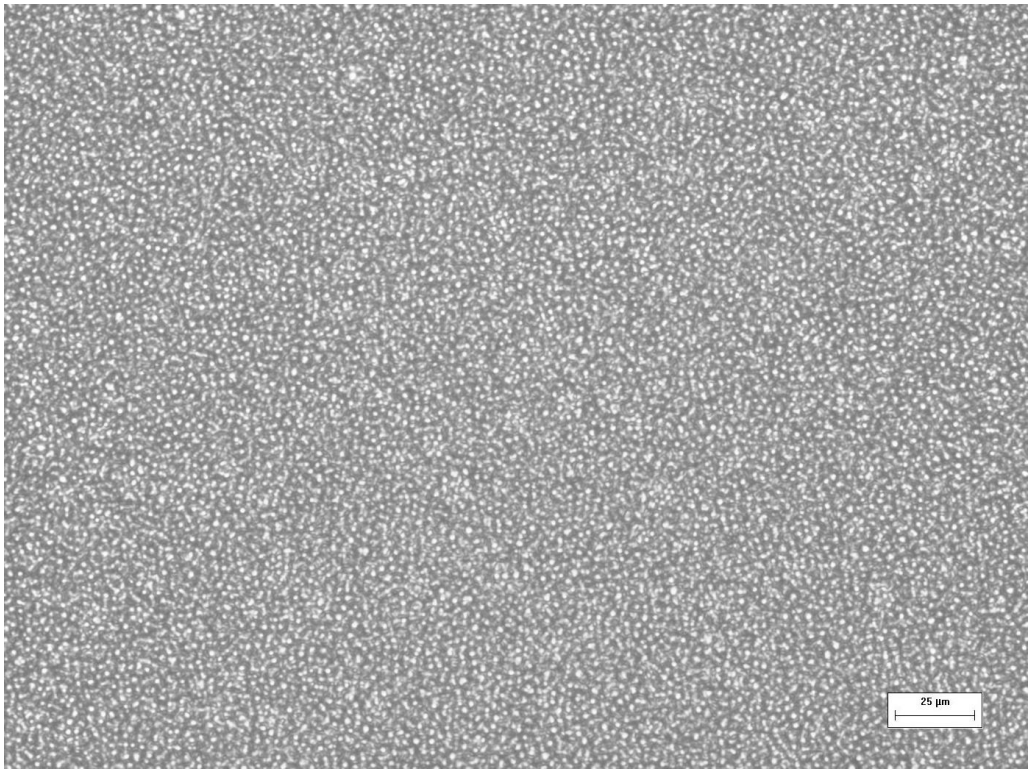

FIGURA 8 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação GsClBt.Q (girassol, canola, buriti com saponina), aumento 200x. Escala 25 µm.

TABELA 12 - Relação do número de partículas nas imagens microscópicas da formulação GsBt (Girassol, e buriti), seus diâmetros médios e desvio padrão dos diâmetros médios,FIGURA 9

Imagem	nº de partículas	Diâmetro médio	Desvio padrão do diâmetro médio
1	9916	1,790	0,926
2	10113	1,766	0,942
3	10517	1,737	0,907
4	10458	1,729	0,895
5	11154	1,526	0,973
6	11545	1,619	0,940
7	6887	1,957	1,039
8	10807	1,757	0,946
9	9611	1,764	0,904
10	11041	1,704	0,959
médias	10204,9	1,735	0,943

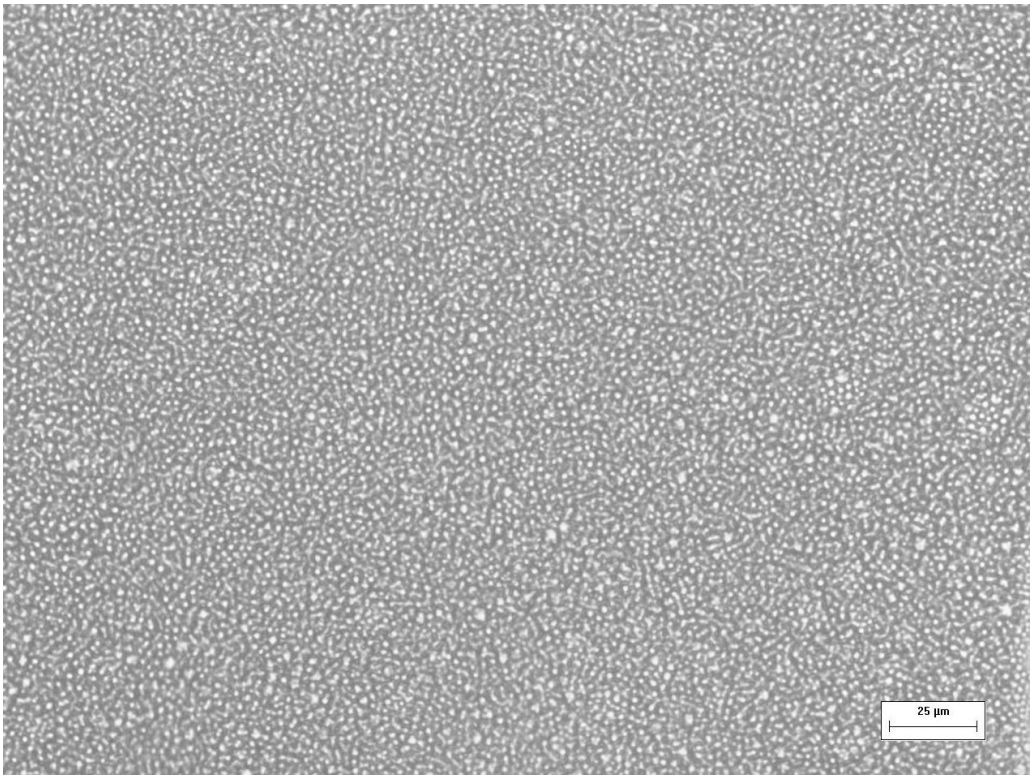

FIGURA 9 - Imagem microscópica de partículas emulsivas da formulação GsBt (girassol, buriti), aumento 200x. Escala 25 µm.

4.3.4 Viscosidade

A viscosidade foi medida com viscosímetro capilar RHEOTEST® LK (RHEOTEST Messgeräte Medingen GmbH), com o capilar no. 2 (faixa aproximada de 5 a 100 mPas). Na indisponibilidade de capilar apropriado para medição de viscosidade comparativa de amostra do ISA50, os dados deste foram coletados da literatura. Pela indisponibilidade de equipamento mais apropriado para emulsões, foi feita medida da viscosidade em temperatura de refrigeração, temperatura de utilização da vacina no campo, com o objetivo de verificar este dado de qualidade das emulsões.

TABELA 13 - Viscosidade

Composições	% parte aquosa na emulsão	Temp. média das leituras	Viscosidade média (mPa s)
GsCl.Q	38,9	2,81°C	53,1
GsClBt.Q	37,4	5,24°C	78,72
GsBt	33,2	7,76°C	97,4
Gs	33,9	2,42°C	63,3
Gs.Q	35,2	3,47°C	66,7
ISA50*	50,0	25,0 °C	200,0

*Dados da literatura (Aucouturier; Dupuis; Ganne, 2001)

4.3.5 Imunogenicidade

Por motivo de viabilidade de elaboração de emulsões com o vírus rábico, foram realizados ensaios pilotos prévios com albumina sérica bovina (BSA), de baixo custo e abundante. As formulações com melhores resultados, num segundo momento, foram utilizadas como composições adjuvantes para vacina da raiva. Nestes ensaios pilotos pôde ser evidenciado que os óleos vegetais apresentam algum efeito adjuvante como base oleosa para elaboração de

emulsões. Também foi possível verificar que há uma tendência de melhor resposta pelos óleos de girassol e de canola quando comparados aos outros de origem vegetal. O mesmo se deu com formulações que continham a mistura desses dois óleos. Contudo, houve variação de resposta das diferentes misturas e proporções de óleos vegetais, que deu margem para o planejamento do experimento com o vírus da raiva.

Vacinas antirrábicas foram elaboradas com as emulsões que obtiverem resultados favoráveis nos testes de toxicidade e de estabilidade. A imunogenicidade do vírus rábico foi realizada pela imunização de camundongo por via intraperitoneal de 2 UI por mL. A revacinação dos camundongos foi efetuada 15 dias do estimulo primário. Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia submandibular. Após a obtenção do sangue este foi centrifugado e separado o soro para ensaio imunoenzimático utilizando o teste de ELISA indireto (JANSEN *et al.*, 2006).

4.3.6 Ensaio imunoenzimático para determinação da imunogenicidade do vírus rábico nas emulsões estáveis e não tóxicas

Das emulsões estáveis e não tóxicas foram elaboradas composições adjuvantes para teste de potência adjuvante comparativo com adjuvante mineral comercial emulsionado. Os resultados com 15 dias após a primeira inoculação, T15, (composição + vírus rábico) ilustra ação adjuvante semelhante entre os óleos vegetais e o mineral e a ação adjuvante diante o grupo que recebeu somente o vírus.

O GRÁFICO 1 ilustra a DO da diluição 1/4.000 da titulação de anticorpos em T15 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelo óleo de girassol (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral e com o grupo que recebeu somente o vírus rábico inativado, com a demonstração do desvio padrão (+). Todos os grupos obtiveram produção de anticorpos significativamente maior que o grupo que recebeu somente o vírus, sem, contudo, diferenciarem entre si.

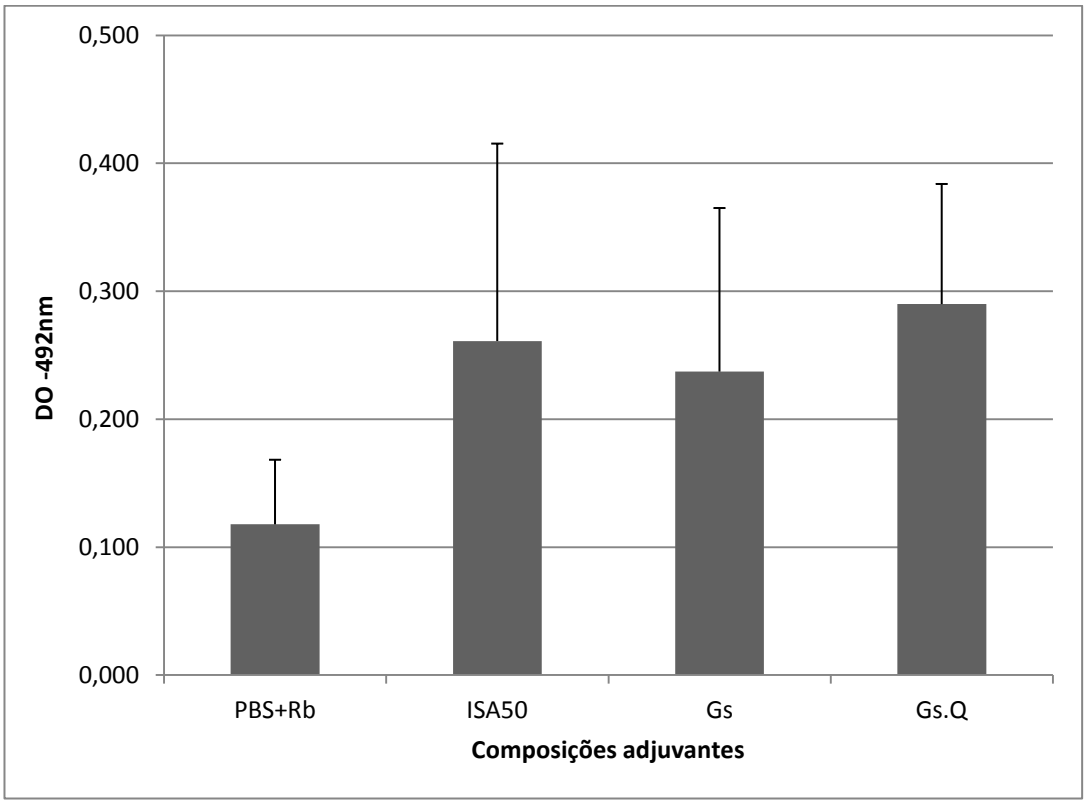

GRÁFICO 1 - Avaliação comparativa da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol com adjuvante comercial (ISA50) e grupo sem adjuvante (PBS+Rb), em T15 para diluição de 1/4.000. Legenda: Gs, óleo de girassol; .Q, saponina 20 µg/ml. ($p < 0,05$).

O GRÁFICO 2 ilustra a DO da diluição 1/4.000 da titulação de anticorpos em T15 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelo óleo de canola (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral e com o grupo que recebeu somente o vírus rábico inativado, com a demonstração do desvio padrão (+). Todos os grupos obtiveram produção de anticorpos significativamente maior que o grupo que recebeu somente o vírus, sem contudo, diferenciarem entre si.

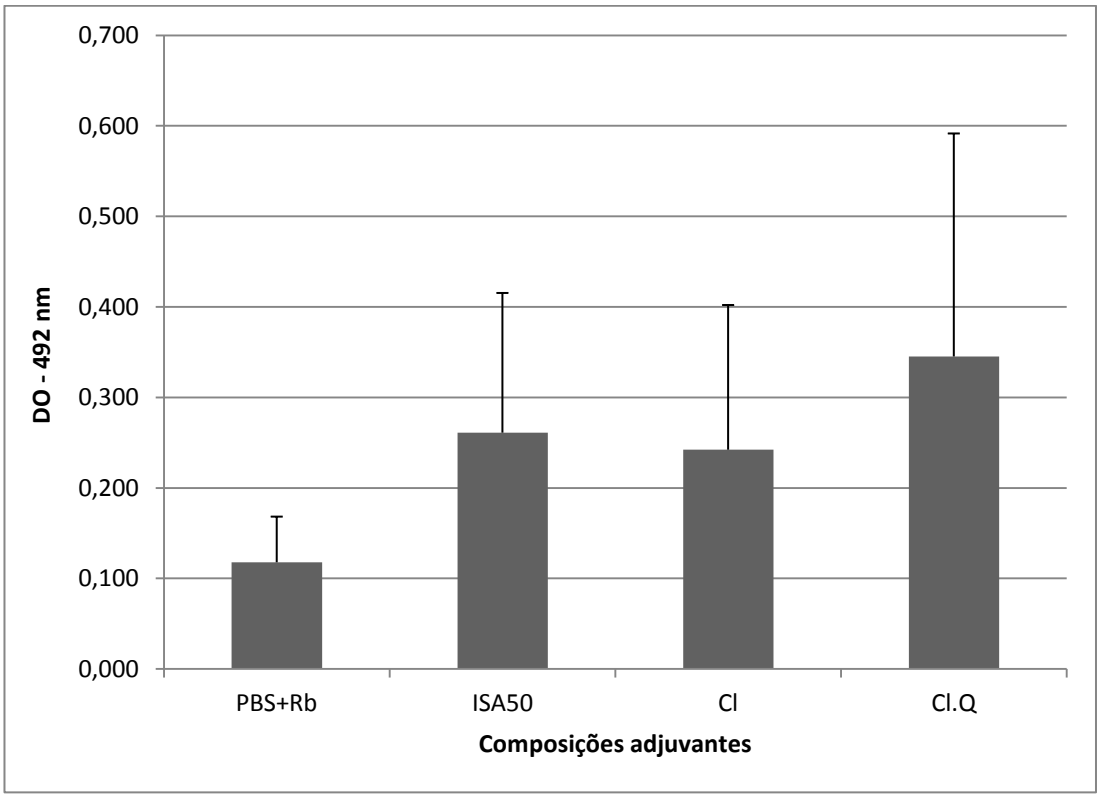

GRÁFICO 2 - Avaliação comparativa da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de canola com adjuvante comercial (ISA50) e grupo sem adjuvante (PBS+Rb), em T15 para diluição de 1/4.000. Legenda: Cl, óleo de canola; .Q, saponina 20 µg/ml. ($p < 0,05$).

O GRÁFICO 3 ilustra a DO da diluição 1/4.000 da titulação de anticorpos em T15 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelos óleos de girassol e buriti (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral e com o grupo que recebeu somente o vírus rábico inativado, com a demonstração do desvio padrão (+). Todos os grupos obtiveram produção de anticorpos significativamente maior que o grupo que recebeu somente o vírus. sem, contudo, diferenciarem entre si. A composição sem saponina demonstrou resposta adjuvante maior que a que recebeu saponina, bem como do óleo mineral comercial (p <0,05).

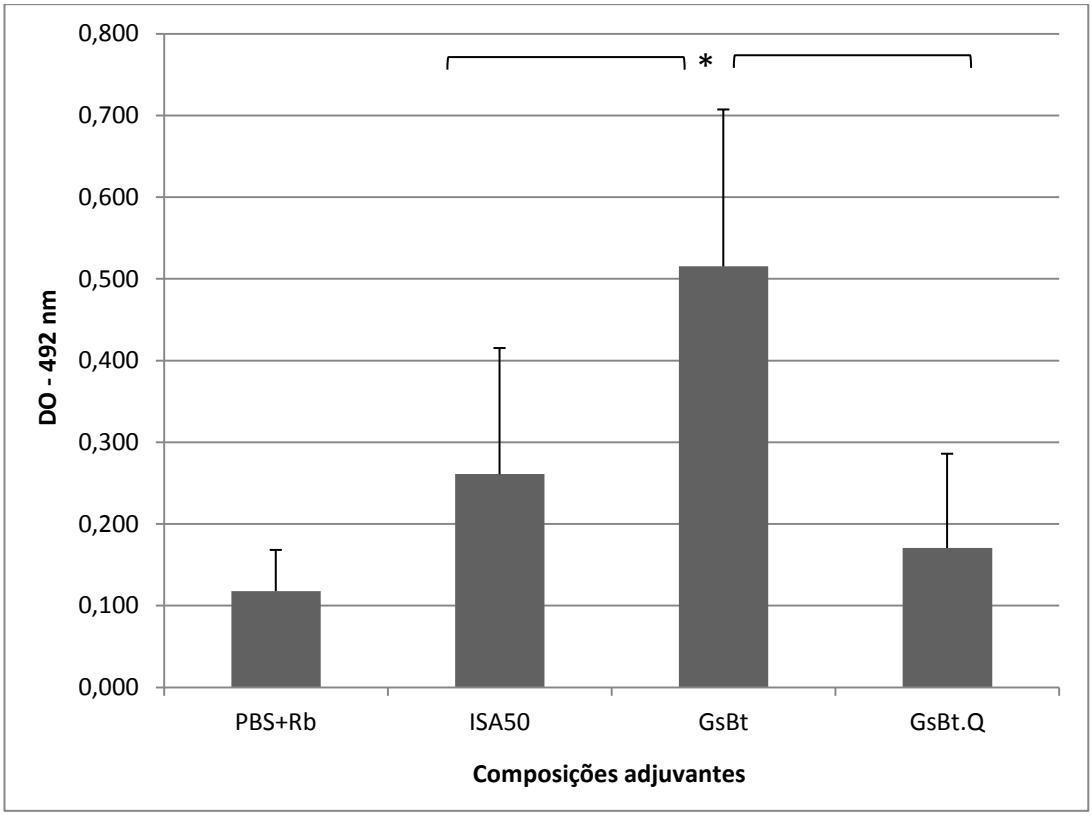

GRÁFICO 3 - Avaliação comparativa da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol e óleo de buriti com adjuvante comercial (ISA50) e grupo sem adjuvante (PBS+Rb), em T15 para diluição de 1/4.000. Legenda: Gs, óleo de girassol; Bt, óleo de buriti;.Q, saponina 20 µg/ml. Composição GsBt foi significativamente maior que ISA50 e GsBt.Q (p <0,05).

O GRÁFICO 4 ilustra a DO da diluição 1/4.000 da titulação de anticorpos em T15 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelos óleos de girassol e de canola (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral e com o grupo que recebeu somente o vírus rábico inativado, com a demonstração do desvio padrão (+). Todos os grupos obtiveram produção de anticorpos significativamente maior que o grupo que recebeu somente o vírus, sem, contudo, diferenciarem entre si.

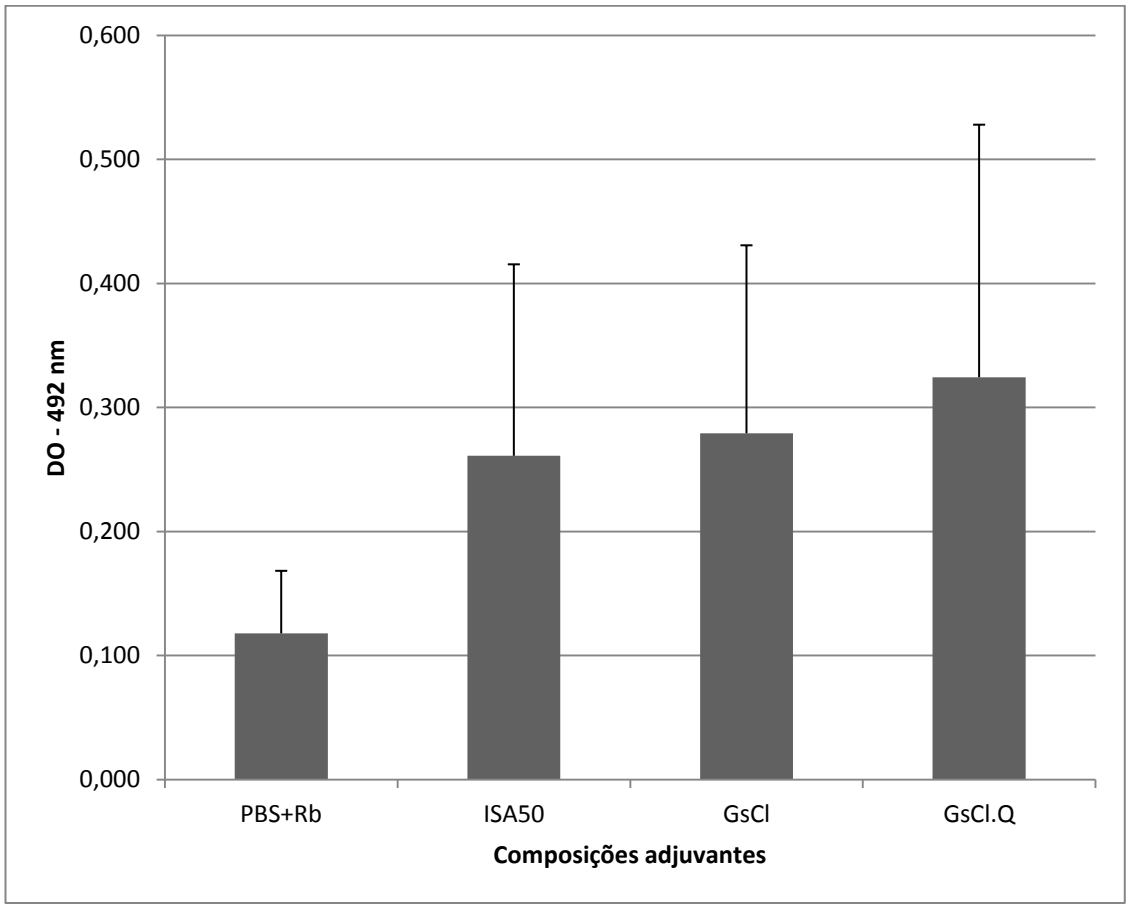

GRÁFICO 4 - Avaliação comparativa da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol e óleo de canola com adjuvante comercial (ISA50) e grupo sem adjuvante (PBS+Rb), em T15 para diluição de 1/4.000. Legenda: Gs, óleo de girassol; Cl, óleo de canola; .Q, saponina 20 µg/ml. ($p < 0,05$).

O GRÁFICO 5 ilustra a DO da diluição 1/4.000 da titulação de anticorpos em T15 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelos óleos de girassol, canola e buriti (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral e com o grupo que recebeu somente o vírus rábico inativado, com a demonstração do desvio padrão (+). Todos os grupos obtiveram produção de anticorpos significativamente maior que o grupo que recebeu somente o vírus, sem, contudo, diferenciarem entre si.

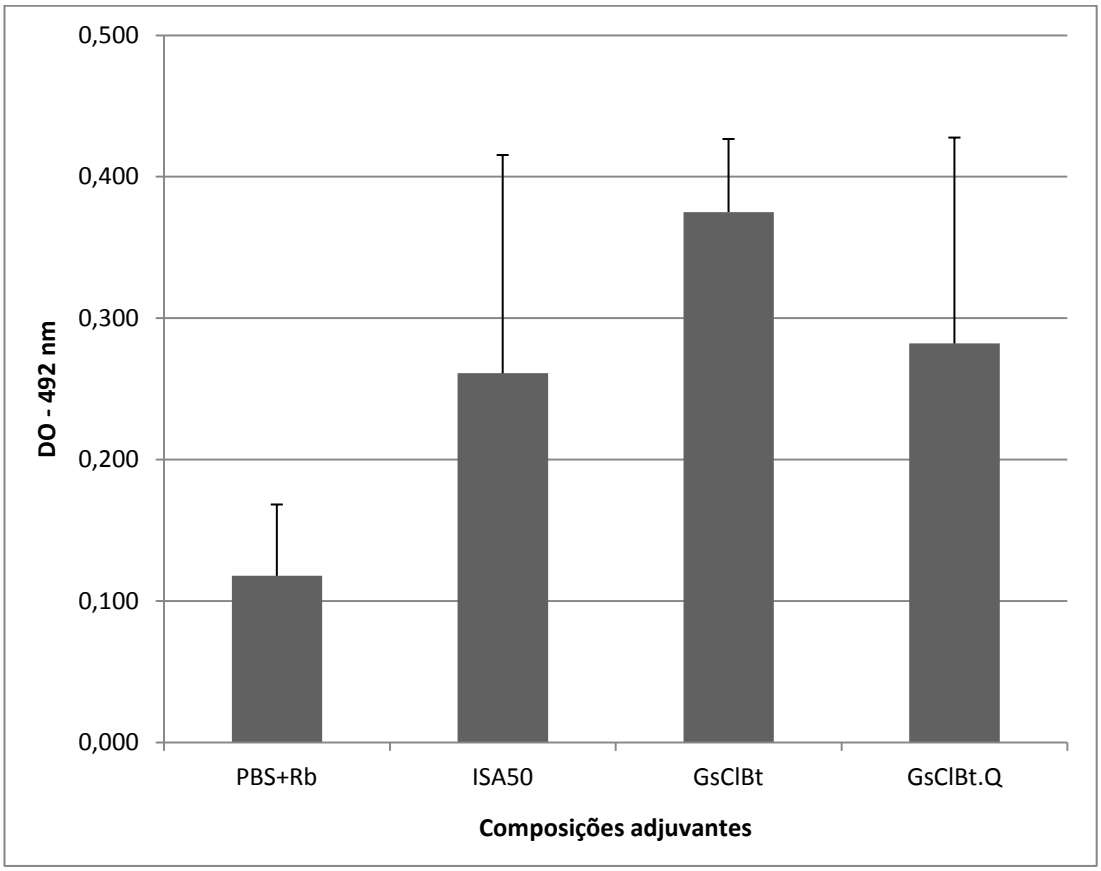

GRÁFICO 5 - Avaliação comparativa da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol, óleo de canola e óleo de buriti com adjuvante comercial (ISA50) e grupo sem adjuvante (PBS+Rb), em T15 para diluição de 1/4.000. Legenda: Gs, óleo de girassol; Cl, óleo de canola; Bt, óleo de buriti; .Q, saponina 20 µg/ml ($p < 0,05$).

O GRÁFICO 6 ilustra a cinética da DO da diluição 1/40.000 da titulação de anticorpos em T15, T21, T28, T35, T42 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelo óleo de girassol (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral, com a demonstração do desvio padrão (positivo e negativo). Não houve diferença significativa (P <0,05) entre as três composições na cinética da resposta imunológica, ainda que, em dias de tratamento isolados, ela tenha ocorrido (dados não demonstrados). O GRÁFICO demonstra que a resposta imunológica das composições de óleos vegetais possui efeito duradouro que se equipara ao do óleo mineral na espécie animal testada.

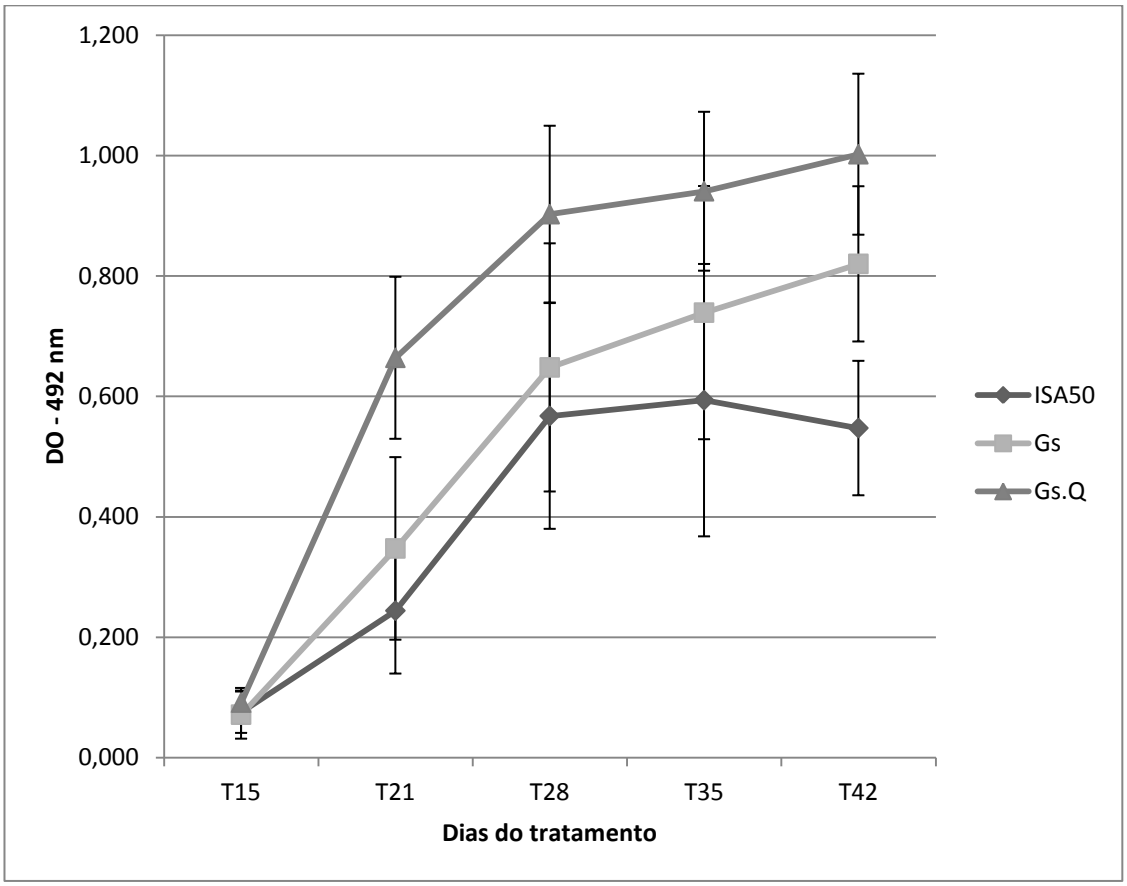

GRÁFICO 6 - Avaliação comparativa da cinética da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol com adjuvante comercial (ISA50) em dias T15, T21, T28, T35, T42 para diluição de 1/40.000. Legenda: Gs, óleo de girassol; .Q, saponina 20 µg/ml. (p <0,05).

O GRÁFICO 7 ilustra a cinética da DO da diluição 1/40.000 da titulação de anticorpos em T15, T21, T28, T35, T42 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelo óleo de canola (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral, com a demonstração do desvio padrão (positivo e negativo). Não houve diferença significativa (P <0,05) entre as três composições na cinética da resposta imunológica, ainda que, em dias de tratamento isolados, ela tenha ocorrido (dados não demonstrados). O GRÁFICO demonstra que a resposta imunológica das composições de óleos vegetais possui efeito duradouro que se equipara ao do óleo mineral na espécie animal testada.

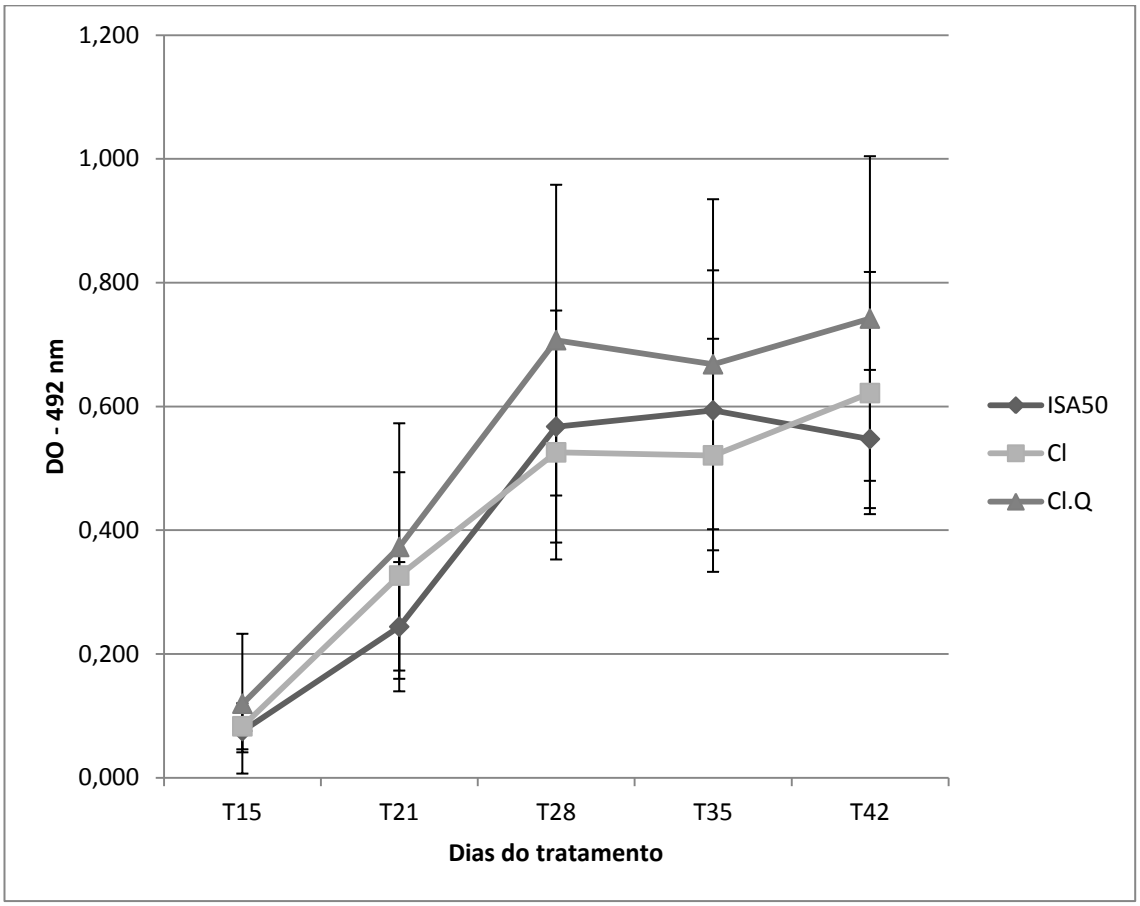

GRÁFICO 7 - Avaliação comparativa da cinética da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de canola com adjuvante comercial (ISA50) em dias T15, T21, T28, T35, T42 para diluição de 1/40.000. Legenda: Cl, óleo de canola; .Q, saponina 20 µg/ml. (p <0,05).

O GRÁFICO 8 ilustra a cinética da DO da diluição 1/40.000 da titulação de anticorpos em T15, T21, T28, T35, T42 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelos óleos de girassol e canola (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral, com a demonstração do desvio padrão (positivo e negativo). Não houve diferença significativa (P <0,05) entre as três composições na cinética da resposta imunológica, ainda que, em dias de tratamento isolados, ela tenha ocorrido (dados não demonstrados). O GRÁFICO demonstra que a resposta imunológica das composições de óleos vegetais possui efeito duradouro que se equipara ao do óleo mineral na espécie animal testada.

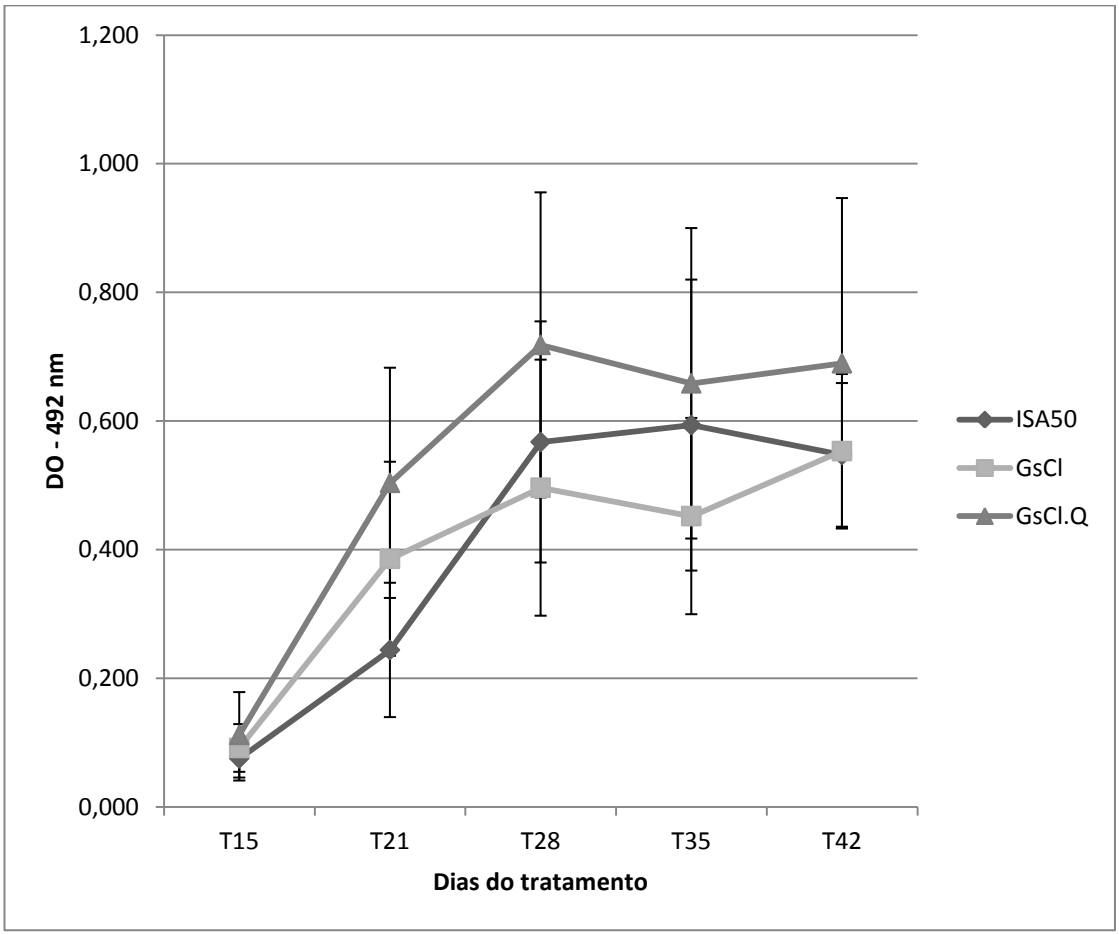

GRÁFICO 8 - Avaliação comparativa da cinética da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol e óleo de canola com adjuvante comercial (ISA50) em dias T15, T21, T28, T35, T42 para diluição de 1/40.000. Legenda: Gs, óleo de girassol; Cl, óleo de canola; .Q, saponina 20 µg/ml. (p <0,05).

O GRÁFICO 9 ilustra a cinética da DO da diluição 1/40.000 da titulação de anticorpos em T15, T21, T28, T35, T42 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelos óleos de girassol e buriti (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral, com a demonstração do desvio padrão (positivo e negativo). Não houve diferença significativa (P <0,05) entre as três composições na cinética da resposta imunológica, ainda que, em dias de tratamento isolados, ela tenha ocorrido (dados não demonstrados). O GRÁFICO demonstra que a resposta imunológica das composições de óleos vegetais possui efeito duradouro que se equipara ao do óleo mineral na espécie animal testada.

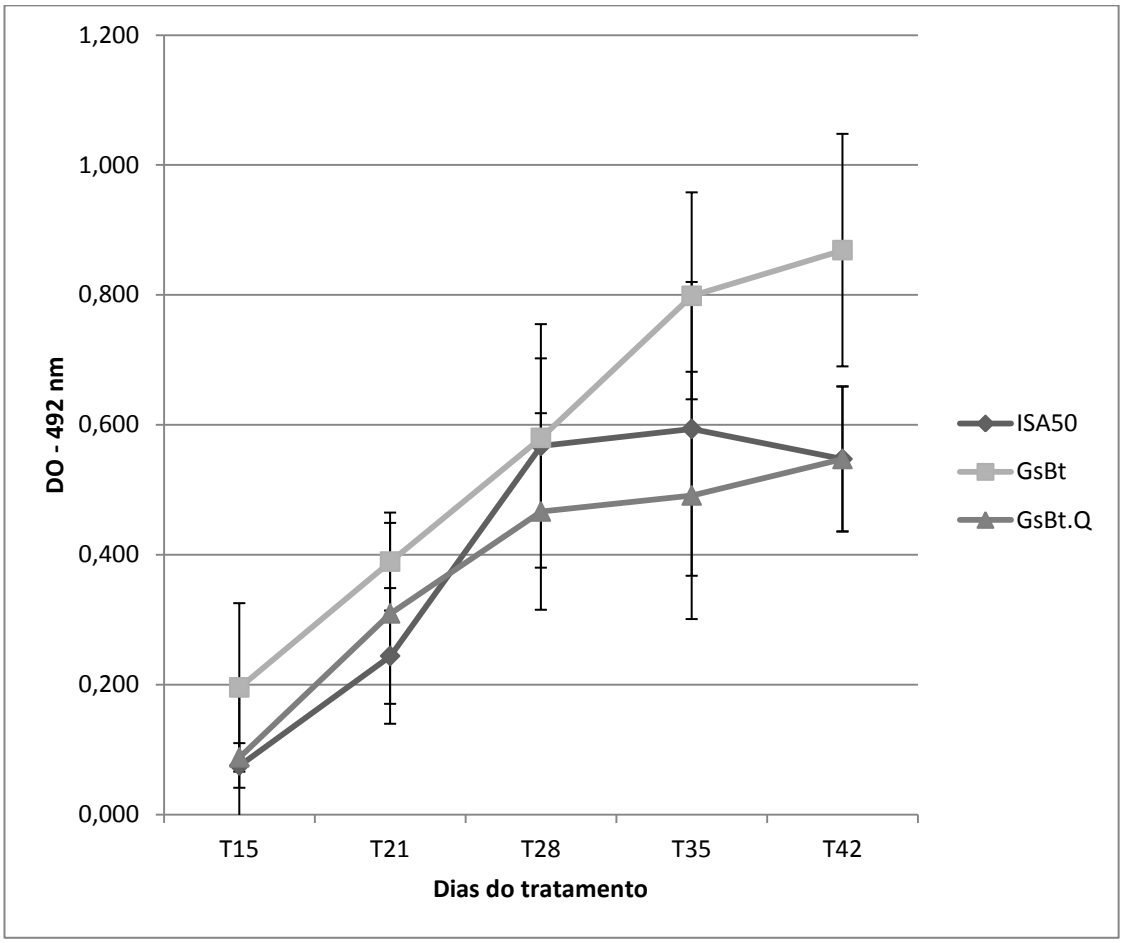

GRÁFICO 9 - Avaliação comparativa da cinética da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol e óleo de buriti com adjuvante comercial (ISA50) em dias T15, T21, T28, T35, T42 para diluição de 1/40.000. Legenda: Gs, óleo de girassol; Bt, óleo de buriti; .Q, saponina 20 µg/ml. (p <0,05).

O GRÁFICO 10 ilustra a cinética da DO da diluição 1/40.000 da titulação de anticorpos em T15, T21, T28, T35, T42 para as composições adjuvantes oleosas compostas pelos óleos de girassol, canola e buriti (com e sem saponina), em comparação com o óleo mineral, com a demonstração do desvio padrão (positivo e negativo). Não houve diferença significativa (P <0,05) entre as três composições na cinética da resposta imunológica, ainda que, em dias de tratamento isolados, ela tenha ocorrido (dados não demonstrados). O GRÁFICO demonstra que a resposta imunológica das composições de óleos vegetais possui efeito duradouro que se equipara ao do óleo mineral na espécie animal testada.

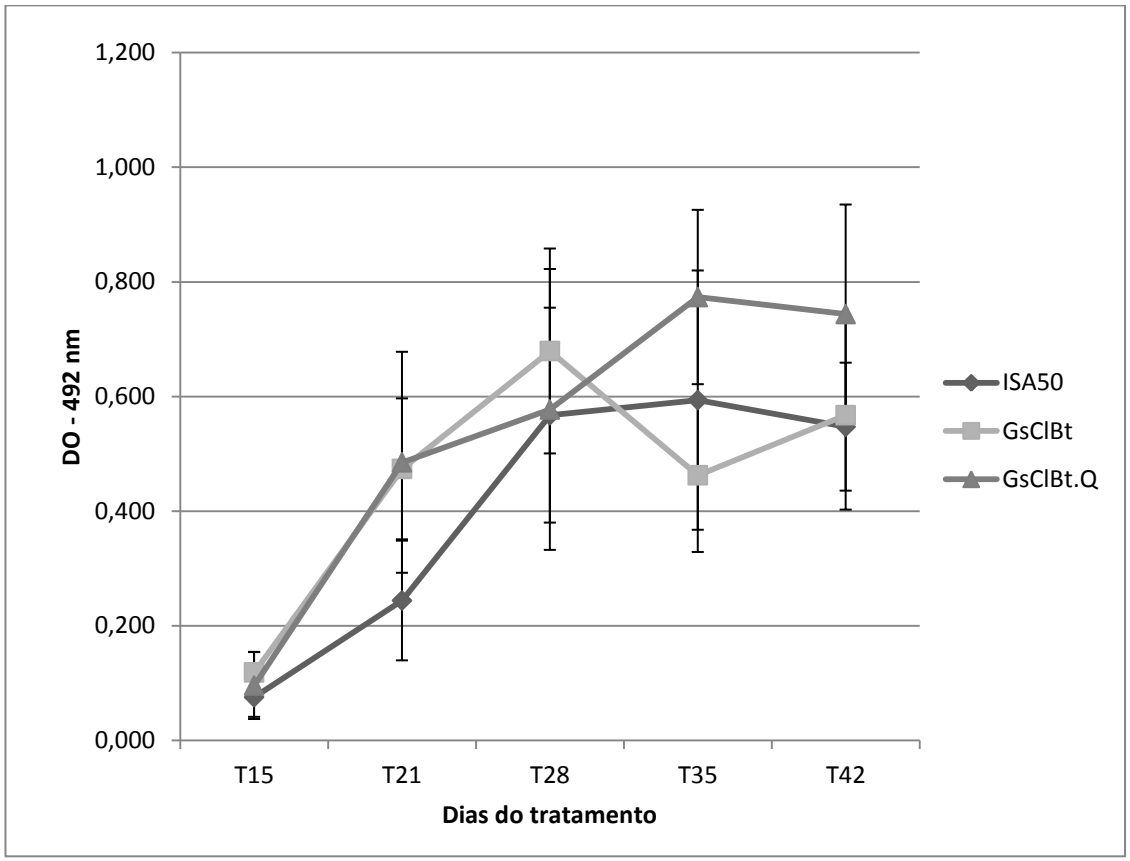

GRÁFICO 10 - Avaliação comparativa da cinética da absorbância da resposta imunológica antirrábica por ELISA das composições adjuvantes de óleo de girassol, óleo de canola e óleo de buriti com adjuvante comercial (ISA50) em dias T15, T21, T28, T35, T42 para diluição de 1/40.000. Legenda: Gs, óleo de girassol; Cl, óleo de canola; Bt, óleo de buriti; .Q, saponina 20 µg/ml. (p <0,05).

4.3.7 Relação IgG1 e IgG2a

A relação IgG1 e IgG2a com utilização de pool de amostras de soro coletadas no T21 de camundongos imunizados com vírus rábico com diferentes composições adjuvantes tem intenção de estabelecer a relação entre as respostas imune celular e humoral. Como todos os valores se encontram próximos de 1,0 (TABELA 14), é possível verificar que há uma tendência de equilíbrio entre respostas Th1 e Th2. Importante ressaltar que o antígeno viral tende a uma resposta Th1, equilibrada pela ação das composições adjuvantes.

TABELA 14 - Relação IgG1 e IgG2a com utilização de pool de amostras de soro coletadas no T21 de camundongos imunizados com vírus rábico com diferentes composições adjuvantes IgG1 e IgG2a por método ELISA

Adjuvante	IgG1/IgG2a
GsBt.Q	1,09
Cl.Q	1,01
ISA50	0,93
GsClBt.Q	0,89
Cl	0,87
GsBt	0,70
GsCl.Q	0,68
GsClBt	0,67
Gs	0,67
Gs.Q	0,66
GsCl	0,64

Legenda: Gs, óleo de girassol; Cl, óleo de canola; Bt, óleo de buriti; .Q, saponina 20 µg/ml.

4.3.8 Ensaio imunoenzimático para indicação de níveis séricos de IgE total

Os níveis séricos de IgE total foram medidos com a intenção de confirmar possível tendência de resposta Th2 por parte das composições adjuvantes.

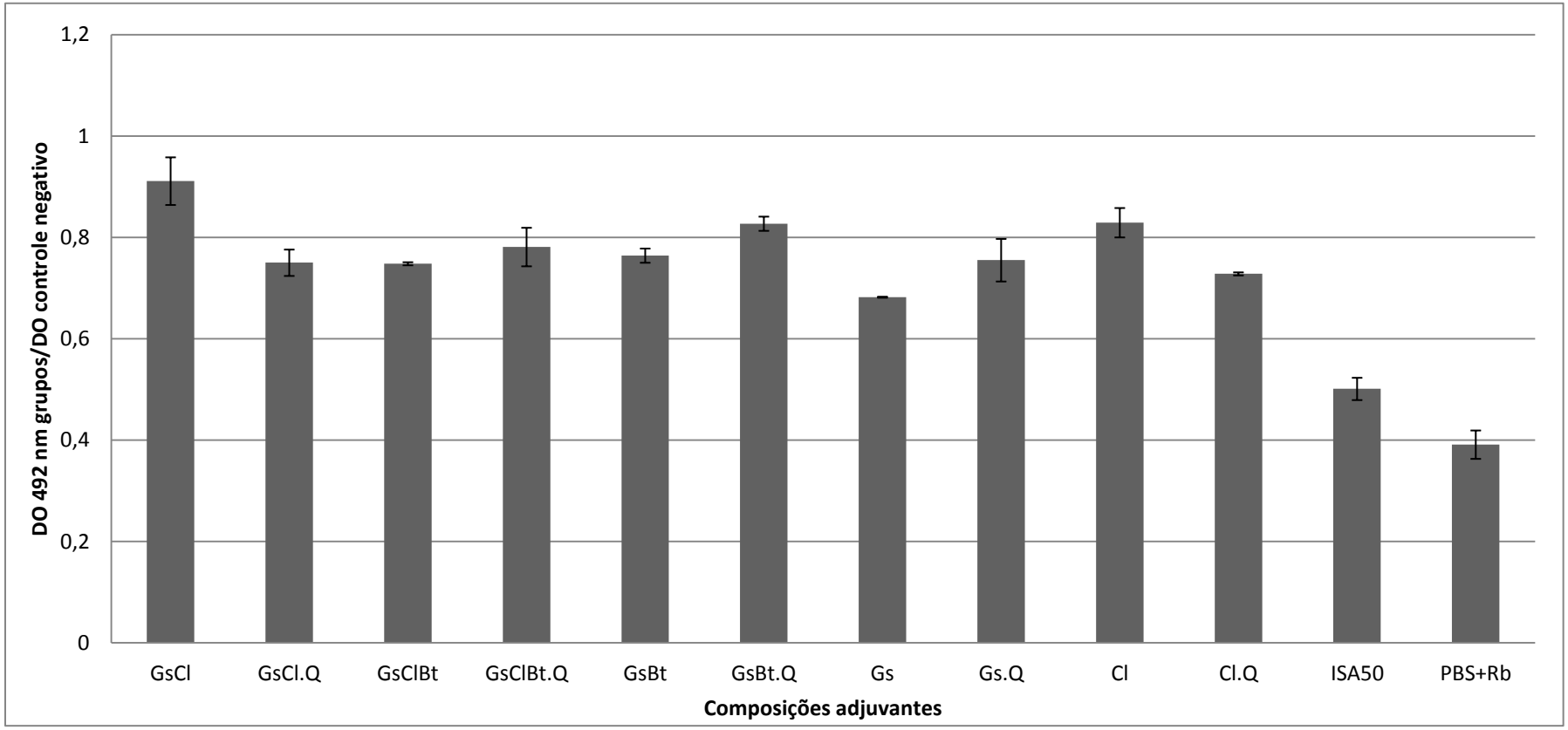

GRÁFICO 11 - Avaliação comparativa dos níveis séricos de IgE total das composições adjuvantes de óleo de girassol, óleo de canola e óleo de buriti com adjuvante comercial (ISA50) e grupo sem adjuvante (PBS+Rb), em T21. Legenda: Gs, óleo de girassol; Cl, óleo de canola; Bt, óleo de buriti; .Q, saponina 20 µg/ml

.

5. DISCUSSÃO

Estudar óleos vegetais para a elaboração de adjuvantes vacinais retoma hipóteses levantadas no início do século passado. Desde 1916 (OLITSKY, 1918) diversos óleos vegetais foram testados na busca de novos adjuvantes de baixo custo, fácil disponibilidade e de fontes renováveis.

Diversos estudos sobre adjuvantes e sistema de entrega de drogas testavam óleos vegetais em paralelo com os minerais e pouco ou quase nenhum resultado significativo para o histórico dos óleos vegetais (BRITO *et al.*, 2011; FOX, 2009; YARKONI, RAPP, 1979). E aquele que o obteve, como o Adjuvant 65, uma emulsão água-em-óleo de óleo metabolizável de amendoim, licenciado para uso em vacinas em 1973 no Reino Unido (PECK *et al.*, 1964; STOKES *et al.*, 1969; WOODHOUR *et al.*, 1964, 1966), teve seu projeto totalmente abandonado quando, por exigência da agência regulatória dos EUA, deveria ser produzido a partir de óleo purificado. Neste procedimento, o produto perdera sua atividade adjuvante (HILLEMAN, 1999).

Décadas de estudos relacionando os óleos vegetais entre suas amostras, mimetizando os métodos que obtiveram resultados positivos de efeito adjuvante com os óleos minerais contra antígenos dos mais diversos, alimentavam uma expectativa de descoberta de um óleo que pudesse servir como adjuvante com segurança substancialmente maior que a dos óleos minerais (EGHAFONA, 1996; FUKUMI, 1967; HILLEMAN, 1966; HILLEMAN *et al.*, 1972; LASAROW, WILLIAMS; THEIS, 1992; LE MOIGNIC, PINOY, 1916; OLITSKY, 1918; REYNOLDS, HARRINGTON, CRABBS, 1980; SARTOR, COLODEL, ALBUQUERQUE, 2011; STONE, XIE, 1990; STONE, 1997, 1993; WOODHOUR *et al.*, 1964).

Os óleos minerais, junto com adequada ação na potencialização da resposta imune, geravam também diversas e extensas reações adversas indesejáveis. Mas não só eles, buscar identificação de adjuvantes potentes com baixas reatogenicidade e toxicidade compreende um dos maiores desafios da pesquisa e desenvolvimento dos adjuvantes. Mesmo adjuvantes aprovados para algumas formulações vacinais, tais como, MF59, ISCOMS, QS21, AS02, e AS04 (PETROVSKY *et al.*, 2007) apresentam significativas reações adversas,

tais como, dor no local de injeção, inflamação, linfoadenopatia e até necrose local, granuloma, e abscesso asséptico.

Os óleos vegetais historicamente testados foram aqueles oriundos ou produzidos em abundância no hemisfério norte. Surgiu, dessa forma, a pergunta sobre os óleos nativos do Cerrado, da Amazônia, da América Latina como um todo. A variedade de cocos, castanhas e leguminosas é proporcional à biodiversidade latinoamericana (BALICK, 1979). Também é significativo o número de óleos com usos medicinais nas comunidades indígenas (BALICK, 1979; MILLIKEN, ALBERT, 1996, 1997). Tudo isto, indicou possibilidades ainda não testadas para sua ação adjuvante.

Nos frigoríficos, a frequente remoção e descarte de áreas rejeitadas para consumo devido reações vacinais é fator instigante ao olhar investigativo, levantando sérias questões sobre o prejuízo causado à cadeia de produção de carnes (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011; MCKERCHER *et al.*, 1971), conforme demonstrado na TABELA 1 e FIGURA 3. Os óleos vegetais amazônicos ou extraídos de plantas de outros ecossistemas brasileiros são alternativas passíveis de serem testadas com a intenção de abordar o problema dos adjuvantes vacinais potentes e seguros.

As diversas amostras de óleos enumeradas no item 2.1 foram acolhidas mais do que escolhidas. Ao considerar o preço de mercado dos óleos, a disponibilidade de cada óleo no mercado, iniciou a seleção daqueles que poderiam figurar como constituintes de composições adjuvantes, quer dizer, aqueles óleos cujo preço como matéria-prima não estivesse fora da realidade da indústria e, assim, pudessem tornar parte de uma formulação adjuvante. Desse modo, fica fácil entender que os óleos comestíveis, como os de soja, de girassol, de canola, de arroz, de milho figurariam entre os mais baratos e mais disponíveis no mercado em grandes quantidades.

Dados não publicados pelo Laboratório Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários do Instituto Butantan de um experimento teste com emulsões de óleos comestíveis refinados, demonstraram que estes óleos, em sua maioria, tiveram muito baixo efeito adjuvante, sem diferença significativa do grupo inoculado somente com o antígeno (BSA) e com grande diferença significativa do grupo inoculado com emulsão de óleo mineral (ISA50). Somente um destes óleos, o óleo de arroz,

demonstrou significativa ação adjuvante, aproximadamente metade dos valores de absorbância encontrados para o óleo mineral.

Considerando as razões que pudessem explicar este efeito, destacou o fato do óleo de arroz ter naturalmente alta concentração de vitamina E na forma de tocoferois e tocotrienois. Isto significa que não há adição de antioxidantes e conservantes na sua composição durante o beneficiamento e refino. Isto evidenciou o óleo de arroz como mais próximo do estado bruto que os outros óleos vegetais do teste. Para verificar esta hipótese, a pesquisa focou em testar as amostras dos óleos vegetais em estado de extração bruto, ou semirrefinado sem adição de antioxidantes.

O teste de toxicidade é essencial para consideração de qualquer matéria-prima, especialmente para formulação de adjuvante. Um adjuvante terá sempre uma função auxiliar, secundária ao antígeno na ação de provocar uma resposta específica a este antígeno, de modo que não deve apresentar característica tóxica ao organismo em que é utilizado. No máximo, poderá apresentar níveis toleráveis de toxicidade segundo a legislação a que vai ser submetida. Algumas formulações utilizadas para a medicina veterinária possuem certo nível de toxicidade e efeitos adversos não tolerados para vacinas humana (SPICKLER; ROTH, 2003).

A letalidade a partir de seu efeito tóxico excluiu imediatamente os óleos de andiroba e óleo de semente de maracujá bruto. Nenhum dos outros óleos utilizados apresentou qualquer toxicidade aguda ou subaguda (7 dias) para camundongos, de modo que podem ser considerados para estudos que desejam uma base oleosa para uso como adjuvante ou veículo. Nos experimentos animais foram observadas reações vacinais das composições adjuvantes em cada grupo para o fim de planejamento de futuros estudos sistematizados de toxicidade, para analisar reações locais e sistêmicas com análise histopatológica. As observações reforçam que o estudo é viável e prospectivo.

O estudo de formação de emulsão das amostras oleosas teve alto grau de dificuldade dada a multiplicidade de fatores implicados no processo de controle e determinação exigentes, e capazes de alterar os resultados finais. O processo de formação da emulsão por adição de energia mecânica em alta força laminar para a formação das partículas emulsivas gera calor. Este

aumento de temperatura no sistema deve ser compensado por algum processo de resfriamento, pois este mesmo calor favorece a desintegração das partículas da emulsão. Com isto, é importante ter controle das seguintes temperaturas: do sistema emulsivo, do ambiente, do processo de resfriamento do sistema, da haste do emulsificador, da fração aquosa que é lentamente adicionada à fração oleosa em agitação pela força laminar exercida pela haste. Da necessidade de exercer algum controle dos múltiplos fatores, decorreu a padronização do procedimento para a preparação de emulsões, item 3.2.2.1.

O número de testes demonstrados na TABELA 5 para cada óleo nas distintas faixas de EHL ilustram as dificuldades no processo de descoberta do EHL Req de cada amostra de óleos, da definição das concentrações de surfactantes na mistura oleosa, da proporção mais favorável das frações oleosa e aquosa, objetivando uma emulsão de qualidade e estabilidade reprodutíveis. A fração aquosa utilizada foi (PBS) e meio de cultura para células de origem animal, na intenção de reproduzir condições industriais de elaboração de vacinas oleosas (SHINODA, LINDMAN, 1987; SHINODA, 1983).

A estabilidade mínima a 25°C estipulada no trabalho não corresponde ao exigido pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para a vacina da aftosa, ou aos parâmetros obedecidos pelas emulsões de óleos minerais. Esta estabilidade mínima de 7 dias em temperatura ambiente, no entanto, foi o suficiente para permitir a inoculação dos animais nos experimentos propostos e ainda apoia a viabilidade do desenvolvimento de um produto que possa ser disponibilizado para avaliação do mercado (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001).

As principais formulações, indicadas na TABELA 7 correspondem aos resultados mais satisfatórios ao se considerar os fatores de formação de emulsão, de estabilidade, reprodutibilidade de resultados das formulações. O fato de não constar as formulações exatas das principais composições adjuvantes não diminui a clareza dos resultados obtidos, uma vez que não são formulações de produto final desenvolvido. Os cinco pares de formulações foram propostos para avaliar a possível adição de saponina, ainda que em baixa concentração, e ver a diferença de resposta que pudesse ser gerada (RAJPUT *et al.*, 2007; SMITSAART *et al.*, 2004).

Os óleos vegetais possuem composição de ácidos graxos com uma variação natural, segundo cada amostra. O entendimento que o óleo extraído do mesocarpo de um fruto (uma castanha, por exemplo) terá sua constituição ligeira ou significativamente diversa pela razão de colheita em diferentes regiões nas quais estes frutos são encontrados ou cultivados. A diferença no tamanho do fruto implica na diferença do tamanho do mesocarpo, que influencia diretamente na quantidade de óleo que pode ser extraída do mesmo e a concentração de algumas substâncias nele. Isto é mais comum nos óleos aqui designados como amazônicos ou do Cerrado, do que nos óleos comestíveis comerciais, cujos cultivares da planta de origem interferem mais na concentração de minerais, vitaminas, polifenois e etc, que propriamente a região onde a planta de origem foi cultivada.

O EHL requerido de um óleo possui pequenas variações em amostras distintas e na prática de elaboração de emulsão, é possível aumentar ou diminuir a concentração do surfactante, que por sua vez influenciará diretamente na quantidade da fração aquosa que o sistema poderá comportar. Os óleos que não apresentaram estabilidade mínima proposta neste trabalho são ainda passíveis de serem estudados para mesmo fim de acordo com a disponibilidade de outros surfactantes com que possam ser testados.

As FIGURAS de 5 a 9 evidenciam com boa qualidade de emulsão, o tipo de imagem que se buscou nos testes de formação de emulsão, TABELA 5. A cada teste, foi coletada uma gota da emulsão para montagem de lâmina e observação no microscópio ótico. A ausência do equipamento de registro de imagem no laboratório onde foram realizados os testes de formação de emulsão, não impediu tomar este parâmetro de qualidade como auxiliar no desenvolvimento das formulações. A média dos diâmetros das partículas evidenciada em cada imagem sugere que as principais formulações formaram microemulsões com características semelhantes a outras de óleo mineral que obtiveram os melhores resultados em teste de adjuvantes para a vacina da raiva (LECLERCQ *et al.*, 2011).

As medidas da viscosidade das composições adjuvantes vegetais em temperatura de refrigeração foram menores que a referida para o ISA50 a 25°C, o que dá indícios de qualidade importante. Mesmo que os resultados não sejam divergentes de outros relatos (CHUNG *et al.*, 2001), são indicados

maiores estudos sobre este fator de qualidade, com equipamentos e metodologia mais adequados.

Estas características físico-químicas de qualidade das emulsões não tóxicas, que demonstraram estabilidade, deram garantia de que elas poderiam ser testadas numa vacina.

Nos ensaios pilotos foi possível observar uma tendência de resposta imunológica e provável efeito adjuvante dos distintos óleos e diferentes formulações para o antígeno BSA. Estas observações foram importantes para a escolha das formulações que foram, num momento posterior, utilizadas no experimento com vírus rábico.

As principais formulações, indicadas na TABELA 7 correspondem aos resultados mais satisfatórios ao se considerar os fatores de formação de emulsão, de estabilidade mínima da emulsão, de uniformidade e tamanho das partículas emulsivas, de viscosidade e de custo dos óleos (viabilidade econômica de um possível adjuvante). Os resultados dos ensaios pilotos indicaram possível tendência de ação adjuvante e estas formulações foram escolhidas para o experimento com o vírus rábico.

A definição de adjuvante ideal é objeto de repetidas vezes na literatura, em todas com a intenção de denominar, delimitar, definir de maneira objetiva o alvo desta linha de pesquisa (AGUILAR, RODRÍGUEZ, 2007; EDELMAN, 2002; GUPTA, SIBER, 1995; MCKEE *et al.*, 2010; NEWMAN, 2000; O'HAGAN, 1998; PATIL *et al.*, 2002; PETROVSKY, AGUILAR, 2004; PETROVSKY *et al.*, 2007; SCHULTZE *et al.*, 2008; SIVAKUMAR *et al.*, 2011; SUN, XIE, YE, 2009). A mudança no processo de aprovação de um adjuvante para uso em vacinas instituiu outros parâmetros para elaboração de tal definição. A aprovação de um adjuvante está totalmente vinculada à aprovação da vacina específica a que ele faz parte da composição. Pesquisar e desenvolver para identificar um adjuvante ideal passou a significar pesquisar e desenvolver um adjuvante ideal para cada vacina a ser submetida à aprovação pelos órgãos regulamentadores (SESARDIC, DOBBELAER, 2004; SUN, GRUBER, MATSUMOTO, 2012).

Ponto pacífico entre as distintas definições é capacidade do adjuvante de modular o sistema imunológico para responder à presença de um antígeno por meio de um conjunto de ações pró-inflamatórias (tipo Th1), mediado por respostas celulares, e outro de ações anti-inflamatórias (tipo Th2), mediado por

anticorpos (MOSMANN, CHERWINSKI, BOND, 1986; MOSMANN, COFFMAN, 1989). Desse modo, um adjuvante seguro, para a espécie que o receberá, que possa modular para uma resposta imunológica celular e que gere uma alta produção de anticorpos a um determinado antígeno, seria considerado ideal para compor com ele uma vacina.

Os resultados evidenciados no teste ELISA demonstraram que houve produção de IgG antirrábica nos grupos inoculados com as composições adjuvantes de origem vegetal. Esta resposta imunológica dá suporte às escolhas de formulações para alcançar o objetivo proposto de selecionar óleos vegetais ou mistura de óleos que pudessem mimetizar a eficácia e potência do óleo mineral comercial. Ainda, esta resposta apoia também que os óleos vegetais possuem potencial adjuvante na condição bruta ou semirrefinada de extração, quer dizer, sem adição de antioxidantes ou conservantes.

Dos GRÁFICOS 5 ao 9 se verificam os resultados de resposta imunológica em T15 para os pares de formulação em comparação com ISA50 e o grupo vacinado sem adjuvante (PBS+Rb). Não houve, na sua maior parte, diferença significativa entre o ISA50 e as formulações de óleos vegetais e todos se diferenciaram do grupo que recebeu somente o vírus rábico (PBS+Rb). A formulação GsBt (GRÁFICO 7) mostrou produção de IgG significativamente maior que o ISA50. No mesmo gráfico fica ilustrada uma tendência em todas as formulações em que há a presença do óleo de buriti e adição de saponina: parece haver um antagonismo de ação. No gráfico 9 o mesmo mecanismo parece ocorrer para as formulações GsClBt e GsClBt.Q, apesar de não haver diferença significativa entre elas. Nenhuma outra formulação apresentou em T15 diferença significativa para com o ISA50.

Analisando a cinética das respostas imunológicas, nota-se que em T21 parece haver uma superioridade de resposta das composições com óleos vegetais em relação ao ISA50, o que é real. Olhando somente T21, a maioria das composições se mostrou significativamente maior que o óleo mineral, evidenciando uma maior velocidade de resposta mediante a segunda dose da vacina (realizada em T15). Entretanto, não houve diferença significativa na cinética da resposta imunológica entre nenhuma das formulações com o óleo mineral, corroborando para sugerir que os óleos vegetais em seu estado bruto possuem importante potencial adjuvante.

Tal potencial parece estar relacionado às características naturais dos óleos, especialmente na sua constitutiva composição de tocoferois e tocotrienois, especialmente o alfa-tocoferol, descrito como benéfico em emulsões utilizadas como vacinas (FRANCHINI *et al.*, 1995; HOGAN *et al.*, 1993; TENGERDY, AMEGHINO, RIEMANN, 1991; TENGERDY, LACETERA, 1991).

Recentemente foi descrito que a presença do alfa-tocoferol corrobora para o recrutamento de granulócitos e monócitos carregados de antígenos para os linfonodos periféricos e modulação na produção de citocinas (MOREL *et al.*, 2011).

Na Tabela 9 a análise da relação IgG1/IgG2a não evidencia a clássica ação da saponina (QS-21) de modular a resposta imunológica para Th1. Parece haver uma tendência equilibrada de modulação tanto para Th1 quanto para Th2 em todas as formulações (valores próximos de 1,0).

Quando um indivíduo, animal ou humano, é infectado pelo vírus da raiva, este deve ser combatido antes de chegar a um feixe nervoso, pois uma vez lá, ele migra pelo nervo periférico até o sistema nervoso central. Desse modo, é desejável uma resposta Th2 robusta e rápida, que possa exercer essa barreira. Importante notar que o vírus impele a uma resposta Th1, evidenciando a grande importância do uso de adjuvantes vacinais com antígenos virais que possam promover resposta imunológica forte de inclinação para Th2, quer dizer, resposta imune humoral (anticorpos)

IgE total inespecífica, não significa alta IgE em relação ao vírus da raiva. IgE total inespecífica pode estar relacionada ao estado bruto dos óleos, que estavam em graus de refino diferentes. Estavam ainda sem adição de antioxidantes, com garantia de origem de fornecedores certificados, contudo, há uma lacuna de padronização destes óleos, ou de cada óleo até este momento.

A produção de IgE confirma inclinação de resposta Th2, uma vez que é evidencia de grande produção de IL-4, citocina que melhor caracteriza a resposta imune humoral. IgE total foi maior nos óleos vegetais que no ISA50, evidência de uma possível ação alérgica e corrobora para inclinação Th2 de sua resposta, também maiores que o grupo PBS+Rb. Importante salientar que nenhum camundongo mostrou sinais de hipersensibilidade, alergia, choque

anafilático, que seriam hemorragia gastrointestinal e hemorragia intraperitonial (para esta espécie). Ainda, as emulsões de óleos vegetais possuíam percentual bem mais alto da fração oleosa, quando comparado com o ISA50, cuja formulação possui 50% de água. Acredita-se que o desenvolvimento de um produto a partir dos óleos vegetais, que pudesse aumentar a fração aquosa, poderia gerar produção menor de IgE total.

O ISA50 se apresenta como um óleo comercial em uso na medicina veterinária como adjuvante vacinal satisfatório em relação às correntes demandas de saúde animal e defesa sanitária (IYER *et al.*, 2000; ROY, FRENCH, ERASMUS, 1992). Entendemos que os resultados deste trabalho sugerem que as diversas composições advindas de óleos vegetais testadas para verificação de sua imunogenicidade obtiveram comportamento satisfatório como adjuvantes. Estes óleos se apresentaram como possibilidades importantes para a busca de novas formulações vacinais.

6. CONCLUSÕES

A primeira conclusão é que é possível elaborar emulsões estáveis não tóxicas a partir de óleos vegetais para sua utilização como veículos e adjuvantes vacinais. Outra é que existem óleos vegetais que possuem potência e atividade adjuvante semelhantes e tão eficientes quanto aos do óleo branco mineral (hidrocarboneto parafínico) utilizado comercialmente. Os óleos vegetais devem estar em seu estado bruto ou semirrefinado, sem a adição de antioxidantes e conservantes. Por último, parece haver um equilíbrio de resposta Th1/Th2 para as formulações de vacina de raiva com óleos vegetais, indicando participação importante desses óleos na vertente Th2 da resposta.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, J. C.; RODRÍGUEZ, E. G. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, v. 25, n. 19, p. 3752-3762, 10 maio. 2007.

ALLISON, A. C.; BYARS, N. E. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. **Journal of Immunological Methods**, v. 95, n. 2, p. 157-168, 24 dez. 1986.

ALLISON, A. C.; BYARS, N. E. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. **Molecular Immunology**, v. 28, n. 3, p. 279-284, mar. 1991.

ASSUMPÇÃO, T. I. *et al.* Economic losses due vaccine reactions in carcasses of Nellore cattle. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 2, p. 375-380, 2011.

AUCOUTURIER; ASCARATEIL, S.; DUPUIS, L. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. Supplement 2, p. S44-S45, 12 abr. 2006.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2666-2672, 21 mar. 2001.

AUDIBERT, F.; LISE, L. D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Immunology Today**, v. 14, n. 6, p. 281-284, jun. 1993.

BALICK, M. J. Amazonian oil palms of promise: a survey. **Economic Botany**, v. 33, n. 1, p. 11–28, 1979.

BENISEK, Z. *et al.* Experimental squalene adjuvant: II. Harmlessness and local reactogenity. **Vaccine**, v. 22, n. 25-26, p. 3470-3474, 3 set. 2004.

BRAMWELL, V. W.; PERRIE, Y. Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 6, p. 717-728, 2006.

BREIMAN, R. F. Vaccines as Tools for Advancing More than Public Health: Perspectives of a Former Director of the National Vaccine Program Office. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 283-288, 15 jan. 2001.

BRITO, L. A. *et al.* An alternative renewable source of squalene for use in emulsion adjuvants. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6262-6268, 26 ago. 2011.

BRONNERT, J. *et al.* Organ Transplantations and Rabies Transmission. **Journal of Travel Medicine**, v. 14, n. 3, p. 177-180, 9 abr. 2007.

BRUGH, M.; STONE, H. D.; LUPTON, H. W. Comparison of inactivated Newcastle disease viral vaccines containing different emulsion adjuvants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 72-75, jan. 1983.

CHERWINSKI, H. M. *et al.* Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 an Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. 5, p. 1229-1244, 1987.

CHRISTENSEN, D. *et al.* Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): Past, present, and future. **Journal of Liposome Research**, v. 19, n. 1, p. 2-11, mar. 2009.

CHUNG, H. *et al.* Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 71, n. 3, p. 339-350, 28 abr. 2001.

COQUERELLE, C.; MOSER, M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 317-334, 2010.

COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, n. 3, p. 248-256, fev. 1997.

DAUGHERTY, A. L.; MRSNY, R. J. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 5-6, p. 686-706, 7 ago. 2006.

DUPUIS, L. *et al.* Veterinary vaccine adjuvants. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 248-249, 15 mar. 2009.

EBENSEN, T.; GUZMÁN, C. A. Immune modulators with defined molecular targets: cornerstone to optimize rational vaccine design. **Human Vaccines**, v. 4, n. 1, p. 13-22, fev. 2008.

EDELMAN, R. The Development and Use of Vaccine Adjuvants. **Molecular Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 129-148, 2002.

EGHAFONA, N. O. Immune responses following cocktails of inactivated measles vaccine and Arachis hypogaea L. (groundnut) or Cocos nucifera L. (coconut) oils adjuvant. **Vaccine**, v. 14, n. 17-18, p. 1703-1706, dez. 1996.

EHRETH, J. The global value of vaccination. **Vaccine**, v. 21, n. 7-8, p. 596-600, 30 jan. 2003.

ENGERING, A. *et al.* The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. **J Immunol**, v. 168, n. 5, p. 2118-2126, 1 mar. 2002.

ENGVALL, E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. **Methods in Enzymology**, v. 70, n. A, p. 419-439, 1980.

FEIJÓ, R. B.; SÁFADI, M. A. P. Imunizações: três séculos de uma história de sucessos e constantes desafios. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3, jul. 2006.

FENN, E. A. The Great Smallpox Epidemic of 1775-82. **History Today**, v. 53, n. 8, p. 10–18, 2003.

FOX, C. B. Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3286-3312, set. 2009.

FRANÇA, A. T. **Perdas Econômicas Por Abcessos Vacinais E/Ou Medicamentosos Em Carcaças De Bovinos Abatidos No Estado De Goiás**. Text.Serial.Journal. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewArticle/383>. Acesso em: 7 jul. 2010.

FRANCHINI, A. *et al.* Vitamin E in Viral Inactivated Vaccines. **Poultry Science**, v. 74, n. 4, p. 666-671, 4 jan. 1995.

FRANCIS, G. *et al.* The biological action of saponins in animal systems: a review. **The British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587-605, dez. 2002.

FRAZATTI-GALLINA, N. M.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; PAOLI, R. L. et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Vaccine, v. 23, n. 4, p. 511-517, 2004.

FROST, L. *et al.* Persistent subcutaneous nodules in children hyposensitized with aluminium-containing allergen extracts. **Allergy**, v. 40, n. 5, p. 368-372, jul. 1985.

FUKUMI, H. **Effectiveness and untoward reactions of oil adjuvant influenza vaccines**Proceedings of the 17th symposium organized by the Permanent Section of Microbiological Standardization and held at the Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht-Bilthoven (The Netherlands), March 30-April 2, 1966. **Anais**... *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS OF IMMUNITY.

Utrecht: Regamey, R. H.; Hennessen, W.; Ikic, D.; Ungar, J., 1967

GOTO, N. *et al.* Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. **Vaccine**, v. 11, n. 9, p. 914-918, 1993.

DE GREGORIO, E.; D'ORO, U.; WACK, A. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 339-345, jun. 2009.

GUPTA, R. K. *et al.* Adjuvants -- a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, n. 3, p. 293-306, 1993.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, n. 14, p. 1263-1276, 1995.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nat Rev Micro**, v. 5, n. 7, p. 505-517, jul. 2007.

HAIDER, S. Rabies: Old Disease, New Challenges. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 5, p. 562-563, 26 fev. 2008.

HARANDI, A. M.; MEDAGLINI, D.; SHATTOCK, R. J. Vaccine adjuvants: A priority for vaccine research. **Vaccine**, v. 28, n. 12, p. 2363-2366, 11 mar. 2010.

HASHIDA, S.; HASHINAKA, K.; ISHIKAWA, E. Ultrasensitive enzyme immunoassay. **Biotechnology Annual Review**, v. 1, p. 403-451, 1995.

HILLEMAN, M. R. Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccines. **Progress in Medical Virology. Fortschritte Der Medizinischen Virusforschung. Progrès En Virologie Médicale**, v. 8, p. 131-182, 1966.

HILLEMAN, M. R. *et al.* The clinical application of adjuvant 65. **Annals of Allergy**, v. 30, n. 3, p. 152-158, mar. 1972.

HILLEMAN, M. R. Personal historical chronicle of six decades of basic and applied research in virology, immunology, and vaccinology. **Immunological Reviews**, v. 170, n. 1, p. 7-27, 1 ago. 1999.

HOGAN, J. S. *et al.* Vitamin E as an adjuvant in an Escherichia coli J5 vaccine. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 2, p. 401-407, fev. 1993.

HORNUNG, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature immunology**, v. 9, n. 8, p. 847–856, 2008.

ISHII, K.; AKIRA, S. Toll or Toll-Free Adjuvant Path Toward the Optimal Vaccine Development. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 4, p. 363-371, 1 jul. 2007.

IYER, A. V. *et al.* Evaluation of three "ready to formulate" oil adjuvants for foot-and-mouth disease vaccine production. **Vaccine**, v. 19, n. 9-10, p. 1097-1105, 8 dez. 2000.

JANSEN, T. *et al.* Structure-activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses. **Vaccine**, v. 23, n. 8, p. 1053-1060, 11 jan. 2005.

JANSEN, T. *et al.* Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. **Vaccine**, v. 24, n. 26, p. 5400-5405, 29 jun. 2006.

JEGERLEHNER, A. *et al.* A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. **Vaccine**, v. 20, n. 25-26, p. 3104-3112, 19 ago. 2002.

JOHNSON, A. G.; TOMAI, M. A. A study of the cellular and molecular mediators of the adjuvant action of a nontoxic monophosphoryl lipid A. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 256, p. 567-579, 1990.

JOHNSON, N.; CUNNINGHAM, A. F.; FOOKS, A. R. The immune response to rabies virus infection and vaccination. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3896-3901, 21 maio. 2010.

KERSTEN, G. F. A.; CROMMELIN, D. J. A. Liposomes and ISCOMs. **Vaccine**, v. 21, n. 9-10, p. 915-920, 14 fev. 2003.

KERSTEN, G.; HIRSCHBERG, H. Antigen delivery systems. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 453-462, ago. 2004.

KOOL, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 4, p. 869-882, 14 abr. 2008.

KRIEG, A. M. Toll-free vaccines? **Nat Biotech**, v. 25, n. 3, p. 303-305, mar. 2007.

KURODA, Y. *et al.* Autoimmunity induced by adjuvant hydrocarbon oil components of

vaccine. **Biomedecine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 5, p. 325-337, jun. 2004.

LAMBRECHT, B. N. *et al.* Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 23-29, fev. 2009.

LASAROW, R. M.; WILLIAMS, D. L.; THEIS, J. H. Humoral responses following immunization with Leishmania infantum (ex. Oklahoma): A comparison of adjuvant efficacy in the antibody responses of Balb-C mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 14, n. 5, p. 767-772, jul. 1992.

LECLERCQ, S. Y. *et al.* Evaluation of water-in-oil-in-water multiple emulsion and microemulsion as potential adjuvants for immunization with rabies antigen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. In Press, Corrected Proof, 2011.

LEINIKKI, P. O.; PASSILA, S. Quantitative, semiautomated, enzyme-linked immunosorbent assay for viral antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 136 Suppl, p. S294-299, out. 1977.

LI, H. *et al.* Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 1, p. 17–21, 2008.

LIU, R. *et al.* Cooperation of Invariant NKT Cells and CD4+CD25+ T Regulatory Cells in the Prevention of Autoimmune Myasthenia. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 7898-7904, 15 dez. 2005.

MAHAMAT, A. *et al.* Risk of rabies transmission and adverse effects of postexposure prophylaxis in health care workers exposed to a fatal case of human rabies. **American Journal of Infection Control**, n. 0, [S.d.].

MAHNKE, K. *et al.* The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, Dec-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II–Positive Lysosomal Compartments. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 3, p. 673-684, 30 out. 2000.

MÁLAGA, C. A. *et al.* Tuberculosis-like lesions arising from the use of Freund's complete adjuvant in an owl monkey (*Aotus* sp.). **Journal of Medical Primatology**, v. 33, n. 2, p. 109-112, 2004.

MANCINO, D.; OVARY, Z. Adjuvant effects of amorphous silica and of aluminium hydroxide on IgE and IgG1 antibody production in different inbred mouse strains. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 61, n. 3, p. 253-258, 1980.

MARCIANI, D. J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 20, p. 934-943, 15 out. 2003.

MBAWUIKE, I.; ZANG, Y.; COUCH, R. B. Humoral and cell-mediated immune responses of humans to inactivated influenza vaccine with or without QS21 adjuvant. **Vaccine**, v. 25, n. 17, p. 3263-3269, 30 abr. 2007.

MCKEE, A. *et al.* Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? **BMC Biology**, v. 8, n. 1, p. 37, 2010.

MCKERCHER, P. D. *et al.* Reaction of swine to oil-adjuvanted inactivated foot-and-mouth disease virus vaccine inoculated by intramuscular and subcutaneous routes. **Archives of Virology**, v. 35, n. 4, p. 364-377, 1971.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil. **Economic Botany**, v. 50, n. 1, p. 10-25, 1996.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil, Part II. **Economic Botany**, v. 51, n. 3, p. 264-278, 1997.

MITCHISON, N. A. Induction of Immunological Paralysis in Two Zones of Dosage. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)**, v. 161, p. 275-292, 15 dez. 1964.

MO, H. *et al.* Schistosoma japonicum eggs modulate the activity of CD4+ CD25+ Tregs and prevent development of colitis in mice. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 385-389, ago. 2007.

LE MOIGNIC; PINOY. Les vaccins en emulsion dans les corps gras ou “lipo-vaccins”. **Comptes Rendus de la Societe de Biologie**, n. 79, p. 201–3, 1916.

MOREL, S. *et al.* Adjuvant System AS03 containing [alpha]-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. **Vaccine**, v. 29, n. 13, p. 2461-2473, 16 mar. 2011.

MOSCA, F. *et al.* Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10501, 2008.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual review of immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MOSSONG, J.; MULLER, C. P. Estimation of the Basic Reproduction Number of Measles during an Outbreak in a Partially Vaccinated Population. **Epidemiology and Infection**, v. 124, n. 2, p. 273-278, 1 abr. 2000.

MOYLETT, E. H.; HANSON, I. C. Mechanistic actions of the risks and adverse events associated with vaccine administration. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 5, p. 1010-1020, nov. 2004.

MURCIANO, C. *et al.* Killed Candida Albicans Yeasts and Hyphae Inhibit Gamma Interferon Release by Murine Natural Killer Cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1403-1406, 2 jan. 2006.

NAKANO, T. *et al.* Effects of geldanamycin and thalidomide on the Th1/Th2 cytokine balance in mice subjected to operative trauma. **Surgery**, v. 141, n. 4, p. 490-500, abr. 2007.

NALLET, S. *et al.* Respiratory syncytial virus subunit vaccine based on a recombinant fusion protein expressed transiently in mammalian cells. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6415-6419, 30 out. 2009.

NEWMAN, M. J. Vaccines adjuvants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 10, n. 3, p. 279-314, mar. 2000.

NORDLY, P. *et al.* Status and future prospects of lipid-based particulate delivery systems as vaccine adjuvants and their combination with immunostimulators. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 7, p. 657-672, jul. 2009.

O'HAGAN, D. T. Recent advances in vaccine adjuvants for systemic and mucosal administration. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 1-10, jan. 1998.

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 9, p. 727-735, 2003.

OLITSKY, P. K. An experimental study of vaccination against Bacilli dysenteriæ. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 28, n. 1, p. 69-88, 1 jul. 1918.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune

response with improved vaccine adjuvants. **Nat Med**, 5 abr. 2005.

PATIL, P. K. *et al.* Immune Responses of Sheep to Quadrivalent Double Emulsion Foot-and-Mouth Disease Vaccines: Rate of Development of Immunity and Variations among Other Ruminants. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 11, p. 4367-4371, 1 nov. 2002.

PECK, H. M. *et al.* NEW METABOLIZABLE IMMUNOLOGIC ADJUVANT FOR HUMAN USE. 2. SHORT-TERM ANIMAL TOXICITY TESTS. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 116, p. 523-530, jun. 1964.

PETROVSKY, N. *et al.* **New-Age Vaccine Adjuvants: Friend or Foe?** ArticleStandard. Disponível em: <http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=444996&sk=&date=&pageID=7>. Acesso em: 28 set. 2010.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunol Cell Biol**, v. 82, n. 5, p. 488-496, online. 2004.

PICHICHERO, M. E. Improving vaccine delivery using novel adjuvant systems. **Human Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 262-270, ago. 2008.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. **Nat Med**, 5 abr. 2005.

PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W. A.; OFFIT, P. A. **Vaccines**. [S.l.] Elsevier Health Sciences, 2008.

RAJPUT, Z. I. *et al.* Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 8, n. 3, p. 153-161, mar. 2007.

REED, S. G. *et al.* New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23-32, jan. 2009.

REYNOLDS, J. A.; HARRINGTON, D. G.; CRABBS, C. L. Adjuvant activity of a novel metabolizable lipid emulsion with inactivated viral vaccines. **Infection and Immunity**, v. 28, n. 3, p. 937-943, 1980.

ROMAGNANI, S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. **Immunology Today**, v. 12, n. 8, p. 256-257, ago. 1991.

ROY, P.; FRENCH, T.; ERASMUS, B. J. Protective efficacy of virus-like particles for

bluetongue disease. **Vaccine**, v. 10, n. 1, p. 28-32, 1992.

RUBIN, L. DA S.; ILHA, A. DA S.; WAQUIL, P. D. O comércio potencial brasileiro de carne bovina no contexto de integração regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, n. 4, dez. 2008.

SARTOR, I. T. M.; COLODEL, E. M.; ALBUQUERQUE, D. Adjuvant activity of rice oil on the immune response to ovalbumin. **Revista Vaccimonitor**, v. 20, n. 2, p. 1-5, 2011.

SCHIJNS, V. E. J. C. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 21, n. 9-10, p. 829-831, 14 fev. 2003.

SCHULTZE, V. *et al.* Safety of MF59™ adjuvant. **Vaccine**, v. 26, n. 26, p. 3209-3222, jun. 2008.

SESARDIC, D.; DOBBELAER, R. European union regulatory developments for new vaccine adjuvants and delivery systems. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2452-2456, 23 jun. 2004.

SHAHIWALA, A.; VYAS, T. K.; AMIJI, M. M. Nanocarriers for systemic and mucosal vaccine delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2007.

SHINODA, K. Solution behavior of surfactants: The importance of surfactant phase and the continuous change in HLB of surfactant. *In*: NAKAGASKI, M.; SHINODA, K.; MATIJEVIĆ, E. (Eds.). **Frontiers in Colloid Science In Memoriam Professor Dr. Bun-ichi Tamamushi**. Darmstadt: Steinkopff, 1983. v. 68p. 1-7.

SHINODA, K.; LINDMAN, B. Organized surfactant systems: microemulsions. **Langmuir**, v. 3, n. 2, p. 135-149, 1 mar. 1987.

SIMERSKA, P. *et al.* Oral vaccine delivery--new strategies and technologies. **Current Drug Delivery**, v. 6, n. 4, p. 347-358, ago. 2009.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 5-6, p. 469-478, maio. 2003.

SIVAKUMAR, S. M. *et al.* Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 4, p. 197-206, out. 2011.

SMITSAART, E. *et al.* Addition of saponin to double oil emulsion FMD vaccines enhances specific antibody responses in cattle and pigs. **Report on the European Commission for the control of foot-and-mouth disease. Session of the Research Group of the Technical Standing Committee, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Chania, Greece, 11–15 October 2004**, p. 344–351, 2004.

SPICKLER, A. R.; ROTH, J. A. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 273-281, jun. 2003.

STOKES, J., Jr *et al.* New metabolizable immunologic adjuvant for human use. IX. Large-scale trials with multiple lots in different regimens. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 207, n. 11, p. 2067-2072, 17 mar. 1969.

STONE, H. D. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle disease and avian influenza. **Avian Diseases**, v. 37, n. 2, p. 399-405, jun. 1993.

STONE, H. D. Newcastle disease oil emulsion vaccines prepared with animal, vegetable, and synthetic oils. **Avian Diseases**, v. 41, n. 3, p. 591-597, set. 1997.

STONE, H. D.; XIE, Z. Efficacy of Experimental Newcastle Disease Water-in-Oil Oil-Emulsion Vaccines Formulated from Squalane and Squalene. **Avian Diseases**, v. 34, n. 4, p. 979-983, 1 out. 1990.

STORNI, T. *et al.* Innate Immunity Together with Duration of Antigen Persistence Regulate Effector T Cell Induction. **J Immunol**, v. 171, n. 2, p. 795-801, 15 jul. 2003.

STORNI, T. *et al.* Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 3, p. 333-355, 10 jan. 2005.

SÜLI, J. *et al.* Experimental squalene adjuvant: I. Preparation and testing of its effectiveness. **Vaccine**, v. 22, n. 25-26, p. 3464-3469, 3 set. 2004.

SUN, H.-X.; XIE, Y.; YE, Y.-P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p. 1787-1796, mar. 2009.

SUN, Y.; GRUBER, M.; MATSUMOTO, M. Overview of global regulatory toxicology requirements for vaccines and adjuvants. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 65, n. 2, p. 49-57, mar. 2012.

TENGERDY, R. P.; AMEGHINO, E.; RIEMANN, H. Serological responses of rams to

a Brucella ovis—vitamin E adjuvant vaccine. **Vaccine**, v. 9, n. 4, p. 273-276, abr. 1991.

TENGERDY, R. P.; LACETERA, N. G. Vitamin E adjuvant formulations in mice. **Vaccine**, v. 9, n. 3, p. 204-206, mar. 1991.

VALTULINI, S. *et al.* Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs. **Vaccine**, v. 23, n. 30, p. 3999-4004, 10 jun. 2005.

VILLINGER, F. Cytokines as clinical adjuvants: how far are we? **Expert Review of Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 317-326, abr. 2003.

VOELKER, R. Global Effort Takes Aim at Rabies. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 15, p. 1749-1750, 17 out. 2007.

VOGEL, F. R. Improving Vaccine Performance with Adjuvants. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. S3, p. S266-S270, 1 jun. 2000.

VOLD, R. D. Emulsions: Theory and practice (Becher, Paul). **Journal of Chemical Education**, v. 42, n. 12, p. 692, 1 dez. 1965.

WACK, A.; RAPPUOLI, R. Vaccinology at the beginning of the 21st century. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 411-418, ago. 2005.

WATANABE, M. *et al.* Efficacy of chemically cross-linked antigens for acellular pertussis vaccine. **Vaccine**, v. 19, n. 9-10, p. 1199-1203, 8 dez. 2000.

WATERS, R. V.; TERRELL, T. G.; JONES, G. H. Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides. **Infect. Immun.**, v. 51, n. 3, p. 816-825, 1 mar. 1986.

WILSON-WELDER, J. H. *et al.* Vaccine adjuvants: Current challenges and future approaches. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1278-1316, abr. 2009.

WOODHOUR, A. F. *et al.* New Metabolizable Immunologic Adjuvant for Human Use. I. Development and Animal Immune Response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 116, n. 2, p. 516-523, 1 jun. 1964.

WOODHOUR, A. F. *et al.* New metabolizable immunologic adjuvant for human use. 4. Development of highly purified influenza virus vaccine in adjuvant 65. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 123, n. 3, p. 778-782, dez. 1966.

WOODWARD, K. N. Veterinary pharmacovigilance. Part 3. Adverse effects of veterinary medicinal products in animals and on the environment. **Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 171-184, 2005.

WU, C.-A.; YANG, Y.-W. Induction of Cell Death by Saponin and Antigen Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 271-277, 1 fev. 2004.

YANG, Y.-W.; WEI, A.-C.; SHEN, S.-S. The immunogenicity-enhancing effect of emulsion vaccine adjuvants is independent of the dispersion type and antigen release rate--a revisit of the role of the hydrophile-lipophile balance (HLB) value. **Vaccine**, v. 23, n. 20, p. 2665-2675, 8 abr. 2005.

YANG, Y.-W.; WU, C.-A.; MORROW, W. J. W. Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1524-1536, 29 mar. 2004.

YANG, Y.-W.; WU, C.-A.; MORROW, W. J. W. The apoptotic and necrotic effects of tomatine adjuvant. **Vaccine**, v. 22, n. 17-18, p. 2316-2327, 2 jun. 2004.

YARKONI, E.; RAPP, H. J. Tumor Regression After Intralesional Injection of Mycobacterial Components Emulsified in 2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene (Squalene), 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosane (Squalane), Peanut Oil, or Mineral Oil. **Cancer Research**, v. 39, n. 5, p. 1518-1520, 5 jan. 1979.

ZINKERNAGEL, R. M. *et al.* Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. **Immunological Reviews**, v. 156, n. 1, p. 199-209, 1997.

ZURBRIGGEN, R. Immunostimulating reconstituted influenza virosomes. **Vaccine**, v. 21, n. 9-10, p. 921-924, 14 fev. 2003.

APÊNDICE 1

APÊNDICE 1 - TABELA DE CÁLCULO DE EHL

	% Span80	ml	% Span20		% Tween80		% Tween 20				
EHL	4,3	mg	7,6	mg	15	mg	16,5	mg	EHL Result	100%	mg
8,37	62	1,86		0	38	1,14		0	8,37	100,00	3,00
8,47	61	1,83		0	39	1,17		0	8,47	100,00	3,00
8,58	60	1,8		0	40	1,2		0	8,58	100,00	3,00
8,69	59	1,77		0	41	1,23		0	8,69	100,00	3,00
8,79	58	1,74		0	42	1,26		0	8,79	100,00	3,00
8,90	57	1,71		0	43	1,29		0	8,90	100,00	3,00
9,01	56	1,68		0	44	1,32		0	9,01	100,00	3,00
12,05		0	50	1		0	50	1	12,05	100,00	2,00
12,05	28	0,56	0	0	72	1,44	0	0	12,00	100,00	2,00
12,05	37	0,74	0	0		0	63	1,26	11,99	100,00	2,00
12,05		0	40	0,8	60	1,2	0	0	12,04	100,00	2,00
12,05	16	0,32	23	0,46	31	0,62	30	0,6	12,04	100,00	2,00
12,05	30	0,6	7	0,14	13	0,26	50	1	12,02	100,00	2,00
12,05	25	0,5	7	0,14	54	1,08	14	0,28	12,02	100,00	2,00

Legenda: EHL do Span 80 = 4,3; EHL do Span 20 = 7,6; EHL do Tween 80 = 15,0; EHL do Tween 20 = 16,5.

ANEXOS

ANEXO 1 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA BUTANTAN

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da utilização de óleos de origem vegetal para formulação de adjuvantes vacinais", protocolo nº **772/10**, sob a responsabilidade de **Celso Pereira Caricati**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **09/12/2010.**

"We certify that the research entitled "Evaluation of vegetable oils use for vaccine adjuvants formulation", protocol n° 772/10, under the responsibility of Celso Pereira Caricati, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 12/09/2010".

Vigência do Projeto: 01/01/2011 a 07/10/2011	**N° de animais/espécie**
Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários	108 / Camundongos Swiss – M

São Paulo, 09 de dezembro de 2010.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

ANEXO 2 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/92/2010

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Avaliação da utilização de óleos de origem vegetal para formulação de adjuvantes vacinais"** (Protocolo CEUA/FCF/291), de responsabilidade do pesquisador **Marnen Almeida Carvalho,** sob a orientação do 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 8 de novembro de 2010.

São Paulo, 18 de novembro de 2010.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO 3 - DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL
marlahmm 018110040020
14/10/2011 13:43 DESP
0000221109304441
Espaço reservado para protocolo

<Uso exclusivo do INPI>

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

1.2 Qualificação: AUTARQUIA ESTADUAL DE REGIME ESPECIAL

1.3 CNPJ/CPF: 63025530000104

1.4 Endereço completo: AV. BRASIL, Nº 1971 JARDIM PAULISTA São Paulo SP

1.5 CEP: 01431001 1.6 Telefone: (11)30911580 1.7 FAX: (11)30310922

1.8 E-mail: PIDIRETO@USP.BR

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: (X) Invenção ( ) Modelo de Utilidade ( ) Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: 2.1 INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

"COMPOSIÇÕES ADJUVANTES, NA FORMA DE EMULSÕES SIMPLES OU MÚLTIPLAS, PARA AUMENTAR A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS"

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido **Data de Depósito:**

5. Prioridade ( ) interna ( ) unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: MARCO ANTONIO STEPHANO

6.2 Qualificação: BRASILEIRO CASADO MEDICO VETERINÁRIO 6.3 CPF: 69470324749

6.4 Endereço completo: AVENDIA DOM BOSCO, Nº 135 - APTO. 92 TAQUARAL CAMPINAS SP

6.5 CEP: 13076060 6.6 Telefone: (11)30911580 6.7 FAX (11)30310922

6.8 E-mail: PIDIRETO@USP.BR

☒ continua em folha anexa

INPI Formulário 1.01 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ **7.1** *Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.*

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: MARIA APARECIDA DE SOUZA

9.2 CPF/CNPJ: 12184617806 9.3 API/OAB: 1833

9.4 Endereço completo: AV. BRASIL, Nº 1971

9.5 CEP: 01431001 9.6 Telefone: (11)30911580 9.7 FAX: (11)30310922

9.8 E-Mail: PIDIRETO@USP.BR

10. Listagem de sequências Biológicos (documentos anexados) (se houver):

☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs e DVDs (originais e cópias).

☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.

☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.

☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução do INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

X	11.1 Guia de recolhimento	1 fls.	X	11.5 Relatório descritivo	20 fls.
X	11.2 Procuração	1 fls.	X	11.6 Reivindicações	3 fls.
	11.3 Documentos de prioridade	fls.	X	11.7 Desenhos	1 fls.
	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	X	11.8 Resumo	1 fls.
	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar):				fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 27 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

SÃO PAULO, 14/10/2011
Local e Data

MARIA APARECIDA DE SOUZA - API 1833
CPF: 12184617806
Assinatura e Carimbo

ANEXO DE INVENTORES

Título: "COMPOSIÇÕES ADJUVANTES, NA FORMA DE EMULSÕES SIMPLES OU MÚLTIPLAS, Página : 1

Nome: MARNEN ALMEIDA CARVALHO
Qualificação BRASILEIRO CASADO MEDICO VETERINÁRIO CNPJ/CPF: 02920526693
Endereço: RUA HEITOR PENTEADO, Nº 1310 - APTO. 1708
Bairro: Cidade: SÃO PAULO
CEP: 05438100 Estado: SP País BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: CELSO PEREIRA CARICATI
Qualificação BRASILEIRO CASADO MEDICO VETERINÁRIO CNPJ/CPF: 04564289845
Endereço: RUA GABRIELLE D'ANNUNZIO, Nº 330 - APTO. 171
Bairro: Cidade: SÃO PAULO
CEP: 04619001 Estado: SP País BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922