

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ESTUDOS SOBRE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DA VACINA ANTIAFTOSA E DO COBALTO II
PARA USO VETERINÁRIO

Lindeberg Rocha Freitas

RECIFE

1995

LINDEBERG ROCHA FREITAS

ESTUDOS SOBRE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DA VACINA ANTIAFTOSA E DO COBALTO II
PARA USO VETERINÁRIO

Tese submetida ao Departamento
de Bioquímica da Universidade
Federal de Pernambuco, para
obtenção do grau de mestre em
Bioquímica.

Orientador:
Dr. Eduardo Henrique Magalhães Melo

Co-Orientador:
M.Sc. Antônio Vicente Marrocos de Andrade

RECIFE

1995

Freitas, Lindeberg Rocha

Estudos sobre sistemas de liberação controlada da vacina antiaftosa e do cobalto II para uso veterinário. / Lindeberg Rocha Freitas. – Recife: O Autor, 2008.

91 folhas : il.,fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 1995.

Inclui bibliografia.

1. Febre aftosa – vacina 2. farmacologia 3. Vacina – testes - bovinos I. Título.

615.3

CDU (2.ed.)

UFPE

615.1

CDD (22.ed.)

CCB – 2008-010

LINDEBERG ROCHA FREITAS

ESTUDOS SOBRE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DA VACINA ANTIAFTOSA E DO COBALTO II
PARA USO VETERINÁRIO

Dissertação Apresentada para o
Cumprimento Parcial das Exigências
para Obtenção do Título de Mestre
em Bioquímica pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

RECIFE

1995

Ato da defesa de Tese do mestrando kindberg Rocha Freitas, realizada em 20/06/96, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Às 9 horas do dia 20 do mês de junho do ano de mil novecentos e noventa e seis (1996) foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo de B. Lins - Depto de Bioquímica/CEB/UFPE, o ato de defesa de Tese de kindberg Rocha Freitas, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica/CEB/UFPE. Iniciando os trabalhos, a Prof. Luana Cassandra B. B. Coelho (Coordenadora do curso supra citado) fez a apresentação do aluno, de seu orientador Prof. Eduardo Henrique de Magalhães Melo em seguida apresentou a Banca Examinadora composta dos professores Nereide Stela Santos Magalhães (Presidente), Zilda Maria Britto Figueiredo, ambas do Depto de Bioquímica/CEB/UFPE e Sebastião José de Melo do Depto de Antibióticos/CEB/UFPE. Daí a Prof. Luana passou a palavra para a Presidente da Banca Examinadora que informou: de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de 50 (cinqüenta) minutos para apresentação do Trabalho e o tempo de arguições para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder as perguntas da Banca Examinadora será de 30 (trinta) minutos. Daí a Sra. Presidente convidou o aluno para apresentação de sua tese intitulada "Estudo sobre Sistemas de liberação Controlada da Vacina Antiinfluenza e do Colralto II para Uso Veterinário". O mestrando procedeu a explanação e comentários, acerca do tema, em 50 (cinqüenta) minutos. Terminada a explanação, a Sra. Presidente passou a palavra para o Prof. Sebastião José de Melo que agradeceu pelo convite, elogiou a apresentação do candidato, em seguida iniciou sua arguição. Ao final de sua sabatina, o referido professor deu-se por satisfeito e deu algumas sugestões. Daí a Sra. Presidente passou a palavra para a Prof. Zilda Maria Britto Figueiredo que agradeceu ao convite, em seguida iniciou sua arguição. Ao final de sua sabatina, a referida professora deu-se por satisfeita e deu algumas sugestões. Continuando os trabalhos, a Sra. Presidente agradeceu pelo convite, elogiou a apresentação do candidato em seguida iniciou sua arguição.

Ao final de minha salvação, a referida professora deu-se por sa-
tisfeita e deu sugestões. Foi a Sra. Presidente suspendeu a sessão
para o julgamento pela Banca Examinadora, a qual permane-
ceu no local. Após alguns comentários a Banca Examinadora
decidiu, por unanimidade, conceder a menção "Aprovada com
Distinção". Nada mais havendo a relatar lavrei a presente de
que vai assinada por mim Secretário e demais membros da
Banca Examinadora. Recife 20/06/96.

Sebastião José de Melo
Mestre de Câmara
Luís de Figueiredo
Sebastião José de Melo

Aos meus pais. À tona, a Berguinho e
aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e orientador Eduardo Henrique de Magalhães Melo, diretor científico da FACEPE, pela nova chance, orientação científica, confiança e amizade.

Ao Professor Antônio Vicente Marrocos de Andrade, professor de Engenharia Química, pela co-orientação científica, confiança e amizade.

Ao meu irmão Hidemburgo Gonçalves Rocha, pela interação científica, seriedade e essencial ajuda.

Ao amigo Sérgio Paulo D'Oleron, pela interação científica, luta diária e amizade.

À Professora Elizabeth Alves de Oliveira, pela colaboração e amizade.

Ao Professor Nicácio Henrique da Silva, pela colaboração científica e amizade.

Ao Professor José Luiz de Lima Filho, pela colaboração na análise de resultados e utilização do computador.

A Professora Maria Elizabeth Cavalcanti Chaves, pela colaboração e utilização do espectrofotômetro.

Aos funcionários Otaviano Tavares da Costa, João Antônio Virgínio e Jefferson Coutinho de Lima, pela colaboração técnica na realização deste trabalho e amizade.

Ao veterinário José Pontes Borba, pelas consultas e amizade.

A Bibliotecária Maria Marinês Gomes Vidal, pela orientação na normatização das referências bibliográficas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, pela amizade e incentivo.

Aos colegas do curso de mestrado e do laboratório de Biotecnologia pelo apoio recebido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a VALLEÉ pelo apoio fornecido.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

1	Evolução das concentrações plasmáticas de um medicamento administrado de forma convencional	19
2	Métodos de enclausuramento	22
3	Métodos de imobilização	23
4	Ligação cruzada	27
5	Amilose.....	29
6	Amilopectina.....	30
7	O Espectro de absorção no visível de $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (curva A) e $[\text{CoCl}_4]^{2-}$ (curva B)	35
8	Espectro de absorção da vacina antiaftosa dialisada.....	51
9	Espectro de absorção do amido solúvel.....	52
10	Cromatograma seguido de espectrofotometria da vacina antiaftosa dialisada concentrada 5 vezes (280 nm).....	54
11	Em amido ativado (280 nm)	57
12	Cromatograma seguido de espectrofotometria da vacina antiaftosa dialisada concentrada 5 vezes + carbodiimida (280 nm). Tempo de ativação 5 minutos....	59
13	Cromatograma seguido de espectrofotometria da vacina antiaftosa dialisada concentrada 5 vezes + carbodiimida (280 nm). Tempo de ativação 30 minutos..	61
14	Hidrólise enzimática do amido na forma livre, ativado e com a vacina imobilizada e ativado por processo modificado e com a vacina imobilizada	65
15	Liberação controlada de drogas	67
16	Duração da imunidade da vacina antiaftosa imobilizada em amido ativado	70
17	Duração da imunidade da vacina antiaftosa imobilizada por ligações cruzadas ..	71
18	Espectro de absorção do cobalto – dextrose – lactose (CDL) comercial e do soro de leite.....	73
19	Espectro de absorção do cloreto de cobalto II. CoCl_2 em H_2O e CoCl_2 em HCl 1M	74

20 Espectro de absorção do cloreto de cobalto II. CoCl_2 em HCl 5 M, CoCl_2 em HCl 5M + lactose, CoCl_2 em HCl 5M + glicose, CoCl_2 em HCl 5M + glicose e lactose.....	75
21 Espectro de absorção do cloreto de cobalto II em presença da glicose. CoCl_2 em HCl 1M + glicose, CoCl_2 em HCl 0,1M + glicose, CoCl_2 em HCl 0,01M + glicose, CoCl_2 em HCl 0,001M + glicose e CoCl_2 em H_2O + glicose.....	77
22 Análise cromatográfica em camada fina para carboidratos utilizando o sistema de solvente I.....	80
23 Análise cromatográfica em camada fina para carboidratos utilizando o sistema de solvente II.....	80
24 Espectro de absorção do cobalto-dextrose-lactose (CDL) comercial.....	82
25 Espectro de absorção do cloreto de cobalto II em presença da glicose, na região visível (350 – 750 nm). As relações molares [Glicose] / [Cobalto II] das amostras foram (0,0; 1,0; 10,0; 50,0; 100,0; 160,0) e a concentração do cloreto de cobalto II 0,01 molar.....	83
26 Espectros de absorção do cloreto de cobalto II em presença da glicose, na região UV - visível.....	84
27 Espectros de absorção do cloreto de cobalto II em presença da glicose, na região visível (350 – 750 nm). As relações molares [Glicose] / [Cobalto II] das amostras foram (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 10,0; 30,0; 40,0) e a concentração do cloreto de cobalto II 0,01 molar.....	86
28 Espectros de absorção do cloreto de cobalto II em presença da proteína, na região (350 – 750 nm).....	87
29 Espectros de absorção do cloreto de cobalto II em presença da glicose ou da glicose + proteína, na região visível (350 – 750 nm).....	88
30 Espectros de absorção do cloreto de cobalto II em presença do amido modificado com periodato de sódio na região visível (350 – 750 nm).....	89

LISTA DE TABELAS

1	Estudo espectrofotométrico da hidrólise enzimática (amido 1% + α – amilase)....	63
2	Estudo espectrofotométrico da hidrólise enzimática (amido 1% ativado com 10 ml de NaIO_4 0,4N + vacina antiaftosa + α – amilase).....	63
3	Estudo espectrofotométrico da hidrólise enzimática (amido 1% ativado com 5 ml de NaIO_4 0,4N + vacina antiaftosa + α – amilase).....	64
4	Resultados dos índices de soro proteção	68

LISTA DE ABREVIATURAS

BEI	- ETILENIMINA BINÁRIA
BSA	- ALBUMINA SÉRICA BOVINA
CDL	- COBALTO-DEXTROSE-LACTOSE
DCC	- DICICLOHEXILCARBODIIMIDA
DEAE-DEXTRAN	- DIETILAMINOETIL-DEXTRANA
DNSA	- ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO
DPV	- DIAS PÓS-VACINAÇÃO
EDTA	- ÁCIDO 1.2 – DIAMINOETANOTETRA – ACÉTICO
ISP	- ÍNDICE DE SORO PROTEÇÃO
RNA	- ÁCIDO RIBONUCLÉICO

RESUMO

Na primeira etapa do nosso trabalho, a suspensão de vírus "O₁ campos" (subtipo de vírus causador de febre aftosa) preparada pela VALLÉE S/A foi proposta como ligante para ser acoplada ao amido através de ligações covalentes ou utilizando carbodiimida para produzir ligações cruzadas. O amido é oxidado pelo metaperiodato de sódio 0,4 N em pH 4,5, que converte grupos hidroxílicos vicinais em aldeídicos, permitindo que a suspensão de vírus "O₁ campos" seja imobilizada nesse suporte. O diciclohexilcarbodiimida em pH levemente alcalino, promove ligações cruzadas entre as proteínas dessa suspensão de vírus. As vacinas antiaftosa livre e imobilizada foram submetidas aos ensaios cromatográficos e espectrofotométricos. Nestes ensaios foram aplicados 7,5 mg de proteínas em coluna empacotada com sephadex G-100 possibilitando verificar a imobilização das proteínas dos vírus "O₁ campos" através do aumento dos picos de absorção a 280 nm e diminuição do volume de eluição. A vacina adsorvida em hidróxido de alumínio (controle) e a imobilizada foram aplicadas em doses de 5 ml por via intramuscular em bovinos, com o objetivo de realizar os testes de índice de soro proteção (ISP) para verificar a liberação do vírus "O₁ campos" no organismo animal. Os resultados dos ISP mostraram que o sistema amido + suspensão de vírus é adequado para liberação controlada do antígeno, principalmente nos 60 últimos dias de experiência. Na segunda etapa, foi proposta a complexação do cobalto II com carboidratos e/ou proteínas como sistemas de liberação controlada deste metal para uso na alimentação animal. Foram realizados estudos espectrofotométricos e cromatográficos comparativos entre o produto comercial (Cobalto-Dextrose-Lactose) de estrutura desconhecida e um produto produzido em nosso laboratório. Na análise cromatográfica foram utilizados padrões, amostras, sistemas de solventes e revelador apropriado com composição conhecida. Os resultados obtidos evidenciaram a complexação do cobalto II com glicose. Na análise espectrofotométrica foram utilizadas soluções de sais de cobalto II puro ou em presença de glicose e lactose variando-se as concentrações dos carboidratos e o pH das preparações. Foram também analisadas preparações de cloreto de cobalto II com proteínas e amido ativado com metaperiodato de sódio 0,4 N em várias concentrações, porém mantendo-se o pH das preparações. Os resultados dos

estudos espectrofotométricos mostraram as relações molares entre ligantes e cobalto II necessárias para complexação, no produto comercial (Cobalto-Dextrose-Lactose) e no produto produzido no nosso laboratório. No produto comercial (Cobalto-Dextrose-Lactose) as condições para formação do complexo Cobalto-Dextrose-Lactose são desfavoráveis, devido a relação molar entre [carboidratos] / [cobalto II] ser aproximadamente 1,73. No nosso produto, a glicose a ser usada como ligante para a complexação de cobalto II, necessita de uma relação molar [glicose] / [cobalto II] maior que 10. A glicose misturada com proteína em uma relação molar de apenas $2,5 \times 10^{-2}$ apresenta um elevado poder de complexação. A proteína e o amido ativado com metaperiodato, favorecem a complexação com o cobalto II mesmo possuindo uma relação molar milhões de vezes inferior quando comparado com o cobalto II complexado com a glicose.

Palavras Chaves: Vacina Antiaftosa, Cobalto II, Complexação

ABSTRACT

On the first stage of our work, suspended virus O1 Campos (causing subtype of virus of foot-and-mouth disease) prepared by VALLÉE S/A was proposed as ligands to be bound to the Starch through covalents or by using carbodiimide in order to produce crosslinkings. The starch is oxidated by sodium metaperiodate 0,4 N in pH 4,5, that vicinal hidroxlicos groups are converted into aldehydic, allowing that viral O₁ suspensions be immobilized in this support. Diciclohexilcarbodiimida (DCC) in a lightly alkaline pH makes crosslinks among the proteins of these suspended viruses. The Vaccine against foot and mouth disease (FMD) free and immobilized were submitted to the chromatographic and spectrophotometric assays. In these tests 7,5mg of proteins were applied in a column packed with Sephadex G-100 and this allow us to verify the immobilization of the O1 Campos virus through its increase in the absorption bands at 280nm and a volume decrease of the volume elution. The adsorbed vaccine in aluminum hydroxide (control group) and the immobilized one were applied of 5 ml intramuscular injection in cattles aiming to carry through tests of serum protection index (ISP) to assure the liberation of the O₁ campos virus into the animal organism. The ISP results had shown that the system Starch + virus suspended is suitable for the controlled liberation of the antigen, mainly in the last sixty days of experiment. On the second stage the complexation of cobalt (II) was proposed with carbohydrates and/or proteins as systems of controlled liberation from this metal for the use of animal feed. Spectrophotometric and chromatographic comparative studies were carried out between a commercial product (Cobalt-Dextrose-Lactose) whose structure was unknown and a product made in our laboratory. For the chromatographic analysis, patterns, samples, solvent systems and appropriate developer with composition were used. The results evidenced the cobalt (II) complexation with glucose. For the spectrophotometric analysis salt solutions of cobalt (II) pure or with glucose and lactose were used with a variation of carbohydrates concentrations and pH of the preparations. Cobalt (II) Chloride with proteins and activated. Furthermore, cassava starch were analyzed with sodium metaperiodate with 0,4 N in several concentrations although the pH of preparations were kept. The results of the spectrophotometric studies showed molar relationships between ligands and cobalt (II) which are necessary for the complexation in the

commercial product (Cobalt- Dextrose-Lactose) and the product made in our laboratory. In the commercial product (Cobalt- Dextrose-Lactose) the conditions for the formation of the Cobalt- Dextrose-Lactose complex are unfavorable, due to molar relationship between [carbohydrates] / [cobalt II] be approximately 1,73. Our product, glucose to be used as a ligand for the complexation of the cobalt II, needs a molar relationship [glucose] / [cobalt II] greater than 10. The mixed glucose with protein in a molar relationship of only $2,5 \times 10^{-2}$ presents a high power of complexation. Protein and activated cassava starch as metaperiodate make the complexation with cobalt II easier even if it owns a molar relationship thousand of times inferior when it is compared to cobalt II complexated with glucose.

Keywords: Antiaftosa Vaccine, Cobalt II, Complexation

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações gerais	18
1.2 Classificação de métodos de imobilização	21
1.2.1 Enclausuramento	21
1.2.1.1 Enclausuramento em gel	21
1.2.1.2 Enclausuramento em fibras	21
1.2.1.3 Microencapsulação	24
1.2.2 Ligação a um carreador	24
1.2.2.1 Adsorção física	24
1.2.2.2 Ligação iônica	24
1.2.2.3 Quelação	25
1.2.2.4 Ligação covalente	25
1.2.3 Ligação cruzada	26
1.3 Febre aftosa	27
1.3.1 Vacina contra febre aftosa inativada	29
1.4 Complexação do cobalto II com carboidratos e/ou proteínas	32
1.5 Objetivos	36
2 MATERIAL	37
2.2 Reagentes	37
2.2 Aparelhos	37
3 MÉTODOS	38
3.1 Ativação do suporte e imobilização do ligante	38
3.1.1 Ativação do suporte	38
3.1.2 Imobilização da vacina antiaftosa em amido	38
3.1.3 Preparação de ligações cruzadas entre as proteínas da vacina usando diciclohexilcarbodiimida	39
3.2 Determinação dos complexos do cobalto II	39
3.3 Análise espectrofotométrica da vacina antiaftosa livre e dialisada	41
3.4 Análise cromatográfica	41
3.4.1 Cromatografia em coluna	41
3.4.2 Cromatografia em camada fina	42
3.5 Determinação da hidrólise enzimática	43
3.5.1 Amido + α -amilase	43
3.5.2 Amido ativado com metaperiodato de sódio 0,4 N + vacina antiaftosa + α -amilase	43
3.5.3 Amido ativado com volume modificado metaperiodato de sódio 0,4 N + vacina antiaftosa + α -amilase	43

3.6 Dosagem de proteínas	44
3.6.1 Método de Lowry modificado.....	44
3.6.2 Método de Warburg e Christian.....	44
3.7 Dosagem de glicose	45
3.8 Determinação dos índices de soro proteção	45
3.8.1 Prova de anticorpos.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Imobilização da vacina antiaftosa em amido	47
4.2 Análise cromatográfica e espectrofotométrica da vacina livre e imobilizada	52
4.3 Hidrólise enzimática do amido livre e do imobilizado amido-vacina	60
4.4 Resultado dos testes de índice de soro proteção	66
4.5 Estudo espectrofotométrico do cobalto II	72
4.6 Estudo cromatográfico	76
5 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O interesse na tecnologia de controle na liberação de fármacos, aumentou incrivelmente nos últimos 20 anos. Muita atividade tem sido centralizada em torno do potencial de produzir aperfeiçoamentos e novas formulações farmacêuticas. Uma variedade de tecnologias de sistemas de liberação controlada foi introduzida, ou seja, vias transdérmicas, formas de dosagem oral de liberação modificada e microcápsulas / microsferas injetáveis. Obviamente nenhuma delas facilita todas as indicações por causa da diversidade das drogas, dosagens, vias de administração e duração de ação, assim como outros fatores como o custo e a aceitabilidade do paciente. O desafio além das propostas existentes, é para selecionar a melhor formulação farmacêutica dos sistemas de liberação controlada para cada droga e respectiva indicação (TICE et. al., 1989).

A liberação por métodos convencionais (formulações de liberação imediata) de administração de drogas sempre utilizam doses excessivas para se ter variações efetivas de concentrações ideais no organismo (Figura 1).

A administração oral é a via mais utilizada, mas possui muitas desvantagens. A taxa e absorção de comprimidos e cápsulas convencionais podem variar amplamente, dependendo de vários fatores como: natureza da droga, característica físico-química da mesma, formulação, a presença ou ausência de alimento e o pH do fluido gastrointestinal. Neste tipo de administração, o início, a intensidade e a duração da ação da droga não podem ser previstos. A liberação rápida não controlada da droga pode causar toxicidade local e gastrointestinal. Enquanto a absorção lenta ou incompleta pode resultar num fracasso terapêutico.

Na administração parenteral as vias são: subcutânea, intramuscular e intravenosa. A via intravenosa é indicada para terapias que necessitam de ação rápida, pois a mesma evita a interação com o metabolismo, tendo a droga, assim, ação rápida.

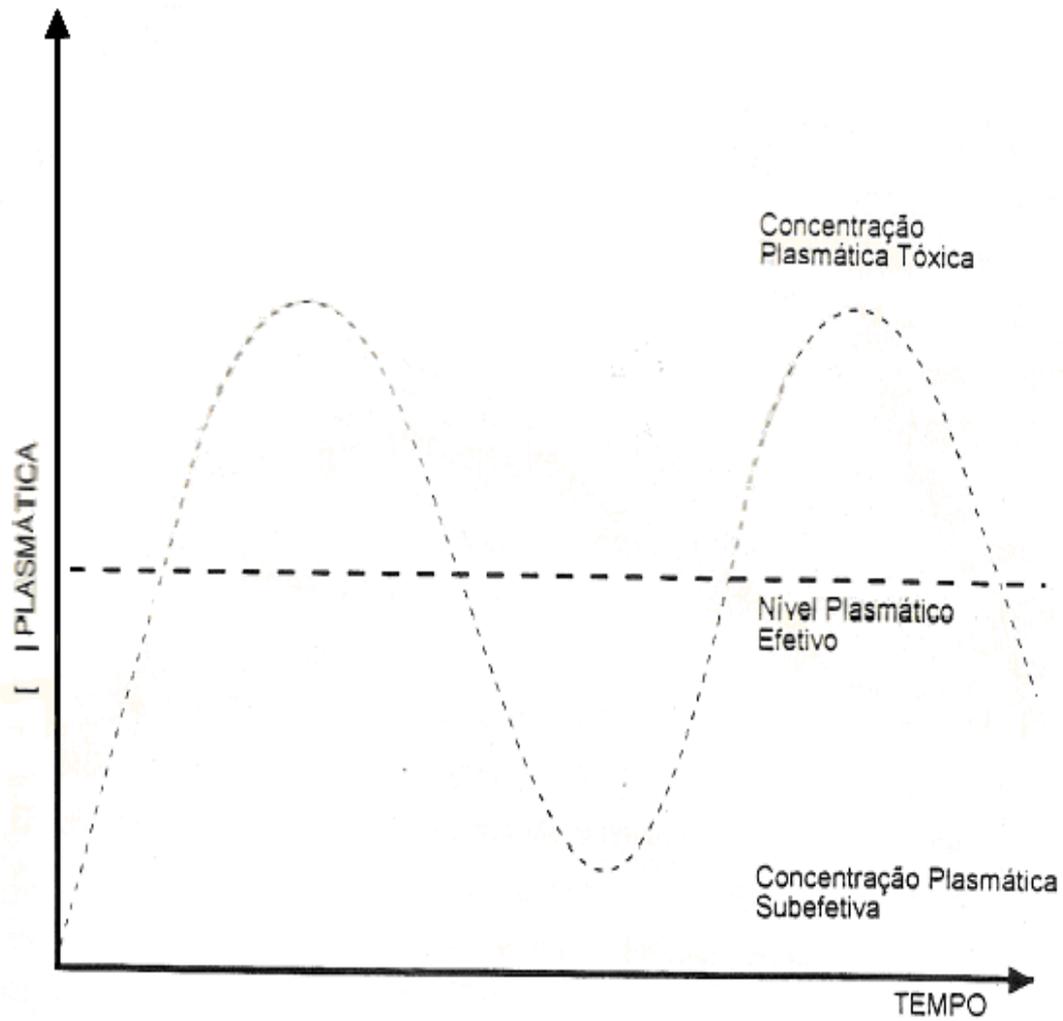


Figura 1: Evolução das concentrações plasmáticas de um medicamento administrado de forma convencional (VALLE et. al., 1988).

Pode ser usada em: diabetes, quimioterapia para câncer e controle da dor. A intramuscular pode causar necrose nos músculos e também sempre está acompanhada de muita dor. Esta via é utilizada no tratamento de diabetes (PRESCOTT, 1989).

A liberação de drogas com distribuição seletiva necessita levar em consideração a quantidade, as propriedades biológicas e físico-químicas da droga, a taxa, a via de administração ou sítio de ação, seletividade de distribuição e o conhecimento da dose ou relação resposta-tempo-concentração sem esquecer idade, doença e fatores genéticos do paciente (NOONAN e BENET, 1987; PERETTI et al., 1987).

Diferentes modelos de cinética de liberação da droga são necessários para diferentes drogas. A Liberação de ordem zero com concentrações constantes pode ser apropriada para muitas drogas, mas para outras (Ex.: agentes citotóxicos e antibióticos) a liberação intermitente pode ser melhor (LE BEL e SPINO, 1988). Portanto, os objetivos de liberação controlada de droga são: disseminar uma droga quando e onde ela é necessária e adequar a sua dosagem. Embora aparelhos mecânicos tais como bombas, seringas e cateteres possam ser usados para liberar drogas, este trabalho focaliza sistemas poliméricos para liberação controlada da droga no organismo.

Os sistemas de liberação controlada podem ser de diversos tipos: drogas poliméricas, conjugado droga-polímero ou carreador de drogas. As drogas poliméricas são macromoléculas, que apresentam atividade biológica. Muitos polímeros sintéticos são inertes biologicamente. Contudo, alguns exibem toxicidade, enquanto outros exibem uma ampla faixa de atividades terapêuticas. Há três espécies de drogas poliméricas: policátions, poliânions e polinucleotídeos (OTTENBRITE, 1991). Nos conjugados, droga-polímero ou droga-carreador, a droga é covalentemente ligada a um polímero apropriado que pode prolongar a terapia em dosagens adequadas, liberação lenta e atividade prolongada da droga. A droga pode ser permanentemente ligada ao polímero ou temporariamente ligada e removida por hidrólises ou por processos enzimáticos. Provavelmente o sistema carreador droga-polímero mais promissor envolve polissacarídeos. Esses polímeros naturais são biodegradáveis, úteis ao hospedeiro ou facilmente eliminados pelo mesmo, como exemplo, o amido e a quitosana (OTTENBRITE, 1991).

1.2 Classificação de métodos de imobilização

Os sistemas de liberação controlada envolvendo droga-polímero podem interagir através de diversos métodos de imobilização que são:

- a) Enclausuramento, no qual a droga é retida em um entrelaçamento de uma matriz polimérica ou membrana, tipo entrelaçamento por gel, microencapsulação e entrelaçamento por fibras (Figura 2);
- b) Ligação a um carreador por adsorção física, ligação iônica, quelação ou ligação covalente (Figura 3).

1.2.1 Enclausuramento

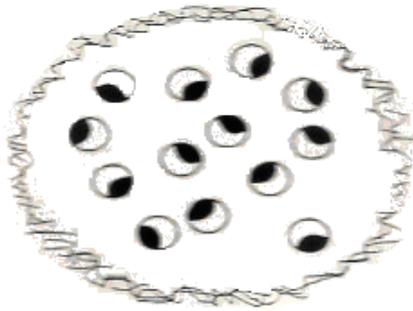
A principal vantagem do enclausuramento sobre os outros métodos de imobilização é que a droga não é alterada pelo processo de imobilização. Nesta técnica a droga pode ser enclausurada em gel, fibras ou microcápsulas.

1.2.1.1 Enclausuramento em gel

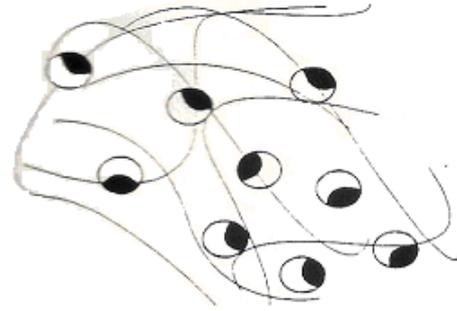
Este método envolve o enclausuramento da droga no espaço intersticial do gel. A primeira técnica de enclausuramento utilizada foi com o gel de poliacrilamida (KENNEDY e WHITE, 1985).

1.2.1.2 Enclausuramento em fibras

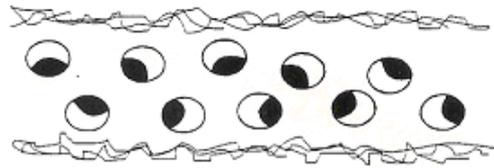
As drogas são fixadas por enclausuramento em microcavidades de fibras sintéticas (DINELLI et. al., 1978). Um polímero muito usado neste tipo de imobilização é o acetato de celulose.



Microencapsulação



Enclausuramento em gel



Enclausuramento em fibras

Figura 2: Métodos de enclausuramento

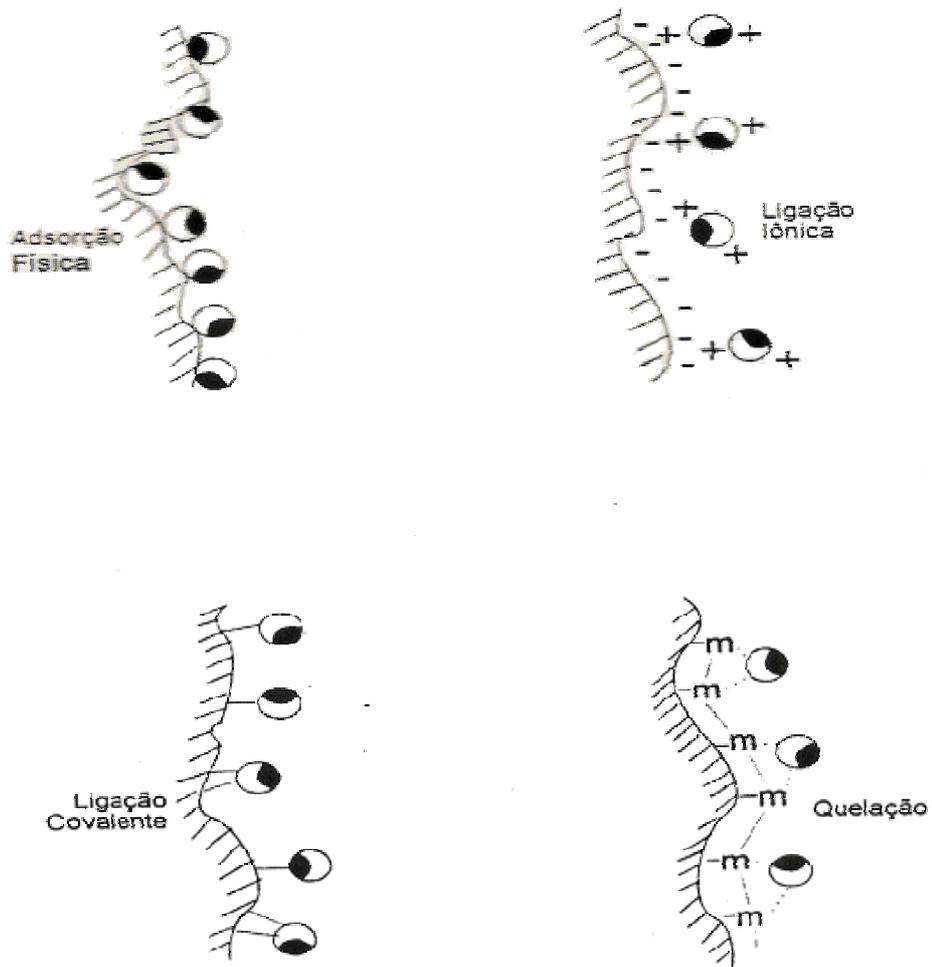


Figura 3: Métodos de Imobilização

1.2.1.3 Microencapsulação

Neste método a droga pode ser imobilizada pelo fechamento de uma membrana polimérica semipermeável e esférica. Esta técnica foi aplicada primeiro em enzimas. A droga fica dentro da microcapsula, enquanto moléculas de substratos e produto difundem-se através da membrana. Como exemplo tem-se microcápsulas contendo asparaginase, preparadas com membranas de nylon e poli-uréia (MORI et. al., 1973).

1.2.2 Ligação a um carreador

A ligação de um composto ativo a um suporte inerte é provavelmente o método de imobilização mais investigado. Este método pode ser subclassificado, dependendo do modo de ligação do agente ligante ao suporte, em quatro tipos diferentes (Figura 3):

Adsorção física

Ligação iônica

Quelação

Ligação covalente

1.2.2.1 Adsorção física

Este é o método mais simples para se obter o conjugado suporte-ligante. Neste método o ligante e o suporte entram em contato em solução aquosa. As espécies participantes da adsorção não reagem, o ligante sofre pouca ou nenhuma modificação conformacional (KENNEDY e WHITE, 1985). Exemplo deste método é vacina antiaftosa adsorvida em hidróxido de alumínio (MARTINS, 1971).

1.2.2.2 Ligação iônica

Neste método o ligante é imobilizado em suporte sólido que possua resíduos de troca iônica. Na prática pode ocorrer ligação iônica e adsorção física simultaneamente, porém, a diferença principal está no fato de que a interação iônica é mais forte que a adsorção física. Os suportes usados são trocadores de íons, obtidos principalmente de suportes orgânicos como dextran e celulose.

A catalase foi a primeira enzima imobilizada por este método utilizando DEAE-celulose e a aminoacilase imobilizada em DEAE-sephadex foi a primeira aplicação industrial para produzir L-aminoácidos de uma mistura racêmica de N-acetil-DL-Aminoácidos (KENNEDY e WHITE, 1985).

1.2.2.3 Quelação

Esta nova técnica é baseada nas propriedades quelantes dos metais de transição, os quais podem ser empregados para imobilizar enzimas, células e antibióticos. Os compostos dos metais de transição são usados para ativar a superfície do suporte e permite a ligação direta da enzima. Os sais de metais de transição que têm sido usados neste processo de ativação são cloretos e sulfatos de titânio, ferro, zinco, vanádio e estanho. Este método tem sido desenvolvido com a utilização de vários suportes, entre eles: celulose, vidro, quitina, celite, nylon e papel de filtro (KENNEDY e CABRAL, 1986).

1.2.2.4 Ligação covalente

É baseado na ligação covalente do ligante à matriz polimérica. Neste método, em certos casos, há a necessidade de modificação química do suporte para que haja a combinação deste suporte modificado com os grupos funcionais dos ligantes. Este método é um dos mais investigados para imobilização de enzimas. A escolha de condições para preparar o suporte para a ligação covalente é mais difícil quando comparado com outros métodos já discutidos.

Uma ampla variedade de ligantes e de suportes com grupos funcionais capazes de realizarem ligações covalentes ou susceptíveis de serem ativados para dar tais grupos, faz deste um método muito utilizado. Por este método podem ser imobilizadas enzimas como β -D-galactosidase, tripsina e β -amilase em celulose (KENNEDY e WHITE, 1985).

1.2.3 Ligação cruzada

A formação de ligações covalentes entre enzimas e carreadores ou entre enzimas pode ser realizada pelo uso de reagentes bi ou multifuncionais (Figura 4). A ligação cruzada entre moléculas de enzimas forma um agregado tridimensional completamente insolúvel em água, o qual não requer o uso de carreador.

É necessário, para formação da ligação cruzada, usar reagentes que possuem dois grupos funcionais idênticos (reagentes homobifuncional) ou dois ou mais grupos funcionais diferentes (reagentes heteromulti-funcional). O reagente mais utilizado é o glutaraldeído. Muitos outros reagentes tais como, diaminobutano e carbodiimida podem ser usados (MELO, 1990).

Diversos métodos de imobilização de moléculas já foram anteriormente citados (Figuras 3 e 4) e nenhum desses métodos é perfeito para todas as moléculas. Quando houver ligação entre a molécula biologicamente ativa e o suporte, é importante evitar ligação com sítio ativo da molécula ou aquelas que causem alterações químicas importantes neste sítio, o que resultará em perdas da atividade da molécula (KENNEDY e WHITE, 1983).

É também importante evitar a sobrecarga na matriz quando da ligação com o ligante, visto que a sobrecarga conduz a uma super ocupação do ligante sobre a matriz. Isto reduz a atividade da molécula por impedimento estérico. As moléculas livres podem interagir com as imobilizadas através de pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas originando um impedimento estérico.

O caminho pelo qual a macromolécula pode ser imobilizada e a escolha da matriz é também muito importante. Um número de matrizes e técnicas têm sido usados no campo da imobilização, não havendo um suporte ideal ou uma técnica de imobilização ideal. Para aplicações específicas muitos dos suportes podem ser discutidos devido suas características. Na aplicação médica, por exemplo, onde uma molécula imobilizada está em contato com o sangue ou tecido, o suporte deve ser solúvel e biodegradável. Para reatores de fluxo contínuo, o suporte deve ser de material cerâmico.

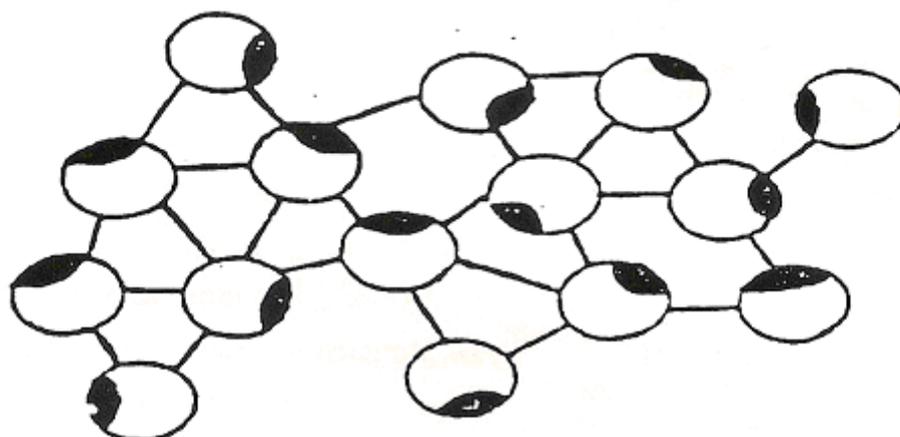


Figura 4: Ligação Cruzada

A escolha do suporte é também influenciada pelo seu efeito nas características da molécula. O suporte ideal para uma dada aplicação é o que favorece a ligação com a molécula (OTTENBRITE, 1991).

Um grande número de polissacarídeos tem sido usado como suportes sólidos incluindo celulose, amido, dextrana, agarose ácidos alginicos.

Os polissacarídeos mais importantes são celulose e amido. Ambos são produzidos nas plantas a partir do dióxido de carbono e da água, pelo processo de fotossíntese. Sucede que, tanto um como outros, estão constituídos por unidades de D=Glicose. O amido forma a reserva nutritiva das plantas e existe principalmente nas sementes. É mais solúvel na água que a celulose, e mais facilmente hidrolisado e, por isso, mais facilmente digerido (MORRISON e BOYD, 1978).

O amido apresenta-se em forma de grânulos, cujo tamanho e forma dependem da fonte de obtenção.

O amido é constituído pelas frações amilose e amilopectina. Estas duas partes correspondem a dois hidratos de carbono de alto peso molecular $(C_6 H_{10} O_5)_n$. A amilose (Figura 5) é constituída por unidades de D-Glicose, unidas entre si por

ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina (Figura 6) é constituída de cadeias ramificadas formadas por unidades de D-Glicose unidas por ligações α -1,4 nas cadeias e por ligações α -1,6 nas ramificações (MORRISON e BOYD, 1978).

Por tratamento com ácidos ou sob ação de enzimas os componentes do amido são hidrolisados progressivamente para dextrina, maltose e finalmente D-glicose.

Por tratamento com ácido periódico ou periodato de sódio ocorre a clivagem das ligações carbono-carbono do amido, pois esses reagentes clivam ligações com hidroxilas vicinais.

A oxidação dos componentes do amido pela clivagem da ligação carbono-carbono com hidroxilas vicinais é um método de análise difundido. Este método utiliza o ácido periódico e seus sais em soluções aquosas de pH 3-5 para evitar a oxidação não seletiva a qual pode ocorrer em altos valores de pH (KENNEDY e WHITE, 1983).

1.3 Febre aftosa

A febre aftosa é considerada a enfermidade mais importante que afeta animais herbívoros biungulados, tanto domésticos como selvagens.

A doença é altamente contagiosa e produz lesões na boca, úbere e espaços interdigitais das patas e resulta numa perda de produtividade de cerca de 25% dos rebanhos afetados, particularmente os produtores de carne e leite. Assim, a enfermidade, onde quer que ocorra, representa um obstáculo ao comércio e pode-se afirmar, sem perigo de contradição, que influi de um modo ou de outro, no preço de quase todos os produtos pecuários colocados no mercado mundial. Além dos prejuízos que a febre aftosa causa no desenvolvimento do rebanho dos países afetados, há que se considerar medidas restritivas ao controle ou erradicação da doença adotada pelos países livres da enfermidade em relação ao produto dos países afetados. Trata-se pois de uma enfermidade que causa prejuízo a todos os países, afetados ou não, com interferência direta nos fatores econômicos, sociais e políticos.

Nos países onde a febre aftosa é endêmica, as campanhas de controle são baseadas na imunização ativa da população susceptível, junto com uma série de medidas sanitárias apropriadas (La TORRE, 1992).

1.3.1 Vacina contra febre aftosa inativada

A primeira vacina inativada contra a febre aftosa foi desenvolvida em 1938, por Waldmann que utilizou como antígeno os vírus (O, A e C) extraídos do epitélio de lesões frescas da língua de animais artificialmente infectados. Estes vírus eram adsorvidos em hidróxido de alumínio e inativados com formol (MARTINS, 1971). O formol tem um tempo de inativação muito longo, o que pode afetar a capacidade imunizante das partículas. Tem sido estudado outros agentes inativadores do vírus aftosa, como betapropriolactona, gliceraldeído, acetiletlenimina e bromoetilimina.

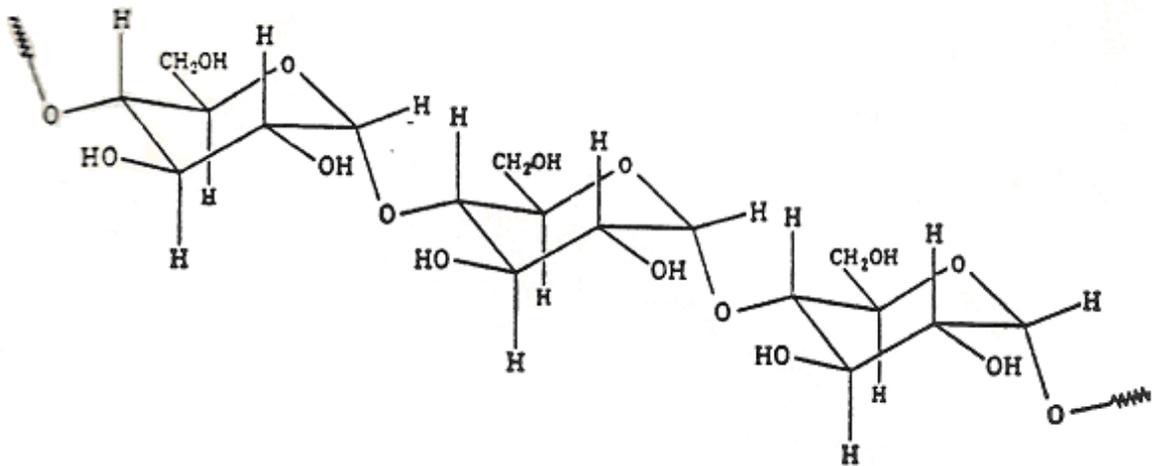


Figura 5: Amilose

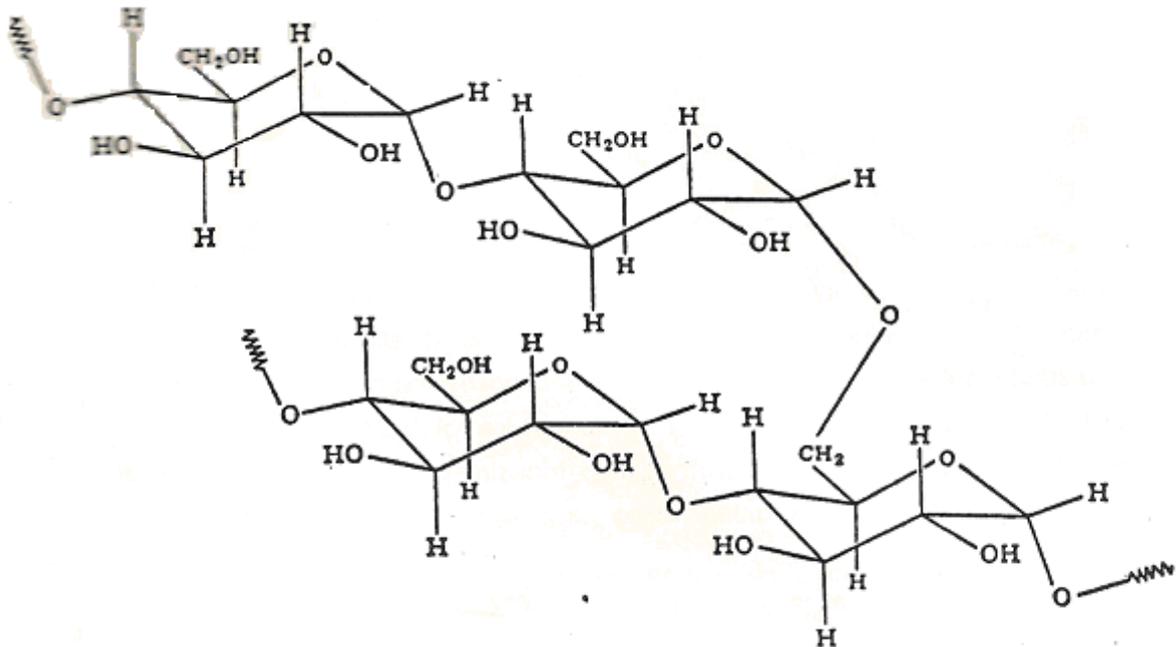


Figura 6: Amilopectina

Posteriormente com a finalidade de melhorar a vacina, foi usado um adjuvante oleoso formado por azeites minerais de grau farmacêutico. Foram investigados outros adjuvantes entre os quais, o DEAE-dextrana, diversas substâncias poliônicas e complexos polinucleotídeos (FERNANDES et al., 1975).

Atualmente tem se avançado no conhecimento profundo do vírus e da enfermidade com a possibilidade de se dispor de vacinas efetivas e métodos de controle e técnicas de engenharia genética, respectivamente.

É evidente que a qualidade de uma vacina depende da qualidade do antígeno, dos inativantes, dos adjuvantes e de um manejo adequado do antígeno durante a produção e a distribuição. Assim mesmo o conhecimento das propriedades bioquímicas, antigênicas e imunogênicas dos agentes são aspectos essenciais que devem ser considerados para a preparação de uma vacina adequada (OLASCOAGA et al., 1988).

Em geral uma vacina convencional compreende:

- Agentes patógenos completos inativos, obtidos através da inativação química de vírus cultivados em células em suspensão e monocapa ou implantes de tecidos.

No caso de vacinas inativadas:

- Muitos vírus são difíceis de cultivar em quantidades adequadas para assegurar suficiente massa antigênica por doses para uma efetiva imunização;
- Grandes volumes de células infectadas constituem um risco para o manejo de segurança biológica;
- Há risco de inativação incompleta (somente uma fração da produção é aprovada para inocuidade);
- Se requer refrigeração durante o armazenamento e distribuição, especialmente nos países tropicais;
- A eventual contaminação bacteriana pode degradar o antígeno através de enzimas proteolíticas;
- Pode haver alteração da estrutura antigênica devido aos inativantes.

Para melhorar as limitações da vacina convencional pode-se proporcionar alterações nas seguintes partes:

1 - Antígeno

O agente causal da enfermidade é um aftovírus pertencente a família picornaviridae. O virion tem estrutura icosaédrica, sem envoltório e tem cerca de 25 nm de diâmetro. Está formado por 60 cópias de cada uma das quatro proteínas estruturais vp1, vp2, vp3 e vp4. Uma ou duas cópias de vpo (precursor não clivado de vp2 e vp4) e 3D a RNA polimerase do vírus. Os polipeptídeos vp1, vp2 e vp3 estão organizados em 12 subunidades pentaméricas cada uma das quais configura um dos 12 vértices do icosaedro. O virion por diminuição do pH abaixo de 6,5 ou o aquecimento a 45°C se dissocia. Vp1 é o único polipeptídeo estrutural que ao ser purificado e injetado em bovinos é capaz de induzir anticorpos neutralizantes e está localizado nos ápices do virion. O polipeptídeo vp4 está localizado internamente. O genoma viral está formado por uma cadeia de RNA e tem aproximadamente 8000 nucleotídeos (La TORRE, 1992).

No caso do vírus da febre aftosa, a qualidade do antígeno é altamente dependente das condições para o cultivo dos vírus. Será necessário estudar métodos alternativos para cultivos de células de alta densidade.

2 - Inativantes

O formaldeído foi o agente tradicional usado para a inativação do vírus em grandes escala. A introdução dos derivados das aziridinas, de maneira

particular a etilenimina binária (B E I) junto com provas mais efetivas de inocuidade, tem dado maior confiança na aplicação segura destas vacinas (OLASCOAGA et al., 1988).

3 - Adjuvantes

Atualmente se está dando grande importância as condições ótimas para apresentar o antígeno ao sistema imunitário. Isto é importante não somente para melhorar as vacinas clássicas como também para o desenvolvimento de novas vacinas. No caso da febre aftosa o adjuvante utilizado é o hidróxido de alumínio-saponina. Também está se investigando o uso de mecanismo de liberação controlada que permitem uma periódica e contínua liberação do antígeno. Entre estes se incluem lipossomas, cápsulas biodegradáveis de liberação lenta e microsferas (OLASCOAGA et al., 1988).

No controle da febre aftosa a utilização da vacinação de animais susceptíveis a esta enfermidade é um dos recursos da maior utilidade. Não obstante, devido as condições inerentes ao vírus em si, como os processos físico-químicos a que são submetidos durante a elaboração da vacina, até o presente não se tem um antígeno específico capaz de conferir aos animais uma imunidade sólida e de larga duração (LA TORRE, 1992).

A primeira parte deste projeto visa a imobilização dos vírus da vacina antiaftosa em polímeros orgânicos como alternativa da produção de sistemas de liberação controlada no organismo.]

Imobilização da vacina aftosa em polímeros orgânicos, ligação cruzada das proteínas presentes na vacina com carbodiimida e glutaraldeído na tentativa de retardar a liberação da vacina que sofrerá ataque enzimático (hidrolases) no organismo animal separando o vírus aftosa do suporte ao qual está ligado covalentemente, formando portanto um sistema de liberação controlada. Com este objetivo, a imobilização da vacina em suportes orgânicos, solúveis em água e não tóxico, amplia o sistema de liberação de drogas.

De acordo com o citado anteriormente, foram realizadas análises espectrofotométricas da vacina e do polímero com a finalidade de se comprovar a imobilização da vacina no polímero.

Foram realizados estudos da atuação de hidrolases sobre a vacina imobilizada no amido e estudos comparativos de índice de soro proteção entre a

vacina convencional e a vacina produzida em nosso laboratório com o objetivo de se obter um sistema de liberação controlada no organismo animal.

1.4 Complexação do cobalto II com carboidratos e/ou proteínas

A segunda parte da dissertação se propõe a complexação do cobalto II com carboidratos e/ou proteínas como um sistema de liberação controlada deste metal para uso na alimentação animal.

A reação de complexação com um íon metálico, envolve a substituição de uma ou mais moléculas do solvente, coordenadas por outros grupos nucleófilos.

Os grupos ligados ao íon central são chamados ligantes e, em solução aquosa, a reação pode ser: $M(H_2O)_n + L \rightleftharpoons M(H_2O)_{n-1}L + H_2O$.

A substituição sucessiva de moléculas de água por outros grupos ligantes, pode ocorrer até que se forme o complexo ML_n , onde n é o número de coordenação do íon metálico e representa o número máximo de ligantes monodentados que podem ser ligados a ele.

Os ligantes são classificados de acordo com o número de pontos em que se prendem ao íon metálico, cada um num determinado ponto, por doação de um par de elétrons ao metal. Os tipos mais freqüentes destes ligantes monodentados são os íons negativos mono-atômicos e moléculas neutras tais como: NH_3 , H_2O e CO (VOGEL, 1981).

Os bidentados são as moléculas que tem dois átomos doadores e podem formar duas ligações coordenadas com o mesmo íon metálico. Exemplo de ligante bidentado é o etilenodiamina. NH_2 , CH_2 , CH_2 , NH_2 . Os ligantes multidentados contém mais de dois átomos coordenados por molécula (ex.: 1,2-diaminoetanotetraacético – EDTA), sendo um hexadentado.

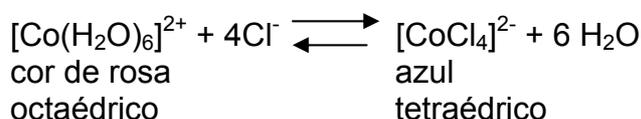
Os ligantes quelantes (bidentados e multidentados) foram complexos de maior estabilidade do que moléculas de um único grupo funcional (VOGEL, 1981).

Ao se considerar a estabilidade dos íons complexos em solução aquosa, não se faz referência à formação desses íons a partir de seus componentes, mas às reações de substituição, nas quais um certo número de moléculas ligantes deslocam um número igual ou maior de moléculas de água da primeira esfera de coordenação em volta do íon metálico (ORGEL, 1970).

A teoria do campo cristalino oferece uma explicação em que complexos formados por íons metálicos com orbitais d não saturados são coloridos. A diferença de energia entre os dois níveis de orbitais d leva em muitos casos a uma grandeza igual à energia de um fóton de luz na região do visível. Isto significa que elétrons d, em íons complexos, podem passar a um nível mais alto por absorção da energia da luz. Quando isto acontece com a luz branca são removidos alguns comprimentos de onda e a luz refletida da amostra é colorida (MASTERTON E SLOWINSKI, 1978).

Portanto a formação dos complexos de um íon metálico pode ser acompanhada através do espectro de absorção na região visível.

As soluções de sais de cobalto II solúveis, na ausência de ligantes fortes, contém o íon hexaquocobalto II, octaédrico, de cor rosa, $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Uma mudança da cor rosa para azul nítida ocorre quando se adiciona o ácido clorídrico concentrado a uma solução aquosa contendo íons $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Esta mudança da cor resulta quando as seis moléculas de água que circundam octaedricamente o íon Co^{2+} do íon $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, cuja cor é rosa, são substituídos por quatro íons Cl^- formando o ânion $[\text{CoCl}_4]^{2-}$ segundo a reação:



Este equilíbrio é deslocado para a direita pela a adição de Cl^- que faz decrescer a concentração efetiva das moléculas de água. O equilíbrio é deslocado para a esquerda pela adição de H_2O (QUAGLIANO e VALLARINO, 1985).

A existência destes dois complexos é constatada através do espectro de absorção no visível conforme a (Figura 7).

Recentemente tem sido citada na literatura a formação de complexos de metais de transição com carboidratos, que se ligam através das hidroxilas (KENNEDY e CABRAL, 1986).

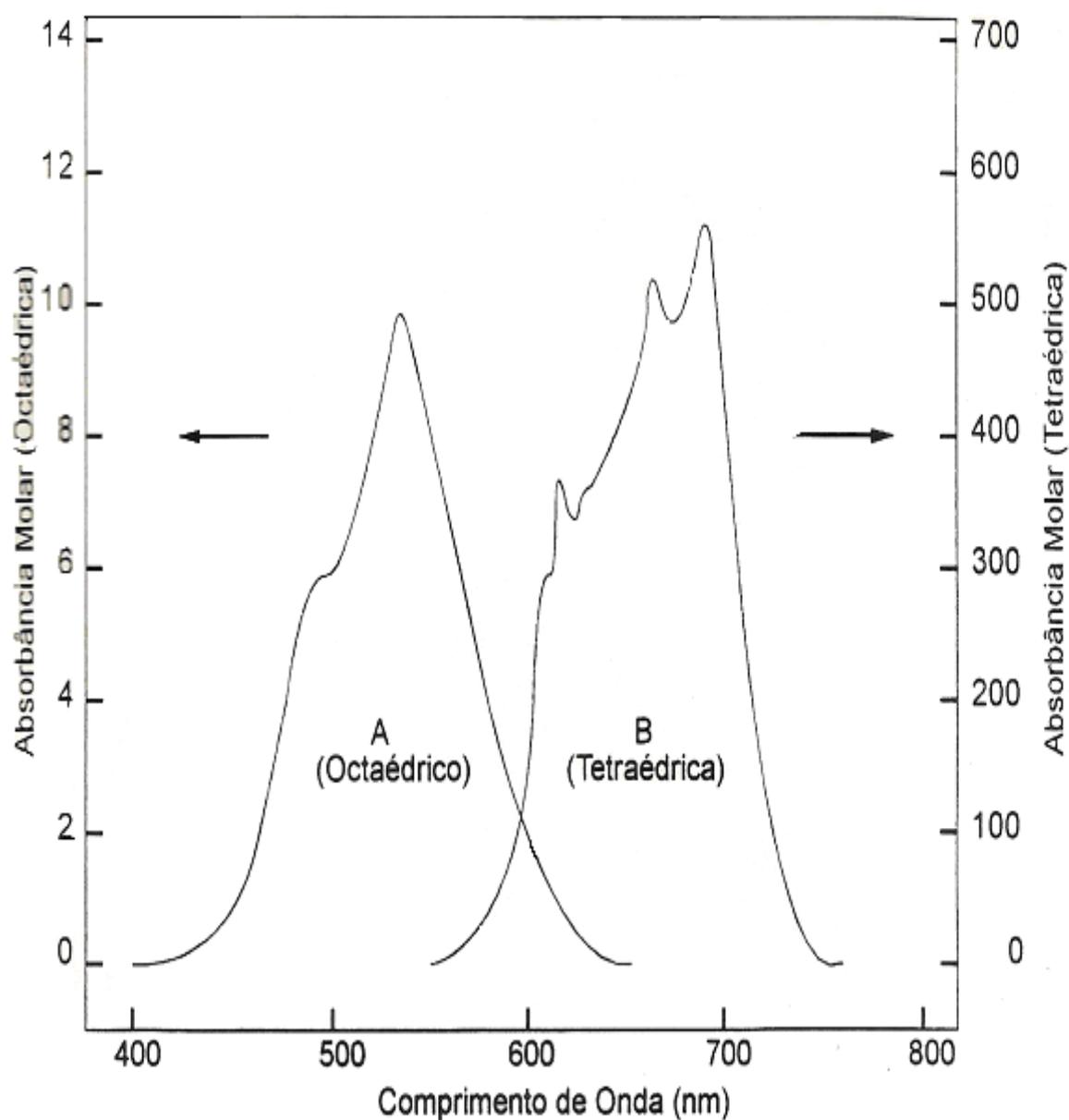


Figura 7: O espectro de absorção no visível de $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (CURVA A) e $[\text{CoCl}_4]^{2-}$ (CURVA B) (COTTON e ALBERT, 1988)

A escolha para esse sistema com o metal de transição cobalto complexando com glicose e/ou proteínas ou amido modificado foi devido a considerações sobre a fisiologia do rúmen:

- No rúmen não há produção de enzimas, sendo pois, a digestão e transformação bioquímica dos nutrientes realizados pelas enzimas produzidas pelos microorganismo, os quais variam de espécies e de quantidade, dependendo da natureza da alimentação (JOHNSON et al., 1956).

Portanto, o nosso sistema de liberação alternativo é compatível com a necessidade dos microrganismos presentes no rúmen, que vão utilizar os ligantes, e do animal que vai utilizar o cobalto para a composição da estrutura da vitamina B12 que está presente nos tecidos e participa de processos metabólicos.

Baseado nos aspectos anteriormente citados foram realizados estudos espectrofotométrico e cromatográfico comparativos entre um produto comercial (cobalto-dextrose-lactose) de estrutura desconhecida e um produto produzido em nosso laboratório, com a finalidade de se obter um quelato (cobalto-carboidrato-proteína) que tem aplicabilidade na alimentação animal.

Este projeto dá continuidade a pesquisa que vem sendo desenvolvida em conjunto pelo laboratório de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica da UFPE e a VALLÉE – S/A, que tem interesse comercial pelos derivados imobilizados obtidos.

1.5 Objetivos

- 1) Imobilização da suspensão de vírus “O₁ Campos” em amido e carbodiimida como sistemas de liberação controlada do antígeno no organismo animal;
- 2) Complexação do cobalto II com glicose e/ou lactose e/ou proteínas o amido modificado como sistema de liberação controlada deste metal para uso na alimentação animal.

2 MATERIAL

2.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes compostos: Cobalto-Dextrose-Lactose (CDL) e vacina antiaftosa cedidos pela VALLÉE S/A; acetato de etila, acetona, ácido clorídrico, ácido 3,5 dinitrosalicílico, ácido fosfórico, anilina, carbonato de cobalto, cloreto de cobalto, difenilamina, dioxano, glicose, hidróxido de sódio, lactose, 1 propanol, sílica gel-G, sulfato de cobalto, tartarato de sódio e potássio, tetraboridreto de sódio obtidos da E. Merck Darmstadt, R.F.A.; amido, albumina sérica bovina (BSA), etilenoglicol, metaperiodato de sódio obtido da Reagen, Rio de Janeiro, Brasil; α -amilase, dicitlohexilcarbodiimida obtidos da Sigma Chemical Company Ltda, St. Louis, USA; sephadex G-100 obtido da Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.

2.2 Aparelhos

Agitador magnético Arthur H. Thomas Co, Filadélfia, USA.

Balança analítica H15, E. Mettler, Zürich, Suíça.

Banho-maria Grant Instruments, Cambridge, Inglaterra.

Centrífuga IEC B-20^a, Damon.

Espectrofotômetro de absorção Cary 118, São Paulo, Brasil

Espectrofotômetro UV-Vis-634, Varian, São Paulo, Brasil

Espectrofotômetro de absorção Hitachi U-3200, Japão.

Liofilizador GT2 Leybold-heraeus, Alemanha.

Potenciômetro Digimed.

3 MÉTODOS

3.1 Ativação do suporte e imobilização do ligante

3.1.1 Ativação do suporte

Foram dissolvidos 100 mg de amido em 10 ml de água. Essa solução de amido a 1% (p/v) foi analisada espectrofotometricamente através de um espectro de absorção (350 – 180 nm). À solução de amido 1% (10 ml) foram adicionados 10 ml de metaperiodato de sódio 0,4 N a pH 4,5 e mantida sob agitação constante por 18 horas na ausência de luz a 4°C (KENNEDY e WHITE, 1983).

3.1.2 Imobilização da vacina antiaftosa em amido

O procedimento de imobilização utilizado neste trabalho seguiu o seguinte processo: à solução de amido 1% foi adicionado 10 ml de metaperiodato de sódio 0,4 N. A mistura foi mantida sob agitação constante por 18 horas na ausência de luz e a 4°C. Ao amido ativado foi adicionado 1,2 ml de etilenoglicol. Para retirar o etilenoglicol foi utilizado ácido clorídrico 0,1 N até o valor de pH 3,5, seguida de diálise por 24 horas com 4 trocas de água. O pH foi elevado com hidróxido de sódio 0,1 N para 7,5 e o acoplamento foi realizado com 4 ml de vacina antiaftosa concentrada 5 vezes durante 12 horas a 4°C. Após a reação de imobilização. O volume foi concentrado para 20 ml e adicionado 10 mg de tetraboridreto de sódio e agitado suavemente por 12 horas a 4°C. Posteriormente, o material resultante (amido-vacina-tetraboridreto de sódio) foi dialisado e logo depois reduzido o volume para 4 ml. Após a preparação de imobilização da vacina antiaftosa em amido foi aplicado 0,5 ml dessa amostra (material concentrado) em coluna de sephadex G-100 para análise espectrofotométrica.

As amostras para as provas de índice de soro proteção (ISP) foram:

- a) Vacina dialisada (94 ml), concentrada 5 vezes e em seguida imobilizada em amido;
- b) Vacina não dialisada (4 ml), concentrada 5 vezes e em seguida imobilizada em amido.

3.1.3 Preparação de ligações cruzadas entre as proteínas da vacina usando diciclohexilcarbodiimida

Foram adicionados 19 ml da vacina antiaftosa não dialisada em um Becker e o pH ajustado com ácido clorídrico 0,1 N para 4,7. À vacina foram incorporados 8 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC) dissolvidos em 1 ml de dioxano. A reação de ativação ocorreu sob suave agitação por 5 ou 30 minutos, mantido o pH rigorosamente em 4,7. Ao término da reação de ativação, o pH foi elevado para 8,0 com hidróxido de sódio 0,1 N e a imobilização realizada sob agitação constante por 12 horas a 4°C. A vacina imobilizada foi dialisada até eliminação da turbidez e então concentrada 5 vezes em liofilizador para ser armazenada e analisada espectrofotometricamente.

As amostras para as provas de índice de soro proteção (ISP) foram:

- a) Vacina não dialisada (19 ml);
- b) Vacina não dialisada (19 ml), com o pH ajustado para 4,7 com ácido clorídrico 0,1 N, adicionado 8 mg de DCC dissolvidos em 1 ml de dioxano. A reação de ativação foi mantida sob suave agitação por 30 minutos e o pH mantido rigorosamente em 4,7. O pH foi elevado para 8,0 com hidróxido de sódio 0,1 N e a imobilização realizada sob suave agitação por 12 horas a 4°C. A vacina imobilizada foi dialisada até a eliminação da turbidez e concentrada para 14 ml e adicionados 6 ml de hidróxido de alumínio.

3.2 Determinação dos complexos do cobalto II

Em virtude dos complexos de metais de transição absorver luz na região espectral do visível, optou-se pelo espectrofotômetro de absorção para identificar os possíveis complexos do cobalto II com glicose e lactose.

Foram feitos espectros de diversas preparações do cloreto de cobalto com glicose e lactose variando tanto a concentração dos monossacarídeos como o pH da preparação.

Preparação das amostras de cloreto de cobalto

- CoCl_2 (3 g) + H_2O (20 ml)
- CoCl_2 (3 g) + HCl 1M (20 ml)
- CoCl_2 (3 g) + HCl 5M (20 ml)
- CoCl_2 (3 g) + HCl 5M (20 ml) + lactose (4 g)
- CoCl_2 (3 g) + HCl 5M (20 ml) + glicose (4 g)
- CoCl_2 (3 g) + HCl 5M (20 ml) + glicose (2 g) + lactose (2 g)

Os espectros destas amostras foram obtidos após 24 horas diluindo as amostras 1:10. Com exceção do CoCl_2 em HCl 1M que não estava diluído.

- CoCl_2 (1,5 g) + HCl 1M (10 ml) + glicose (7,3 g)
- CoCl_2 (1,5 g) + HCl 0,1M (10 ml) + glicose (7,3 g)
- CoCl_2 (1,5 g) + HCl 0,01M (10 ml) + glicose (7,3 g)
- CoCl_2 (1,5 g) + HCl 0,001M (10 ml) + glicose (7,3 g)
- CoCl_2 (1,5 g) + H_2O (10 ml) + glicose (7,3 g)

Os espectros destas amostras foram obtidos após 24 horas não diluídas.

A partir de estudos espectrofotométricos do cloreto de cobalto II com glicose, foram feitas análises espectrofotométricas de preparações do cloreto de cobalto II com proteínas e amido ativado com metaperiodato de sódio variando as suas concentrações, mas mantendo o pH das preparações.

As amostras foram:

- CDL (1 g) + H_2O (20 ml) – o espectro foi obtido após 24 horas diluindo-se a amostra 1:10.
- Cloreto de cobalto 0,01 M + glicose ([glicose] / [cobalto]) (0; 1,0; 10,0; 50,0; 100,0; 160,00).
- Cloreto de cobalto II 0,01 M + glicose
[Glicose] / [cobalto I] (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 10,0; 30,0; 40,0)
- Cloreto de cobalto II 0,01 M + proteína
[proteína] / [cobalto I] (0,0; $1,3 \times 10^{-6}$; $5,4 \times 10^{-6}$; $1,3 \times 10^{-5}$)

- Cloreto de cobalto II 0,1 M + glicose + proteína
[Glicose] / [cobalto] (0,0; 0,2; 2,0) e [glicose] / [cobalto II]
+ [proteína] / [cobalto II] ($2,5 \times 10^{-2}$ e $6,8 \times 10^{-5}$)
- Cloreto de cobalto II 0,1 M + amido ativado com metaperiodato
[Amido] / [cobalto] (0,0; $1,3 \times 10^{-7}$).

Os espectros foram obtidos após 24 horas.

O produto comercial (cobalto – dextrose – lactose) foi dissolvido em água ou em ácido clorídico e analisado também em espectrofotômetro de absorção.

- ✓ Adicionou-se CDL (cobalto – dextrose – lactose) 1 g em 20 ml de água ou ácido clorídico 5M. os espectros foram obtidos após 24 horas, diluindo-se as amostras 1:10.
- ✓ O soro foi obtido por coagulação espontânea do leite “in natura” seguido de centrifugação e o espectro foi obtido após 24 horas diluindo-se a amostra em 1:10.

3.3 Análise espectrofotométrica da vacina antiaftosa livre e dialisada

A vacina antiaftosa contém na sua preparação o vermelho de fenol que interfere no espectro. Portanto, diálises foram efetuadas durante 24 horas com 3 trocas de água para remoção do vermelho de fenol. O espectro de absorção da vacina foi realizado nos comprimentos de ondas entre 200 e 350 nm.

3.4 Análise cromatográfica

3.4.1 Cromatografia em coluna

A vacina antiaftosa livre e imobilizada em amido foram concentradas 5 vezes e 0,5 ml foi aplicado em uma coluna cromatográfica empacotada com gel sephadex

G-100. A eluição das proteínas com diferentes massas moleculares foram acompanhadas espectrofotometricamente a 280 nm.

Preparação da coluna:

- Coluna sephadex G-100 (27 cm /1,5 cm) cuja taxa de fluxo foi de 0,3 ml por minuto. Foram pesadas 6,0 g de sephadex G-100, dissolvidos em 100 ml de tampão tris 0,1 M pH 8,0. Colocados em banho-maria fervente durante (4-5) horas, e logo depois empacotados na coluna.

3.4.2 Cromatografia em camada fina

Foram realizadas cromatografias em camada fina com placas de vidro (20x20 cm) recobertas com sílica gel G (0,25 mm). As placas foram ativadas em estufa a 100°C durante 30 minutos e esfriadas a 28°C, antes de serem usadas. Os padrões

(3-5) µl e as amostras (3-10) µl foram aplicadas com uma microseringa.

Padrões: (G) glicose, (G^I) galactose, (L) lactose, (Co) cloreto de cobalto

Amostras: (C) Cobalto – dextrose – lactose em água

(C⁺) Cobalto – dextrose – lactose em HCl 5M 10 ml)

(A^I) CoCO₃ (1,5 g) + glicose (9,14 g) + HCl 5M (10 ml)

(A^{II}) CoCO₃ (1,5 g) + glicose (4 g) + HCl 5M (10 ml)

(A^{III}) CoCO₃ (1,5 g) + glicose (7,3 g) + HCl 5M (10 ml)

Foram usados dois sistemas de solventes:

I – 1 – Propano – acetato de etila – água (30 : 50 : 20 v/v)

II – 1 – Propano – acetato de etila – água (60 : 20 : 20 v/v) (COLLINS, et al., 1971).

Foi usado revelador apropriado para carboidratos com a seguinte composição: Difenilamina a 2% em acetona (5 ml); ácido fosfórico concentrado (1 ml) e anilina a 2% em acetona (5 ml) (GHRBREGZABHER et al., 1976). Após o desenvolvimento das placas no sistema de solventes deixou-se secar a temperatura ambiente (28°C) e pulverizou-se as placas com revelador. Levando-se em seguida para a estufa a 100°C por 10 minutos. Os carboidratos foram visualizados como manchas azuis.

3.5 Determinação da hidrólise enzimática

Foram realizadas as hidrólises utilizando a enzima α -amilase sobre o amido livre e amido ligado a vacina para observar uma simulação de liberação de glicose e vacina a partir da degradação do amido e amido ligado a vacina respectivamente. Isto foi verificado através da dosagem da glicose pelo método de DNSA (BERNFELD, 1955).

3.5.1 Amido + α -amilase

Foram dissolvidos 100 mg de amido em 10 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,9. A essa solução foi adicionado 1 ml de α -amilase (1 mg/ml preparado em tampão fosfato 0,1 M pH 6,9) a 37° sem agitação. Foram retirados 100 μ l para tubos de ensaio contendo 1 ml de DNSA em tempos de 0, 30, 60, 90, 120 min. As leituras foram obtidas espectrofotometricamente a 570 nm.

3.5.2 Amido ativado com metaperiodato de sódio 0,4 N + vacina antiaftosa + α -amilase

O processo de imobilização da vacina antiaftosa em amido foi realizado nas condições descritas no item 3.1.2, substituindo a água por tampão fosfato 0,1 M pH 6,9 e o volume final foi reduzido em liofilizador para 10 ml.

No processo de hidrólise foram utilizados os 10 ml em um becker e adicionado 1 ml de α -amilase (1 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M pH 6,9) a 37°C sem agitação. Foram retirados 100 μ l para tubos de ensaio contendo 1 ml de DNSA em tempos de 0, 30, 60, 90, 120 min. As leituras foram obtidas espectrofotometricamente a 570 nm.

3.5.3 Amido ativado com volume modificado de metaperiodato de sódio 0,4 N + vacina antiaftosa + α -amilase

O processo de imobilização da vacina antiaftosa em amido ativado e a hidrólise do sistema amido + vacina foram realizados nas condições descritas no item 3.1.2, sendo que o volume utilizado do metaperiodato de sódio 0,4 N foi de 5 ml.

3.6 Dosagem de proteínas

para determinação de proteínas totais foram usados dois métodos: o de Lowry modificado e o de Warburg e Christian (VILLELA et al., 1973).

3.6.1 Método de Lowry modificado

Sol. I – Hidróxido de sódio 1 N

Sol. II – Carbonato de sódio 2% m/V

Sol. III – Tartarato de sódio e potássio 1% m/V

Contendo sulfato cúprico 0,5% m/V

Sol. IV – Ao reagente II (50 ml) adicionou-se o reagente III (1 ml). Este reagente deve ser preparado antes do uso.

Sol. V – Folin – ciocalteau (diluído 1:1)

Reagente de Folin – ciocalteau.

Tungstato de sódio- 2 H₂O 100 g

Molibdato de sódio- 2 H₂O 25 g

Para amostras de proteínas em solução (0,5 ml) foi adicionado o reagente I (0,5 ml) e agitado. Depois de 25 minutos a 25°C adicionou-se o reagente IV (5 ml), misturou-se e em seguida deixou-se em repouso por 10 minutos, a 25°C. adicionou-se então o reagente V (0,5 ml) e agitou-se. Depois de 30 minutos de repouso a 25°C, foi determinada a absorvância espectrofotométrica a 570 nm.

A curva de calibração foi preparada com BSA para as concentrações 0 – 25 – 50 – 75 – 100 – 125 µg.

3.6.2 Método de Warburg e Christian

A maioria das proteínas exibe absorção na luz ultravioleta em 280 nm, devido sobretudo à presença de triptófano e tirosina. Os ácidos nucleicos também apresentam forte absorção em 280 nm, mas inferior à absorção em 260 nm, ao passo que as proteínas absorvem contrariamente mais em 280 do que em 260.

Concentração de proteínas em mg/ml = $1,45 A_{280} - 0,74 A_{260}$.

3.7 Dosagem de glicose

Foi usado o método DNSA (BERNFELD, 1955) para determinação de glicose:

- Preparação do DNSA (ácido dinitrosalisílico)

I – Pesou-se 4 g de NaOH e dissolveu-se em 50 ml de água

II – Pesou-se 0,25 g de DNSA e dissolveu-se na solução anterior

III – pesou-se 75 g de tartarato de sódio e potássio e dissolveu-se em 150 ml de água.

IV – Misturou-se as duas soluções e diluiu-se com água para um volume de 250 ml.

V – Foi construída curva de calibração para verificar o teor de glicose nas amostras.

Partindo de padrões de glicose (1, 2, 3, 4, 5) mg/ml e destes retirou-se 100 µl para cada 1 ml de DNSA. Foi aquecido a 100°C por 10 minutos e feito leituras a 570 nm.

3.8 Determinação dos índices de soro proteção

Vírus:

Os componentes da vacina antiaftosa fornecida pela VALLÉE S/A são vírus “O₁ Campos”.

Vacinas:

A VALLÉE S/A preparou uma vacina monovalente, proveniente do cultivo de suspensão de células de rim de hamster (cepa BHK), os vírus foram inativados com BEI (etilenimina binária) e misturados em parte iguais.

O laboratório de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica da UFPE preparou outra vacina utilizando os mesmos vírus imobilizados em suportes orgânicos.

Animais:

No experimento se utilizaram bovinos de idade média 18 meses com peso médio de 360 kg.

Vacinação:

Se utilizou m total de 16 animais os quais foram inoculados com 5 ml de vacina por via intramuscular. Nestes experimentos foram utilizados:

- a) 3 bovinos inoculados com vacina dialisada e concentrada 5 vezes e imobilizada em amido;
- b) 3 bovinos inoculados com vacina não dialisada e concentrada 5 vezes e imobilizada em amido;
- c) 3 bovinos inoculados com vacina não dialisada + carbodiimida;
- d) 2 bovinos inoculados com vacina não dialisada + carbodiimida + hidróxido de alumínio;
- e) 5 bovinos foram vacinados com suspensão de vírus "O₁ Campos" + hidróxido de alumínio para serem usados como controle.

3.8.1 Prova de anticorpos

De todos os animais foram coletadas amostras de sangue com intervalos de um mês e os soros bovinos examinados através de prova de proteção realizados pela VALLÉE S/A.

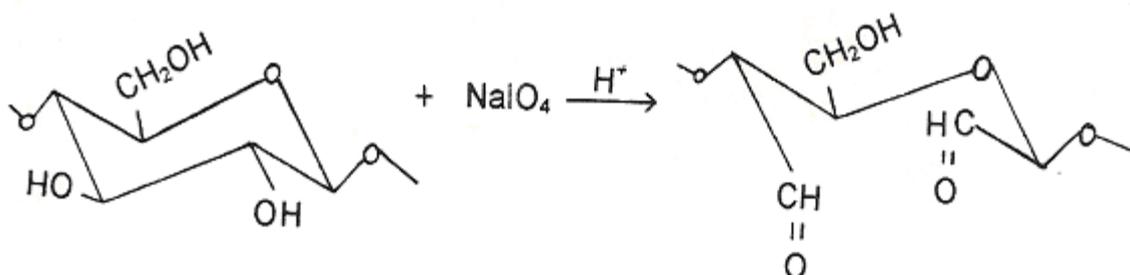
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Imobilização da vacina antiaftosa em amido

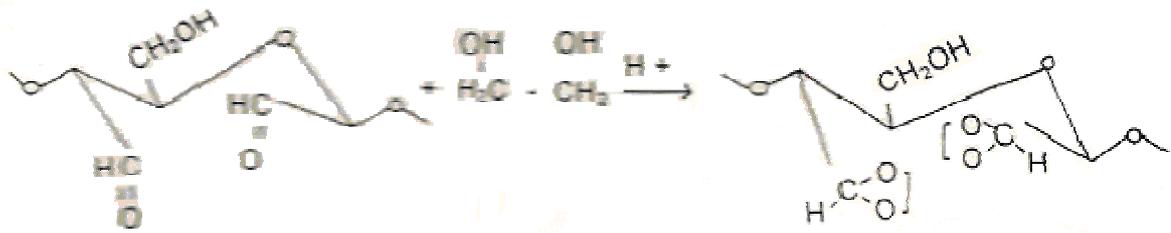
A suspensão do vírus "O₁ Campos" preparada pela VALLÉE S/A foi acoplada em amido por ligações covalentes, através da reação de oxidação com metaperiodato de sódio ou utilizando carbodiimida produzindo ligações cruzadas.

O amido solúvel, usado como suporte, foi ativado com metaperiodato de sódio 0,4 N, converteu grupamentos hidroxílicos ligados a átomos de carbonos adjacentes em grupos aldeídicos, pela ruptura das ligações carbono-carbono. Isto ocorreu em solução aquosa de pH entre 3-5 para evitar a oxidação não seletiva, a qual pode ocorrer em valores de pH mais altos (KENNEDY e WHITE, 1983).

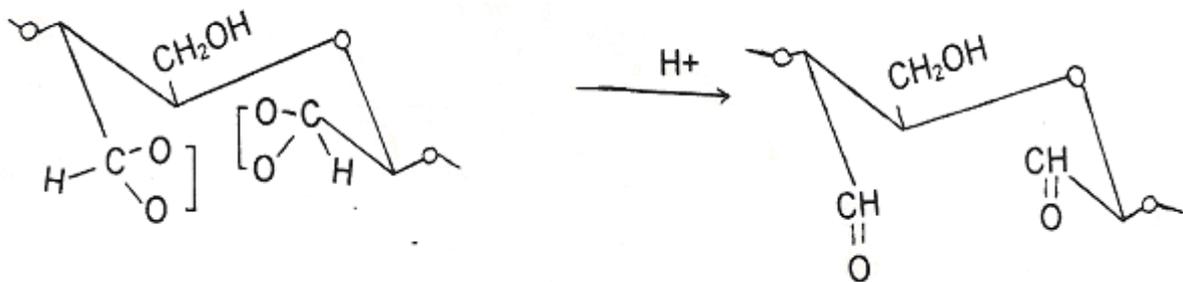
Ativação do suporte



Os dialdeídos formados após a oxidação com metaperiodato de sódio são instáveis em água (KENNEDY e WHITE, 1983), sendo portanto necessário proteger os grupamentos aldeídicos com etilenoglicol em pH em torno de 5,0.

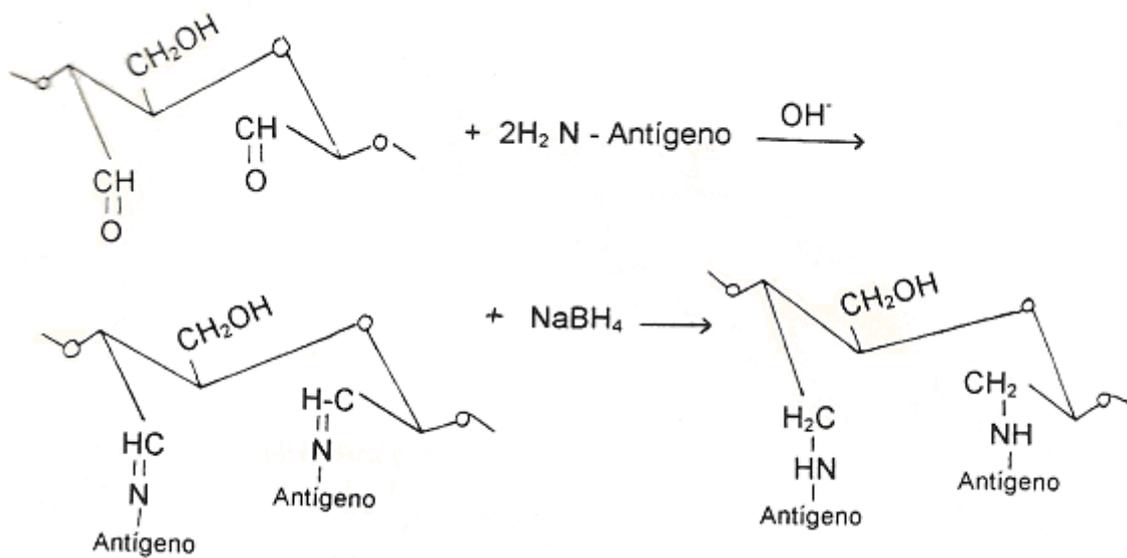


Os grupos protetores (etilenoglicol) foram retirados pela adição do ácido clorídrico 0,1 N até pH 3,5 seguido de diálise, que regenerou a carbonila (ALLINGER et. al., 1978).

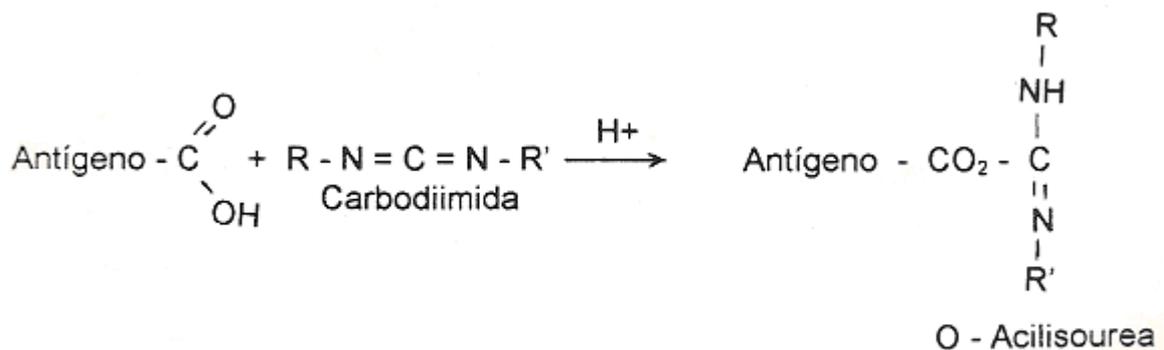


Imobilização covalente do antígeno

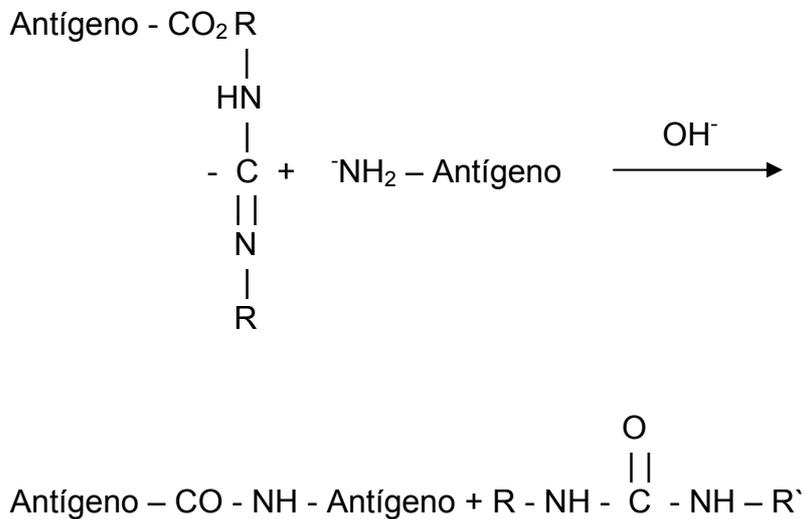
Os grupos aldeídos introduzidos no suporte reagem com grupos amínicos de aminoácidos nucleofílicos das proteínas do antígeno em pH levemente básico formando a base de SCHIFF (SNELL et al., 1970). A formação da base de SCHIFF é uma reação reversível a qual pode se tornar estável pela redução da forma imina ($-N=C$) para a forma amina ($-NH-C$) com tetraboridreto de sódio. O tetraboridreto de sódio estabiliza as ligações entre suporte – ligante e bloqueia um excesso de grupos ativados (EMNÉUS e GORTON, 1993).



A carbodiimida insolúvel em água (DCC) foi utilizada como carreador e agente condensante, ativando as carboxilas das proteínas do antígeno. As carbodiimidas reagem em pH levemente ácido para formar o derivado o-acilisourea (KENNEDY e WHITE, 1985).



A isourea inicialmente formada reage em pH levemente alcalino com aminas primárias das proteínas para formar a ligação amida, como indicado abaixo (JANOLINO e SWAISGOOD, 1982).



O produto comercial (vacina antiaftosa) foi dialisado por 24 horas com três trocas de água para retirar o vermelho de fenol presente na vacina.

O vermelho de fenol é usado como indicador de controle de pH durante o processo de produção da vacina e interfere no aparecimento do pico característico para proteínas (280 nm), quando da realização do espectro de absorção na faixa de comprimento de onda de 200 a 350 nm.

Na ausência do indicador de pH, foi determinado o espectro da vacina antiaftosa dialisada e verificado a presença do pico característico para proteínas em torno de 280 nm (Figura 8).

O amido solúvel, polímero de D-Glicose, que causa reações colaterais quando injetado no organismo, foi usado como suporte para a imobilização da vacina antiaftosa.

O espectro de absorção do amido (Figura 9) mostra que a absorção máxima ocorreu em 215 nm, não apresentando nenhuma absorção no comprimento de onda de 280 nm, região de absorção da vacina. Isto permite que a vacina imobilizada possa ser

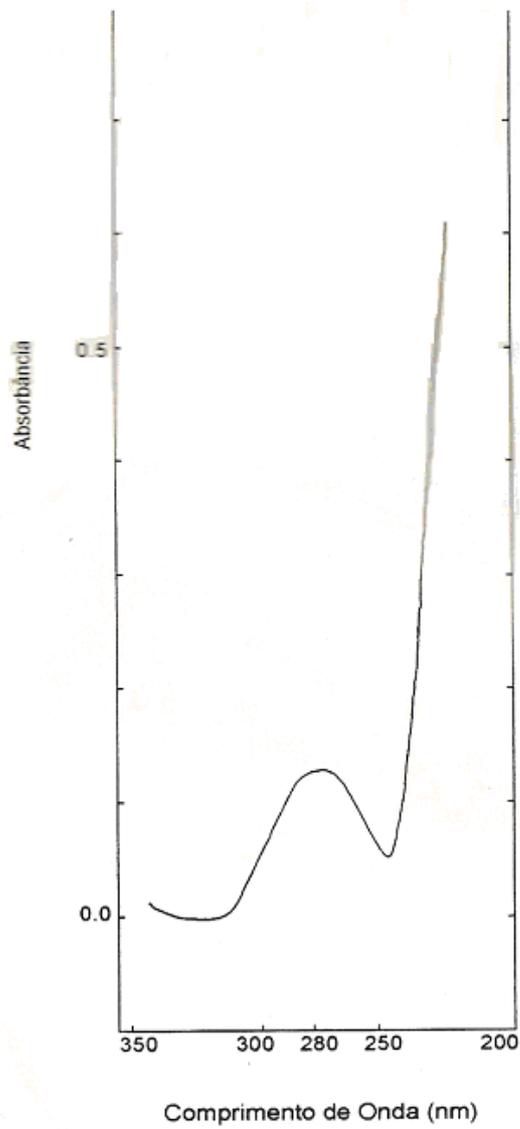


Figura 8: Espectro de Absorção da Vacina Antiatfosa Dialisada.
Amostra :
0,9 ml de tampão Tris 0,1 M pH 8,0
0,1 ml de vacina (1,5 mg prot. /ml)

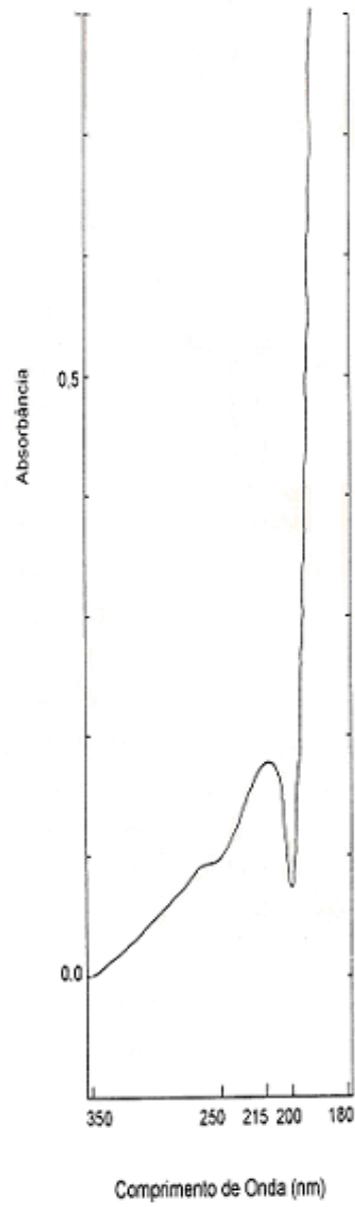


Figura 9: Espectro de Absorção do Amido Solúvel
Amostra: 2,5 ml tampão Tris 0,1M pH 8,0
0,5 ml de amido 1%

analisada espectrofotometricamente em 280 nm.

A partir da realização dos espectros de absorção foi possível realizar os ensaios cromatográficos em coluna sephadex G-100 permitindo-se verificar a imobilização das proteínas do vírus “O₁ Campos” ao suporte através do aumento dos picos de absorção a 280 nm e diminuição do volume de eluição.

4.2 Análise cromatográfica e espectrofotométrica da vacina livre e imobilizada

A cromatografia em gel Sephadex empacotado em coluna separa as moléculas por massa molecular. Neste procedimento cromatográfico as moléculas protéicas de baixa massa molecular são eluídas no “Bed Volume”, ou seja, retardadas no seu caminho, enquanto que as moléculas protéicas de elevada massa molecular são eluídas no “Void Volume” conseqüentemente saindo mais rapidamente.

A escolha do gel sephadex G-100 em relação ao G-200 foi possível utilizando-se a vacina dialisada (suspensão de vírus “O₁ Campos”) após a verificação de vários parâmetros (volume aplicado, velocidade de eluição) para determinar a concentração de proteínas a ser utilizada (7,5 mg/ml). A opção pela coluna de gel sephadex G-100 foi devido a mesma apresentar uma melhor resolução gráfica.

Baseado nestas propriedades citadas anteriormente, foram realizados estudos cromatográficos em coluna contendo sephadex G-100 com subsequente análise espectrofotométrica da vacina antiaftosa livre e imobilizada.

A Figura 10 mostra o perfil de eluição das proteínas constituintes da vacina antiaftosa em gel sephadex G-100. Este cromatograma apresenta quatro picos, cujos volumes de eluição foram 11,2; 22,5; 26,2 e 33 ml.

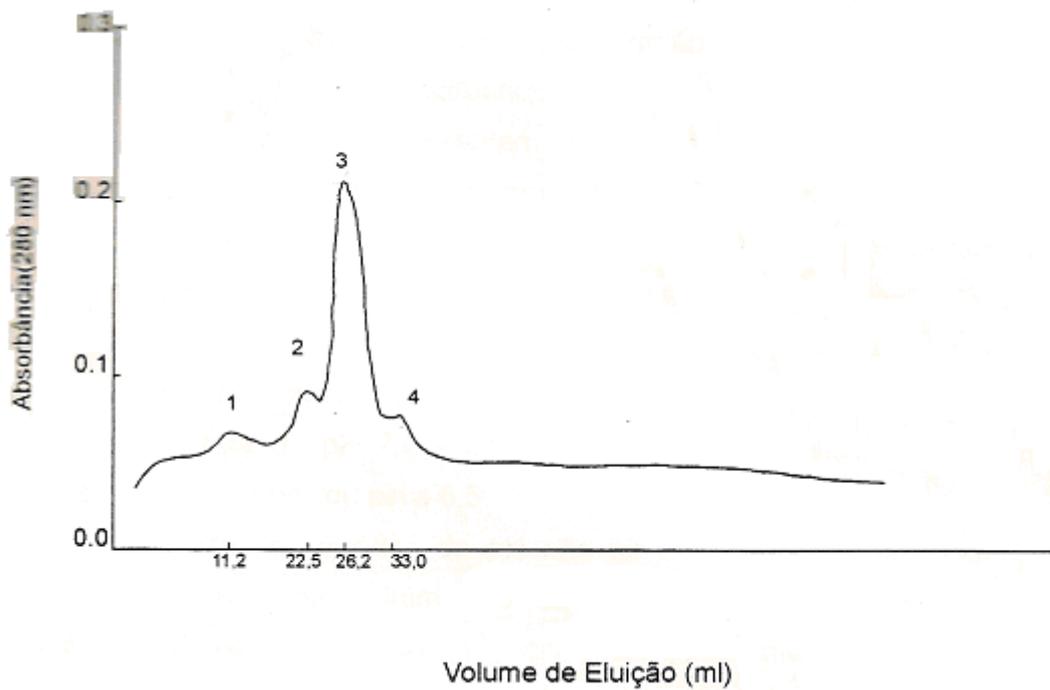


Figura 10: Cromatograma seguido de espectrofotometria da vacina antiaftosa dialisada concentrada 5 vezes (280 nm). A vacina antiaftosa contém 7,5mg proteína/ml em tampão tris 0,1M pH 8,0 foi aplicada na coluna sephadex G - 100
Volume aplicado na coluna 0,5ml
Velocidade do fluxo = 0,3 ml/min.

O pico 1 representa as proteínas da vacina de maior massa molecular, por ter apresentado o menor volume de eluição. Apresentou também o menor valor de absorvância, caracterizando a menor concentração.

Os picos 2 e 3 representam as proteínas da vacina de massa molecular intermediária entre as proteínas dos picos 1 e 4. Sendo que o pico 3 de volume de eluição 26,2 ml, representa a maior concentração de proteínas da vacina, devido apresentar o maior valor de absorvância.

O quarto pico representa as proteínas da vacina de menor massa molecular, por ter apresentado o maior volume de eluição.

O vírus "O₁ Campos" é um subtipo de vírus causador da febre aftosa. O mesmo pode ser alterado a pH menor que 7,0 e através de elevação de temperatura (La TORRE, 1992).

O aparecimento dos 4 picos da Figura 10 pode estar relacionado a mudança na faixa de pH 7,5 – 8,0. Após a diálise da suspensão de vírus "O₁ Campos" o pH final baixou para 6,5.

Devido a queda do pH não ter sido brusca é provável que tenha ocorrido uma alteração mínima no capsídeo de alguns vírus. Isto pode ser confirmado através da Figura 10, onde os picos menores correspondem as proteínas liberadas do capsídeo de alguns vírus e o pico 3 seria um provável aglomerado de vírus "O₁ Campos".

A alteração mínima no capsídeo de vírus "O₁ Campos" acarretou mudanças na atividade antigênica desse vírus como verificado a partir dos estudos dos índices de soro proteção (ISP). E a etapa de diálise que causou modificações no vírus "O₁ Campos" é necessária pois serviu para remover excesso de determinados componentes, como também retirar a coloração da vacina que interfere na análise espectrofotométrica da mesma.

O processo de imobilização de proteínas em um suporte pode ser influenciado por fatores como: concentração do suporte, concentração de proteínas, tempo de ativação do suporte, concentração do ativante, temperatura e pH de acoplamento (KENNEDY e WHITE, 1985).

Matrizes polissacarídicas podem ser ativadas pela oxidação de grupos diol em carbonos adjacentes para formar aldeídos. Os dialdeídos reagem com grupos amínicos primários do ligante para formar a base de Schiff. As bases de Schiff são relativamente instáveis, especialmente em pH baixo. Contudo, podem ser

estabilizadas pela redução com tetraboridreto de sódio para produzir um derivado estável.

Para realizar a imobilização foram necessárias modificações no suporte, reagente de ativação e ligante (proteínas dos vírus “O₁ Campos”).

Durante a imobilização a temperatura foi mantida a 4°C para não alterar a vacina antiaftosa. Após a imobilização foi realizado o processo de diálise para retirar componentes em excesso. A diálise proporcionou uma queda no pH para 6,5. Isto sugere uma provável alteração na estrutura do vírus “O₁ Campos” imobilizado no amido. Esta alteração pode influenciar no comportamento antigênico do vírus. A vacina antiaftosa imobilizada em amido ativado com periodato de sódio foi adicionada na mesma coluna empacotada com sephadex G-100 e analisada espectrofotometricamente a 280 nm (Figura 11).

Esta figura apresenta 5 picos eluídos nos volumes 7,0; 8,7; 10,0; 16,2 e 27,5 ml. Os cinco picos da Figura 11 são diferentes, em valores absolutos de absorbância e volumes de eluição, aos da Figura 10.

Os picos 1, de maior valor de absorbância, 2 e 3 da Figura tiveram volumes de eluição menores que o do pico 1 da Figura 10. Isto mostra que houve considerável imobilização das proteínas da vacina sobre o amido, devido ao aparecimento desses 3 picos (Figura 11) e a diminuição do pico 3 (Figura 10), que corresponde ao pico 5 na Figura 11.

Portanto o aparecimento desses picos com volumes de eluição menores (Figura 11) caracteriza a presença do imobilizado vacina-amido.

Os métodos mais utilizados para ativação de carreadores contendo grupos carboxilas envolvem o uso de carbodiimidas formadas por $R-N=C=N-R'$, onde R e R' podem ser alifático ou aromático.

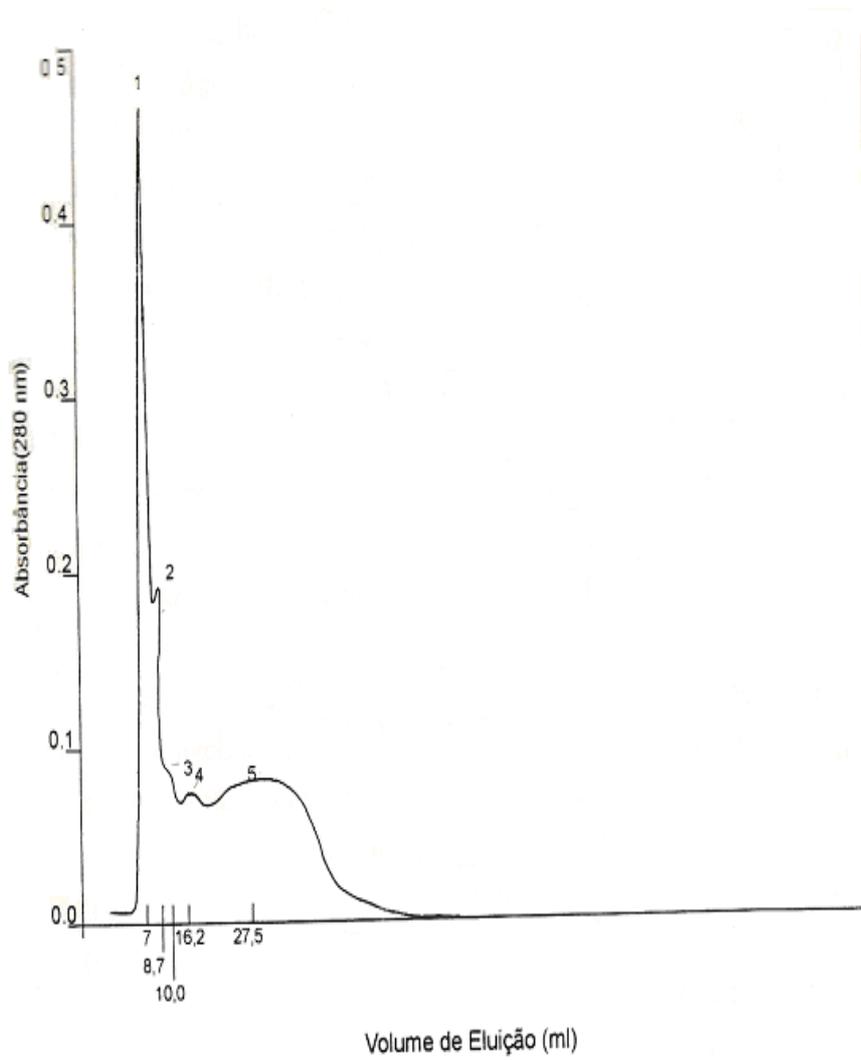


Figura 11: Cromatograma seguido de espectrofotometria da vacina antiaftosa dialisada e concentrada 5 vezes imobilizada em amido ativado (280 nm).
 A vacina antiaftosa contém 7,5mg proteína/ml de tampão tris 0,1M pH 8,0
 Coluna sephadex G - 100
 Volume aplicado na coluna 0,5ml
 Velocidade de fluxo = 0,3 ml/min.

Carbodiimidias tem sido usadas para ativação de polissacarídeos (BEDDOWS et al., 1981 e DOMINGUES et al., 1988) e proteínas (PERFETTI et al., 1976) contendo grupos carboxilas.

O processo de formação da ligação amida entre compostos contendo grupos carboxilas e amínicos com participação de carbodiimidias, ocorre da seguinte maneira:

A modificação do grupo carboxílico do carreador ocorre pela reação com carbodiimida, formando o O-Acilsourea. Então, a reação de O-Acilsourea com grupos amínicos primários formará a ligação amida.

As ligações cruzadas entre as proteínas da suspensão do vírus "O₁ Campos" promovida pela carbodiimida insolúvel em água, foram realizadas de acordo com Hearn et al., 1979 e Hearn, 1987.

Durante a reação para formação da ligação cruzada entre as proteínas constituintes do capsídeo da vacina e temperatura foi mantida a 4°C para não alterar a atividade da vacina antiaftosa.

A turbidez ocasionada pela adição da água a carbodiimida solubilizada em dioxano foi eliminada através de diálise.

A diálise provocou uma queda no pH para próximo de 6,5. Podendo esta alteração modificar a estrutura do vírus "O₁ Campos" imobilizado através de ligações cruzadas.

A ligação cruzada entre as proteínas da vacina antiaftosa foi verificada através de estudo cromatográfico e espectrofotométrico a 280 nm. Foram feitos estudos da vacina antiaftosa + carbodiimida com tempo de reação de 5 e 30 minutos.

A Figura 12 apresentou 5 picos com os seguintes volumes de eluição 7,0; 13,0; 16,0; 22,0 e 33,0 ml.

Esta figura comparada com a Figura 10, da vacina livre, mostrou que a maioria das proteínas da vacina eluíram em volumes abaixo de 26,2 ml, que corresponde ao terceiro pico da Figura 10. isto caracterizou a formação de aglomerados protéicos com massa moleculares maiores que aqueles da Figura 10.

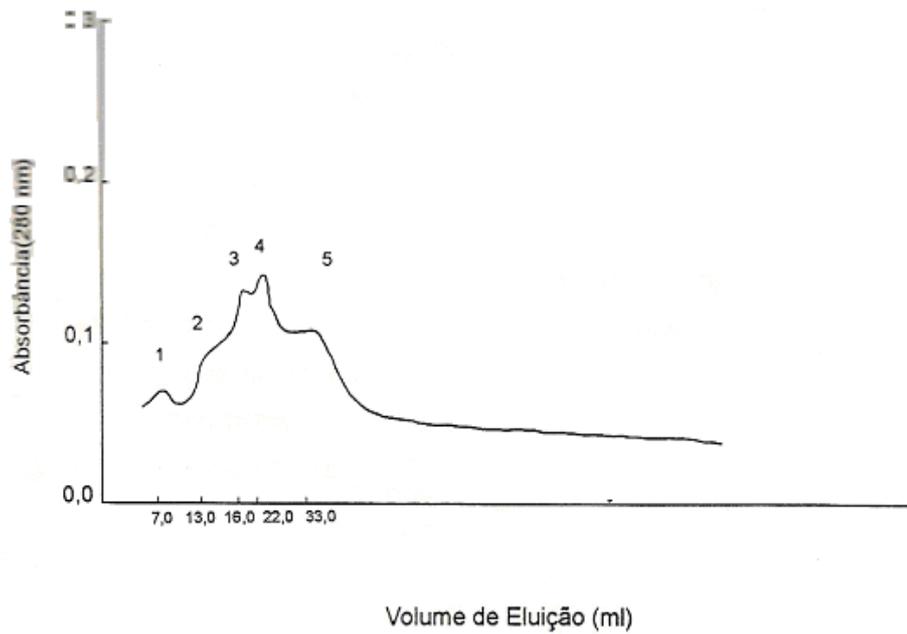


Figura 12: Cromatograma seguido de espectrofotometria da vacina antiaftosa dialisada concentrada 5 vezes + carbodiimida (280 nm).
(Tempo de ativação 5 min.)
A vacina antiaftosa contém 7,125mg proteína/ml de tampão tris 0,1M pH 8,0
Coluna sephadex G - 100
Volume aplicado na coluna 0,5ml
Velocidade de fluxo = 0,3 ml/min.

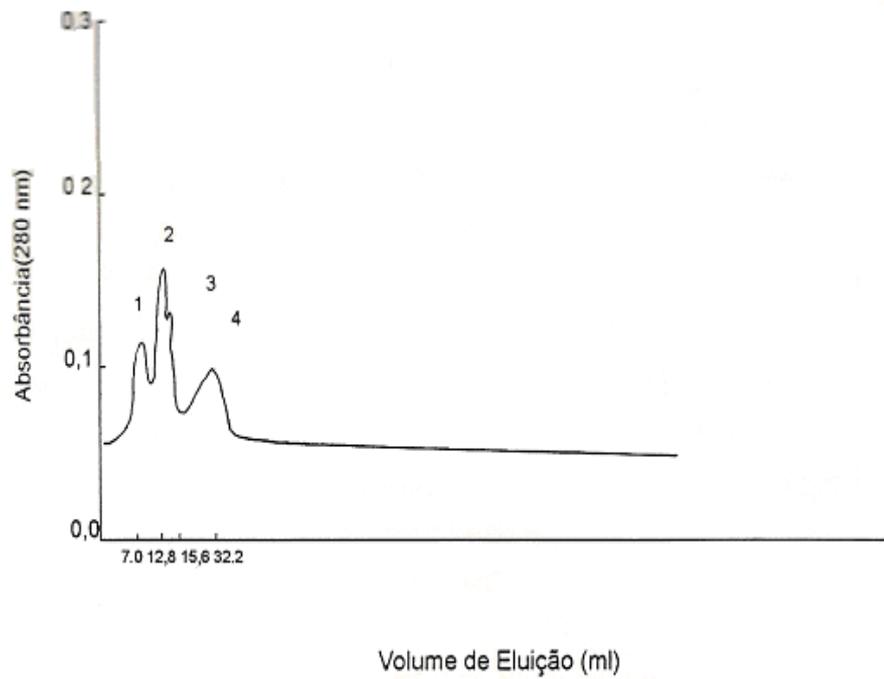


Figura 13: Cromatograma seguido de espectrofotometria da vacina antiaftosa dialisada concentrada 5 vezes + carbodiimida (280 nm).
(Tempo de ativação 30 min).
A vacina antiaftosa contém 7,125mg proteína/ml de tampão tris 0,1M pH 8,0
Coluna sephadex G - 100
Volume aplicado na coluna 0,5ml
Velocidade de fluxo = 0,3 ml/min.

Nos experimentos de hidrólise enzimática foram realizadas hidrólises do amido livre e amido ligado a vacina utilizando a α -amilase. Esta permite simular a liberação de glicose e vacina a partir da degradação do amido no organismo animal.

As tabelas 1, 2, 3 e a Figura 14 apresentaram a hidrólise do amido (—), do amido ativado em 10 ml de metaperiodato de sódio 0,4 N com a vacina imobilizada (...) e do amido ativado por processo modificado em 5 ml de metaperiodato de sódio 0,4 N com a vacina imobilizada (---).

A hidrólise do amido livre foi usada como controle. O estudo da hidrólise do amido e do amido-antígeno, foi realizado sob as mesmas condições.

A degradação enzimática do amido a monossacarídeos ocorre em animais pela ação da α -amilase (EC 3.2.1.1 α - 1,4 Glucan – 4 Glucanohidrolases) que faz a clivagem interna das ligações α - 1,4 glicosídicas na molécula do amido. O hidrolisado foi analisado pelo método do ácido 3,5 – dinitrosalisílico para medir o conteúdo de açúcar redutor (BERNFELD, 1955).

A Figura 14 mostra a hidrólise do amido durante 30 minutos e em seguida atingindo a velocidade máxima de reação (saturação da enzima). A hidrólise do amido – antígeno no intervalo de 0 – 120 minutos foi linear, crescente e com concentrações de glicose bem inferior ao hidrolisado do amido livre.

Comparando as curvas de hidrólise enzimática sobre o amido – vacina, sendo o amido ativado com metaperiodato de sódio 0,4 N (5 e 10 ml, respectivamente) pode-se observar que houve um ligeiro aumento na hidrólise do amido ativado com 5 ml de metaperiodato de sódio do que com o amido ativado com 10 ml. Isto sugere que a diminuição do volume do metaperiodato de sódio diminuiu a formação de grupamentos aldeídicos, os quais realizam as ligações com as proteínas da vacina antiaftosa. Todavia, as duas retas apresentaram linearidades muito semelhantes, o que parece também ser viável e mais econômico o uso de 5 ml de metaperiodato de sódio. A presença das proteínas ligadas ao amido nestas preparações parece ser a razão da diminuição da concentração de oligossacarídeos produzidos depois da degradação enzimática.

Tabela 1
Estudo espectrofotométrico hidrólise enzimática

1 – Amido 1% + α -amilase (1 mg/ml)
 Condições: pH 6,9
 Temperatura 37°C
 Sem agitação
 Enzima - α -amilase (1 mg/ml)

Tempo minuto	ABS	ABS	Média
0	138	215	176
30	645	585	615
60	620	640	630
90	630	635	632
120	620	645	632

Tabela 2
Estudo espectrofotométrico hidrólise enzimática

2 – Amido 1% ativado com NaIO₄ 0,4 N + vacina antiaftosa + α -amilase (1 mg/ml)
 As mesmas condições da tabela 1

Tempo minuto	ABS	ABS	Média
0	25	21	23
30	62	58	60
60	110	125	117
90	170	190	180
120	225	205	215

Tabela 3
Estudo espectrofotométrico hidrólise enzimática

1 – Amido 1% ativado com NaIO_4 0,4 N + vacina antiáftosa + α -amilase (1 mg/ml)
As mesmas condições da tabela 1

Tempo minuto	ABS	ABS	Média
0	50	45	47
30	95	98	96
60	185	190	187
90	170	198	201
120	210	240	225

Obs.: Houve modificação na metodologia: foi usado 5 ml de NaIO_4 .

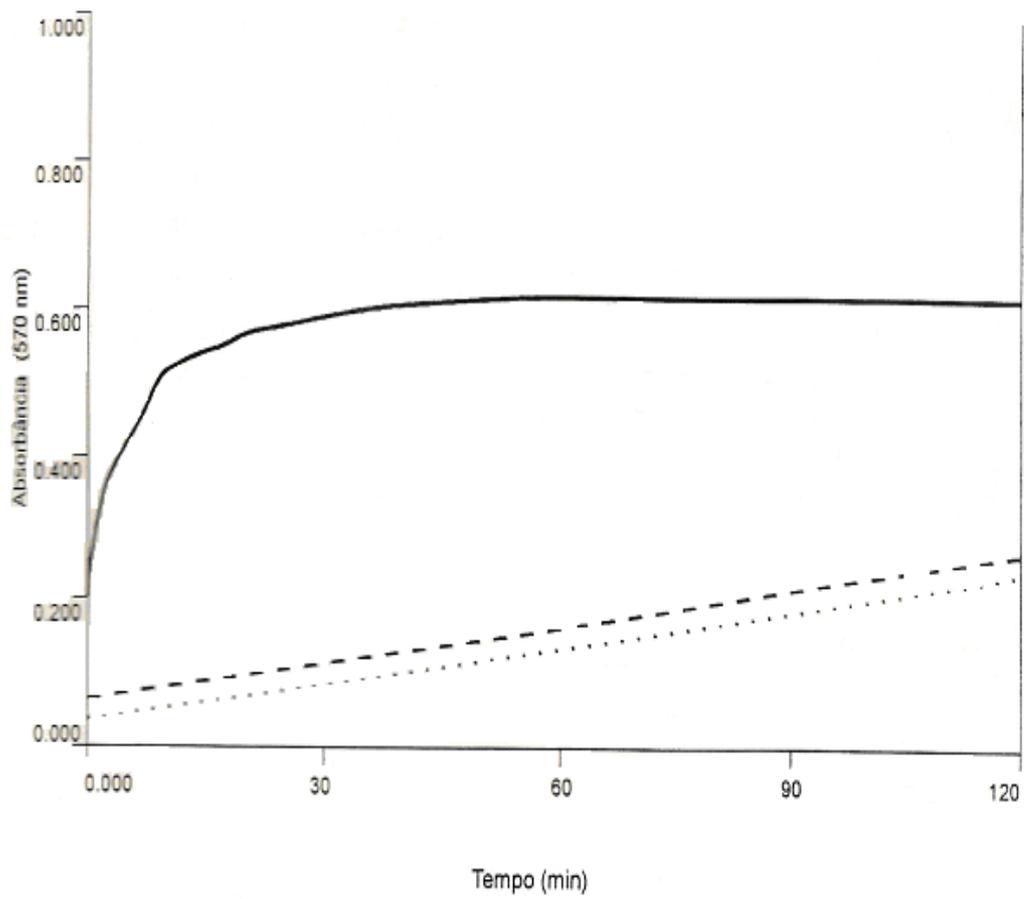


Figura 14: Hidrólise Enzimática do Amido na Forma Livre (—); Ativado e com a Vacina Imobilizada (.....); ativado por processo modificado e com Vacina Imobilizada (---).

Portanto, a degradação enzimática mais efetiva e esperada foi a do amido livre pela α -amilase, pelo fato de não haver moléculas ligadas ao substrato causando impedimento estérico.

A degradação enzimática pela α -amilase foi maior para o amido do que para o amido – antígeno. Isto ocorreu provavelmente por impedimento estérico causado pelas proteínas do antígeno que se ligam covalentemente ao suporte. As proteínas ligadas ao suporte dificultam o acesso da enzima as ligações 1,4 glicosídicas e conseqüentemente a sua hidrólise. Isto é verificado pela diminuição da concentração de glicose liberada.

4.4 Resultados dos testes de índice de soro proteção

Segundo Cunha (1957) o resultado da prova de soro proteção proporciona uma informação mais adequada com relação a imunidade dos animais.

Uma correlação entre o índice de proteção e a resistência dos animais vacinados com suspensão de vírus aftosa (o, A e C) e a infecção pode ser estabelecida nos limites de certos valores. Quando o índice de soro proteção for $\geq 2,0$ o animal mostrou-se resistente, sendo o índice $\leq 1,0$ o animal apresentou-se susceptível à infecção (AUGÉ DE MELO et al., 1978).

O valor mínimo de ISP que confere imunidade aos animais inoculados com suspensão de vírus “O₁ Campos” é em torno de 0,5.

Segundo Skelly (1989) e Faust (1994) a liberação controlada de uma droga ocorre quando a concentração da droga no plasma se mantém praticamente constante, isto é, com poucas variações na concentração fora da faixa terapêutica da droga em intervalos de tempos previstos (Figura 15).

As médias dos índices de soro proteção em bovinos inoculados com suspensão de vírus “O₁ Campos” adsorvidos em hidróxido de alumínio e suspensões de vírus “O₁ Campos” imobilizados em amido ativado com NaIO₄ 0,4 N (amostras IA e IB) foram mostradas na tabela 4 e Figura 16.

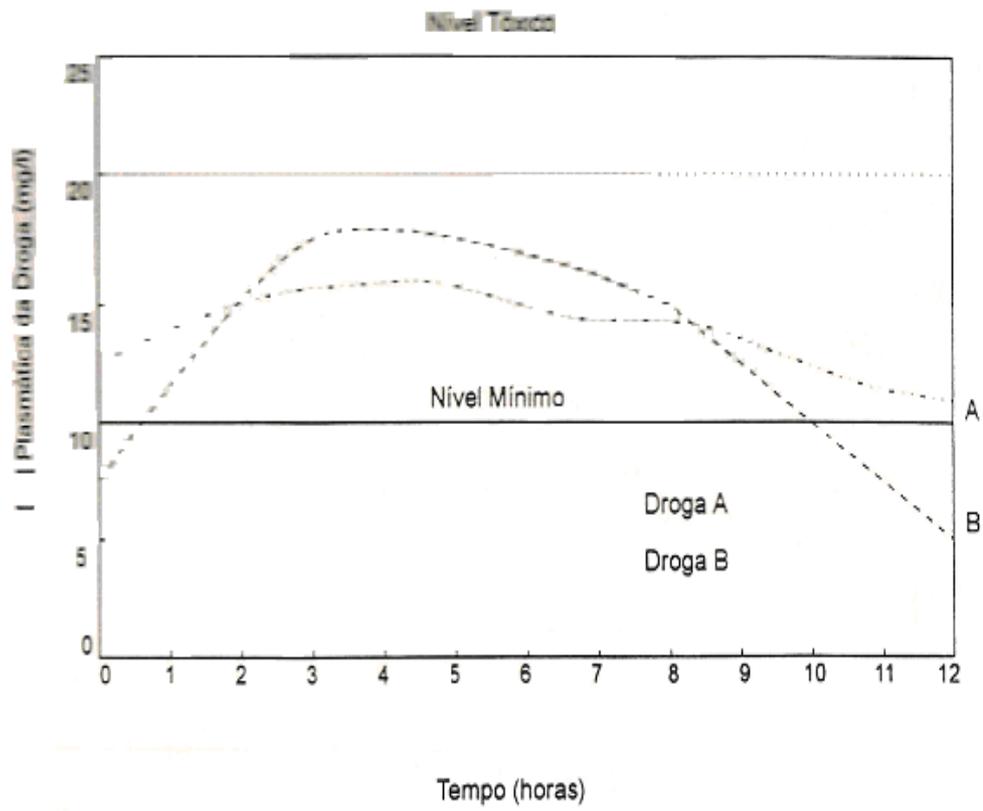


Figura 15 : Liberação Controlada de Drogas

TABELA 4**Resultados dos índices de soro proteção**

Sangria: 0 (zero) D.P.V., 30 D.P.V, 60 D. P.V, 90 D. P. V.

Vírus: "O₁ Campos"
Local: VALLÊE UDILD – Leitura Direta
X – Média Aritmética

Tratamento	Número Bovino	Zero dia		30 dias		60 dias		90 dias	
		LD	X	LD	X	LD	X	LD	X
I _A	203	0,0		1,0		0,2		0,46	
	215	0,4	0,30	2,4	1,4660	0,2	0,3	0,46	0,56
	232	0,5		1,0		0,5		1,76	
I _B	246	0,5		1,0		0,5		0,45	
	275	0,5	0,5	0,4	0,5333	1,3	0,736	1,20	
	280	0,5		0,2		0,5		0,53	
II _A	241	0,3		1,5		0,5		1,0	
	244	1,0	0,53	0,5	0,6666	0,3	0,344	0,42	0,624
	278	0,3		0,0		0,3		0,46	
II _B	277	0,0		0,2		0,5		1,50	
	283	0,7	0,35	0,0	0,1000	0,0	0,25	0,716	1,108
Controle	229	0,7		1,5		0,0		0,80	
	231	0,2		1,5		0,5		0,70	
	242	0,3	0,44	0,5	1,32	0,5	1,06	0,50	0,608
	274	0,7		2,7		3,3		0,44	
	284	0,3		0,4		1,0		0,60	

I_A - Vacina dialisada e concentrada 5 vezes imobilizada em amido ativado.I_B – Vacina não dialisada e concentrada 5 vezes imobilizada em amido ativado.II_A – Vacina não dialisada + carbodiimida.II_B – Vacina não dialisada + carbodiimida.+ hidróxido de alumínio.

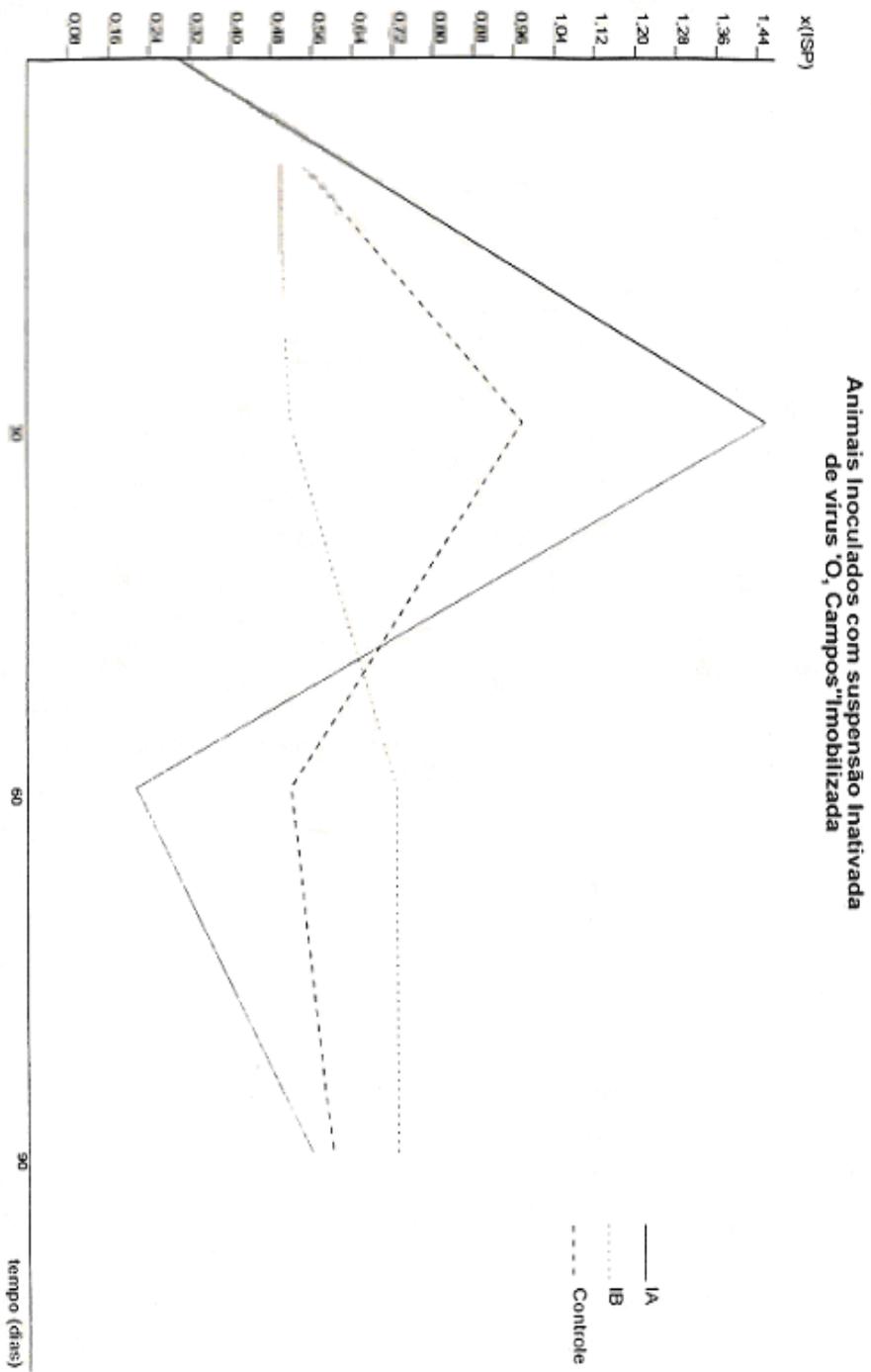


Figura 16. Duração da imunidade da Vacina Antifélsa Imobilizada em Amido Ativado
 Medir dos índices de soro proteção em bovinos inoculados com suspensão inativada de vírus "O₁ Campos" em hidróxido de alumínio - suspensão e soropreito inativada de vírus "O₁ Campos" imobilizada em amido ativado com NaIO₄ 0,4 N:
 I₁ - Vacina diluída e concentrada 5 vezes (4ml) I₂ - Vacina não diluída e concentrada 5 vezes (4ml)

As amostras IA e IB, em que vírus “O₁ Campos” foram imobilizados no amido, diferem entre si apenas pela diálise promovida na amostra IA. Observou-se na Figura 16 comportamentos diferentes. A amostra IA atingiu seu pico máximo aos 30 dias, chegando a valores de ISP abaixo de 0,5, valor mínimo de soro proteção. A amostra IB, ao contrário manteve nos primeiros 30 dias valores abaixo do mínimo necessário a imunoproteção, elevando-se entre 30 e 60 dias e mantendo-se constante do 60 aos 90 dias. A diferença no comportamento entre as amostras IA e IB parece estar relacionada com a diálise, visto que houve uma queda no pH de 8,0 para 6,5 após o processo de diálise. Na Figura 16 observou-se diferença de comportamento entre a amostra IB e o controle. O controle atingiu seu pico máximo aos 30 dias, chegando a valores mínimos de ISP aos 60 dias. A amostra em IB comentada anteriormente, apresentou crescimento gradual e contínuo de índice de soro proteção. Esta diferença de comportamento é devido as formulações diferentes. No controle os vírus “O₁ Campos” foram adsorvidos em Al (OH)₃, enquanto que na amostra IB, os vírus foram imobilizados em amido.

As médias dos índices de soro proteção em bovinos inoculados com suspensão de vírus “O₁ Campos” adsorvidos em hidróxido de alumínio (controle) e suspensões de vírus “O₁ Campos” + dicitohexilcarbodiimida (amostras IIA e IIB) mostradas na tabela 4 e Figura 17.

Na Figura 17, observou-se diferença do comportamento entre as amostras IIA e IIB.

A amostra IIB atingiu valores abaixo de 0,5 no intervalo de tempo de 0 a 60 dias, chegando a valores acima de 0,5 a partir dos 60 dias.

A amostra IIA atingiu seu pico máximo aos 30 dias e aos 60 dias chega a valores abaixo do mínimo que oferece imunoproteção.

A diferença de comportamento entre as amostras IIA e IIB está relacionada com suas formulações. A amostra IIA é constituída de suspensão de vírus “O₁ Campos” + carbodiimida, enquanto a amostra IIB é formada por suspensão de vírus “O₁ Campos” + carbodiimida + Al (OH)₃.

Animais Inoculados com suspensão Inativada de vírus O_1 Campos¹ Imobilizada

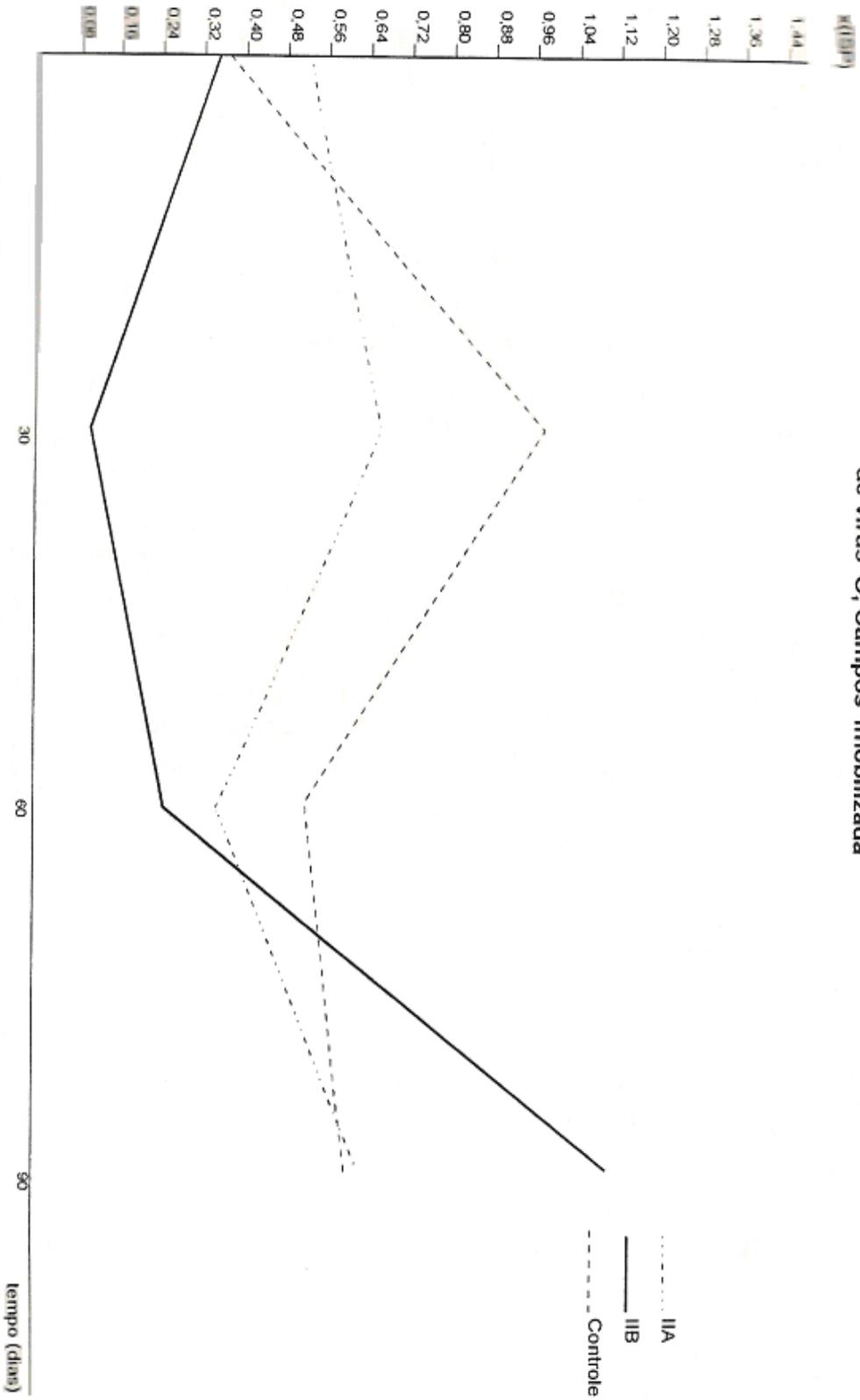


Figura 17 Duração da imunidade da Vacina Antiféfica Imobilizada por Ligações Cruzadas

Medida dos índices de soro proteção em bovinos inoculados com suspensão inativada de vírus "O₁ Campos" em hidróxido de alumínio - suspensão e suspensão inativada de vírus "O₁ Campos" + carboidrinda tempo de reação 30 minutos.

II_a - Vacina não diluída + carboidrinda - II_b - Vacina não diluída + carboidrinda + Al(OH)₃.

Portanto a ligação cruzada realizada nas amostras IIA e IIB não possibilitou uma liberação adequada do antígeno e o acréscimo do Al (OH)₃ a formulação da amostra IIB dificultou ainda mais a liberação do antígeno livre, principalmente nos 60 dias iniciais.

4.5 Estudo espectrofotométrico do cobalto II

O produto comercial adquirido pela VALLÉE S/A e fornecido para análise foi dissolvido em água (curva —), ácido clorídrico 5M (curva ---) e analisado através de espectrofotômetro de absorção em varredura. Foi constatado apenas um pico de absorção em torno de 283 nm (Figura 18). Na presença de ácido clorídrico 5 M houve maior absorção neste comprimento de onda (283 nm), devido a degradação da glicose e lactose pelo ácido clorídrico, levando a formação de hidroximetilfurfural.

Como o soro de leite entra na composição do produto comercial, também foi obtido o seu espectro de absorção (curva) que apresentou o mesmo pico observado nos espectros do Cobalto-Dextrose-Lactose (Figura 8).

Portanto o aparecimento deste pico é devido principalmente as proteínas do soro de leite e ao hidroximetilfurfural produzido em meio ácido.

No espectro de absorção do cloreto de cobalto em água (Figura 19 – curva —) evidenciou o pico de absorção do complexo octaédrico do íon metálico (Co⁺⁺) com moléculas de água na faixa de comprimento de onda 400-600 nm. Na curva (-----) da Figura 19, o espectro de absorção do cloreto de cobalto II em ácido clorídrico 1M apresenta também formação do complexo octaédrico do íon metálico com a água na região de comprimento de onda 400-600 nm. Este pico é mais intenso que o anterior (curva ———), devido a amostra ser dez vezes mais concentrada.

Na Figura 20 (curva —) o espectro de absorção do cloreto de cobalto II em ácido clorídrico 5M, apresentou dois picos na região do visível, como evidenciados na literatura (COTTON e ALBERT, 1988).

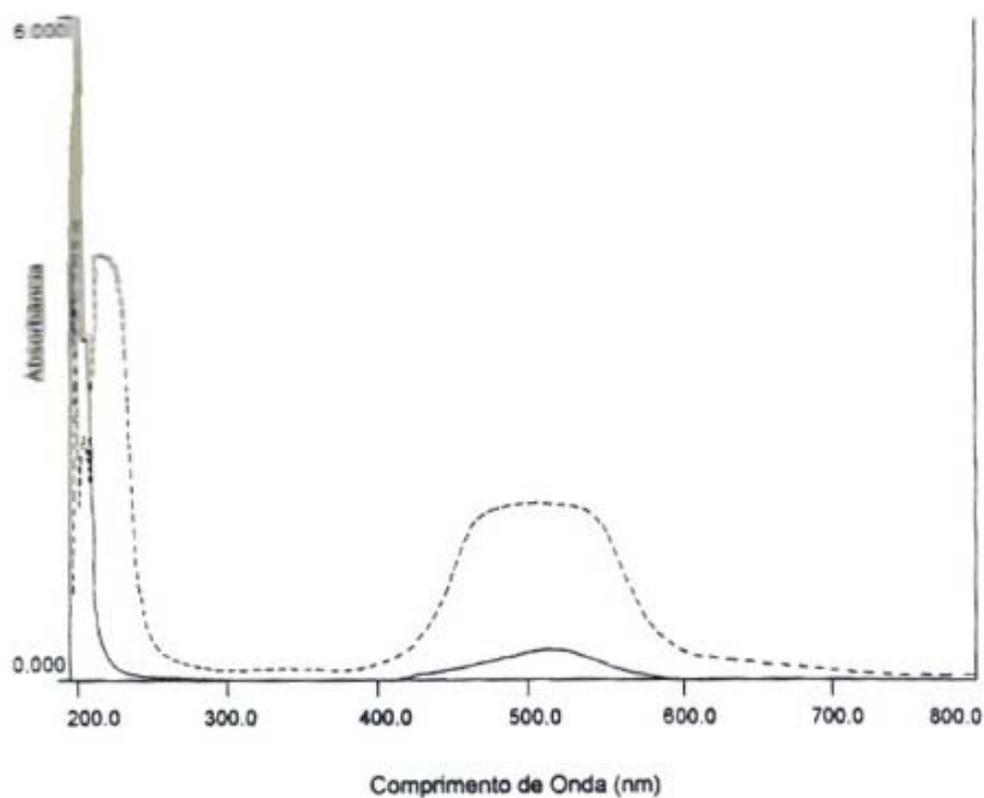


Figura 19: Espectro de Absorção do Cloreto de Cobalto II.
(—) - CoCl_2 em H_2O ; (---) - CoCl_2 em HCl 1M.
Preparação das Amostras: CoCl_2 (3g) + H_2O (20 ml)
Condições de ensaio: o espectro foi obtido após 24 horas diluindo-se a amostra 1:10.
Preparação da amostra: CoCl_2 (3g) + HCl 1M (20 ml)
Condições de ensaio: o espectro foi obtido após 24 horas não diluído.

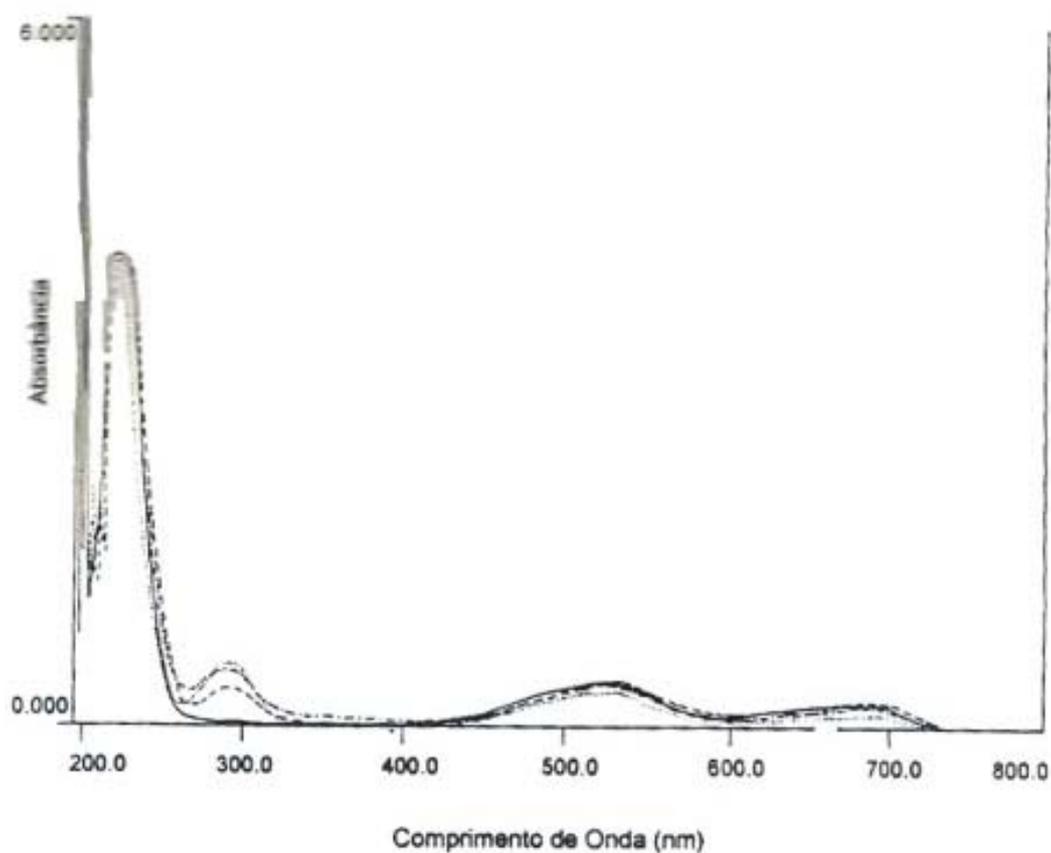


Figura 20: Espectro de Absorção do Cloreto de Cobalto II.

(—) - CoCl_2 em HCl 5M; (---) - CoCl_2 em HCl 5M + Lactose.
 (.....) - CoCl_2 em HCl 5M + Glicose; (-.-.-) - CoCl_2 em HCl 5M
 + Glicose e Lactose.

Preparação das Amostras:

CoCl_2 (3g) + HCl 5M (20 ml)

CoCl_2 (3g) + HCl 5M (20 ml) + lactose (4g)

CoCl_2 (3g) + HCl 5M (20 ml) + glicose (4g)

CoCl_2 (3g) + HCl 5M (20 ml) + glicose (2g) + lactose (2g).

Condições de ensaio: o espectro foi obtido após 24 horas diluindo-se as amostras 1:10.

1º Na região entre os comprimento de ondas 400-600 nm, pico do complexo octaédrico do íon metálico com a água.

2º O pico de complexação tetraédrica de íon metálico com o cloreto, abrange o comprimento de onda 600-750 nm.

A seqüência dos espectros de absorção do cloreto de cobalto II em ácido clorídrico 5M em presença de lactose (Figura 20 – curva ---), glicose (curva) e em presença de lactose/glicose (curva -.-.-). Todos apresentaram 3 picos, que são respectivamente o do hidroximetilfurfural a 283 nm, o do complexo octaédrico (400-600 nm) e do complexo tetraédrico (600-750 nm). Observou-se que na presença de glicose (curva) houve maior produção de hidroximetilfurfural provavelmente devido a sua degradação ser mais fácil que a da lactose.

Os espectros de absorção do cloreto de cobalto II em presença de glicose com concentração de ácido clorídrico de 1M, 0,1M, 0,01M 0,001M e em água (Figura 21), mostraram que a concentração decrescente do ácido clorídrico favoreceu a formação do complexo octaédrico, desaparecendo completamente o complexo tetraédrico que é favorecido pela presença do cloreto em solução. Notou-se também a redução do pico hidroximetilfurfural, que aparece em função da degradação da glicose em meio ácido.

4.6 Estudo cromatográfico

Foram feitas duas cromatografias em camada fina.

Na primeira cromatografia (Figura 22) os padrões foram: glicose, galactose e lactose (Merck), glicose e lactose (comercial). As amostras foram: cloreto de cobalto, cobalto-dextrose-lactose em ácido, cobalto-dextrose-lactose em água e três amostras de cloreto de cobalto em ácido clorídrico 5M com concentrações diferentes da glicose.

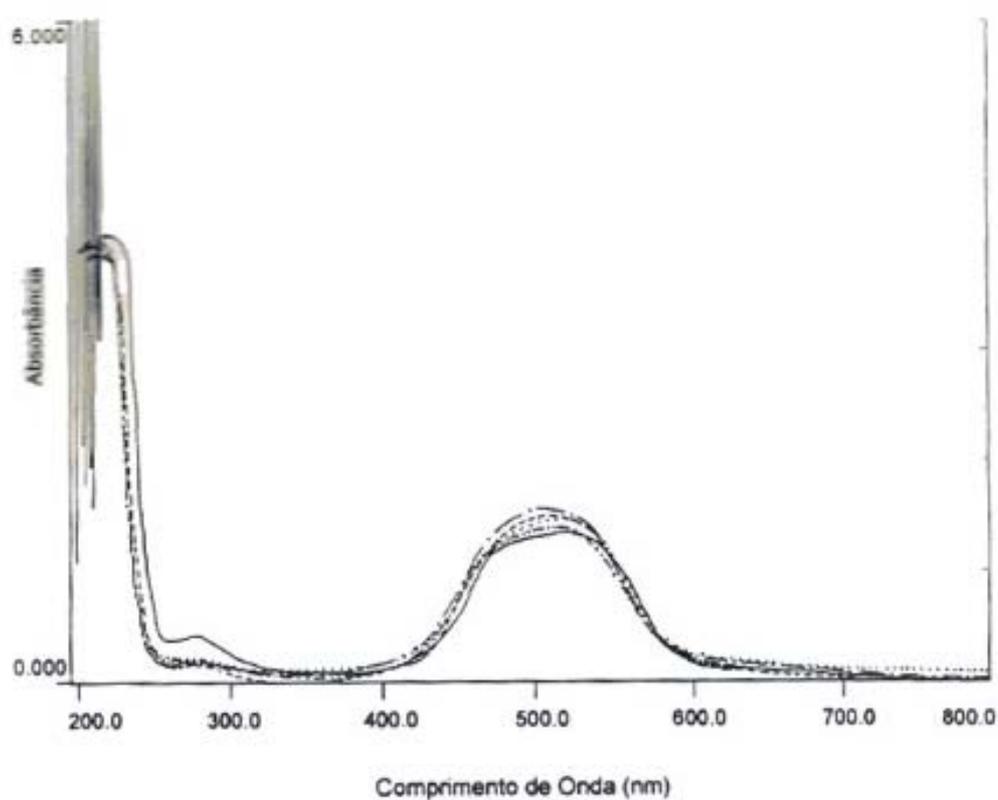


Figura 21: Espectro de Absorção do Cloreto de Cobalto II em presença da Glicose.

(—) - CoCl_2 em HCl 1M + Glicose; (---) - CoCl_2 em HCl 0,1M + Glicose; (.....) - CoCl_2 em HCl 0,01M + Glicose; (—) - CoCl_2 em HCl 0,001M + Glicose; (- - -) - CoCl_2 em H_2O + Glicose.

Preparação das Amostras:

CoCl_2 (1,5g) + HCl 1M (10 ml) + glicose (7,3 g)

CoCl_2 (1,5g) + HCl 0,1M (10 ml) + glicose (7,3g)

CoCl_2 (1,5g) + HCl 0,01M (10 ml) + glicose (7,3g)

CoCl_2 (1,5g) + HCl 0,001M (10 ml) + glicose (7,3g)

Condições de ensaio: o espectro foi obtido após 24 horas não diluídas.

GG'LGLCCoCC+A₁ A₂ A₃ C

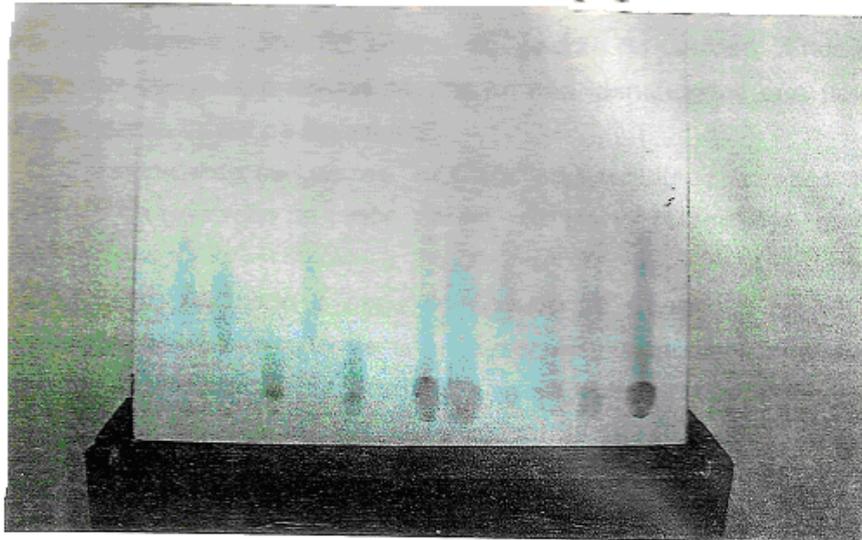


Figura 22: Análise cromatográfica em camada fina para Carboidratos

Utilizando o sistema de solventes 1

Padrões: (G)Glicose (G')Galactose (L)Lactose

Amostras: (Co) Cloreto de Cobalto (C) CDL em água

(C+) CDL em ácido clorídrico 5M

(A₁) CoCO₃(1,5g) + Glicose(9,14g) + HCl (10ml)

(A₂) CoCO₃(1,5g) + Glicose(4,0g) + HCl (10ml)

(A₃) CoCO₃(1,5g) + Glicose(7,3g) + HCl (10ml)

Foram aplicados na placa: Padrões - 5ul

Amostras: - 10ul

Sistema de Solventes I :Propanol-1 (30ml), Acetato de etila (50ml) e Água(20ml)

Revelador: Difenilamina 2% em acetona (5ml) + ácido fosfórico

Concentrado (1ml), Anilina 2% em acetona (5ml)

A amostra de cloreto de cobalto e ácido clorídrico 5M não apresentou nenhuma coloração após aplicação do revelador.

O cobalto-dextrose-lactose em água, quando comparado aos padrões contém lactose, glicose e um produto que migra semelhante a galactose. Tem também outro componente com Rf acima do padrão de glicose. Ainda no CDL (H₂O) apareceram compostos retidos na origem não identificados que podem ser complexos do cobalto II com os açúcares.

O cobalto-dextrose-lactose HCl 5M apresentou-se idêntico ao CDL (H₂O) em termos de migração na placa, porém com menor retenção de material na origem.

O produto produzido a partir do cloreto de cobalto II em HCl 5M e diferentes concentrações de glicose (A1, A2 e A3), quando comparadas aos padrões apresentaram bandas características para glicose e componentes que migraram como lactose e galactose. Havendo também na origem evidenciado a complexação do Co⁺⁺ com os açúcares.

Na segunda cromatografia (Figura 23). Os padrões e as amostras foram idênticos ao da primeira cromatografia (Figura 22), alterando-se apenas o sistema de solvente e as quantidades aplicadas. O objetivo desta modificação foi conseguir um melhor arraste e uma melhor visualização.

Nesta placa o CDL (H₂O), quando comparado aos padrões, mostram compostos que tem migração semelhante a lactose, galactose, glicose e pontos abaixo destes padrões indicando a presença de complexos Co⁺⁺ com açúcares.

O cobalto-dextrose-lactose em meio ácido tem um comportamento semelhante ao CDL (H₂O), porém apresentando menor retenção de componentes na origem.

As amostras aplicadas de cloreto de cobalto II em HCl 5M com glicose, foram praticamente idênticas entre si, porém, diferentes do produto comercial (CDL). Apresentaram glicose livre e um complexo com Rf semelhante a galactose. Essas amostras neste sistema de solvente não apresentaram nenhum composto de açúcares na origem.

G G' L C C C + A' A' A''' A' A' A'''

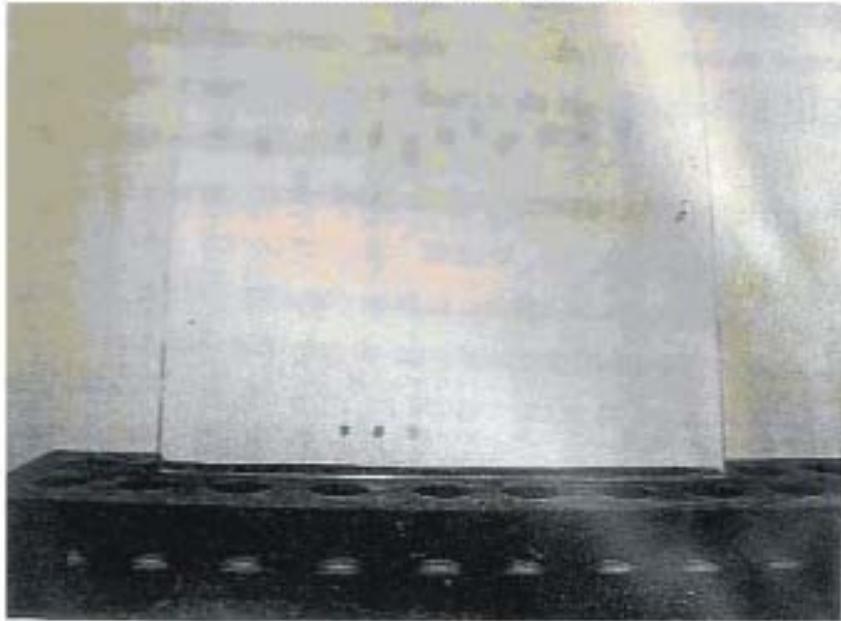


Figura 23: Análise Cromatográfica em Camada Fina para Carboidratos
Utilizando o Sistema de Solventes II

Padrões: (G) Glicose (G') Galactose (L) Lactose

Amostras: (C) CDL em água
(C+) CDL em ácido clorídrico 5M (10ml)
(A') CoCO_3 (1,5g) + Glicose (9,14g) + HCl 5M (10 ml)
(A'') CoCO_3 (1,5g) + Glicose (4g) + HCl 5M
(A''') CoCO_3 (1,5g) + Glicose (7,3g) + HCl 5M (10ml)

Foram aplicados na placa: Padrões - 3 μl
Amostras - 3 e 5 μl

Sistema de solventes II: Propanol - 1 (60ml), acetado de etila (20ml) e água (20 ml)

Revelador: Difenilamina 2% em acetona (5ml) + ácido fosfórico concentrado (1ml), anilina 2% em acetona (5ml)

Após estudos realizados com as cromatografias em camada fina era necessário analisar a fração retida no ponto de aplicação (Figura 22 e 23). Esta fração indicava a possibilidade de no produto comercial haver complexação do cobalto II com carboidratos. Para isto ser verificado foi necessário continuar com os estudos espectrofotométricos comparativos do CDL (produto comercial) e produto produzido em nosso laboratório, realizando modificações na faixa de densidade óptica e comprimento de onda.

O produto comercial (cobalto-detrose-lactose) foi dissolvido em água e verificado seu comportamento através de espectrofotômetro de absorção (Figura 24), sendo constatado apenas um pico de absorção em torno de 283 nm.

A ausência do pico do complexo octaédrico do íon metálico com a glicose e/ou proteína na região entre os comprimentos de onda (400-600 nm) do CDL é devida a pequena quantidade do cobalto ($7,428 \times 10^{-4}$ moles / 1 g CDL) presente no produto comercial, necessária e suficiente para complexar com carboidratos e proteínas do soro de leite que estão no CDL.

Para verificar a influência da relação molar [glicose] / [cobalto II] sobre a formação do quelato (PILARCZYK et al., 1988), foram realizadas análises espectrofotométricas na região visível (Figura 25) e nas regiões ultravioleta e visível (Figura 26). Nos dois casos a concentração do cloreto de cobalto II foi fixada em 0,01 molar e da glicose foi variável de modo que as relações molares glicose/cobalto II situaram-se entre 0 e 250. Os espectros mostrados na (Figura 25) estão dispostos de baixo para cima, em ordem crescente das relações molares [glicose] / [cobalto II], portanto a primeira curva corresponde ao espectro do cloreto de cobalto II em água, isto é, a relação [glicose] / [cobalto II] igual a zero. As curvas da Figura 25 evidenciaram que a queleção foi mais intensa (maior densidade óptica) quanto maior a relação [glicose] / [cobalto II], principalmente quando esta situou-se entre 10 e 160. Os espectros mostrados na Figura 26, são semelhantes aos da Figura 25, diferindo apenas pelo fato de estender-se à região ultravioleta. A primeira curva da Figura 26 corresponde ao espectro de um padrão de glicose que evidenciou a ausência de absorção visível e apresentou um pico de 283 nm devido provavelmente a contaminação com hidroximetilfurfural. As outras curvas apresentam o pico característico do complexo do cobalto II, glicose em ordem crescente com a relação molar [glicose] / cobalto II].

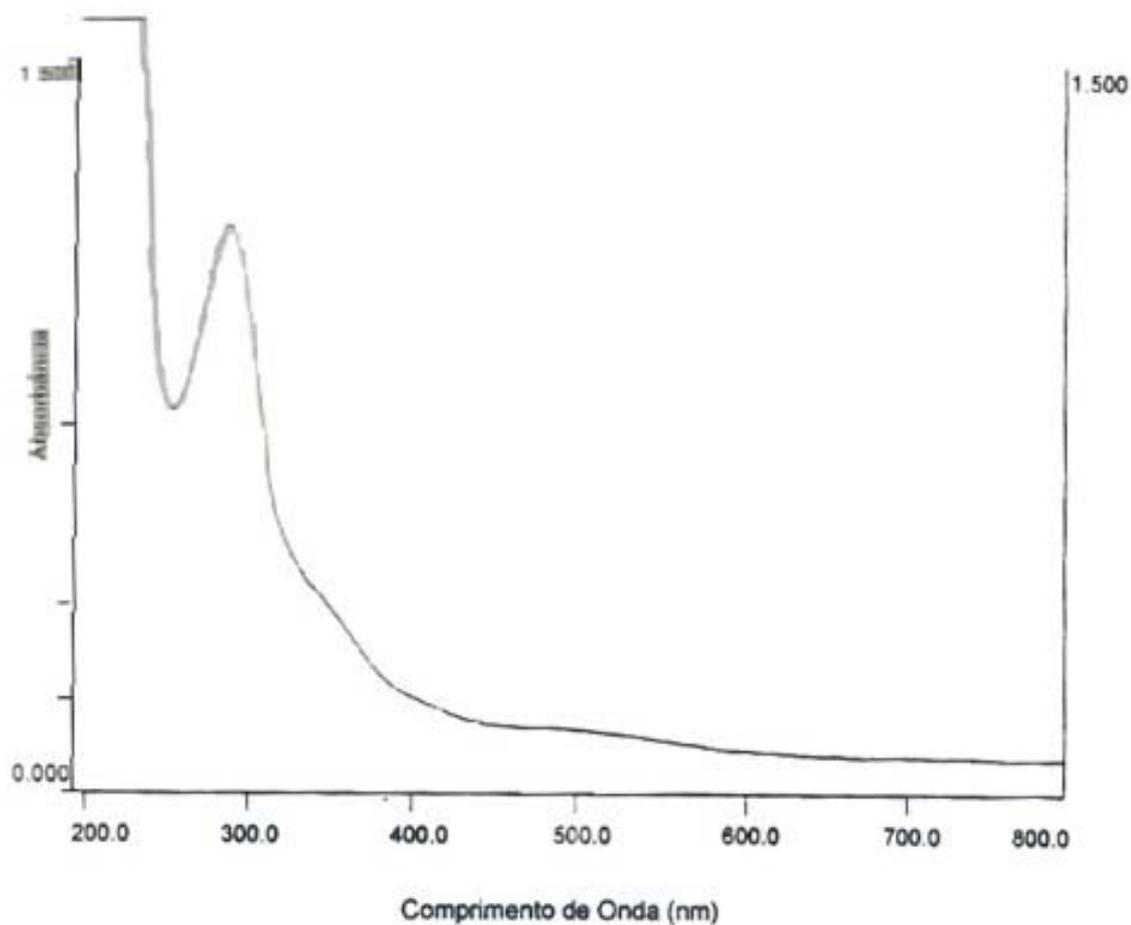


Figura 24: Espectro de Absorção do Cobalto-Dextrose-Lactose (CDL) Comercial
Preparação das Amostras: CDL (1g) + H₂O (20 ml)
Condições de ensaio: o espectro foi obtido após 24 horas diluindo-se a amostra 1:10.

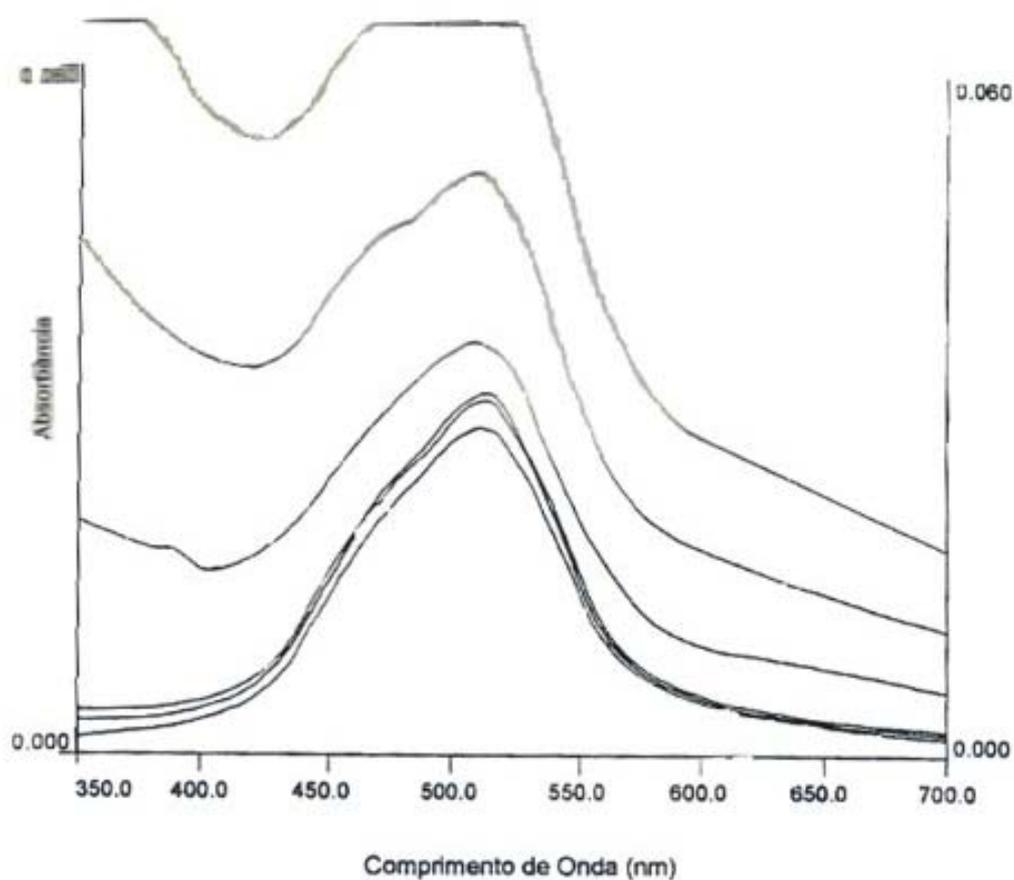


Figura 25: Espectros de Absorção do Cloreto de Cobalto II em presença da Glicose, na Região Visível (350 - 750 nm).
Preparação das Amostras: Foram preparadas amostras com as seguintes relações molares [glicose] / [cobalto II] (0,0; 1,0; 10,0; 50,0; 100,0; 160,0) , sendo a concentração do cloreto de cobalto 0,01 molar.
Condições de ensaio: os espectros foram obtidos após 24 horas.

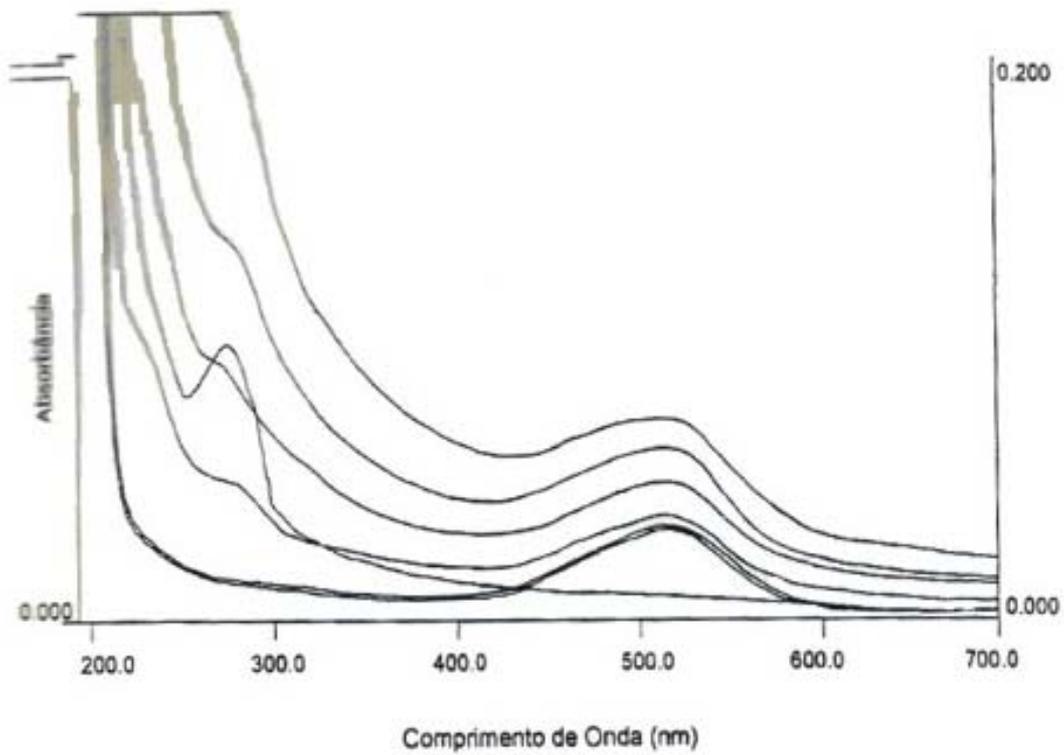


Figura 26: Espectros de Absorção do Cloreto de Cobalto II em presença da Glicose, na Região UV-Visível.
Preparação das amostras: foram preparadas amostras com as seguintes relações molares (0,0; 10,0; 50,0; 100,0; 160,0; 250,0), sendo a concentração do Cloreto de Cobalto II 0,01 molar padrão - glicose (1,6 M)
Condições de ensaio : os espectros foram obtidos após 24 hs.

Nestas mesmas curvas o desaparecimento do pico a 283 nm é provavelmente devido a complexação do hidroximetilfurfural com o cobalto II.

Para verificar a influência da concentração do cobalto II sobre a quelação com a glicose, obteve-se outra série de espectros ficando-se o cobalto II em 0,1 molar (10 vezes maior que o valor anterior) e variando-se [glicose] / cobalto II] de 0 a 40 (Figura 27).

Os espectros da Figura 27 são semelhantes aos da Figura 25, diferindo apenas no valor absoluto das densidades ópticas, devido a maior concentração de cobalto II, porém não há diferença significativa quando se compara os incrementos de densidade óptica em função das relações [glicose] / cobalto II]. Ficou evidente que independente da concentração do cobalto II só obteve-se uma maior complexação com [glicose] / cobalto II] maior que 10.

Gutierrez (1964) descreveu que os protozoários do rúmen digerem carboidratos solúveis tais como: glicose, sacarose, como também amido. As bactérias também digerem carboidratos solúveis e proteínas.

Baseado no que foi dito anteriormente, foram usados como agentes ligantes as proteínas (BSA) Figuras 28 e 29 e amido modificado com periodato de sódio (Figura 30). Os espectros do cloreto de cobalto II em presença de proteínas (BSA) (Figura 28) com relações molares [glicose] / cobalto II] crescentes (de baixo para cima 0,0; $1,3 \times 10^{-6}$; $5,4 \times 10^{-6}$ e $1,3 \times 10^{-5}$), apresentou um perfil semelhante à Figura 27, no entanto, comparando os valores das frações molares observou-se que com a proteína esses valores são cerca de um milhão de vezes menores que os correspondentes na Figura 27. Isto indica uma tendência mais favorável de complexação com as proteínas do que com a D-glicose o que é de se esperar em função da presença de grupamentos carbonílicos na molécula protéica. Para comprovar o experimento anterior ministrou-se a proteína com a glicose e obteve-se com mostra a Figura 29 quatro curvas de espectros de absorção, sendo as três primeiras amostras de relações molares [glicose] / cobalto II] e a última amostra de relações molares da glicose + proteína + cobalto II. Isto mostra que essa última relação evidencia a formação de mais complexo na região do visível do que com as amostras que contém glicose e cobalto II, mesmo as amostras com proteína, glicose e cobalto numa relação molar menor do que aquelas que estão somente com glicose e cobalto II. Na Figura 30 as duas curvas de absorção do cloreto de cobalto II em presença do amido ativado com o metaperiodato de sódio mostra um aumento

significativo do quelato com o cobalto II, quando comparado com a Figura 27, em que estão as relações molares de suas amostras bem superiores. Isto era de se esperar, pois o amido ativado está repleto de grupos aldeídicos introduzidos pela modificação com o metaperiodato de sódio.

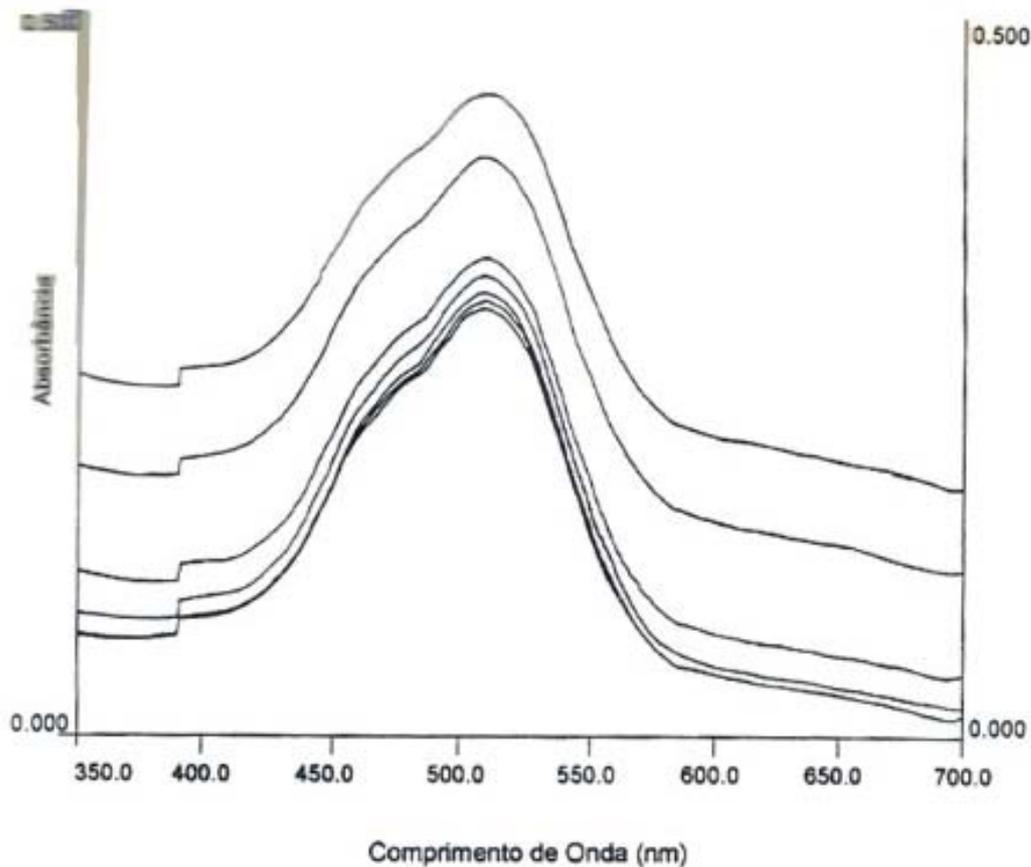


Figura 27: Espectros de Absorção do Cloreto de Cobalto em presença da Glicose, na Região Visível (350 - 750 nm).
Preparação das Amostras: Foram preparadas amostras com as seguintes relações molares [glicose] / [cobalto II] (0,0;0,5;1,0;2,0;10,0;30,0;40,0), sendo a concentração do cloreto de cobalto II 0,1 molar.
Condições de ensaio: os espectros foram obtidos após 24 horas.

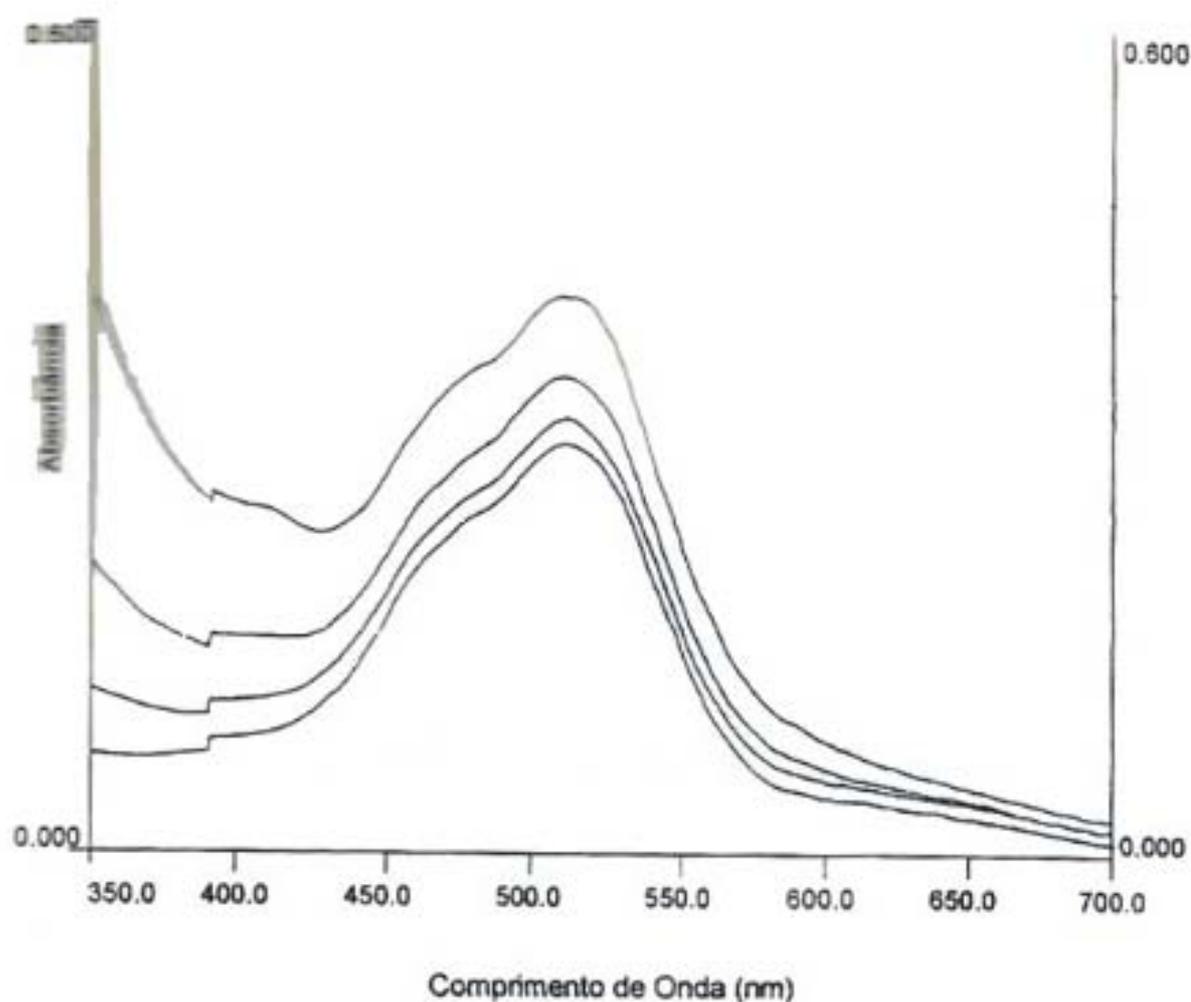


Figura 28: Espectros de Absorção do Cloreto de Cobalto II em presença da Proteína na Região (350 - 750 nm).
Preparação das Amostras: Foram preparadas amostras com as seguintes relações molares [proteína] / [cobalto II] ($0,0$; $1,3 \times 10^{-6}$; $5,4 \times 10^{-6}$; $1,3 \times 10^{-5}$), sendo a concentração do cloreto de cobalto $0,1$ molar.
Condições de ensaio: os espectros foram obtidos após 24 horas.

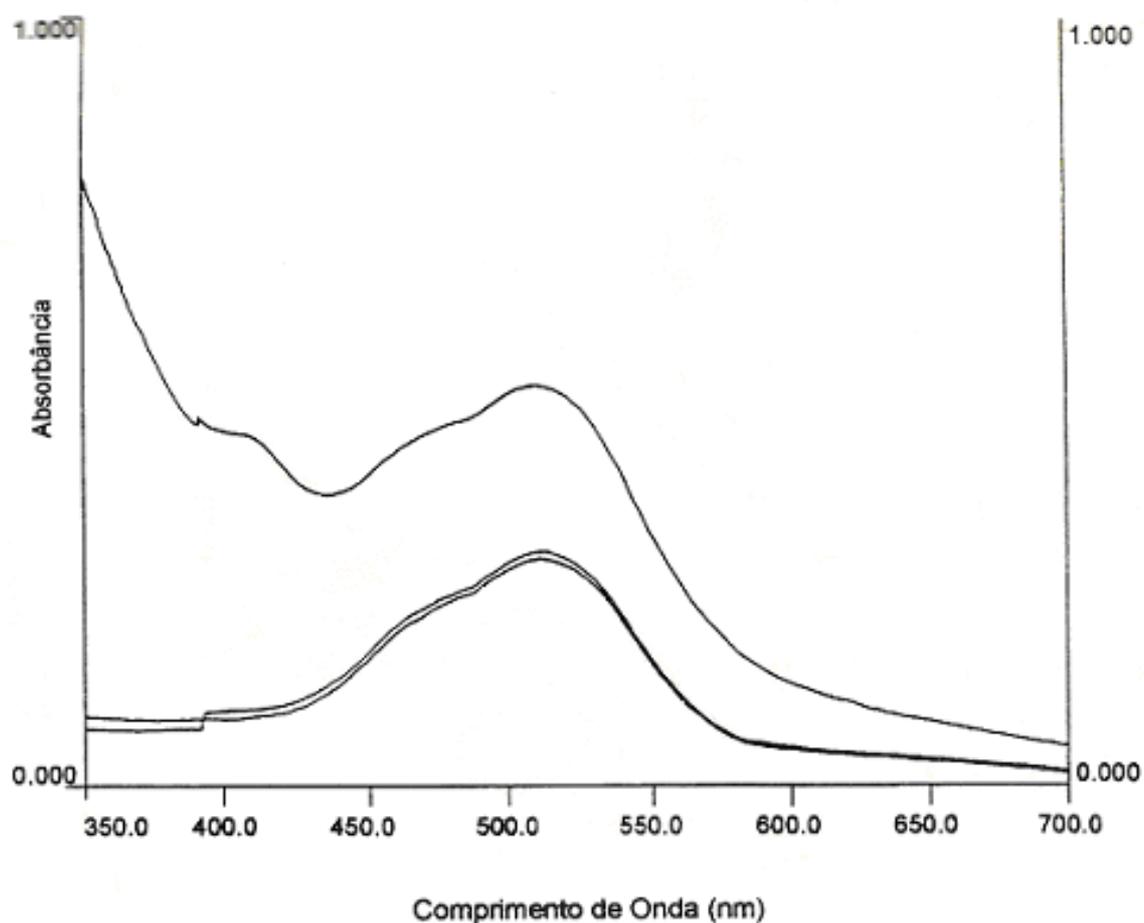


Figura 29: Espectros de Absorção do Cloreto de Cobalto II em presença da Glicose ou da Glicose + Proteína, na Região Visível (350 - 750 nm).

Preparação das amostras: Foram preparadas amostras com as seguintes relações molares [glicose] / [cobalto II] (0,0;0,2;2,0;) e [glicose]/[cobaltoII] + [proteína]/[cobaltoII] na sequência ($2,5 \times 10^{-2}$ e $6,8 \times 10^{-5}$) sendo a concentração do cloreto de cobalto 0,1 molar.

Condições de ensaio: os espectros foram obtidos após 24 horas.

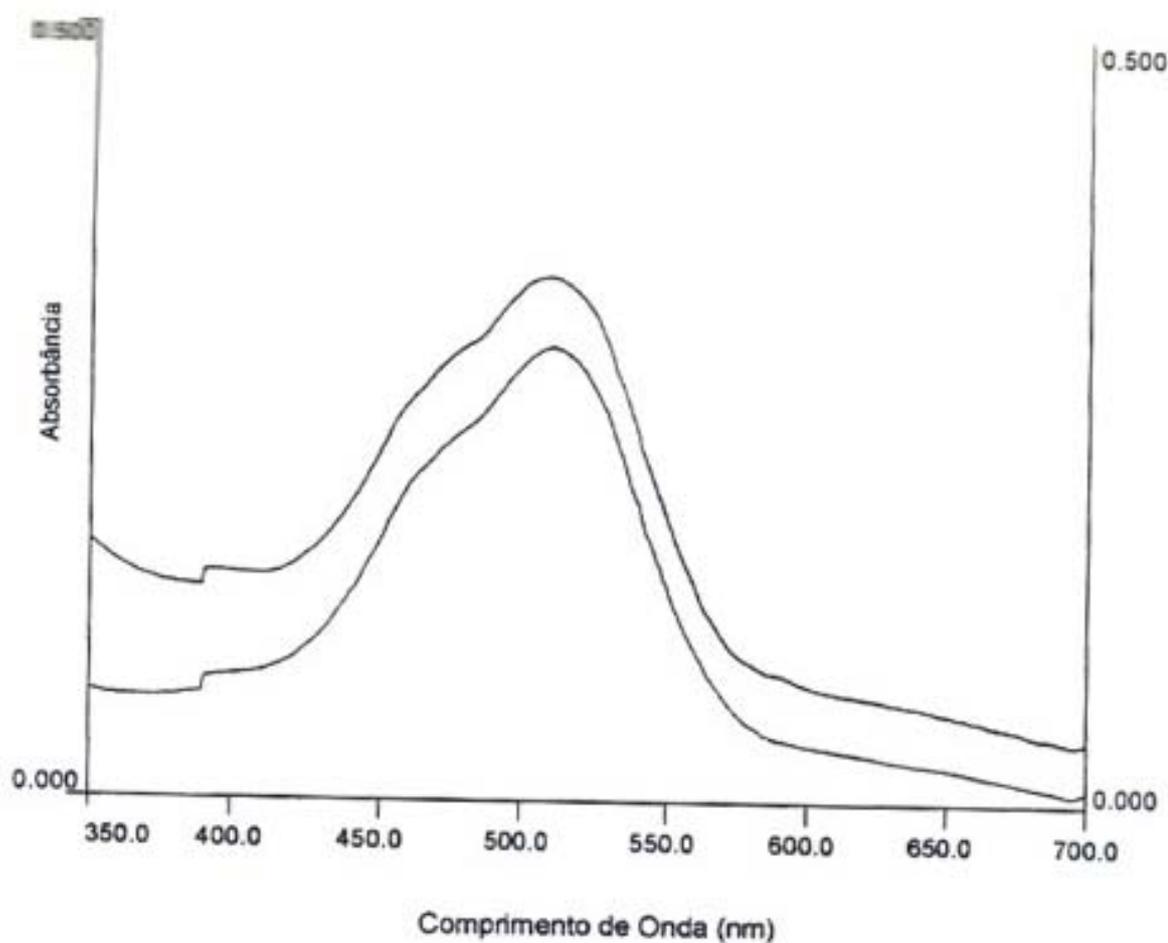


Figura 30: Espectros de Absorção do Cloreto de Cobalto II em presença do Amido Modificado com Periodato de Sódio, na Região Visível (350 - 750 nm).
Preparação das Amostras: Foram preparadas amostras com as seguintes relações molares [amido] / [cobalto II] ($0.0:1.3 \times 10^{-7}$), sendo a concentração do coreto de cobalto 0,1 molar.
Condições de ensaio: os espectros foram obtidos após 24 horas.

5 CONCLUSÕES

- 1- As cromatografias em sephadex G-100 seguida de análise espectrofotométrica evidenciaram a imobilização da suspensão de vírus “O₁ Campos” em amido e carbodiimida. Isto é comprovado pela alteração dos volumes de eluição em relação a suspensão de vírus “O₁ Campos” que serviu como parâmetro de comparação.
- 2- Os testes de Índice de Soro Proteção (ISP) realizados pela VALLÉE S/A evidenciaram o sistema amido + suspensão de vírus “O₁ Campos” como sistema adequado para liberação do antígeno. Visto que, a liberação do vírus foi crescente, gradual e contínua durante 90 dias.
- 3- No produto comercial (CDL) as condições para a formação do complexo cobalto – dextrose – lactose, são desfavoráveis devido a relação molar entre [carboidratos] / [cobalto II] ser de aproximadamente 1,73.
- 4- A glicose para ser usada como ligante para a complexação de cobalto II, necessita de uma relação molar [glicose] / [cobalto II] maior que 10.
- 5- A glicose misturada com proteína em uma relação molar [glicose] / [cobalto II] de apenas $2,5 \times 10^{-2}$ apresenta um elevado poder de complexação.
- 6- A albumina sérica (BSA) e amido ativado com metaperiodato de sódio, favorecem a complexação com o cobalto II, mesmo possuindo uma relação molar milhões de vezes inferior quando comparado com o cobalto II complexado com a glicose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLINGER, N.L., CAVA, M.P., JOHNSON, C.R. et al. **Química Orgânica**. E. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. p. 427-456: Reações de aldeídos e cetonas.
- AUGÉ DE MELO, P., GOMES, I., FERNANDEZ, A. et al. Vacuna antiaftosa com adjuvante oleoso para cerdos II. Vacunacion intraperitoneal de cerdos juvenes com emulsion doble. **Boletín do Centro Panamericano de Fiebre Aftosa** Rio de Janeiro, v. 32, p. 13-19, 1978.
- BEDDOWS, C.G., GUTHRIE, J.T., ABDEL – HAY F.I. The use of graft copolymers as enzyme supports immobilization of proteins and enzymes on a hydrolyzed nylon-co-acrylonitrile system. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 23, p. 2885-2889, 1981.
- BERNFELD, P. Amylases, alfa and beta In: COLOWICK, S.P., KARPLAN, N.O. **methods enzymology**. New York; Academic Press, 1955, v. 1, p. 149-150.
- COLLINS, F.W., CHADORKAR, K.R. Thin-layer Chromatography of fructo-oligosaccharides. **Journal of Chromatography**, v. 56, p. 163-167, 1971.
- COTTON, F., ALBERT. **Advanced Inorganic Chemistry**, 5. ed. New York: Wiley. 1988, 1455p.
- CUNHA, R.G., BAPTISTA JJUNIOR, J.A., SERRÃO, U.M. et al. El uso los ratones lactantes em la evaluacion de los anticuerpos contra el vírus de la fiebre aftosa y su significacion inmunológica. **Gaceta Veterinária**, Montevideo, v. 19, n. 100, p. 261-263, 1957.
- DINELLI, D., MARCONI, W., CERE, F. et al. In: Dye, E. K., Weetall, H. H., **Enzyme Engineering**, new York: Plenum Press, 1978, p. 477-481.
- DOMINGUEZ, E., NILSSON, M., HAHN – HGERDAL, B. Carbodiimide couplin of μ -galactosidade from *Aspergillus oryzae* to alginate, **Enzyme microbiology technology**, Sweden, v. 10, p. 606-610, 198.
- EMNÉUS, J., GORTON, L. Compararasion between different inorganic supports for the immobilization of amyloglicosidase and α -amilase to be used in enzyme reactors in flow – injection systems. **Analytica Chimica Acta**, Sweden, v. 276, n. 1, p. 303-318, 1993.
- FAUST, C.B. Drug delivery-under control. **Education in Chemistry**, England, p. 38-40, 1994.

- FERNANDES, M.V., MARTINS, P.A., MCKERCHER, P.D. et al. Vacunas contra la fiebre aftosa. I. Comparacion entre vacunas preparada com vírus inactivado com formalina y adsobido em hidróxido de alumínio y vacunas preparadas com vírus inactivado com acetilileneimina emulsificado com adjuvante incompleto de Freud. **Boletin Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**. Rio de Janeiro, v. 20, p. 1-8, 1975.
- GHRBREGZABHER, M., RUFINI, S., MONALO, B. Thin-layer Chromatography of Carbohydrates. **Journal of Chromatography**, v. 127, n. 2, p. 133-162, 1976.
- GUTIERREZ, J. Physiology of the rumen protozoa. **Agricultural Science Review**, Washington, v. 2, n. 2, p. 31-34, 1964.
- HEARN, M.T.W., BETHEL, G.S., AYRES, J.S. **Journal of Chromatography**, v. 185, p. 463-470, 1979.
- HEARN, M.T.W. In: COLOWINCK, S.P., KAPLAN, N.O. Methods in: Enzymology. New York: Academic Press, 1987, v. 135, p. 102-117.
- JANOLINO, V.G., SWAISGOOD, H.E. Analisis and optimization of methods using water soluble carbodiimide for immobilization of biochemicals to porous glass. **Biotechnonology and Bioengineering**, North Carioine, v. 24, p. 1069-1080, 1982.
- JOHNSON, R.R. et al. Ruminant nutrition: in vivo and in vitro nutritional requeriments of rumen microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 4, n. 7, p. 627-631, 1956.
- KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. use of titanium etc. species for the immobilization of bioactive compounds-enzymes. **Transition Metal Chemistry**, Birmingham, v. 11, p. 41-66, 1986.
- KENNEDY, J.F., WHITE, C.A. **Bioative Carbohydrates**. 1. ed. England: Ellis Horwood, 1983. In: Chemistry, Biochemistry and Biology. P. 66-77: Analytical Methods for identification and determination of macromolecular structure. P. 142-149: polysaccharides.
- KENNEDY, J.F., WHITE, C.A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2. ed. England: Ellis Horwood, 1985. p. 147-207: principles.of immobilization of enzymes, p. 380-420: Date on Techniques of enzyme immobilization and bioaffinity procedures.
- La TORRE, J.L. Control y erradicacion de la fiebe aftosa en Argentina: Aplicacion de las modernas técnicas de la biologia e inmunologia molecular, 1992. Fac. de Ciências Veterinárias, Argentina, p. 31-36.

- LE BEL, M., SPIMO, M. Pulse dosing versus continuous infusion of antibiotics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 14, p. 71-95, 1988.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.W., FARR, R.V., et al., **Journal Biol. Chem.**, v. 193, p. 265, 1951.
- MARTINS, A.I. Vacunas antiaftosas hidroxido – saponinadas inactivadas por el formol. **Boletín do Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 1-19, 1971.
- MASTERTON, W.L., SLOWINSKI, E.J., **Química Geral Superior**. 4. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1978, 583p.
- MELO, E.H.M. **Evaluation of acidic polysaccharide derivatives**, Department of Chemistry, University of Birmingham, 1990, p. 24-31.
- MORI, T., TOSA, T., CHIBATA, I. Enzymatic properties of microcapsules containing asparaginase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 321, p. 651-661, 1973.
- MORRISON, R.J., BOYD, R.N. **Organic Chemistry**, 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Guibekian, 1978, p. 1168-1175: Hidratos de carbono II. Dissacarídeos e polissacarídeos.
- NOONAN, P.K., BENET, L.Z. Variable glyceryl dinitrate formation as function of route of nitroglycerin administration. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, p. 273-277, 1987.
- OLASCOAGA, R.C., AUGÉ DE MELLO, P., BERGMANN, I, Perspectivas para nuevas vacunas em América Latina y em el Caribe. **Boletín Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, La Habana, v. 54, p. 7-20, 1988.
- ORGEL, L.E. **Introdução á química dos metais de transição**. São Paulo: Edgard Blucher, 1970. 172p.
- OTTENBRITE, R.M. **Polimeric drugs and drug delivery systems**. 1. ed. Virgínia: Academic Press, 1991. p. 1-10: Biologically active polymers.
- PERFETTI, R.B., ANDERSON, C.D., HALL, P.L. **Biochemistry**, v. 15, p. 1735-1743, 1976.
- PERETTI, E., KARLAGANIS, G., LAUTERBURG, G.H. Increased urinary excretion of toxic hydrazine metabolites of isoniazid by slow acetylators. Effect of a slow-release preparation of isoniazid. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 33, p. 283-286, 1987.

- PILARCZYK, M. GRZYBKOWSKI, W., KLINSZPORN, L. Spectrophotometric study of the pseudotetrahedral bromocomplexes of cobalto (II) in hexamethylphosphoramide solution. **Journal Chemistry Society: Faraday Translation**. Gdansk, Poland, v. 94, n. 11, p. 3973-3981, 1988.
- PRESCOTT, L.F. **Novel drug delivery and its therapeutic application**, 1. ed. v. 1, Edinburgh: W.S. NIMMO, 1989. p. 1-11: The need for improved drug delivery in clinical practice.
- QUAGLIANO, V.J., VALLARINO, M.L. **Química**, 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1985, 690p, p. 194-196.
- SKELLY, J.P. **Novel drug delivery and its therapeutic application**, 1. ed. Maryland: L.F. Prescott and W.S. NIMMO, 1989. p. 342-351: Drug reaction and novel delivery systems.
- SNELL, E.E., Di MARI, S.J. BOYER, P.D. **The enzymes**, New York: Academic Press, 1970, v. 2, p. 335.
- TICE, R.T. MASON, D.W., GILLEY, R.M. **Novel drug delivery and its therapeutic application**, 1. ed., Birmingham: L.F. PRESCOTT AND W.S. NIMMO, 1989. p. 223-235: Clinical use and future of parenteral microsphere delivery systems.
- VALLE, L.B. et al. **Farmacologia Integrada. Princípios Básicos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988. v. 1.
- VILLELA, G.G., BACILA, M., TALSTADI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. p. 26-36, p. 106-128, p. 135-142.
- VOGEL, A. **Análise Inorgânica Quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981. 690p.