



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
QUITOSANA CONTENDO ANTIGENO CAPSULAR Vi DE
*Salmonella Typhi***

Raimundo Lopes da silva

BELÉM-PA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
QUITOSANA CONTENDO ANTIGENO CAPSULAR Vi DE
*Salmonella Typhi***

Autor: Raimundo Lopes da Silva

Orientador: Prof^a. Dr^a. Roseane Maria Ribeiro Costa

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para o título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde da UFPA

Silva, Raimundo Lopes da.

Sistema de liberação controlada de quitosana contendo antígeno capsular Vi de *Salmonella* Typhi / Raimundo Lopes da Silva; orientadora, Roseane Maria Ribeiro Costa, co-orientador, Francisco Martins Teixeira – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Belém, 2012.

1. Isolamento. 2. Caracterização do antígeno. 3. Nanopartículas 4. Adsorção.
I. Título.

CDD: 22. ed.: 541.335

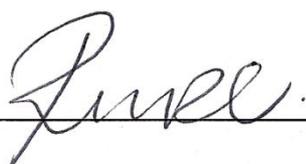
Raimundo Lopes da Silva

Sistemas de Liberação Controlada de Quitosana Contendo o Antígeno Vi de *Salmonella* Typhi.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

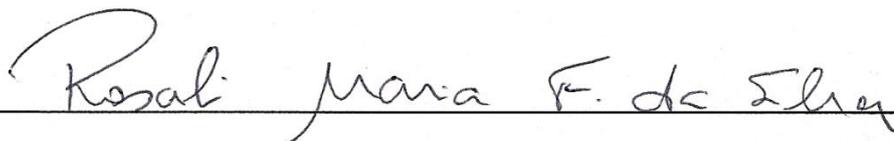
Trabalho defendido e aprovado em: 31 / 08 / 12

Banca examinadora



Profª. Drª. Roseane Maria Ribeiro Costa

Instituição: Universidade Federal do Pará



Profª. Drª. Rosali Maria Ferreira da Silva

Instituição: Universidade Federal do Pará



Profª. Drª. Karla Tereza Silva Ribeiro

Instituição: Universidade Federal do Pará

Aos meus pais, Raimundo e Tatiana, por terem me guiado e apoiado por toda a
minha vida.

Ao meu irmão Ronaldo pelo incentivo a cada momento e a todos os meus familiares
pelo apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado nos momentos difíceis e ter me mostrado sempre o caminho certo.

Aos meus pais, que sempre estiveram comigo, me apoiando e me fortalecendo com palavras de incentivos.

Ao meu irmão, pela ajuda e orientação em vários momentos e familiares, principalmente a minha avó Maria, pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Roseane Maria Ribeiro Costa, pela orientação e ensinamentos passados em todos os momentos, além da confiança e paciência que teve em toda essa caminhada.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira, pelos ensinamentos, confiança e ajuda direta no trabalho e artigos.

Ao Prof. Dr. José Carréra Silva Junior, pela dedicação em buscar sempre a melhor estrutura aos alunos de curso de mestrado.

À prof. Dra. Patricia Marinho, pela contribuição nas análises dos resultados de Ressonância magnética nuclear.

Ao Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro, pela colaboração em ceder seu laboratório de bacteriologia do Instituto Evandro Chagas para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Dr. José Antônio Picanço Diniz Junior, do Instituto Evandro Chagas, pela colaboração e ajuda na execução e desenvolvimento dos trabalhos de Microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos, do laboratório de Toxicologia da UFPa, por ceder reagentes ou equipamentos de seu laboratório.

À Prof^a. Dr^a. Marta Chagas Monteiro, pela ajuda em ceder os espaços de seu laboratório de Microbiologia no início da pesquisa.

À Dr. Eliana da Silva Nascimento, pela colaboração e dedicação incansável na elaboração do desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Luiz, Oséias e Charles, pela ajuda direta na obtenção dos resultados de análise térmica.

Aos colegas do laboratório de controle de qualidade Ana Carolina, Suellem Sanches, Marcos Pena e Marina Nídia, pelo companheirismo, ajuda e descontração nos momentos difíceis.

Aos colegas de pós-graduação Carla, Rosa, Edinilza, Angélica e Jailton, pelo incentivo moral nos momentos difíceis e na colaboração prestada.

Às secretárias do Programa de Pós – Graduação de Ciências Farmacêutica (PPGCF) Cliciane e dona Brasília pela paciência, compreensão e atenção dada.

À Universidade Federal do Pará e Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por ceder os espaços necessários à pesquisa.

Ao CNPQ, pela aprovação do projeto.

À todos, que contribuíram de forma alguma forma no desenvolvimento desta pesquisa.

"Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto as cheias as baixam para a terra, sua mãe".

Leonardo da Vinci

RESUMO

SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE QUITOSANA CONTENDO ANTÍGENO CAPSULAR Vi DE *Salmonella* Typhi

A utilização do antígeno Vi em vacinas é bastante promissor devido a este proporcionar um alto nível de imunidade em vacinas parenterais. A necessidade pela busca por alternativas para administração de vacinas levou à aplicação da tecnologia da liberação controlada de fármacos no campo da imunização. Nestes sistemas de liberação controlada, as doses administradas são diminuídas, porém o período de imunidade aumenta, já que prolonga a quantidade liberada do antígeno ao longo do tempo. O presente estudo propôs desenvolver e caracterizar um sistema de liberação controlada contendo antígeno Vi, utilizando como polímero veiculador a quitosana. As técnicas de RMN H^{-1} e espectroscopia de infravermelho mostraram que o método de extração do antígeno Vi empregado foi satisfatório qualitativamente. A caracterização da quitosana e das nanopartículas através de ensaios de análise térmica mostrou maior estabilidade das partículas em relação à quitosana, além do aumento da temperatura de degradação nas nanopartículas à medida que aumenta a concentração da quitosana. Em relação ao potencial zeta todas as nanopartículas tiveram cargas positivas em pH 7,2, enquanto que, no tamanho, as partículas foram menores à medida que aumentou a quantidade de quitosana no sistema. Na microscopia eletrônica de transmissão, as partículas mostraram-se morfologicamente homogêneas e com formato esférico. Na cinética de adsorção o antígeno, contido em solução, sofreu uma adsorção de 55% nas partículas de quitosana. Com isso, observou-se que é possível criar um sistema de liberação controlada envolvendo nanopartículas de quitosana e antígeno Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi.

Palavras chave: Vacinas, Antígeno Vi, Quitosana, Nanopartículas

ABSTRACT

CONTROLLED RELEASE SYSTEM CHITOSAN CONTAINING VI CAPSULAR ANTIGEN OF *Salmonella* Typhi

The use of the Vi antigen in vaccines is very promising because this provides a high level of immunity in parenteral vaccines. The need for the search for alternatives for administration of vaccines has led to the application of technology controlled release of drugs in the field of immunization. In such controlled delivery systems, the doses are decreased, but the period of immunity increases, extending the amount of antigen released over time. This study aimed to develop and characterize a controlled delivery system containing Vi antigen, using as disseminator polymer chitosan. The techniques of H^1 NMR and infrared spectroscopy showed that the method of extracting the Vi antigen used was qualitatively satisfactory. The characterization of chitosan and nanoparticles by tests thermal analysis showed greater stability of the particles in relation to chitosan, besides increasing the degradation temperature of the nanoparticles increases as the concentration of chitosan. Regarding the zeta potential nanoparticles were all positive charges at pH7.2, while the particles were smaller size as they increased the amount of chitosan in the system. In transmission electron microscopy showed the particles are morphologically homogeneous and spherical. In the adsorption kinetics of antigen contained in solution, suffered a 55% adsorption of the particles of chitosan. With this, we observed that it is possible to create a controlled delivery system involving nanoparticles of chitosan and Vi antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi.

Keywords: Vaccines, Vi antigen, Chitosan, Nanoparticle

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Coeficiente de incidência e letalidade da febre tifoide no Brasil. Incidência (Linha cinza) e Letalidade (Linha verde).....	21
Figura 2 – <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhi	22
Figura 3 – Estrutura química do monômero do antígeno Vi de <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhi. NAc, N-acetil; AcO, O-acetil.....	26
Figura 4 - Estruturas das nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	35
Figura 5 - Concentração plasmática efetiva de fármacos em função do tempo em: sistemas convencionais (curva contínua) e sistemas de liberação controlada (curva tracejada).....	37
Figura 6 – Estrutura da quitosana.....	38
Figura 7 - Fluxograma de obtenção do antígeno Vi a partir de cepas de <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhi.....	54
Figura 8 - Espectro de Infravermelho do antígeno Vi puro.....	61
Figura 9 - Espectro de Infravermelho da amostra 1 (cepas mortas por radiação ultravioleta).....	63
Figura 10 - Espectro de Infravermelho do amostra 2 (cepas mortas por acetona).....	63
Figura 11- Espectro de RMN da amostra de antígeno Vi puro mostrando os cinco sinais correspondente ao anel do polissacarídeo na faixa de 4,63 – 4,78 ppm e o pico do grupo N-acetil e O-acetil em 3,29 ppm.....	65
Figura 12 - Espectro de RMN da amostra 1 (cepas mortas por radiação ultravioleta) mostrando os cinco sinais correspondente ao anel do polissacarídeo (à esquerda) e o pico do grupo N-acetil ou O-acetil (à direita)....	66
Figura 13 - Espectro de RMN da amostra 2 (cepas mortas por acetona) mostrando os cinco sinais do anel do polissacarídeo (à esquerda) e o pico do grupo N-acetil e O- acetil (à direita)	66
Figura 14 – Mecanismo de formação das nanopartículas.....	68
Figura 15 – Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de quitosana. a) 0,5% - 0,5% (QS – PMAA); b) 0,8% - 0,5%; c) 1,0% - 0,5%; d) 0,5% - 0,8%; e) 0,8% - 0,8%; f) 1,0% - 0,8%; g) 0,5% - 1,0%; h) 0,8% - 1,0%; i) 1,0% - 1,0%.....	71

Figura 16 - Curva TG/DTG e DTA da quitosana pura em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.....	76
Figura 17 - Curvas TG/DTG e DTA das nanopartículas de QTS - PMAA, nas proporções: A) QS 0,5%- PMAA 0,5%; B) QS 0,8% - PMAA 0,5% e C) QS 1,0% - PMAA 0,5% obtidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) na razão de aquecimento de 10°C/min.....	78
Figura 18– Gráfico da cinética de adsorção do antígeno Vi em solução nas nanopartículas de quitosana 1,0% - 1,0% (QS – PMAA).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Regiões espectrais do infravermelho.....	47
Tabela 2 – Bandas de adsorção na região do infravermelho para o antígeno Vi.....	60
Tabela 3 – Valores do tamanho de partículas e potencial zeta das nanopartículas QS – PMAA.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucinas
LPS	Lipopolissacarídeos
IFN- β	Interferon beta
PMNs	Polimorfonucleares
NAc	N-acetil
AcO	O-acetil
SPI	Ilha de Patogenicidade
rEPA	Endotoxina A Recombinante
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
GD	Grau de Desacetilação
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
SLC	Sistemas de Liberação Controlada
SINAN	Sistema de Informação de agravos de notificação
FTIR	Espectrômetro de Infravermelho de Transformada de Fourier
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
SS	<i>Salmonella – Shigella</i>
RPM	Rotações por minuto
QS - PMAA	Quitosana – poli (ácido metacrílico)
QS	Quitosana
PTA	Ácido Fosfotúngstico

TG	Termogravimetria
DTA	Análise Térmica Diferencial
PPM	Parte por milhão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IG	Imunoglobulina
NK	Natural Killer

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
%	Porcentagem
Kb	Kilobase
°C	Grau Celsius
M	Molar
pH	Potencial de hidrogênio
KDa	Kilo-Dalton
MHz	Mega-hertz
ml	Mililitro
Mg	Miligrama
μl	Microlitro
Nm	Nanômetro
mV	Milivolts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Febre tifoide.....	19
2.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
2.1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.1.3 PATOGENIA.....	22
2.1.4 RESPOSTA IMUNE OU IMUNOPATOLOGIA.....	24
2.1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA – ANTÍGENO Vi.....	25
2.1.6 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	27
2.1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	28
2.1.8 TRATAMENTO.....	30
2.1.9 VACINAS PARA A FEBRE TIFOÍDE.....	31
2.2 Nanotecnologia.....	34
2.2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	34
2.2.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	36
2.2.3 QUITOSANA.....	38
2.2.4 NANOESFERAS DE QUITOSANA.....	41
2.3 Métodos de caracterização.....	43
2.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	43
2.3.2 TAMANHO DE PARTÍCULAS.....	44
2.3.3 POTENCIAL ZETA.....	45
2.3.4 ANÁLISE TÉRMICA.....	45
2.3.5 TÉCNICA DE INFRAVERMELHO.....	46
2.3.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	48
3 OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo geral	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Material	51
4.1.1 MATÉRIAS PRIMAS.....	51

4.1.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	51
4.1.3 EQUIPAMENTOS.....	51
4.2 Métodos.....	52
4.2.1 OBTENÇÃO DA CEPA DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SOROTIPO TYPHI.....	52
4.2.2 ISOLAMENTO DO ANTÍGENO CAPSULAR Vi DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SOROTIPO TYPHI.....	52
4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO Vi.....	55
4.2.3.1 Identificação do antígeno Vi pelo método de infravermelho.....	55
4.2.3.2 Identificação do antígeno Vi pelo método de ressonância magnética nuclear.....	56
4.2.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE POLIMERIZAÇÃO EM MOLDE.....	56
4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QS – PMAA.....	57
4.2.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	57
4.2.5.2 Determinação de tamanho de partícula e potencial zeta.....	57
4.2.5.3 Termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA).....	58
4.2.6 CINÉTICA DE ADSORÇÃO.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Isolamento do antígeno Vi de <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhi.....	59
5.2 Caracterização do antígeno Vi.....	60
5.2.1 IDENTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO Vi PELO INFRAVERMELHO.....	60
5.2.2 IDENTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO Vi PELO MÉTODO DE RMN-H ¹	64
5.3 Obtenção das nanopartículas de QS – PMAA	68
5.4 Caracterização das nanopartículas de QS – PMAA	69
5.4.1 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	69
5.4.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA.....	72
5.4.3 ANÁLISE TÉRMICA DAS NANOPARTÍCULAS.....	75
5.5 Cinética de adsorção.....	80
6 CONCLUSÃO	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

A febre tifoide é uma doença sistêmica, causada pela *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, sendo caracterizada por febre, dor abdominal e manchas rosadas. É uma doença comum em países em desenvolvimento devido esses apresentarem baixo nível social e precárias condições de saneamento. Além disso, é considerada uma doença endêmica no subcontinente indiano, sudeste asiático, África e América Central e do Sul (HOFFER *et al.*, 2000).

A doença ainda hoje é considerada um grande problema de saúde pública afetando no mínimo 20 a 30 milhões de pessoas com grande mortalidade em países em desenvolvimento. No Brasil as regiões Norte e Nordeste são as que apresentam a maior incidência, refletindo, as precárias condições de saneamento básico (SCONDRO *et al.*, 2008).

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi é o agente causador da febre tifoide, trata-se de um bacilo GRAM-negativo, não esporulado, móvel e de 2 a 5 µm de diâmetro. Os bacilos são aeróbios, fermentam manitol e não fermentam lactose, além de produzirem sulfeto de hidrogênio (H₂S). A bactéria possui antígenos de interesse para o diagnóstico da febre tifoide como o antígeno O (antígeno somático), o antígeno H (antígeno flagelar) e o antígeno Vi (antígeno capsular) (BRASIL, 2010).

A transmissão da bactéria está relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados por dejetos humanos e de animais. A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi é transmitida somente pelo homem, mas todas as outras espécies têm um reservatório animal tão significativo quanto o humano (LEVINSON e JAWETZ, 2006).

O antígeno capsular Vi é o principal antígeno de superfície da *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, devido proteger a bactéria da imunidade inata do hospedeiro, além de impedir a opsonização mediada por anticorpos e aumentar a resistência da *Salmonella enterica* sorotipo Typhi à ação do sistema complemento (CAMPOS, 2008).

A utilização do antígeno Vi em vacinas parenterais se iniciou com um histórico de bastante sucesso, proporcionando uma boa imunidade, produzindo cerca de 90% de anticorpo anti-Vi, porém, apresentou concomitantemente reação adversa como dor e endurecimento local em 20 a 30% dos indivíduos, além de raros casos de febre. Uma das formas de se tentar evitar reações adversas pelo antígeno é o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada constituído de polímero, como quitosana, que possa reduzir o número de doses, obtendo a resposta imune desejada por mais tempo (VIRLOGEUX-PAYANT e POPOFF, 1996).

A quitosana é um polímero de origem natural que apresenta características que fazem dela um polissacarídeo de grande interesse para um número expressivo de aplicações, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioreabsorção e bioatividade; por ser quimicamente modificada e ser processada em diferentes formas. Considerada forte candidata no desenvolvimento de sistemas de liberação de vacinas, como nanopartículas, em função das propriedades que podem ser ajustadas como: concentração, carga e pH (MOURA *et al.*, 2008).

Produzir e modular as propriedades físico-químicas das nanopartículas de quitosana pode ser um caminho interessante para controlar a liberação de fármacos e vacinas, e conseqüentemente, melhorar a administração e índice terapêutico (ARAL *et al.*, 2000).

Neste contexto, considera-se que o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada utilizando a quitosana como veículo carreador do antígeno capsular Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi seja uma alternativa de interesse no campo da imunização para o tratamento contra a febre tifoide.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Febre tifoide

2.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A febre tifoide faz parte do sistema de informação de agravos de notificação (SINAN) do Ministério da Saúde brasileiro. Trata-se de uma doença endêmica em países pobres e em países em desenvolvimento, onde a qualidade da água é duvidosa e a ausência de saneamento básico persiste. Já em países desenvolvidos, a incidência de febre tifoide é baixa e geralmente está associada a viagens recentes, dos pacientes diagnosticados, para regiões endêmicas (CONNOR e SCHWARTZ, 2005; PARRY *et al.*, 2011; BRASIL, 2012).

Em 1829, Louis, em Paris, descreveu a febre tifoide, diferenciando-a de outras febres, onde relatou as características clínicas das lesões intestinais, dos nódulos linfáticos e do baço. Bretonneau, na França, e Smith, nos Estados Unidos, reconheceram a difusão da doença através do contágio e a criação de imunidade. Em 1880, Eberth descobriu o agente etiológico da doença em tecidos de pacientes infectados (IVANOFF *et al.*, 1994).

Em 1884, o bacteriologista alemão Gaffky isolou o bacilo da *Salmonella enterica* sorotipo Typhi a partir de fragmentos de baço de pacientes infectados. Outros estudos foram realizados, obtendo-se avanços na identificação sorológica e no isolamento da bactéria, através do teste de Widal em 1896 e a hemocultura de Schotmüller, em 1900, respectivamente (MARQUES, 2011).

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

A febre tifoide é uma doença endêmica em países da África, Ásia, América do Sul, Caribe e Oceania (exceção da Austrália e Nova Zelândia). Estudos recentes revelam que há aproximadamente 22 milhões de casos de febre tifoide a cada ano, com 200.000 mortes. A incidência da febre tifoide em áreas endêmicas é tipicamente alta em crianças em idade escolar e jovens, enquanto é baixa em recém-nascidos e em adultos. Já os idosos são relativamente resistentes, devido à alta frequência de imunidade. A mortalidade é maior em crianças menores de um ano (MAHLE e LEVINE, 1993; BOYD, 1995; ANGERAMI, 2009).

Os casos da doença em áreas com pouca prevalência decorrem muito a partir de portadores que viajaram para as áreas endêmicas. Contudo o diagnóstico da doença é dificultado, pois, muitas vezes, é confundido com diversas outras doenças febris, além de que em muitas áreas endêmicas há uma carência na facilidade de confirmação e notificação do diagnóstico (ACKERS *et al.*, 2000; CRUMP *et al.*, 2004; ANGERAMI, 2009).

Nos Estados Unidos, em 1926, o índice de morte era de 20,54% numa população de 100.000 habitantes, enquanto que, em 1973, apenas 680 casos foram confirmados, com sete mortes. Atualmente, a doença é rara, em que aproximadamente 400 casos são reportados ao ano. A maioria (70%) é de pessoas que apresentavam histórico de viagens para áreas endêmicas do mundo. A mortalidade é rara, sendo um pouco mais de 1% (FILHO *et al.*, 1994; MERMIN *et al.*, 1998).

No Brasil, nas últimas décadas, observa-se um declínio na incidência e letalidade da doença (Figura 1) até 2009, segundo dados do Ministério da Saúde. Sua incidência reduziu de 1,5 por 100.000 habitantes, em 1995, para 0,1 por 100.000 habitantes, em 2009 (BRASIL, 2010).

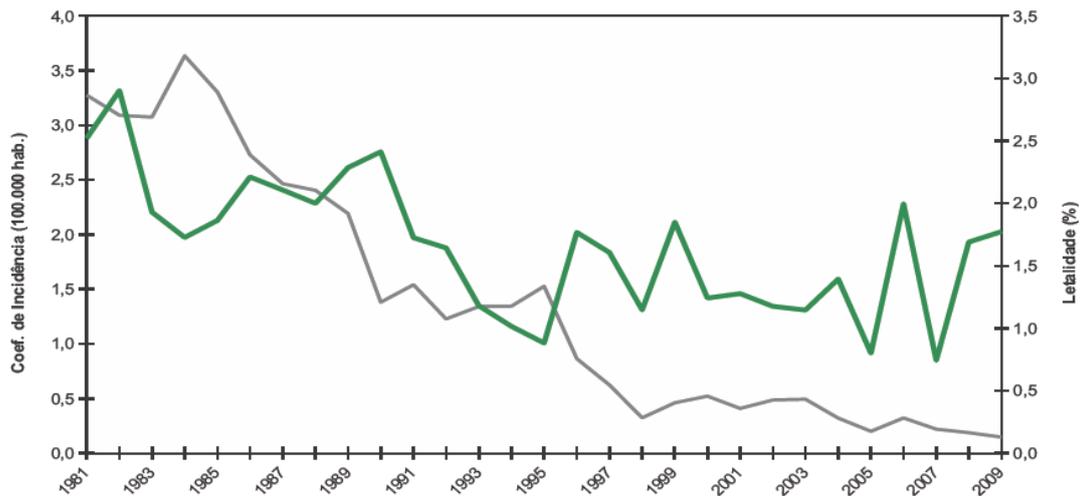


Figura 1: Coeficiente de incidência e letalidade da febre tifoide no Brasil. Incidência (Linha cinza) e Letalidade (Linha verde) (BRASIL, 2010).

Nos anos de 2001 a 2006, foram registrados 3.749 casos de febre tifoide no Brasil, com 30 óbitos, sendo que ocorreram principalmente nas regiões Norte e Nordeste, com destaque para os Estados do Acre (741 casos/3 óbitos), Bahia (671 casos/3 óbitos), Maranhão (592 casos/1 óbito), Pará (665 casos/3 óbitos) e Amazonas (333 casos/3 óbitos). No Pará, os surtos de febre tifoide, que acometeram muitas pessoas, ocorreram no interior do Estado, nos municípios de Óbidos, em 1997, de Mojú, em 1999, e de Anajás, em 2001 (SOUZA *et al.*, 2010).

Oliveira *et al.* (2009) avaliaram registro de febre tifoide no Estado da Bahia, no período de 2003 – 2006, onde foram notificados 852 casos em 2003, e 144 em 2004 e 2006, com isso, confirmando o declínio de casos da doença. No Paraná, entre 1980 – 2003, 1030 casos foram notificados, sendo a incidência em 2003 de 0,01 casos/100.000 habitantes (SCONDRO *et al.*, 2008).

Dados recentes divulgados pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Amapá – LACEN/AP apontaram um aumento dos casos notificados de febre tifoide em 2011 na capital do Macapá-AP, apresentando um aumento de 38 para 50 notificações, com 21 confirmações (ALVES, 2011).

2.1.3 PATOGENIA

O gênero *Salmonella* Spp na classificação atual é dividido em duas espécies, a *Salmonella enterica* e a *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* ainda pode ser dividida em diferentes sorotipos, entre esses, a *Salmonella enterica* sorotipo Typhi (CAMPOS, 2008).

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi é o agente etiológico da febre tifoide. A bactéria pertence à família das enterobactérias, apresentando a forma bastonete (Figura 2). É anaeróbio facultativo, reduz nitrato a nitrito, fermenta glicose e outros carboidratos formando ácidos e produzem sulfeto de hidrogênio (H₂S). Possui três diferentes antígenos: o antígeno O, que é o Antígeno Somático da membrana externa; o Antígeno Flagelar H, que é de natureza proteica e o Antígeno Capsular Vi, que é responsável por sua virulência (LEVINSON e JAWETZ, 2006; BRASIL, 2010; MARQUES, 2011).

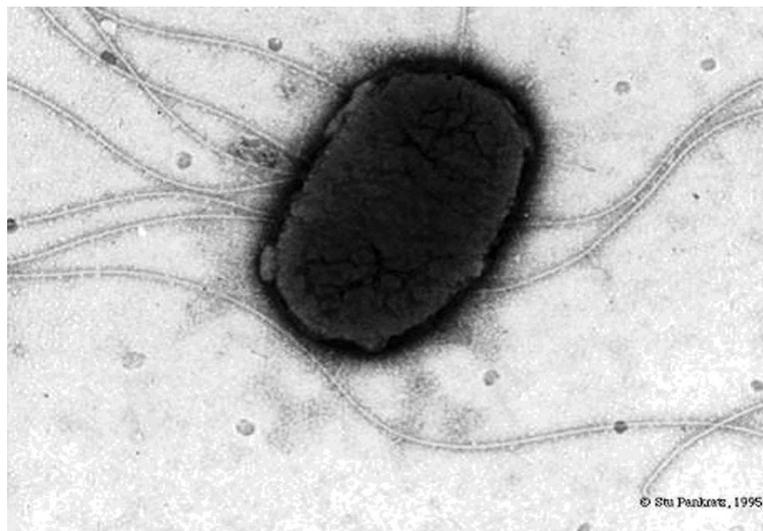


Figura 2: *Salmonella enterica* sorotipo Typhi (BRASIL, 2008).

O ser humano é o único reservatório e hospedeiro natural da *Salmonella enterica* sorotipo Typhi. A transmissão da bactéria ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes contendo o patógeno ou ainda de forma mais rara de pessoa para pessoa (contato direto). A sua distribuição no mundo está estreitamente relacionada com o desenvolvimento socioeconômico da localidade (QUINTAES *et al.*, 2000 *apud* BASTOS *et al.*, 2008; MARQUES, 2011).

O período de incubação da doença é variável, geralmente, oscilando de três dias a dois meses, dependendo muito do tamanho do inóculo e da imunidade do paciente (MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

As bactérias podem sobreviver por longo período em água, gelo e matéria seca de esgoto, onde servirão como fonte de infecção. Em áreas endêmicas, o pico de transmissão da doença ocorre no período seco ou no começo do período chuvoso. A ingestão de comidas preparadas na rua, como sorvetes, sucos e saladas, são fatores de risco que aumentam a incidência da doença. A transmissão, também, pode ser atribuída a acidentes em laboratórios, instrumentos não esterilizados e contaminação por moscas (VELEMA *et al.*, 1997; LUXEMBURGER *et al.*, 2001).

Após a ingestão, as bactérias chegam ao intestino delgado, atravessam e invadem a parede intestinal, onde penetram em macrófagos teciduais. Há o recrutamento de outras células do sangue, assim, fazendo com que a bactéria consiga se disseminar pela corrente sanguínea, causando uma bacteremia. Esta fase seria assintomática (LEVINSON e JAWETZ, 2006).

As bactérias localizadas no sangue multiplicam-se dentro de órgão, como o fígado, baço e medula óssea, sendo que ocorre dentro de células da linhagem monocítica. A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi retorna ao sangue, causando a bacteremia secundária, que é sintomática. Neste período a doença pode regredir ou continuar para um desenvolvimento mais severo. Em alguns casos, pode ocorrer uma infecção crônica assintomática, na qual a bactéria persiste na vesícula biliar (CAMPOS, 2008).

A sintomatologia da doença consiste em febre prolongada, cefaleia, anorexia, bradicardia relativa, esplenomegalia, manchas rosadas (roséolas tíficas),

esplenomegalia, desconforto abdominal (constipação em adultos e diarreias em crianças) e tosse seca. A febre é explicada devido à liberação de pirogênicos endógenos (Interleucinas (IL) - 1, por exemplo) pelos macrófagos infectados, enquanto a hiperplasia das placas de *Peyer*, com ulcerações, é responsável pelas manifestações intestinais, como dor abdominal, diarreia, sangramento ou perfuração intestinal (BRASIL, 2010; SCONDRO *et al.*, 2008).

Atualmente, o quadro clínico completo é observado raramente, sendo a febre a manifestação mais expressiva acompanhada por um ou outro sintoma. Nas crianças, o quadro clínico é menos grave do que nos adultos, nos quais a diarreia é mais frequente (BRASIL, 2010).

2.1.4 RESPOSTA IMUNE OU IMUNOPATOLOGIA

A resposta imune celular constitui uma parte crítica na defesa do hospedeiro contra a agressão de certas bactérias intracelulares, assim como a *Salmonella enterica* sorotipo Typhi (intracelular). Uma ótima resposta contra essas bactérias requer usualmente a combinação de diferentes elementos do sistema imunitário (MORENO, 2009).

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, quando atravessa e invade a parede intestinal, induz a secreção de IL-6. Os macrófagos do tecido intestinal, ao fagocitarem as bactérias, liberam várias citocinas, como a IL-1. Isso causa o recrutamento de monócitos e outras células inflamatórias do sangue. As citocinas são importantes na regulação da resposta imune do hospedeiro contra a doença (FIDAN *et al.*, 2008).

A bactéria pode sobreviver em células fagocíticas mononucleares como os macrófagos localizados no espaço tecidual entre o intestino e o sistema circulatório. Estudos demonstraram que, quando a *Salmonella enterica* sorotipo Typhi invade o organismo, as células NK (Natural Killer) secretam a citocina IFN- γ (Interferon gamma), que são responsáveis por ativar os macrófagos, onde esta ação é a chave

da imunidade inata contra o patógeno (VAZQUES-TORRES *et al.*, 1999; SASHINAMI *et al.*, 2006).

O IFN- γ restringe a multiplicação das bactérias no estágio inicial de crescimento bacteriano. Esta proteína é o principal produto de células Th1 (que são populações efetoras das células CD4⁺), promovendo a essas células características efetoras no mecanismo de imunidade mediado por células (via ativação de células NK) e ativação de macrófagos (SCHRODER *et al.*, 2004).

Os lipopolissacarídeos (LPS) das *Salmonellas* são responsáveis pelos efeitos endotóxicos, contribuindo para a resposta inflamatória local nas células intestinais, promovendo diarreia. Estudos demonstraram que a ativação dos macrófagos pelas LPS resulta na liberação de várias citocinas inflamatórias, semelhantes as IL-6 e IFN- β (Interferon beta) (ZHANG *et al.*, 2008; MORENO, 2009).

2.1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA – ANTÍGENO Vi

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi tem fatores de virulência como as fimbrias responsáveis pela adesão nas células intestinais e os LPS, que são considerados um fator de virulência porque protegem a bactéria da ação letal das defensinas. Porém, o mais importante fator é o antígeno de superfície que protege a bactéria do mecanismo da imunidade inata, chamado antígeno capsular Vi (CAMPO, 2008).

O antígeno Vi é também encontrado em *Salmonella Paratyphi C*, *Salmonella* Dublin e *Citrobacter ballerup*. O antígeno Vi é antifagocitário e um importante fator de virulência da bactéria. Felix e Pitt (1934) chamaram a cobertura antigênica da *Salmonella enterica* sorotipo Typhi de “antígeno Vi” devido ao fato deste apresentar a capacidade de aumentar a virulência da bactéria (daí a denominação Vi) em infecções de ratos e causar uma resposta imune em coelhos (EDWARDS e EWING, 1986).

Estudos foram realizados com objetivo de mostrar a capacidade do antígeno de proporcionar a virulência; Hone *et al.* (1988) demonstraram que, quando se removia o antígeno Vi de cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, estas ficavam mais vulneráveis em ensaios realizados em ratos quando comparados com ratos inoculados com as mesmas cepas contendo o antígeno.

O mecanismo de virulência do antígeno Vi foi examinado *in vitro*, sendo, no início dos trabalhos, definido que o antígeno evita a fagocitose pelos polimorfonucleares (PMNs), além de aumentar a resistência da bactéria contra o processo oxidativo pós-fagocitose. O antígeno diminui a fixação do fator complemento C₃ (MILLER *et al.*, 1972; KOSSACK *et al.*, 1981; LOONEY e STEIGBIGEL, 1986).

Do grupo das *Salmonellas spp*, o sorotipo Typhi possui o antígeno capsular Vi, sendo composto basicamente por um homopolímero linear de ligação 1 → 4 ácido galacturônico-2-desoxi-N- acetil, onde o grupo do carbono 3 é variável em O-acetil na forma de monômero (Figura 3). A união desses monômeros forma um polissacarídeo de alto peso molecular (tipicamente, maior do que 10⁶ dáltons). O Vi assemelha-se com as glicosaminas de mamíferos com repetidas unidades de açúcares contendo tanto N-acetil como grupo ácido urônico (HEYNS *et al.*, 1959; KARAKAWA e VANN, 1982; DANIELS *et al.*, 1989).

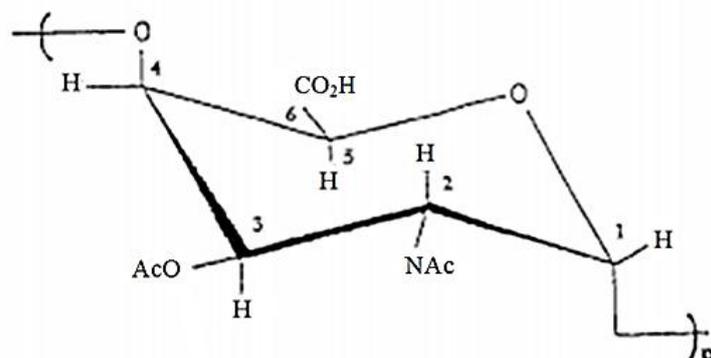


Figura 3: Estrutura química do monômero do antígeno Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi. NAc, N-acetil; AcO, O-acetil (STONE e SZU, 1988).

Estudos genéticos sobre *Salmonella enterica* sorotipo Typhi demonstraram que existem no mínimo dois *loci* gênicos, designados Via A e Via B, que são responsáveis por expressarem o antígeno capsular Vi, além disso, estes genes podem ser transferidos para outras bactérias que não possuem a capacidade de produzir o antígeno, passando a produzi-lo, como a *Salmonella typhimurium*. O *locus* de via A é comumente encontrado nas bactérias entéricas, porém o de via B é específico para cepas que expressam o antígeno Vi (JOHNSON *et al.*, 1965; JOHNSON *et al.*, 1966; JOHNSON e BARON, 1969).

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi possui as chamadas ilhas de patogenicidade (SPI), que são grupos de genes responsáveis pela expressão dos fatores de virulência. A ilha de patogenicidade responsável pela produção do antígeno Vi é a SPI-7, que tem um comprimento de 134kb. Além disso, o SPI-7 possui o operon via B (HASHIMOTO *et al.*, 1993; ZHOU e GALÁN, 2001).

Vários métodos de isolamento e purificação do antígeno capsular Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi foram desenvolvidos, destacando-se o fracionamento de extratos de bactérias com etanol na presença de cloreto de sódio seguido por hidrólise com ácido acético, além de método que utiliza a extração salino-etanol em várias temperaturas. Para uma identificação sorológica do antígeno Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, normalmente se realiza a precipitação em lâmina, utilizando o sorokit para *Salmonella* que emprega soros para antígeno Vi (WONG e FEELEY, 1972; SCODRO *et al.*, 2008).

2.1.6 PREVENÇÃO E CONTROLE

A febre tifoide pode ser prevenida por medidas simples como higiene pessoal, tratamento apropriado de fezes, através da criação de uma rede de esgoto satisfatória, abastecimento de água clorada com monitoramento periódico para verificar a presença de coliformes fecais e boas práticas de manipulação de alimentos, sendo realizado exame de fezes das pessoas que irão manipulá-los (LEVINSON e JAWETZ, 2006).

Outra forma de prevenção é a vacinação, que é indicada para aqueles que viajarão para áreas endêmicas por mais de 30 dias ou que vivem nessas áreas, que apresentam condições precárias de saneamento básico e higiene. As vacinas atualmente disponíveis no mercado apresentam eficácia variável de 50% a 70% (CHINWA *et al.*, 2008).

A primeira vacina foi desenvolvida no final do século 19 e consistia de bactérias mortas pelo calor e preservadas em fenol, sendo que eram administradas por via parenteral. Essa vacina, embora apresentasse razoável eficácia (60 a 70% de proteção por um período de 7 anos), causava fortes reações adversas, como febre e convulsões na maior parte dos indivíduos que a utilizavam. Por esse motivo, essa vacina foi substituída a partir da década de 70 (BASTOS, 2008).

Hoje, é possível citar vacinas de organismo vivo atenuado, Ty21a, que são administradas oralmente, porém necessitam de várias doses para alcançar uma proteção razoável. Vacinas contendo polissacarídeo capsular Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi utilizadas para administração intramuscular, também, podem ser utilizadas como forma de prevenção, porém ambas as vacinas têm eficácia limitada em crianças (LEVINSON e JAWETZ, 2006; CUI *et al.*, 2010).

Resultados promissores foram obtidos com vacinas conjugadas contendo polissacarídeo capsular Vi, que revelaram eficácia na proteção de crianças de 1 a 5 anos. Essas vacinas apresentaram proteção de 89% em crianças do Vietnã de 2 a 5 anos, por 46 meses (CAMPOS, 2008; CUI *et al.*, 2010).

2.1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A febre tifoide é uma doença bacteriana de apresentação clínica mais diversa, e, em geral, o diagnóstico não é confirmado antes do final do curso da doença. Por conseguinte, há quase sempre uma dependência do diagnóstico laboratorial para se confirmar ou descartar a doença (FILHO *et al.*, 1994).

O diagnóstico laboratorial da *Salmonella enterica* sorotipo Typhi baseia-se inicialmente no isolamento e na identificação do agente etiológico a partir de diferentes materiais clínicos como fezes (coprocultura), urina (urocultura), sangue (hemocultura), aspirado medular (mielocultura) e bile (BRASIL, 2002).

O isolamento da bactéria a partir das fezes parte da preparação de uma suspensão fecal, onde uma alíquota é transferida para tubos contendo meios de enriquecimento e placas contendo meios seletivos, e, então, colônias são transferidas para meio ágar nutriente para que se realizem testes bioquímicos e sorológicos para a confirmação do diagnóstico (BRASIL, 2010).

O diagnóstico de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi utilizando-se culturas de fezes é indicado a partir da segunda até a quinta semana da doença. A princípio, o sucesso do isolamento da *Salmonella* está na coleta e conservação das fezes até aplicação dos métodos laboratoriais. Assim, quando coletada, a amostra deve ser remetida ao laboratório no tempo máximo de duas horas, em temperatura ambiente, e seis horas, sob refrigeração (4 a 8°C) (BRASIL, 2010).

A mielocultura é o exame mais sensível (90% de sensibilidade) e que tem a vantagem de apresentar positividade mesmo na vigência de antibioticoterapia prévia. Já a desvantagem ocorre em razão do desconforto para o doente e necessidade de pessoal com treinamento específico para o procedimento da punção medular. Para a urocultura o diagnóstico é limitado e a positividade máxima ocorre na terceira semana da doença (BRASIL, 2002).

A hemocultura tem alta positividade na primeira e segunda semana da doença, com positividade de 80%. O sangue coletado é transferido para tubo contendo meios de culturas, como o caldo biliado e, então, feita a bacterioscopia pelo método de GRAM. São feitos repiques em meio ágar nutriente para, no final, realizar-se teste bioquímico e sorológico (BRASIL, 2010).

A reação de Widal também é utilizada para o diagnóstico da febre tifoide. Esta reação consiste em um teste sorológico que se baseia no princípio da aglutinação de antígeno – anticorpo, dessa maneira, determinando-se a presença de anticorpos contra os antígenos O e H. Porém, devido à sua falta de especificidade, deve ser interpretado junto com um contexto clínico. Atualmente, o teste é pouco utilizado em

razão dos resultados falso-positivos, que ocorrem graças à reação cruzada com aglutininas formadas contra sorotipo do grupo D de *Salmonella* e vacinação anterior contra a febre tifoide (ZUÑIGA, 2006; MARQUES, 2011).

Recentemente, estudos com métodos moleculares utilizando protocolos de Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), sondas de DNA (desoxiribonuclease) e técnicas de ELISA, também, têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados para a detecção da *Salmonella enterica* sorotipo Typhi diretamente no sangue, nos casos de hemoculturas negativas (SCONDRO *et al.*, 2008).

2.1.8 TRATAMENTO

O cloranfenicol é considerado a droga de primeira escolha para o tratamento da doença, apesar de serem publicados diversos casos de resistência ao medicamento ocorridos na África e Ásia devido a seu baixo custo e resposta terapêutica satisfatória (SOUZA *et al.*, 2010).

O Ministério da Saúde preconiza para o tratamento da febre tifoide, causada pela *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, o emprego do cloranfenicol ou da ampicilina, do sulfametoxazol – trimetoprima e da amoxicilina, ou, ainda, em situações que impeçam o emprego destes, o uso de ciprofloxacino, ofloxacino ou ceftriaxona (PARRY *et al.*, 2002; BRASIL, 2007).

Por sua vez, o tratamento da febre tifoide tem sido dificultado devido às inúmeras resistências que têm ocorrido a medicamentos clássicos, como o cloranfenicol, a ampicilina e o sulfametoxazol – trimetoprima. Nestes casos, esses medicamentos estão sendo substituídos pelas cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas (CAMPOS, 2008).

A resistência ocorre devido ao uso indiscriminado dos antimicrobianos para o tratamento da febre tifoide e da automedicação sem uma investigação adequada para um diagnóstico laboratorial (SOUZA *et al.*, 2010).

Tratamento de suporte pode ser empregado também para auxiliar na melhora do paciente, como a reidratação do doente, porque este perde muito líquido, causado pelas diarreias. Além disso, não devem ser administrados ao paciente medicamentos como laxantes, além da ingestão de alimentos hiperlipídicos ou hipercalóricos. É importante atentar também para a importância do repouso e de cuidados com a higiene (BRASIL, 2010).

2.1.9 VACINAS PARA A FEBRE TIFOIDE

A vacinação é considerada a melhor estratégia no controle da febre tifoide. A vacina para a prevenção da doença está entre as principais indicadas para aqueles que viajam ou vivem em área endêmica, estando na frente de vacinas para difteria – tétano, hepatite A, hepatite B e febre amarela (SHINWA *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2010).

Diferentes estudos têm sido feitos para o desenvolvimento de vacinas contra a *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, apresentando grandes índices de imunidade. As principais vacinas desenvolvidas são aquelas parenterais, compostas de células inteiras inativadas ou de polissacarídeo capsular Vi e oral, composta de bactérias vivas atenuadas (GUZMAN *et al.*, 2006).

As vacinas de células inteiras inativadas são obtidas por micro-organismos inativados por aquecimento ou tratamento químico, e sua administração é por via parenteral. A introdução desta vacina ocorreu simultaneamente na Inglaterra e Alemanha, em 1986, para a proteção contra a febre tifoide (SHANDERA *et al.*, 1985).

Estudos demonstraram que a vacina de células inteiras inativadas tem uma eficácia de 51 a 88% em criança e adultos, sendo que a proteção permanece por até 7 anos. Apesar de conferir alta proteção contra a febre tifoide, o seu uso global como ferramenta na saúde pública, atualmente, é pequeno devido à sua alta reatogenicidade, como febre, dor de cabeça e severas dores locais (ASHCROFT *et*

al., 1964; ASHCROFT *et al.*, 1967; TAPA e CVJETANOVIC, 1975; ENGELS *et al.*, 1998).

As vacinas de bactérias vivas atenuadas são administradas oralmente e, comumente, estão associadas a baixo índice de reação adversa local ou sistêmica. A *Salmonella enterica* sorotipo Typhi Ty21a é uma cepa mutante atenuada e utilizada para a preparação dessas vacinas (LEVINE, 2003).

A Ty21a vem da cepa Ty2, através da mutação realizada no gene galE, que resulta na completa deficiência da enzima difosfato uridina (UDP)-galactose-4-epimerase, que é responsável pela conversão da UDP-galactose em UDP-glucose e vice-versa. Com isso a UDP-galactose acumula-se no citoplasma, o que causa a atenuação da bactéria (GUZMAN *et al.*, 2006).

As vacinas orais de bactérias vivas têm resposta mediada por célula e produção de IgA mucosa nasal, que são provavelmente responsáveis em maior parte pela proteção (LEDER *et al.*, 2001).

Outra abordagem foi o desenvolvimento de vacinas a partir de subunidades, como o polissacarídeo capsular Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi purificado. O antígeno é precipitado em sobrenadantes de culturas de bactérias, purificado e seco a vácuo para então ser ressuspendido em tampão (LANDY, 1954).

A vacina constituída pelo antígeno capsular Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi tem despertado grande interesse, por ser mais efetiva e segura em relação às vacinas baseadas em células inativadas de *Salmonella spp* (ROBBINS e ROBBINS, 1984; HESSEL *et al.*, 1999).

Desde então, vários estudos foram realizados para o desenvolvimento de vacinas constituídas de antígeno Vi. Inicialmente, estudos utilizando antígeno Vi purificado não obtiveram sucesso na proteção, tanto em chimpanzés como em humanos. Posteriormente, as características imunológicas do antígeno foram mantidas em vacinas parenterais, tendo boa tolerância e imunogenicidade, porém ocorreram reações adversas, como dor e endurecimento local em 10 a 20% das vacinas (LANDY, 1954; ROBBINS e ROBBINS, 1984; TACKET *et al.*, 1986).

A vacina de polissacarídeo Vi é licenciada em vários países para uso comercial, sendo usada principalmente por viajantes, pessoas que trabalham em laboratórios e na área de saúde (PLOTKIN e BOUVERET LE CAM, 1995).

A eficácia de vacinas ligadas ao antígeno capsular Vi foi avaliada no Nepal e no sul da África, em pessoas de 5 a 44 anos e 5 a 15 anos, respectivamente. A eficácia no Nepal foi de 72% em casos confirmados de febre tifoide nos últimos 20 meses após a imunização. No sul da África, a eficácia foi de 50% e 61,52% no primeiro e segundo anos, respectivamente, após a imunização. Estudos demonstram que vacinas Vi não são adequadas para uma imunização rotineira de crianças e jovens em razão da sua imunogenicidade relacionada à idade e independência às células T (ARCHARYA *et al.*, 1987; KEDDY *et al.*, 1999; CUI *et al.*, 2010).

Recentemente, a utilização de um conjugado entre o antígeno capsular Vi e a endotoxina A recombinante (rEPA) de *Pseudomonas aeruginosa* tem indicado eficácia protetora em crianças de 1 a 5 anos de idade. A ligação do antígeno Vi com proteínas confere dependência com relação à resposta por células T e aumenta a imunogenicidade da vacina de antígeno Vi. Estudos clínicos com conjugado Vi-rEPA verificaram proteção de 89% em crianças do Vietnã de 2 a 5 anos, por 46 meses (KOSSACZKA *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2001; MAI *et al.*, 2003; CAMPOS, 2008; CUI *et al.*, 2010).

A conjugação dos polissacarídeos às proteínas carreadoras muda a resposta antipolissacarídica para uma resposta T dependente, cujas células B, ao reconhecerem, processam o carreador proteico e apresentam os epítopos peptídicos às células T-CD⁴⁺, induzindo a produção de níveis elevados de anticorpos. Além disso, esta dependência cria a chamada memória imunológica, que é responsável por gerar uma reação rápida, intensa e específica, numa resposta secundária ao antígeno exposto às células T (SÁFADI e BARROS, 2006; ABBAS *et al.*, 2008).

2.2 Nanotecnologia

2.2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Esta ciência tem o objetivo de desenvolver novos materiais funcionais, dispositivos e sistemas através do controle da matéria na escala nanométrica, sendo exploradas as novas propriedades físicas, químicas e biológicas adquiridas com a modificação (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA *et al.*, 2009; HOLAND *et al.*, 2009).

A nanotecnologia no Brasil vem produzindo vários resultados na área farmacêutica e de interface com a biotecnologia, entre os quais, podemos citar os nanocarreadores, usados em cosméticos e medicamentos, como alguns antitumorais (ZANETTI-RAMOS e CRECZYNSKI, 2008).

Nas várias tecnologias empregadas em nanoproductos, o nanoencapsulamento talvez seja o mais interessante, pois permite a utilização de materiais líquidos e sólidos, bem como o controle da composição e das características da camada protetora possibilita a verificação da cinética de liberação dos produtos encapsulados (ARAKI, 2007).

O reconhecimento da nanotecnologia, como uma tendência tecnológica, avançou a partir de 1998. A consciência global do potencial desta nova tecnologia criou uma competição científica e tecnológica, movendo recursos humanos e financeiros na indústria mundial. As nanopartículas têm atraído grande atenção dos pesquisadores por causa das suas potencialidades terapêuticas, maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o seu armazenamento (BENOIT *et al.*, 1986; SOPPIMATH *et al.*, 2001; ZANETTI-RAMOS e CRECZYNSKI, 2008).

As nanopartículas são dispersões líquidas ou sólidas com um tamanho inferior a 1 μ m. As nanopartículas são divididas em nanocápsulas e nanoesferas que se diferenciam de acordo com a sua composição estrutural (Figura 4). As nanocápsulas são formadas por um invólucro disposto ao redor de um núcleo oleoso, cujo fármaco ou antígeno pode estar adsorvido neste núcleo ou na parede

polimérica. E as nanoesferas, que não apresentam óleo na sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, em que fármaco ou antígeno fica adsorvido ou retido. Em virtude de seu tamanho, pode ser realizada modificação nas suas propriedades físico-químicas, criando novas funções para as nanopartículas (MAINARDES *et al.*, 2006; ZHANG e WEBSTER, 2009; LUNA e ANDRADE, 2011).

O desenvolvimento desses sistemas visa a inúmeras aplicações terapêuticas, principalmente, para administração parenteral ou oral. Na administração parenteral, pode ser utilizada na distribuição de fármacos anticancerígenos e de antibióticos. Na administração oral, por sua vez, visa-se principalmente à diminuição de efeitos colaterais, à proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal e ao aumento da biodisponibilidade de fármacos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

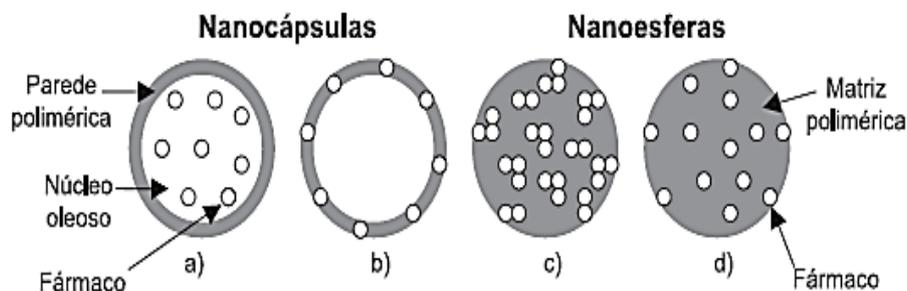


Figura 4: Estruturas das nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanopartículas se comportam quase como um fluido, quando dispersadas no ambiente, devido ao seu tamanho diminuto e elevada energia superficial. Com isso, elas podem facilmente ser adsorvidas no trato respiratório chegando aos alvéolos. Entretanto, por causa de sua elevada energia superficial, podem ocorrer aglomerações entre as nanopartículas, o que aumentaria sua massa e volume (SILVA, 2008).

Outra aplicação das nanopartículas está na liberação de antígenos em vacinas, criando imunidade. Recentes pesquisas demonstraram as vantagens na

encapsulação de antígenos em modelos animais, mostrando a capacidade das nanopartículas em desenvolver uma ótima imunização (SAHOO *et al.*, 2007).

2.2.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

O principal objetivo de um fármaco, quando administrado, é atingir concentrações plasmáticas ou níveis de concentrações adequadas nos tecidos, sendo terapeuticamente efetivo e não tóxico, por um longo tempo (MOURA, 2009; COIMBRA, 2010).

Os sistemas de liberação controlada (SLC) são sistemas promissores em relação ao aumento da eficácia terapêutica de um fármaco através da manutenção de níveis dos fármacos dentro da faixa terapêutica, diminuindo significativamente a toxicidade e reduzindo a necessidade de várias doses, em relação ao sistema convencional; isso leva conseqüentemente à melhor adesão do paciente ao tratamento (Figura 5). Entre esses sistemas, têm-se as nanoesferas, que apresentam cinéticas de adsorção rápidas e maior facilidade de manuseio e operação (VILA *et al.*, 2002; DENKBAS *et al.*, 2002; DAUGHERTY e MRSNY, 2006).

A utilização de um sistema de liberação controlada representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir para o desenvolvimento da saúde humana. Esses sistemas oferecem inúmeras vantagens quando comparados com o sistema convencional, como: maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência do fármaco na circulação; administração segura e conveniente (menor número de dose); direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas, e possível incorporação tanto de substâncias hidrofílicas como lipofílicas (AZEVEDO, 2002).

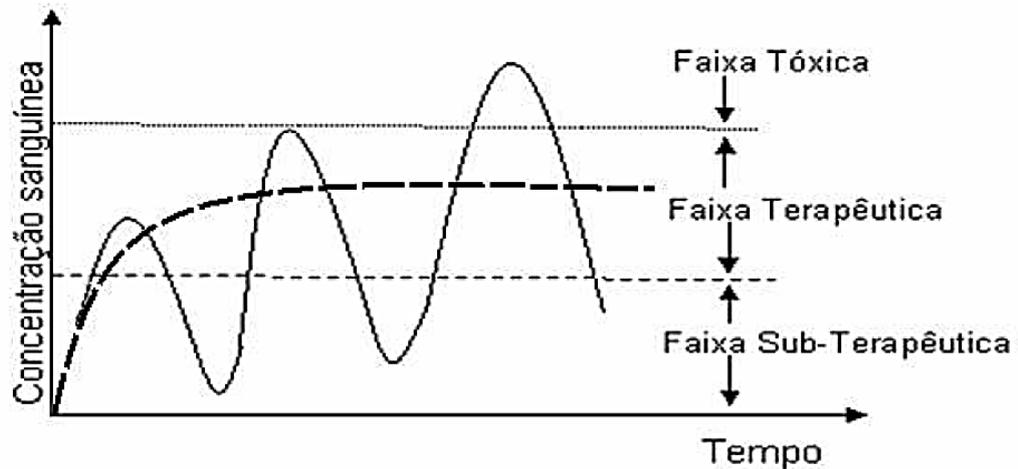


Figura 5: Concentração plasmática efetiva de fármacos em função do tempo em: sistemas convencionais (curva contínua) e sistemas de liberação controlada (curva tracejada) (AZEVEDO, 2008).

Nos últimos anos, esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de tecnologias ao sistema de liberação controlada. Espécies coloidais, como lipossomas micro e nanopartículas, vêm sendo extensamente estudadas para esse sistema que, em geral, pode ser utilizado para melhorar a biodisponibilidade, manter o efeito do fármaco no tecido alvo, solubilizar fármacos, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (MOURA, 2009).

Grande variedade de polímeros, sintéticos e naturais ou semissintéticos, podem ser aplicados no desenvolvimento de um sistema de liberação controlada. Um requisito para escolher o material a ser utilizado nesta finalidade é que este polímero e os seus produtos não sejam tóxicos e apresentem uma boa biodisponibilidade, pelo menos nos tecidos que vão entrar em contato direto (COIMBRA, 2010).

O princípio ativo, no sistema de liberação controlada, é encapsulado em uma matriz polimérica, a qual poderá ser moldada conforme via de administração (PANYAM e LABHASETWAR, 2003; MOURA, 2009).

São vários os mecanismos que controlam a liberação da substância ativa, como a erosão, difusão e intumescimento. A predominância de um desses mecanismos depende do excipiente polimérico a ser utilizado (LOPES *et al.*, 2005).

2.2.3 QUITOSANA

A quitosana (Figura 6) é um polissacarídeo amino derivado do processo de desacetilação da quitina. O processo de desacetilação da quitina ocorre em meio básico com a solução de hidróxido de sódio a 40%, sob temperatura de 120°C, durante um período de 3 horas. Esse processo de desacetilação envolve a remoção dos grupos acetil da cadeia de quitina, resultando em grupos amino livres (NH₂). A reação de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana não ocorre de forma total, de modo a obter um homopolímero 100% desacetilado, estruturalmente; sendo assim, a quitosana pode ser considerada um copolímero com unidades 2-amino - 2-desoxi-D-glicose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, as quais são unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 → 4), com sua estrutura C6 sendo composta de um grupo amino primário e dois grupos hidroxilas livres (PETER, 1995; RAVI KUMAR, 2000; ASSIS; SILVA, 2003; SILVA, 2005; GEORGE e ABRAHAM, 2006; ABDEL- FATTAH *et al.*, 2007; SOUZA, 2009).

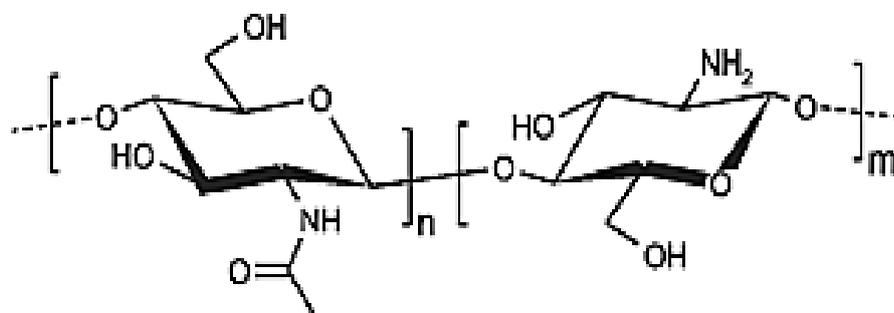


Figura 6: Estrutura da quitosana (SILVA, 2006).

A quitosana é considerada uma base fraca e é insolúvel em água, bases, álcool e acetona, porém dissolve-se em soluções ácidas diluídas de ácidos orgânicos, como o acético, fórmico e cítrico, além de ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico diluído, resultando em soluções viscosas. A solubilidade da quitosana em soluções ácidas converte a unidade glicosamina em grupos protonados ($-\text{NH}_3^+$) (SANTOS *et al.*, 2003; NGAH *et al.*, 2005).

A solubilidade da quitosana é normalmente investigada com sua dissolução em ácido acético a 1% ou 0,1M. De fato, a solubilidade é um parâmetro difícil de ser controlado e está relacionado com a desacetilação, concentração iônica, pH, natureza do ácido usado para protonação e a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia (RINAUDO, 2006).

Apesar de a quitina e a quitosana serem consideradas distintas, é o grau de desacetilação que define a forma do biopolímero predominante. Assim, o biopolímero é considerado quitosana quando o grau de desacetilação for superior a 40%. O grau de desacetilação da quitosana em produtos comerciais normalmente se encontra na faixa de 70 a 95%, e a massa molar média entre 10 e 1000kDa. O grau de desacetilação influencia na solubilidade da quitosana, pois quanto maior a quantidade dos grupos aminos maior é a repulsão eletrostática entre as cadeias e, conseqüentemente, maior é a solvatação em água (BARROS *et al.*, 2006; GEORGE e ABRAHAM, 2006).

Diferentes graus de desacetilação da quitosana são obtidos, quando se varia o tempo e a concentração de hidróxido utilizado, além da temperatura em que a reação ocorre. Para medir o grau de desacetilação, utilizam-se metodologias baseadas na espectroscopia de infravermelho, cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além de medidas potenciométricas, condutimétrica e de ressonância magnética nuclear (RMN) (MUZZARELLI *et al.*, 1980; RATHKE e HUDSON, 1993).

A massa molecular, assim como o grau de desacetilação, influencia nas propriedades físico-químicas da quitosana, como a solubilidade. Considera-se que derivados da quitosana com baixa massa molecular são mais solúveis. Também, a massa molecular influencia na atividade antimicrobiana, onde quanto maior a massa

molecular da quitosana maior é a atividade antimicrobiana. A massa molecular pode ser determinada por cromatografia líquida ou viscosimetria (JIA *et al.*, 2001).

A utilização da quitosana é interessante devido a ela ser um produto natural, de baixo custo e renovável, além de ser biocompatível, biodegradável e atóxica. A quitosana pode ser quimicamente modificada e ser processada em diferentes formas como soluções, filme, blendas e como sistemas de liberação controlada de fármacos (SILVA, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2007).

O emprego da quitosana e a pesquisa por novas aplicações têm aumentado em diversas áreas, como na agricultura e indústria de alimentos, além das indústrias farmacêuticas e no desenvolvimento de vacinas. O polímero é vastamente utilizado na literatura como meio complexante de íons metálicos, na formação de coberturas com ação antifúngica e bactericida, como elemento básico para a confecção de matrizes de liberação controlada de drogas e como um agente ativo no emagrecimento humano, pois interage com gorduras (ASSIS e SILVA, 2003; FRIEDE e AGUADO, 2005; GULIYEVA *et al.*, 2006).

Sua maior aplicação, atualmente, está na área biomédica, a qual tem evoluído muito nas últimas três décadas, como biomateriais, em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, liberação controlada de fármacos em animais e humanos (RINAUDO e DOMARD, 1989; FELT *et al.*, 1998; SENEL *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2000).

A utilização como sistemas de liberação de fármacos (*Drug-delivery systems*) surgiu desde a década de 1980 e representa biomateriais utilizados como agente facilitador na entrega de drogas sistêmicas e locais, capaz de proporcionar uma taxa de liberação controlada e prolongada da droga com o mínimo de efeito colateral. A quitosana, por ser um material seletivamente permeável, surgiu como bom candidato a meio de liberação controlada de medicamentos no meio gastrointestinal e na mucosa oral. Foi proposto utilizá-la como material para a liberação de antibióticos para a redução bacteriana local em aplicações orais (NEEDLEMAN *et al.*, 1998; RAVI KUMAR, 2000; IKINCI *et al.*, 2002; TAKEUCHI *et al.*, 2003).

2.2.4 NANOESFERAS DE QUITOSANA

Nos últimos anos, verifica-se um grande crescimento no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Nesse período, a indústria farmoquímica se destacou no uso e aproveitamento de matérias-primas de baixo custo e fácil acesso para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, o que permitiu o uso de várias técnicas de encapsulamento de muitos compostos em sistemas multiparticulados, como as nanoesferas (JOSUÉ *et al.*, 2000).

Estes nanossistemas podem funcionar como carreadores protegendo o fármaco da degradação e/ou da inativação pelo sistema retículo endotelial, promovendo um nível plasmático constante, ampliando o potencial terapêutico. As nanoesferas permitem a liberação do fármaco na dosagem ideal por longos períodos, aumentando o tempo de meia-vida do fármaco, o que resulta na diminuição da frequência de dosagem, estimulando a adesão do paciente (LUNA; ANDRADE, 2011).

Em relação aos materiais poliméricos, as nanopartículas podem ser compostas de polímeros naturais, sintéticos e semissintéticos. As nanopartículas são mais vantajosas que as micropartículas maiores por serem mais adequadas na administração intravenosa. Os fármacos ou outras moléculas podem apresentar-se dissolvidos em seu interior, aprisionadas, encapsuladas, adsorvidas ou anexadas nas nanoesferas (BLANCO, 2011).

A utilização de uma nanopartícula para sistemas de liberação controlada abre grandes possibilidades de aplicações. A aplicação de nanopartículas, por exemplo, no transporte de drogas através da barreira hemato-encefálica é bastante utilizado, pois esta barreira apresenta um grande obstáculo para grande número de fármacos, como antimicrobianos, fármacos anticancerígeno e neuropeptídeo (MOURA, 2009).

Em relação à administração oral de nanopartículas, esta tem o objetivo de diminuir efeitos colaterais de certos fármacos, destacando-se os anti-inflamatórios não esteroides, os quais causam frequentemente irritação na mucosa gastrointestinal, e proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal,

como proteínas e hormônios, aumentando a disponibilidade dos mesmos (LANGER e TIRREL, 2004).

O uso de quitosana como transportador de fármacos tem solucionado problemas relacionados com a solubilidade e hidrofobicidade de agentes terapêuticos. O desenvolvimento de nanoesferas de quitosana pode diminuir este problema, visto que estas são dotadas de caráter amorfo. A preparação de nanoesferas é uma estratégia para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana (REGE *et al.*, 1999; DENKBAS *et al.*, 2002; SINHA *et al.*, 2004).

As nanopartículas de quitosana ganham destaque entre os pós com atividade antimicrobiana por apresentarem um alto potencial antimicrobiano. A maior área superficial e densidade das nanopartículas fazem com que elas tenham maior grau de interação com a superfície de carga negativa das células bacterianas (BLANCO, 2011).

Os sistemas particulados à base de quitosana têm sido produzidos e testados para a liberação de princípio ativo, como a ampicilina, diclofenaco, hemoglobina e proteínas como insulina e BSA. As nanoesferas de quitosana foram usadas em outros trabalhos no encapsulamento de clotrimazol e econazol; quando reticuladas com politrifosfato e genipina encapsularam indometacina, e quando reticuladas com sulfato de sódio e revestidas com alginato foram usadas na adsorção de antígenos para uso em vacinas (PAULA *et al.*, 2009).

Diversos estudos relatam que a quitosana pode ser utilizada como transportador em vacinas, como o de Mohapatra *et al.* (2002), que avaliou o uso de quitosana como matriz de liberação de DNA, visando o desenvolvimento de vacinas. Neste estudo, o uso de nanoesferas de quitosana-DNA, administrada por via nasal, mostrou-se adequado e capaz de diminuir de forma significativa o título viral em infecções respiratórias causadas pelo vírus sincial respiratório.

Considera-se que o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada utilizando quitosana como veículo carreador do antígeno capsular Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi seja uma alternativa de interesse no campo da imunização contra a febre tifoide.

2.3 Métodos de caracterização

2.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

O estudo da estrutura da matéria tem despertado o interesse do homem há milhares de anos. Porém, foi apenas no final do século XIX e início de século XX que conceitos e espécies, como estrutura cristalina, contornos de grãos, fases e interfaces puderam ser afirmados. Este conhecimento só se deu através do desenvolvimento e aperfeiçoamentos de técnicas experimentais. A importância do conhecimento e das análises quantitativas da microestrutura tem levado ao contínuo desenvolvimento de tais técnicas experimentais, particularmente da microscopia, cujos, os aumentos máximos têm crescido e as resoluções melhorando continuamente (REIMER, 1997).

De um modo geral, as estruturas biológicas podem ser divididas em macroscópica e microscópica, sendo essa última invisível a olho nu. As principais unidades de medidas empregadas na microscopia é o micrômetro (μm), em microscopia ótica e nanômetro (nm), na microscopia eletrônica (LODISH *et al.*, 2003).

Na microscopia eletrônica de transmissão, forma-se uma imagem bidimensional sobre a tela, pela passagem de um feixe de elétrons através de cortes extremamente finos da amostra. A imagem se forma diretamente a partir da impressão do feixe de elétrons na tela de observação, após a passagem pela amostra (MELO, 2002).

A parte essencial do microscópio eletrônico de transmissão é uma coluna vertical, a qual é percorrida pelo feixe de elétrons. Na parte superior da coluna existe uma fonte de elétrons, o canhão eletrônico. Neste canhão existe um gerador de elétrons que é normalmente um filamento de tungstênio. A voltagem aplicada entre o filamento e o ânodo situa-se entre 40.000 e 100.000 V e provoca a aceleração dos elétrons (TABOGA, 2001).

2.3.2 TAMANHO DE PARTÍCULAS

O tamanho de partículas é importante para muitas operações de produção e processamento envolvendo sistemas de materiais particulados. A distribuição do tamanho de partícula influencia de maneira significativa em várias etapas de produção (transporte, compactação, sinterização, etc.). Portanto, a determinação do tamanho é uma etapa necessária em todos os processos que envolvam materiais de pós (PAPINI, 2003).

É difícil a determinação exata dos valores de tamanho de partícula, encontrando obstáculos diferentes para cada uma das técnicas. Com isso, a reprodutibilidade passa a ser importante para as medidas de controle de processo; porém, no desenvolvimento de novos produtos, a exatidão da análise pode ser fundamental (ALLEN, 1997).

Um fator importante a ser considerado na determinação da distribuição do tamanho de partícula é a unidade de medida da partícula. No caso das esferas, o seu tamanho é definido por um único valor, que é o diâmetro. Todavia as partículas irregulares necessitam de mais de uma medida para a quantificação do seu tamanho. Para expressar este valor em um único número, normalmente, adota-se o valor de uma esfera equivalente (PAPINI, 2003).

De um modo geral, as nanopartículas, depois de produzidas, obtidas por diferentes métodos apresentam distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão. Os métodos mais empregados para a determinação da distribuição do tamanho das nanopartículas são a espectroscopia de correlação de fótons e a Microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou a Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Dependendo do método utilizado podemos obter diferenças no tamanho de partículas (SCHAFFAZICK *et al*, 2003).

A composição quali/quantitativa e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidades, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

2.3.3 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta é uma abreviação de potencial eletrocinético em sistemas coloidais. De um modo geral, todos os materiais macroscópicos ou particulados adquirem cargas em sua superfície quando em contato com um líquido. A carga líquida na superfície das partículas contribui para a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contraíons junto à superfície, formando uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido (BEDÉ, 2010).

As superfícies das partículas em uma suspensão coloidal contêm grupamentos químicos que induziram uma carga de superfície ou simplesmente adsorvem íons que dão carga à superfície da partícula. A quantidade de cargas na superfície de uma partícula é uma característica importante, pois determina algumas propriedades da suspensão como tempo de sedimentação e redispersão (GUIMARÃES, 2005).

Em um campo elétrico, cada partícula e íons ligados fortemente a essas partículas movem-se como uma unidade, cujo potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado de potencial zeta. Esse potencial é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio, e da natureza e composição do meio que o circunda. Em virtude de esse potencial refletir a carga efetiva nas partículas, ele está relacionado com a repulsão eletrostática entre as partículas e com a estabilidade da suspensão. Esta característica é bastante importante nas nanopartículas para direcionar a escolha do fármaco que será adsorvido no sistema (BEDÉ, 2010).

2.3.4 ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica consiste em medir a variação de massa de um material quando submetido a um programa de controle de temperatura, sendo possível determinar o conteúdo de água, a decomposição de substância e o teor de cinzas utilizando pequena quantidade de amostra (MATUDA, 2004).

As técnicas termoanalíticas têm sido definidas como sendo métodos nos quais se mede a variação de uma determinada propriedade física de uma amostra em função do tempo. Esta definição foi proposta por Mackenzie e aceita pela Confederação Internacional de Análise Térmica (CAVALHEIRO *et al.*, 1995).

A termogravimetria é uma das técnicas empregadas na análise térmica, sendo utilizada quando se deseja acompanhar a variação de massa, ao longo do tempo a altas temperaturas, de uma amostra envolvida num experimento. Os seus resultados podem ser afetados por diversos fatores experimentais, motivo pelo qual alguns cuidados devem ser tomados quando se realizar a experimentação (CAVALHEIRO *et al.*, 1995).

A análise térmica é uma importante técnica analítica, que vem sendo usada para um melhor entendimento da relação estrutura/propriedade, além de avaliar a estabilidade térmica dos diferentes materiais (MOTHÉ e ARAUJO, 2004).

2.3.5 TÉCNICA DE INFRAVERMELHO

O termo espectroscopia significa a determinação ou medição através da utilização de métodos que utilizam luz. Em meados de 1800, Frederich William Hershel propôs a existência de outros componentes da luz, além daqueles conhecidos como visíveis. Na tentativa de comprovar a sua teoria, ele incidiu a radiação abaixo do vermelho em um termômetro de bulbo preto, constatando uma pequena elevação na temperatura: a esta radiação ele denominou de infravermelho. Ao colocar uma amostra no caminho entre a radiação e o termômetro, observou-se uma atenuação no aumento da temperatura; a esta foi denominada de absorção de infravermelho (CAROLEI, 2005).

A espectroscopia de infravermelho consiste basicamente na interação da radiação infravermelho com a matéria. O equipamento que permite obter os espectros é denominado espectrômetro de infravermelho, sendo o aparelho mais utilizado o Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (MONTEIRO, 2007).

O principal objetivo da técnica é determinar os diferentes grupos funcionais de um dado material. Cada grupo absorve a radiação em frequência característica de radiação na região do infravermelho (PICCOLI *et al.*, 2006).

A espectroscopia de infravermelho é certamente uma das mais importantes técnicas analíticas nos dias atuais. Uma das grandes vantagens é que grande parte das amostras, em quaisquer estados físicos (líquido, pastoso, pó, filme e superfície), pode ser estudada (HAACK, 2010).

A região do espectro de infravermelho compreende radiação com número de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10cm^{-1} . O espectro de infravermelho é dividido em infravermelho próximo, médio e distante, conforme a tabela 1. Os métodos quantitativos no infravermelho diferem dos métodos espectroscópicos no ultravioleta/visível devido à maior complexidade dos espectros, à menor largura das bandas e às limitações instrumentais dos aparelhos de infravermelho (SKOOG *et al.*, 2002).

Tabela 1: Regiões espectrais do infravermelho.

Região	Número de onda cm^{-1}
Próximo	12800 a 4000
Médio	4000 a 200
Distante	200 a 10

A energia da radiação eletromagnética na região do infravermelho, a qual está relacionada com ligações covalentes, é responsável pela transição do estado vibracional fundamental para o estado excitado. As ligações químicas possuem sua

frequência natural, devendo ser a mesma da energia incidente para que ocorra uma adsorção. Pelo fato de a radiação infravermelha apresentar tamanho próximo ao de uma ligação química, a mudança do momento dipolar faz com que a amplitude da ligação varie conforme a radiação eletromagnética que atinge a molécula, dessa maneira, promovendo a absorção (COLTHUP *et al.*, 1990).

A técnica de infravermelho tem sido utilizada pela indústria farmacêutica, principalmente no controle de qualidade de produtos e monitoramento do processo de produção, por ser uma técnica rápida e confiável (OZDEMIR e OZTURK, 2004; REICH, 2005; PICCOLI *et al.*, 2006).

2.3.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

É uma técnica espectroscópica atinente às propriedades magnéticas dos núcleos atômicos, baseando-se na medida de adsorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência de cerca de 4 a 900MHz. Determinados núcleos ressonam em frequências características na região de radiofrequências do espectro eletromagnético quando expostos a um campo magnético. E a variação nas frequências leva a informações mais detalhadas sobre a estrutura molecular em que os átomos se encontram. A frequência aumenta da direita para esquerda e a intensidade de um sinal de adsorção no RMN é dada pela respectiva área, sendo proporcional ao núcleo que está em sua origem (GIL e GERALDES, 2002; SANTOS, 2007; DUARTE, 2011).

Pode-se dividir a espectroscopia por RMN em duas áreas: a de baixa resolução, cujos campos trabalham com uma intensidade inferior a 2 tesla ou cerca de 85MHz para H¹; e a de alta resolução, com variação de 2 a valores maiores de 20 tesla (AZEREDO *et al.*, 2003).

A técnica pode ser de dois tipos: as de ondas contínuas (CW) e pulsadas ou Transformada de Fourier (FT NMR). Na primeira, o campo magnético ou a radiofrequência são varridos, enquanto que, na segunda, a amostra é irradiada com

pulsos periódicos de radiofrequência com componente perpendicular ao campo magnético (SANTOS, 2007; RITOTA *et al.*, 2010).

O que torna a ferramenta interessante é o fato de que os núcleos da mesma espécie, mas em locais diferentes nas moléculas, absorvem e reemitem energias de radiofrequência diferentes; isso se deve à contribuição dos elétrons da molécula para o campo magnético total sentido pelo núcleo magnético (SANTOS, 2007).

O hidrogênio (H^1) é o núcleo mais sensível para o RMN, em função de sua alta magnetividade e alta abundância natural. Devido ao H^1 estar em quase todos os compostos orgânicos, a técnica é uma ferramenta poderosa para observar, identificar e quantificar um grande número de metabólitos importantes. Em experimentos de RMN envolvendo biomoléculas, o solvente, quando utilizado, é geralmente composto por núcleos semelhantes à amostra de interesse. Como a concentração do solvente é maior do que do soluto, o espectro é dominado pelo primeiro, o que faz com que os espectros do soluto que ressonam próximo ou abaixo do intenso sinal do solvente se tornem difíceis de analisar (DUARTE, 2011).

Os primeiros estudos da técnica de Ressonância Magnética Nuclear na análise de biopolímeros ocorreram por volta dos anos de 1960, com o RMN de H^1 . Com o desenvolvimento da técnica, passou-se a utilizar equipamentos que operam no modo pulsado com transformação de Fourier, desse modo, avaliando-se com melhor precisão e sensibilidade outros núcleos magnéticos, como o C^{13} , por conseguinte, possibilitando a melhor caracterização dos polímeros (ESCHER, 2004).

A espectroscopia de RMN de alta resolução é a técnica que leva a um maior número de dados, tanto qualitativos como quantitativos, sobre a microestrutura dos polímeros. Os últimos desenvolvimentos da técnica permitem realizar estudos de polímeros tanto em solução como em gel ou estado sólido (ESCHER, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de liberação controlada de quitosana adsorvido ao antígeno capsular Vi, proveniente de cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, como uma nova alternativa para imunização contra a febre tifoide.

3.2 Objetivos específicos

- Adquirir cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, sendo confirmadas com testes bioquímicos e sorológicos;
- Isolar o antígeno capsular Vi a partir de cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi;
- Verificar a presença do antígeno Vi nas amostras obtidas através da técnica de aglutinação com anticorpos específicos, técnica de infravermelho e RMN;
- Preparar as nanoesferas de quitosana e ácido metacrílico;
- Realizar a microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta e tamanho da partícula;
- Avaliar o perfil termo analítico das nanopartículas;
- Realizar a cinética de adsorção do antígeno Vi nas nanopartículas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 MATÉRIAS-PRIMAS

A Cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi foi gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com ATCC (19430) na forma liofilizada. O antígeno Vi puro foi fornecido pela Bio-rad® (França, Lote: OL 2154), o qual foi utilizado como padrão para a caracterização do antígeno. A quitosana, QS, em pó, foi adquirida com a empresa Sigma Aldrich® (Alemanha), apresentando um grau de desacetilação de 94%. O ácido metacrílico (PMAA) utilizado foi fornecido pela Sigma Aldrich® (Alemanha), enquanto que o persulfato de sódio, $K_2 S_2 O_8$, foi obtido a partir da empresa Synth® Ltda (São Paulo).

4.1.2 SOLVENTES E REAGENTES

Para o método de isolamento do antígeno Vi utilizou-se reagentes como azida sódica, brometo de hexadeciltrimetilamônio, desoxiribonuclease e ribonuclease, que foram fornecidos pela Sigma aldrich® (Alemanha), enquanto que o Tris (Hidroximetil) aminometano foi adquirido através da Passos Científica® (São Paulo).

4.1.3 EQUIPAMENTOS

Para a esterilização dos meios de cultura foi utilizado o autoclave HIMEDIA® M002. A manipulação das bactérias foi realizada no fluxo laminar BIO SEG® 09. Os procedimentos envolvendo centrifugação foram feitos em centrífuga refrigerada marca EPPENDORF® 5804R. As bactérias usadas para o isolamento do antígeno foram incubadas na incubadora bacteriológica QUIMIS® a uma temperatura de

35°C. Outro equipamento utilizado foi a placa aquecedora com agitação magnética MAG MULTI®.

4.2 Métodos

4.2.1 OBTENÇÃO DA CEPA DE *SALMONELLA ENTERICA* SOROTIPO TYPHI

A cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi liofilizada foi ressuspensa em 1mL de caldo nutriente e, em seguida, repicada em ágar *Salmonella-Shigella* (SS). Após o crescimento das bactérias, as mesmas foram submetidas ao teste bioquímico para identificação da espécie e, posteriormente, realizou-se o teste sorológico para confirmar a presença do antígeno Vi. Uma vez confirmada a espécie e a presença do antígeno Vi, as bactérias foram estocadas em ágar nutriente e conservadas em geladeira.

4.2.2 ISOLAMENTO DO ANTÍGENO CAPSULAR Vi DE *SALMONELLA ENTERICA* SOROTIPO TYPHI

A metodologia empregada foi adaptada a partir da técnica proposta por Wong e Feeley (1972), a qual consiste basicamente na utilização de vários reagentes, seguida de centrifugações. A obtenção da massa celular bacteriana ocorreu por repique da *Salmonella enterica* sorotipo Typhi do estoque em caldo TSB, tendo crescimento exponencial por 4h e, posteriormente, foi repassada para um meio ágar nutriente contido em garrafa de vidro para cultivo de células. Após 24h, as cepas foram extraídas. A metodologia utilizada para a extração está detalhada na figura 7.

Para o isolamento do antígeno Vi as bactérias precisaram ser inicialmente mortas. O procedimento empregado para este fim foi realizado de duas etapas: a primeira através da exposição das bactérias à radiação ultravioleta (técnica 1); e a segunda pelo tratamento das bactérias com acetona (técnica 2), conforme adaptação realizada por Wong *et al.* (1972). Às bactérias mortas adicionou-se 10mL de solução de azida sódica 0,1%, em seguida, esta mistura foi agitada e colocada em banho-maria por 30min e posteriormente centrifugada a 11000rpm por 30min.

Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo falcon, repetindo este procedimento por duas vezes. Ao sobrenadante, adicionou-se 1mL de tampão Tris-HCl 1N e 500µl de desoxirribonuclease e ribonuclease, permanecendo sob agitação durante 6h, a 37°C. Após este período, adicionou-se 500µl de pronase e agitou-se por 12h. Em seguida, adicionou-se NaCl 5% (p/v) e se manteve a mistura no freezer até que ocorresse o congelamento. Logo depois, adicionou-se 6mL de etanol pré-resfriado e foi mantido em *overnight* na geladeira. O passo seguinte foi a centrifugação desta mistura por 30min, a 11000rpm e descarte do sobrenadante.

Ao sedimento, foi adicionado 5ml de solução de etanol a 60%, em salina, e mantido em agitação por 24h. Após este período, executou-se a centrifugação e o sobrenadante foi reservado. Este passo foi repetido por mais duas vezes.

Após obter o sobrenadante total das extrações anteriores, este foi congelado a 2°C e, então, foi adicionado igual volume de etanol pré-resfriado e, posteriormente, conservado na geladeira por cerca de 15min. Na sequência, foi submetido à centrifugação de 11000rpm a 2°C, por 30min. O sobrenadante foi descartado. Ao sedimento, acrescentaram-se 10mL de solução salina 0,85% estéril e 0,01g de brometo de hexadeciltrimetilamônio (p/v) e, logo em seguida, centrifugou-se a 8000rpm, por 15min.

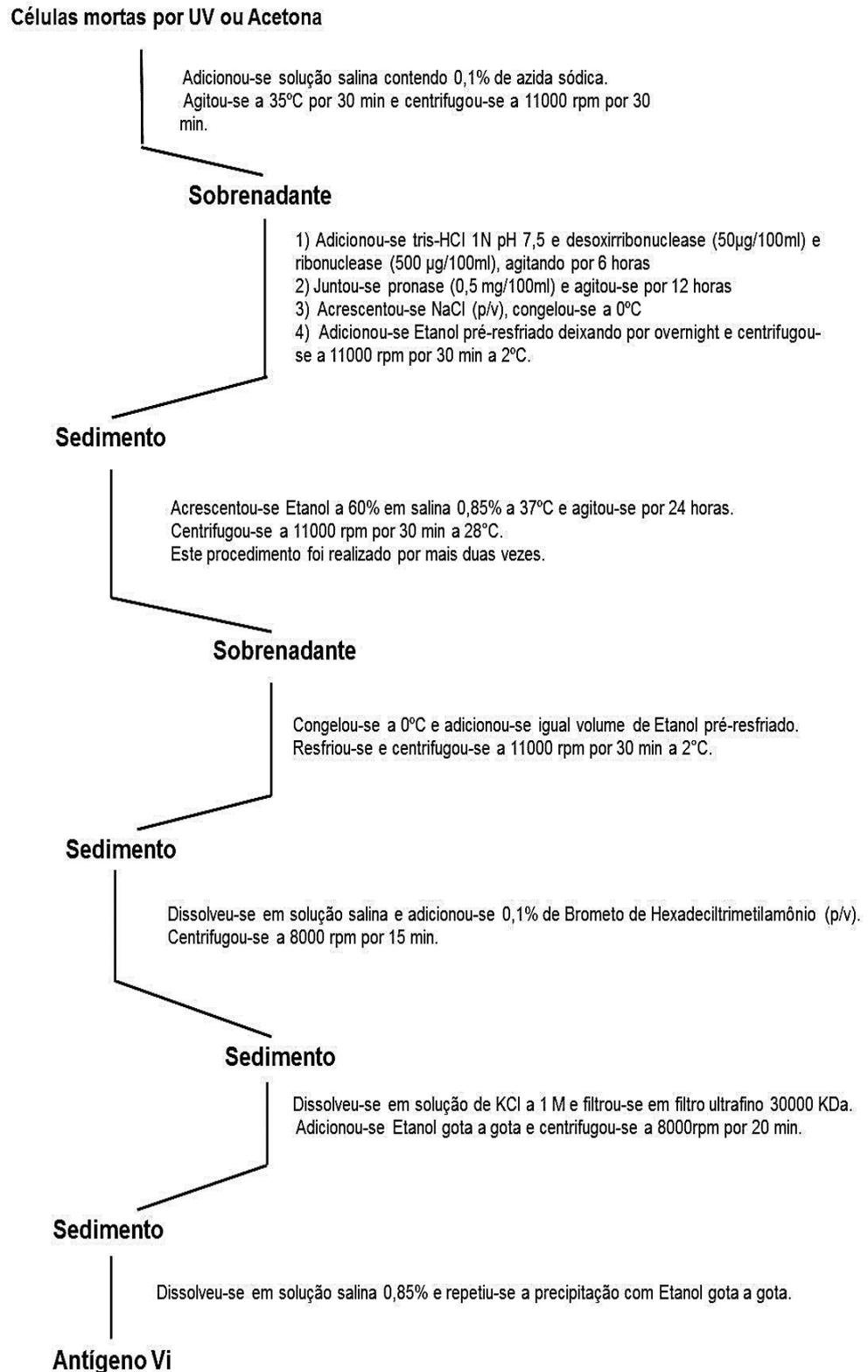


Figura 7: Fluxograma de obtenção do antígeno Vi a partir de cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi.

Ao sedimento obtido, acrescentaram-se 4mL de solução de KCl 1M e, em seguida, esta mistura foi transferida para um tubo com filtro milipore ultrafino de 30.000KDa para se realizar a filtração. Para que a filtração fosse eficiente, submeteu-se o tubo com a mistura à centrifugação a 7000rpm, por 15min.

Para recuperar o antígeno que ficou retido no filtro foram adicionados, gota a gota, 2mL de etanol P.A, centrifugado a 8000rpm, por 20min. Ao antígeno que, então, estava presente no sedimento, adicionaram-se 5mL de solução salina e mais 2mL de etanol P.A, obtendo-se, desta forma, a suspensão final do antígeno.

A amostra inicialmente, morta por ultravioleta, foi denominada **amostra 1**; e aquela tratada inicialmente com acetona, **amostra 2**.

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO Vi

4.2.3.1 Identificação do antígeno Vi pelo método de infravermelho

A aplicação da técnica FT-IR teve como objetivo a identificação de grupos funcionais característicos das amostras analisadas. Os espectros de infravermelho foram obtidos a partir das amostras 1 e 2 liofilizadas e misturadas com brometo de potássio (KBr), sendo prensadas em alta pressão para a formação de pastilhas. Os espectros foram obtidos em espectrômetro NICOLET® 1179, na faixa de comprimento de onda de 4000 a 400cm⁻¹, durante 128 varreduras, com resolução de 2cm⁻¹. Efetuou-se a análise espectroscópica do antígeno Vi puro liofilizado como padrão para estudo de comparação com as análises das amostras extraídas.

4.2.3.2 Identificação do antígeno Vi pelo método de ressonância magnética nuclear

No intuito de averiguar a interação da radiação eletromagnética com o antígeno, utilizou-se uma das técnicas espectroscópicas mais poderosas, a ressonância magnética nuclear, principalmente na elucidação estrutural de polissacarídeos com estruturas complexas (KAISER, 2000). Neste estudo, pesaram-se 20mg de cada amostra (padrão do antígeno puro e amostras 1 e 2) e se solubilizou em água deuterada (D_2O) para análise de hidrogênio (1H) no aparelho de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Varian, modelo Mercury Plus BB® (300 MHz).

4.2.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE POLIMERIZAÇÃO EM MOLDE

A polimerização em molde é definida como a formação de uma cadeia de polímeros a partir de um molde formado por macromoléculas, através de interação química (interação hidrofóbica, ligações de hidrogênios e força eletrostáticas), criando-se as nanopartículas (VAN de GRAMPEL *et al.*, 1990). As nanopartículas de quitosana foram obtidas a partir da polimerização dos monômeros do ácido metacrílico, tomando a quitosana como molde, adaptado de Moura *et al.* (2008).

Para a polimerização em molde, foram preparadas três soluções de ácido metacrílico a 0,5, 0,8 e 1% (v/v). Em cada uma dessas soluções, foram realizadas três reações diferentes, uma com concentração de quitosana em 0,5%, outra com 0,8% e a última com 1% de quitosana (p/v) e, dessa forma, foram construídas nove formulações, e cada uma foi submetida à agitação magnética por 12h.

Após completa solubilização da quitosana em solução de ácido metacrílico, aqueceu-se até chegar à temperatura de 70°C. Ao estabilizar a temperatura, foi adicionada uma solução 0,2mmol de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), diluída em 5mL de água ultrapura. Com isso, a agitação permaneceu por 1h para que houvesse a formação das nanopartículas. Após 1h, as nanopartículas foram levadas ao banho de gelo para o seu resfriamento.

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QS – PMAA

4.2.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Através da microscopia eletrônica de transmissão, foram observadas a morfologia e homogeneidade das nanopartículas de quitosana em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS® EM 900. Para realizar a análise, as amostras foram colocadas em banho ultrassônico por 2min para melhor dispersão das partículas, assim, evitando possível aglomeração.

Aplicou-se uma gota de 10 μ L da suspensão de nanopartículas sobre uma grade de cobre, recoberta por um filme de carbono, retirando-se o excesso de água com papel-filtro, sendo adicionado ácido fosfotúngstico (PTA) a 2%, como contrastante.

4.2.5.2 Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta

Determinou-se o tamanho de partícula e potencial zeta das nanopartículas por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando-se um Zetasizer-Nano® ZS90 (Malvern). As amostras foram diluídas em tampão PBS 7,2. Em seguida, foram filtradas e agitadas em vortex, mantendo-se durante 5min em banho de ultrassom, e, então, as amostras foram diluídas em PBS (1:100) antes de realizar a leitura. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.5.3 Termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA)

As análises térmicas TG/DTG e DTA foram realizadas com o objetivo de observar o comportamento térmico das nanoesferas. Para as curvas TG/DTG e DTA foi utilizada a termobalança Shimadzu DTG-60H®. Utilizou-se aproximadamente 3mg de cada amostra de nanopartículas, sendo usados cadinhos de alumina.

Aqueceram-se as amostras em uma razão de aquecimento de 10°C/min, em atmosferas dinâmicas de nitrogênio na vazão de 50mL/min, e se submeteu a uma faixa de temperatura compreendida entre 25 a 600°C.

4.2.6 CINÉTICA DE ADSORÇÃO

A cinética de adsorção foi realizada entre as nanopartículas de 1,0% - 1,0% (QS - PMAA); e o antígeno Vi puro, em tubos falcon, utilizando meio tampão fosfato pH 7,2, à temperatura ambiente. Pesaram-se 150mg de partículas, as quais foram adicionadas a uma solução de antígeno de concentração igual a 1mg/mL. Os intervalos de tempo investigados nesta cinética foram 6, 24 e 48h.

A cada intervalo de coleta, foi retirado um tubo e centrifugado a 4.000rpm, por 10 min, sendo retirado o sobrenadante para subsequente quantificação do antígeno não adsorvido. A quantificação do antígeno Vi foi realizada de forma indireta, utilizando o corante laranja de acridina, segundo adaptação da técnica de Stone e Szu (1988), por espectrofotometria UV-Visível na faixa de 530 a 430nm (Espectrofotômetro UV – 1800 Shimadzu®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento do antígeno Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi

A atenuação da bactéria por duas técnicas diferentes foi realizada apenas para a comparação na obtenção qualitativa do antígeno Vi no final da extração, sendo que, em ambos os processos, obteve-se o antígeno em quantidades satisfatórias na suspensão final.

O tratamento das cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi com a desoxirribonuclease, ribonuclease e pronase removeram interferentes como ácidos nucleicos e proteínas para que houvesse a purificação do antígeno Vi.

O etanol teve a função de precipitar e concentrar o antígeno Vi para que este pudesse ser recuperado no sedimento. Já o brometo de hexadeciltrimetilamônio foi utilizado para se ligar ao antígeno Vi e destacá-lo do antígeno somático residual (antígeno O), visto que este fica intimamente ligado ao antígeno somático na estrutura bacteriana, ocorrendo a precipitação do complexo com a ajuda do etanol (WONG e FEELEY, 1972).

Para que o brometo de hexadeciltrimetilamônio não viesse a interferir na purificação do antígeno, pois este se liga ao mesmo, aplicou-se a solução de KCl, para que dissolvesse o complexo e liberasse o antígeno Vi.

Algumas técnicas relacionadas ao isolamento do antígeno Vi foram empregadas em outros estudos, porém ocorreram alguns problemas quanto à sua estabilidade, como, por exemplo, o isolamento do antígeno com etanol na presença de cloreto de sódio, acarretando na hidrólise com ácido acético quente, causando a despolarização do antígeno e problemas relativos à sua imunogenicidade (WONG e FEELEY, 1972).

O método empregado neste estudo não causou a desestabilidade do antígeno Vi, além de ser um procedimento de fácil execução. Isto é importante em virtude da

manutenção dos grupos necessários para o desenvolvimento da imunidade do antígeno empregado em vacinas a serem produzidas.

5.2 Caracterização do antígeno Vi

5.2.1 IDENTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO Vi PELO INFRAVERMELHO

Na tabela 2, elencam-se as regiões de absorção no infravermelho e os respectivos grupos químicos referentes ao antígeno Vi.

O espectro do antígeno puro comercial apresentou um pico em 617cm^{-1} devido às vibrações do anel piranosídico, comum em polissacarídeos, um pico entre $1200 - 950\text{cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento C-O-C; e um pico em 1734cm^{-1} , relacionado ao grupo O-acetil (STONE e SZU, 1988; MOURA, 2008).

Ainda para o espectro do antígeno puro, observou-se banda de adsorção entre $1650 - 1540\text{cm}^{-1}$, que corresponde ao grupo N-acetamino; e entre $1604 - 1417\text{cm}^{-1}$, relacionado à presença de ânion carboxilato. O espectro de infravermelho do antígeno Vi está exposto na figura 8 (STONE e SZU, 1988).

Tabela 2: Bandas de adsorção na região do infravermelho para o antígeno Vi.

Bandas de adsorção (cm^{-1})	Grupo químico
617	Anel piranosídico
1200-950	C-O-C
1734	Grupo O-acetil
1650-1540	Grupo N-acetil
1604-1417	Ânion carboxilato

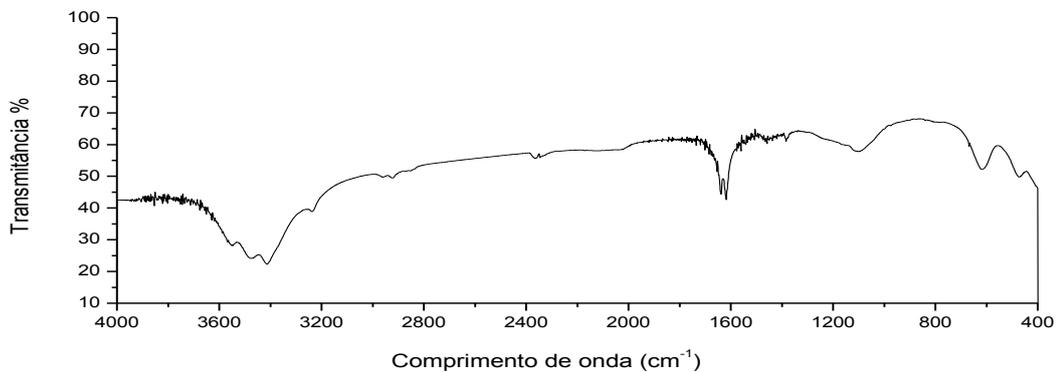


Figura 8: Espectro de Infravermelho do antígeno Vi puro.

É importante a presença dos grupos O-acetil e N-acetil na estrutura do antígeno Vi, pois estudos têm referido que esses grupos estão relacionados à propriedade imunoquímica do antígeno em *Salmonella enterica* sorotipo Typhi Ty2 (SZEWCZYK e TAYLOR, 1980).

Para a amostra 1, extraída da cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, observou-se um pico semelhante em 617cm^{-1} , correspondente às vibrações do anel piranosídico, além da banda em 1101cm^{-1} , devido ao estiramento C-O-C e, entre $1650 - 1540\text{cm}^{-1}$, do grupo N-acetil. A faixa entre $1604 - 1417\text{cm}^{-1}$ correspondeu ao ânion carboxilato. Ainda se detectou a presença da banda em 1734cm^{-1} relacionada ao grupo O-acetil.

Na amostra 2, foi verificado um pico em 619cm^{-1} , o qual está próximo a 617cm^{-1} do antígeno Vi puro, que corresponde ao anel piranosídico. Foram visualizadas bandas de adsorção em 1100cm^{-1} e entre $1650 - 1540\text{cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento do C-O-C, e à presença do grupo N-acetil, respectivamente.

Também, para a amostra 2, individuou-se o pico relacionado ao grupo O-acetil, o qual foi observado em 1732cm^{-1} , ficando próximo ao de 1734cm^{-1} do antígeno puro. A presença de ânion carboxilato deu-se entre $1604 - 1417\text{cm}^{-1}$.

Em ambas as amostras, a banda para o grupo carboxílico, presente na estrutura do polissacarídeo, foi intensa e se mostrou bem nítida, sendo importante em possível ligação deste grupo a anticorpos na criação de imunidade.

Em outros trabalhos, como o de Soares (2009), observaram-se regiões correspondentes ao ácido carboxílico entre $1650 - 1630\text{cm}^{-1}$ para frações de polissacarídeos extraídas de algas marinhas. Já Santos *et al.* (2010) perceberam a presença de ácido carboxílico entre $1629 - 1618\text{cm}^{-1}$, em polissacarídeo localizado em frações da *Campomanesia Xanthocarpa* Berg.

Na figura 9, expõe-se o espectro de infravermelho obtido da amostra 1 (cujas bactérias foram mortas por exposição à radiação ultravioleta), enquanto que a figura 10 corresponde ao espectro da amostra 2 (na qual as bactérias foram mortas por tratamento com acetona).

A presença da banda do anel piranosídico é característica para estruturas de polissacarídicas. Em ambas as amostras, foi acusada a presença dessa banda, tendo intensidade parecida com a do antígeno Vi puro, confirmando que, de modo geral, as amostras são de polissacarídeo.

Moura *et al.* (2008) encontraram o pico correspondente em 620cm^{-1} para o anel piranosídico em trabalho com quitosana, que é um polissacarídeo natural, na produção de nanopartículas. Mallmann (2010) acusou a presença em uma faixa um pouco maior, sendo de $1200 - 800\text{cm}^{-1}$ em estudo com a quitosana na obtenção de compostos biológicos com propriedades magnéticas.

Além do anel piranosídico, o pico correspondente ao grupamento C-O-C também é característico para determinar a autenticidade de uma estrutura de polissacarídeo. Tonhi e Plepis (2002) relataram que este grupamento esteve presente entre $1070 - 1030\text{cm}^{-1}$, dessa maneira, restando dentro da faixa apresentada no trabalho, que foi de $1200 - 950\text{cm}^{-1}$.

A análise de espectroscopia de infravermelho já vem sendo utilizada para a identificação e caracterização de grupos químicos relacionados a polissacarídeos superficiais presentes na parede celular de micro-organismos. Fukuda *et al.* (2009) desenvolveram uma revisão dos estudos da composição da parede celular de fungos, em que a técnica de infravermelho foi utilizada para tal finalidade.

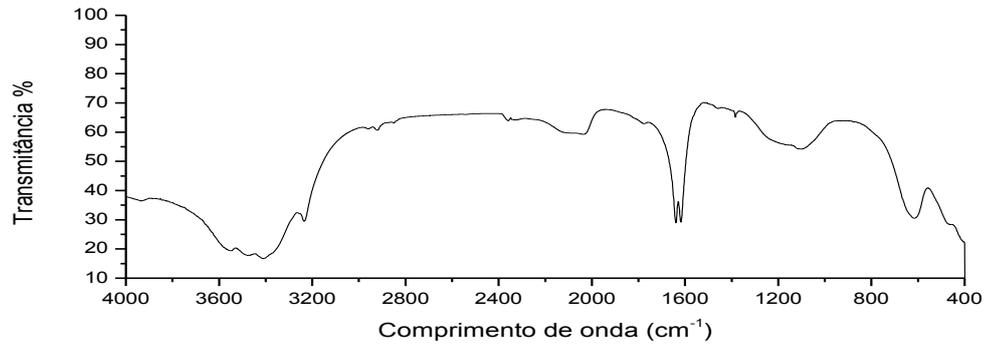


Figura 9: Espectro de Infravermelho da amostra 1 (cepas mortas por radiação ultravioleta).

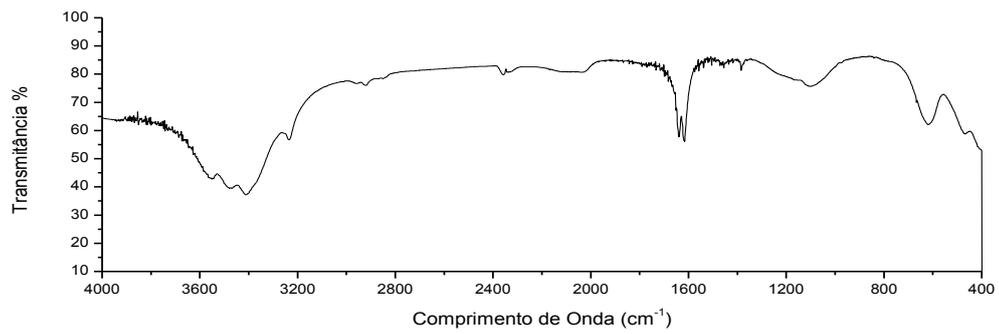


Figura 10: Espectro de Infravermelho do amostra 2 (cepas mortas por acetona).

Silva *et al.* (2006) citaram a análise na região do infravermelho como importante na identificação de características estruturais específicas de glucanas fúngicas (polissacarídeo que forma uma capa externa ao redor de micélios).

Os comportamentos dos espectros das amostras 1 e 2 foram similares ao do antígeno puro, tendo a presença de todos os grupos característicos, assim, demonstrando que, no processo de extração, não há a perda de grupos que servirão na criação da imunidade ao antígeno.

5.2.2 IDENTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO Vi PELO MÉTODO DE RMN H^{-1}

A Ressonância Magnética Nuclear é uma importante ferramenta na pesquisa biológica, sendo muito utilizada na elucidação de estruturas ou no estudo de mecanismos biológicos. Na pesquisa dos polissacarídeos, é fundamental a determinação da estrutura de oligossacarídeos e monossacarídeos, além da determinação da configuração glicosídica, posição das ligações, sequência de ligação e da conformação espacial de oligossacarídeos ou partes específicas de carboidratos complexos (GUERIM, 2007).

Na análise de RMN, foram avaliados os sinais de prótons do antígeno Vi puro, das amostras 1 e 2. Os espectros obtidos das duas amostras extraídas foram comparados com o do antígeno Vi puro para verificar se o processo de extração e purificação do antígeno foi realizado com êxito.

No antígeno puro, detectou-se a presença de cinco sinais no espectro de RMN H^{-1} , os quais estão relacionados aos cinco hidrogênios localizados no anel da estrutura do polissacarídeo. Esses sinais estão localizados na faixa de 4,63 – 4,78ppm (Figura 11). Estes valores são condizentes com os da literatura, onde os sinais ficaram localizados entre 4,53 – 5,34ppm (LEMERCINIER *et al.*, 2000). Evidenciou-se também um sinal em 3,29ppm, este corresponde à presença dos grupos N-acetil e O-acetil.

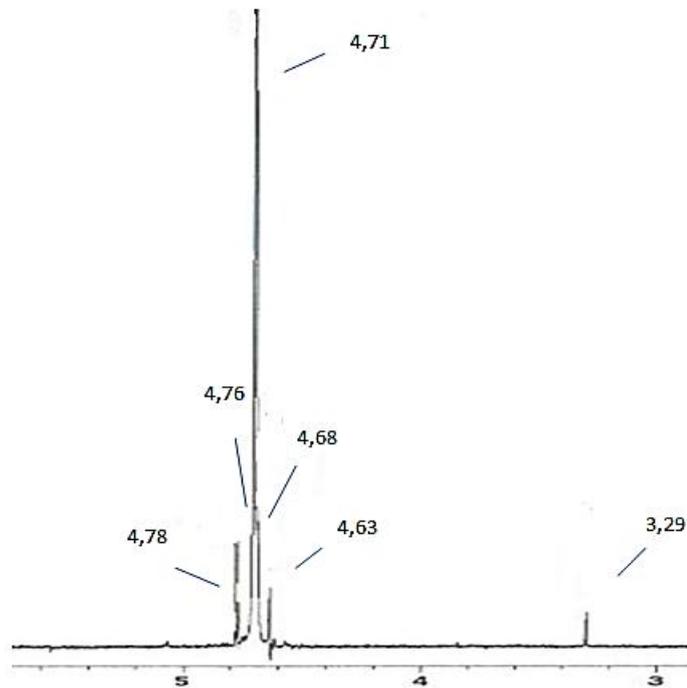


Figura 11: Espectro de RMN da amostra de antígeno Vi puro mostrando os cinco sinais correspondente ao anel do polissacarídeo na faixa de 4,63 – 4,78 ppm e o pico do grupo N-acetil e O-acetil em 3,29 ppm.

O sinal relacionado ao hidrogênio H-2 do anel do polissacarídeo coincidiu com o sinal da água (4,70ppm), visto que não foi realizada a técnica de pré-saturação da água residual. Este fato foi relatado por Lemercinier *et al.* (2000) para a análise de RMN do antígeno capsular Vi puro. Esta técnica de pré-saturação tem o objetivo de suprimir o sinal de água residual, através da aplicação de um pulso longo e de baixa potência na frequência do solvente (DUARTE, 2011).

As figuras 12 e 13 referem-se aos espectros de RMN H^{-1} das amostras 1 e 2, respectivamente. Ambas as amostras apresentaram os cinco sinais correspondentes ao espectro do antígeno Vi, ficando também na faixa de 4,63 – 4,78ppm. Com isso, os espectros das amostras mostraram total similaridade com o antígeno Vi.

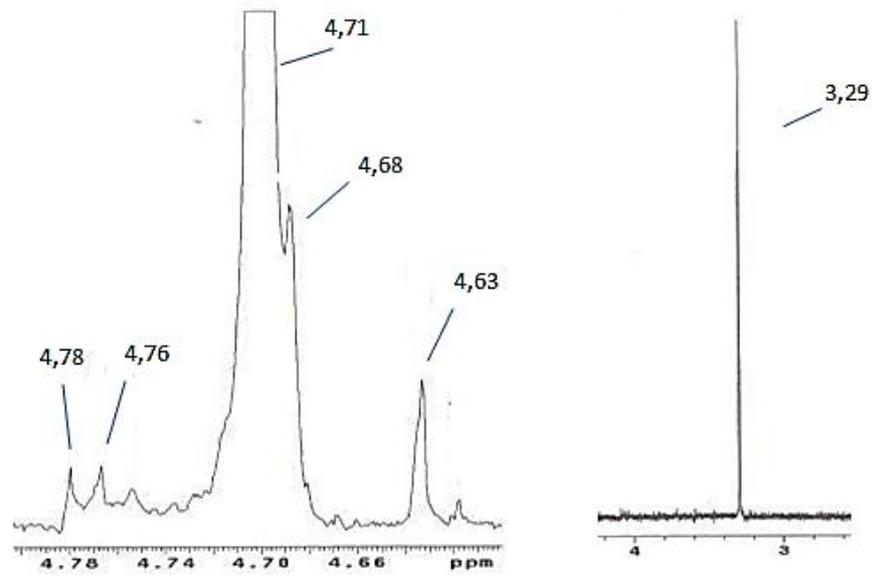


Figura 12: Espectro de RMN da amostra 1 (cepas mortas por radiação ultravioleta) mostrando os cinco sinais correspondente ao anel do polissacarídeo (à esquerda) e o pico do grupo N-acetil ou O-acetil (à direita).

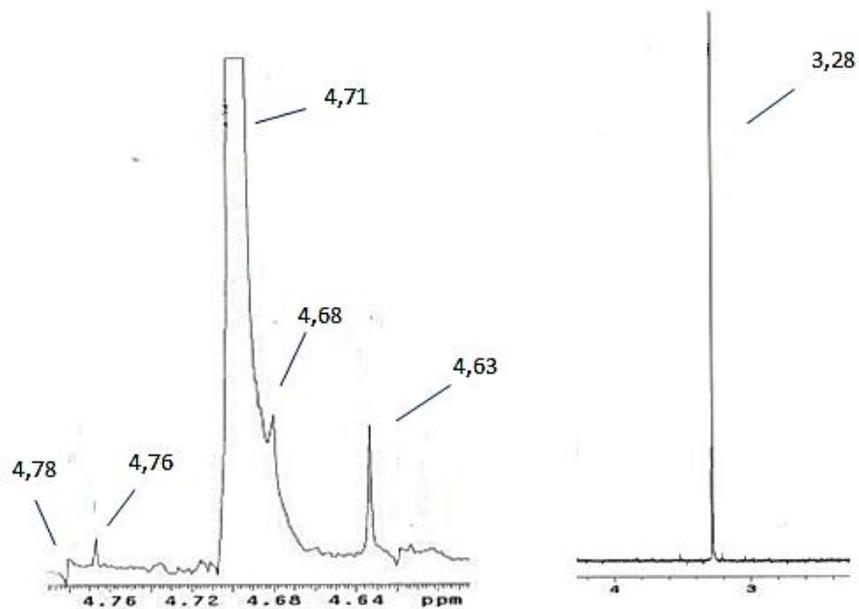


Figura 13: Espectro de RMN da amostra 2 (cepas mortas por acetona) mostrando os cinco sinais do anel do polissacarídeo (à esquerda) e o pico do grupo N-acetil e O-acetil (à direita).

Ademais, nas amostras 1 e 2, foram evidenciados sinais nos valores de 3,29ppm e 3,28ppm, respectivamente. Estes sinais estão relacionados aos hidrogênios do grupo N-acetil (NAc) ou O-acetil (AcO) da estrutura do antígeno Vi. Pôde-se verificar também um aumento na intensidade no sinal desses grupos nas duas amostras.

Esta intensidade pode estar relacionada à maior quantidade desses grupos nas duas amostras em relação ao antígeno puro. Esses sinais dos grupos N-acetil e O-acetil foram relatados por Lemercinier *et al.* (2000), em que ambos coincidiram no mesmo sinal em resíduos O-acetilados do polissacarídeo capsular Vi.

A caracterização do antígeno Vi pela técnica de RMN já foi realizada anteriormente por Martínez *et al.* (1999), quando se avaliou a pureza de três lotes de amostras de antígeno Vi comerciais, tendo como referência espectros do antígeno obtidos pelo *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC, Reino Unido), em que foi observado similaridade das amostras com o espectro padrão.

Diversos são os estudos da composição e caracterização de polissacarídeos superficiais da parede celular de micro-organismos utilizando a técnica de RMN, como no estudo de Burjack (2010), o qual avaliou a composição de frações extraídas da parede celular do fungo dematiáceo, em que, a partir do RMN, foram determinados quais açúcares fazem parte da sua composição estrutural. Serrato (2008) extraiu biopolímeros da parede de várias bactérias diazotróficas, estudando a sua composição química e estrutural através do RMN. Guerim (2007), também, avaliou o polissacarídeo presente na parede de fungos *Exophiala Spinifera* visando a determinar o potencial patogênico desta linhagem.

A análise de ressonância magnética nuclear também foi utilizada com sucesso na caracterização estrutural das glucanas existentes em fungos, as quais são polímeros de glucose que formam uma capa extracelular ao redor dos micélios. Para que ocorresse a caracterização através do RMN das glucanas, segundo os autores, foi preciso, primeiro, realizar o isolamento e a purificação das mesmas até a sua homogeneidade (SILVA *et al.*, 2006).

Os sinais das amostras 1 e 2 foram todos similares aos cinco hidrogênios da amostra do antígeno Vi puro, indicando que, em ambas as extrações, o antígeno

esteve presente, indicando que a extração do antígeno pela técnica empregada neste trabalho foi satisfatória.

5.3 Obtenção das nanopartículas de QS – PMAA

O método de polimerização em molde consiste na polimerização de vários monômeros a partir de um molde de macromolécula, formando uma cadeia polimérica. Neste estudo, os monômeros de ácido metacrílico se ligaram aos polímeros de quitosana, formando uma cadeia devido a uma interação eletrostática (Figura 14) (POLOWINSKI, 2002).

Para que ocorra a preparação das nanopartículas, tanto a quitosana como o ácido metacrílico devem estar em solução. A quitosana, quando em solução, tornou-se positiva, isso acontece apenas em soluções de ácidos fracos. Assim, no momento em que se adicionou a quitosana em solução de ácido metacrílico, houve a protonação dos grupos NH_2 da quitosana em NH_3^+ (MOURA, 2009).

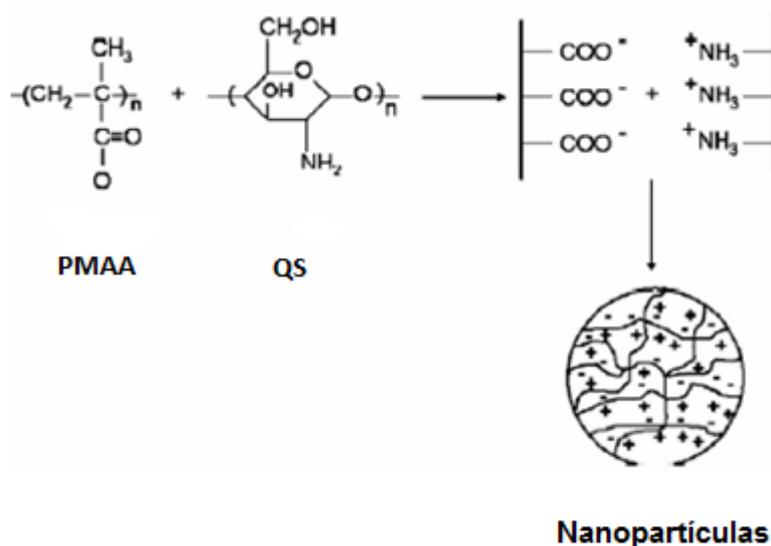


Figura 14: Mecanismo de formação das nanopartículas (MOURA, 2009).

O ácido metacrílico em solução aquosa acaba por se desprotonar criando grupos COO^- , estes grupos, então, interagem com os grupos NH_3^+ da quitosana, dessa maneira, criando a polimerização dos ácidos que conseqüentemente forma as nanopartículas. O processo de polimerização não ocorreu de forma imediata, ou seja, foi necessária a adição do catalizador, o persulfato de potássio, além da necessidade de uma temperatura de 70°C por 1h.

Quando a polimerização começa, a propagação das cadeias de poli (ácido metacrílico) resulta em um aumento da densidade de carga, de modo que, ao tornar-se crítica, complexos polieletrólitos insolúveis entre a quitosana e o ácido são formados através de interações eletrostáticas (CHALLA e TAN, 1981; MOURA *et al.*, 2008).

No momento em que se adicionou o persulfato de potássio, percebeu-se que a solução de quitosana em ácido metacrílico transformou-se de incolor a opalescente, e isso se deu devido à formação de complexos insolúveis na solução.

O processo de polimerização em molde vem sendo utilizado com sucesso em outros trabalhos na produção de nanopartículas. Van de Grampel *et al.* (1990) realizaram a polimerização de ácido metacrílico em molde de N-Vinylimidazol a 50°C , utilizando azobis (2-amidinopropano) 2HCl (AAP) como catalizador. Wang *et al.* (2009), também, prepararam nanopartículas utilizando gelatina como molde para a polimerização do ácido metacrílico.

5.4 Caracterização das nanopartículas de QS – PMAA

5.4.1 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A análise de MET objetiva principalmente a visualização morfológica de um sistema micro ou nanoparticulado através da transmissão de elétrons que formam a

imagem em consequência à interação desses elétrons com a matéria (MOURA, 2009).

Em relação à morfologia das nanopartículas, detectou-se certa semelhança entre as partículas das diversas formulações, apresentando uma morfologia homogênea. Todas as nanopartículas apresentaram um formato esférico com variações no tamanho tanto na própria formulação como entre as outras formulações (Figura 15).

Azevedo (2011), criando um sistema nanoestruturado de PLGA contendo itraconazol, encontrou semelhança nas formas de suas nanopartículas, apresentando formato regular e esférico.

Os tamanhos médios das partículas, determinados pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão, ficaram entre 20 a 70nm, apresentando um tamanho menor ao determinado pelo espectroscópico de correlação de fótons na análise do tamanho de partícula. Na análise de MET, a suspensão das nanopartículas é gotejada sobre a grade e, então, secada, para só assim ser analisada. Com isso a água presente dentro das nanopartículas é eliminada, causando uma contração e uma diminuição no seu tamanho.

As nanopartículas de formulação 0,8% - 1,0% e 1,0% - 1,0% (QS - PMAA) apresentaram os dois menores tamanhos, correspondendo ao resultado obtido pela análise de tamanho de partícula feito no Zetasizer-NanoZS90 (Malvern) na análise de tamanho de partícula.

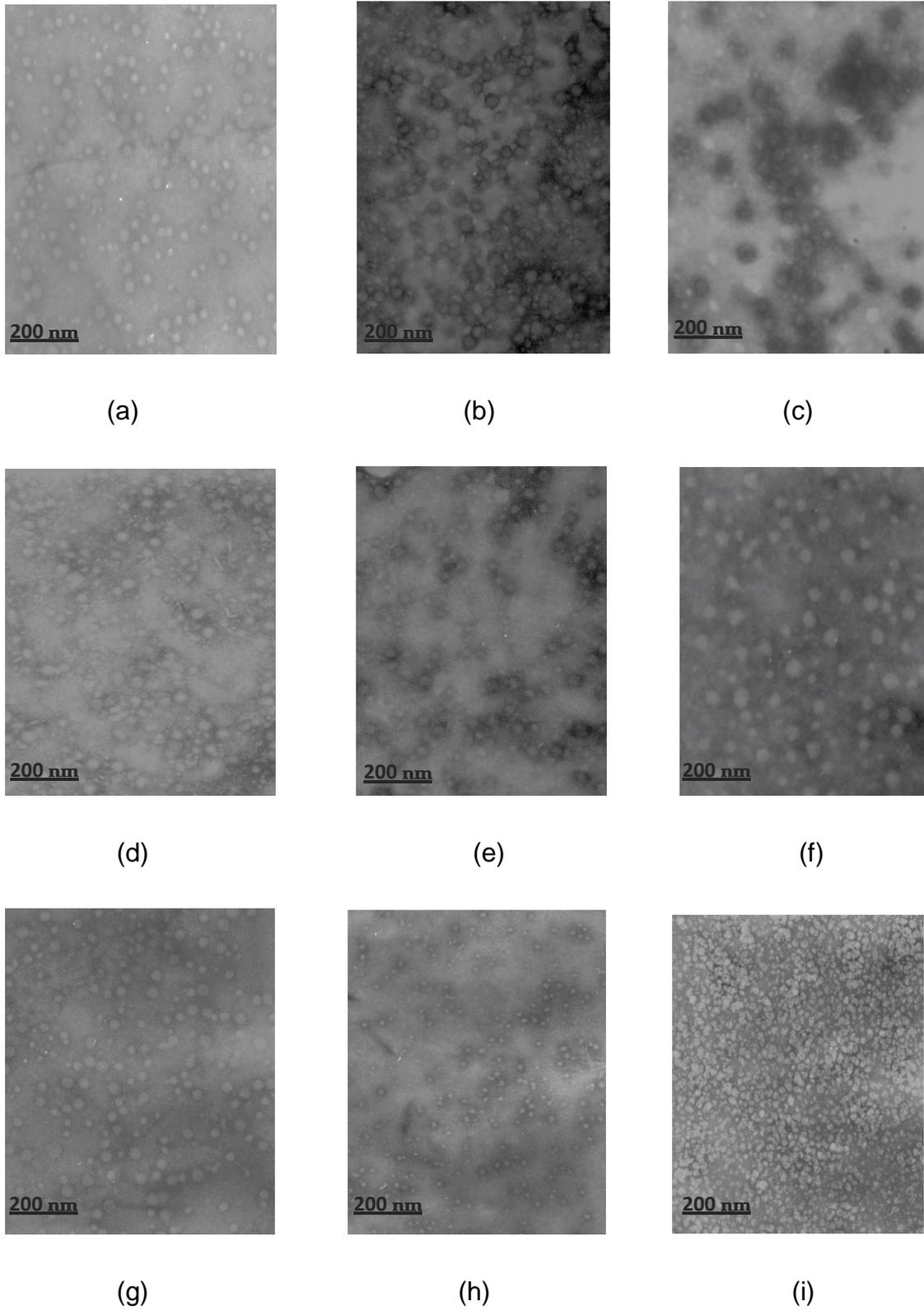


Figura 15: Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de quitosana. a) 0,5% - 0,5% (QS - PMAA); b) 0,8% - 0,5%; c) 1,0% - 0,5%; d) 0,5% - 0,8%; e) 0,8% - 0,8%; f) 1,0% - 0,8%; g) 0,5% - 1,0%; h) 0,8% - 1,0%; i) 1,0% - 1,0%.

Moura *et al.* (2008), realizando a análise de nanopartículas de QS – PMAA, encontraram tamanhos de 38, 50 e 78nm para sistemas de quitosana na síntese, contendo 0,8; 0,5 e 0,2% (m/v), respectivamente.

Ferreira (2009) utilizou a microscopia eletrônica de transmissão para determinar o tamanho de nanopartículas magnéticas coberta com sílica, encontrando um tamanho de aproximadamente 43nm.

Houve poucas aglomerações entre as nanopartículas, ficando estas bastante dispersas, demonstrando que a sonicação foi eficiente antes e durante a visualização. Além disso, esta dispersão foi facilitada pelo meio ácido em que as nanopartículas se encontravam, já que neste meio os grupos NH_3^+ da quitosana são protonados, causando uma repulsão entre as partículas.

Landi (2009), no desenvolvimento de nanopartículas de cobalto, não conseguiu visualizar a distribuição de tamanho devido à ocorrência de uma aglomeração entre as partículas formando uma estrutura rugosa e desordenada.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

Quanto ao tamanho de partícula, este variou entre 124 – 235nm (Tabela 3), ficando em tamanhos coerentes aos que são relatados na literatura, que são normalmente de 100 – 300nm. Verificou-se, de acordo com o resultado, uma dependência da quantidade de quitosana na síntese e no tamanho médio das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Blanco (2009) encontrou os tamanhos de partículas no intervalo de 79 a 342nm para nanopartículas de quitosana produzidas com o objetivo de incorporarem cimentos endodônticos AH PlusTM como estratégia para melhorar a atividade antimicrobiana deste cimento. Hu *et al.* (2002) também encontraram tamanhos menores que 300nm em nanopartículas de QS – PMAA em diferentes proporções.

Para as nanopartículas com ácido metacrílico a 1,0%, o tamanho das partículas diminuiu à medida que aumentou a concentração de quitosana. Para aquelas partículas com ácido metacrílico, a 0,5%, o menor tamanho foi observado àquela de maior concentração de quitosana. Já para as nanopartículas com ácido metacrílico, a 0,8%, o menor tamanho de partícula foi observado para formulação de 0,8% - 0,8% (QS - PMAA).

Pôde-se observar que, nas formulações preparadas, quanto maior a massa de quitosana menor o tamanho das nanopartículas formadas, exceto no caso das formulações de concentração de 0,8% de ácido metacrílico. Resultado semelhante também foi observado por Moura (2009), que preparou nanopartículas QS - PMAA nas concentrações de 0,2%, 0,8% e 1,0% em solução de ácido metacrílico 0,5%, onde as últimas nanopartículas de 1,0% QS (p/v) apresentaram o menor tamanho.

Tang *et al.* (2006), preparando nanopartículas de Dextrana – ácido acrílico (AA), verificaram uma dependência do tamanho de partícula com a quantidade do polissacarídeo, ou seja, quanto maior a quantidade de dextrana menor foi o tamanho das partículas.

Em relação a todas as 9 formulações de nanopartículas, a de menor tamanho foi aquela de 1,0% - 1,0% (QS - PMAA), com 124nm. Pode-se observar que, nesta formulação, houve maior concentração de ácido metacrílico, assim como de quitosana, onde ambos se equivaleram.

Todas as nanopartículas apresentaram potencial zeta com carga positiva em pH 7,2; tal resultado foi importante para realizar a adsorção do antígeno que tem carga negativa no mesmo pH (Tabela 3).

O potencial zeta da maioria das nanopartículas ficou na faixa de valores de 5,5 - 9,8mV. Porém, tivemos valores menores de 2,2 e 2,6 para as nanopartículas de 0,8% - 0,5% e 1,0% - 0,8% (QS - PMAA), respectivamente.

Tabela 3: Valores do tamanho de partículas e potencial zeta das nanopartículas QS - PMAA.

Amostra (QS + PMAA)	Tamanho de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
0,5% - 0,5%	213,9	4,8
0,8% - 0,5%	234,9	2,2
1,0% - 0,5%	153,9	9,8
0,5% - 0,8%	222,7	6,79
0,8% - 0,8%	173,6	6,69
1,0% - 0,8%	206,7	2,65
0,5% - 1,0%	193,2	5,55
0,8% - 1,0%	131,4	6,34
1,0% - 1,0%	123,9	7,45

Na literatura, já foi relatada a importância do pH do meio em relação às nanopartículas, sendo que, em pH ácido, as nanopartículas tiveram cargas positivas e, em meio básico, apresentaram cargas negativas. A positividade das partículas esteve relacionada às características catiônicas da molécula de quitosana, enquanto que a negatividade teve relação com a desprotonação do ácido metacrílico em meio básico (MOURA *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que quanto menor a nanopartícula maior será o valor do potencial zeta (BLANCO, 2011). Esta afirmativa, todavia, somente foi verdadeira para as nanopartículas com concentração de ácido metacrílico de 0,5% e 1,0%.

As características catiônicas das nanopartículas são influenciadas pela presença do grupo amino na molécula de quitosana. No presente trabalho, utilizou-se o pH 7,2, o qual está na faixa do pKa dos grupos aminos de 6,3 – 7,2 (GONSALVES *et al.*, 2011).

Um potencial zeta alto é importante, pois cria uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal devido às grandes forças repulsivas que tendem a evitar a agregação em função das colisões de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

5.4.3 ANÁLISE TÉRMICA DAS NANOPARTÍCULAS

São várias as modificações dos polímeros ao serem aquecidos a altas temperaturas, como a formação de gases, líquidos e mudanças de cores. A degradação térmica acaba por quebrar ligações entre as cadeias principais e laterais, dessa maneira, causando a formação de outros produtos, porém a capacidade dos polímeros de resistir à decomposição por certo período é denominada estabilidade térmica (DAMIAN, 2005).

A análise termogravimétrica (TG) é utilizada para a determinação da estabilidade térmica e/ou a taxa de composição de uma substância em função da temperatura. É amplamente usada no estudo da eficácia da aplicação de materiais

orgânicos quando se deseja avaliar a estabilidade térmica e oxidativa desses materiais (FARJADO, 2009).

As curvas TG/DTG e DTA para a quitosana pura, na razão de 10°C/min, obtidas em atmosfera de nitrogênio são indicadas na figura 16, onde se veem dois eventos de perdas de massa. O primeiro ocorreu entre 25 - 120°C, com um percentual aproximado de 11% de perda de massa, e o segundo teve início em 220°C até a temperatura de 600°C, com uma perda de aproximadamente 71%.

O primeiro estágio correspondeu ao desprendimento de água adsorvida no polímero. A água ligou-se principalmente aos grupos hidroxila e amina da quitosana, sendo que a interação ocorreu mais fortemente com os grupos hidroxila. Esta ligação da água sucedeu-se principalmente por pontes de hidrogênio (NETO, 2005).

Já o segundo estágio está relacionado à degradação térmica do polímero a partir desta temperatura, ou seja, o polímero de quitosana apresentou resistência até essa temperatura.

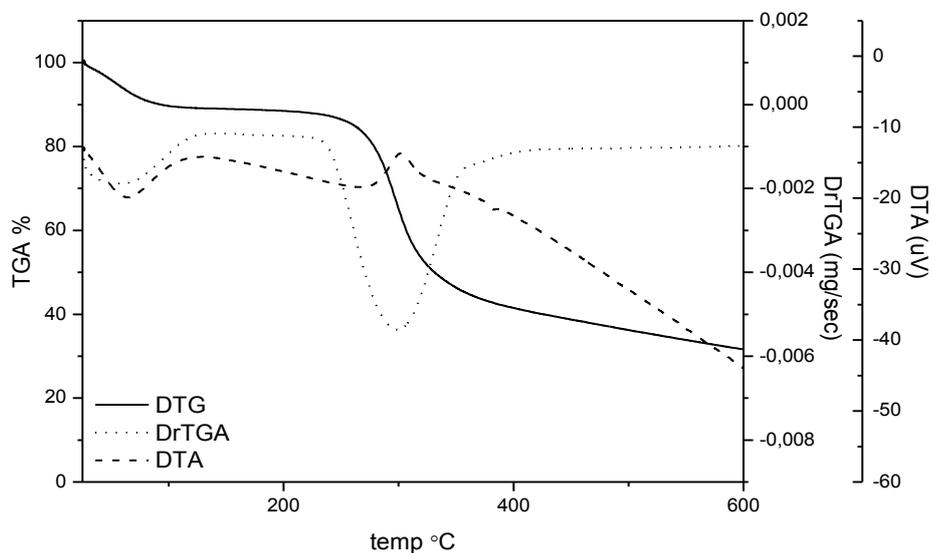


Figura 16: Curva TG/DTG e DTA da quitosana pura em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) com razão de aquecimento de 10°C/min.

A curva DTA da quitosana pura na razão de 10°C/min assinalou um pico endotérmico que se relaciona à perda de água que ocorreu no polímero, ficando próximo a 100°C. Pôde-se visualizar a presença também de um pico exotérmico próximo a 290°C, correspondente à degradação da quitosana. Ambos verificados na curva TG/DTG.

Nas amostras de nanopartículas de QS - PMAA, observou-se um comportamento da curva TG/DTG semelhante ao da quitosana pura, com a presença de dois estágios de perda. O primeiro, entre 25 - 122°C, e o segundo com início em 225°C até a temperatura de 600°C. As curvas TG/DTG e DTA estão representadas na figura 17.

O primeiro estágio está relacionado à perda de voláteis ligados às nanopartículas; enquanto o segundo, à decomposição térmica. Neste segundo estágio, observaram-se várias decomposições da nanopartícula, principalmente, a quebra da ligação entre a quitosana e o ácido metacrílico.

O comportamento térmico das nanopartículas foi idêntico ao observado na quitosana pura, na razão de aquecimento de 10°C/min. Com isso, foi comprovado que não houve diminuição da estabilidade térmica das nanopartículas em relação à quitosana.

Em relação à curva DTA das nanopartículas observou-se um evento endotérmico próximo à temperatura de 100°C, com relação à perda de água do sistema. Esta perda foi um pouco maior nas nanopartículas, devido à água mostrar-se mais fortemente ligada às nanopartículas (MOURA *et al.*, 2008).

Houve um evento exotérmico a partir da temperatura de 300°C, devido ao início da degradação das nanopartículas. Esta temperatura de degradação foi maior em relação à quitosana pura, o que mostra que as nanopartículas apresentam termicamente maior estabilidade. Isto pode ser explicado devido à presença da ligação entre a quitosana e o ácido metacrílico, onde é necessária uma maior temperatura para a quebra desta ligação.

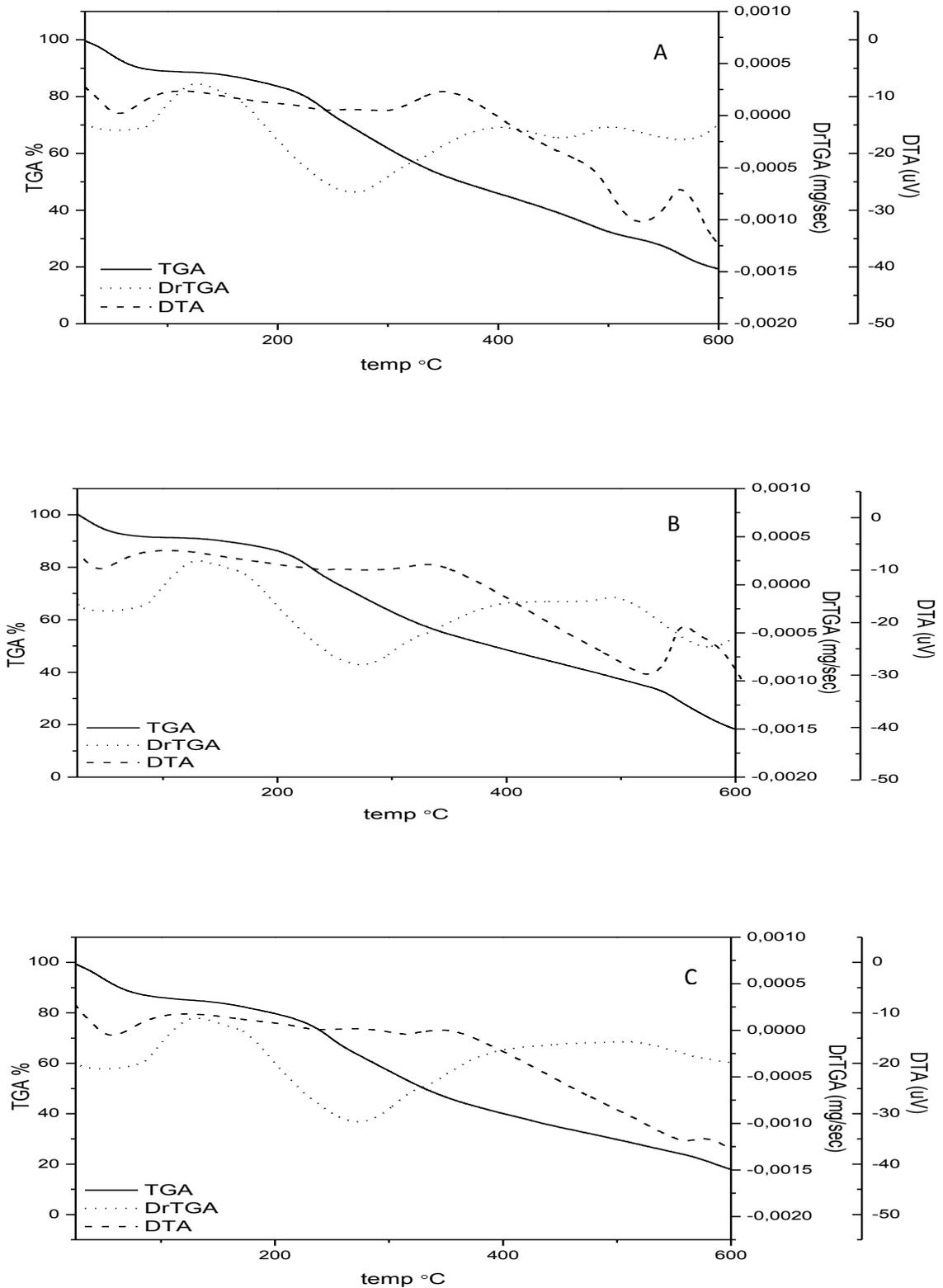


Figura 17: Curvas TG/DTG e DTA das nanopartículas de QTS - PMAA, nas proporções: A) QS 0,5%-PMAA 0,5%; B) QS 0,8% - PMAA 0,5% e C) QS 1,0% - PMAA 0,5% obtidas em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) na razão de aquecimento de 10°C/min.

Nas diferentes formulações de nanopartículas, como ilustrado nas figuras 17-A, 17-B e 17-C, detectou-se um pequeno deslocamento da temperatura de degradação, sendo que, quanto maior a concentração de quitosana na solução maior a temperatura de degradação.

O percentual de perda de água das nanopartículas de formulações 0,5 – 0,5%, 0,8 – 0,5% e 1,0 – 0,5% (QS - APMA) foi de aproximadamente 11, 12 e 15%, respectivamente, tendo diferença nos valores entre si e se aproximando do valor do percentual de água, que foi de 11%. Moura (2009) observou o mesmo comportamento para nanopartículas e água, porém, em relação às nanopartículas entre si, não verificou qualquer diferença significativa nos valores de perdas.

Este percentual maior de perda de voláteis nas partículas, à medida que se aumentou a proporção de massa de quitosana, pode ser devido à presença de maior número de grupos hidroxilas e amins da quitosana, fazendo com que haja maior número de água ligada por pontes de hidrogênio.

Ademais, quanto maior a quantidade de quitosana maior foi o percentual de perda de massa no estágio de degradação, tendo porcentagem de 74,27%, 77,61% e 84,03% para as quantidades de 0,5%, 0,8% e 1,0% de QS, respectivamente, assim, confirmando a grande estabilidade das nanopartículas.

O estudo de análise térmica é um importante passo na caracterização da quitosana em diferentes modelos de estudo por demonstrar até qual temperatura ocorre a estabilidade térmica do material em estudo.

Tonhi e Plepis (2002) estudaram a degradação térmica da quitosana em blendas formadas com o colágeno em diferentes proporções. Chaves *et al.* (2009), também, utilizaram a análise térmica na caracterização da quitosana como pré-requisito no estudo da adsorção do corante têxtil violeta 5R Remazol em quitosana no meio aquoso.

5.5 Cinética de adsorção

A adsorção é um processo que ocorre entre o adsorvente, que, geralmente, encontra-se no estado sólido, e o adsorbato, que pode estar no estado líquido. Um dos pontos de sucesso que deve ser levado em consideração durante o processo de adsorção é a distribuição do tamanho de partículas do adsorvente, área específica da superfície do adsorvente, estabilidade mecânica, química e térmica (KALYANPUR, 2002).

As nanopartículas de quitosana representam a fase sólida deste sistema; e o antígeno Vi, a fase líquida. As nanopartículas escolhidas para adsorção foram as de composição de quitosana 1,0% e ácido metacrílico 1,0%, com tamanho de 124nm e carga de superfície de +7,45mV.

A cinética de adsorção do antígeno nas nanopartículas pode ser visualizada na figura 18. A quantidade do antígeno presente na solução é inversamente proporcional à quantidade do antígeno que foi adsorvido na matriz polimérica. A taxa de adsorção do antígeno nas partículas foi de 55% no intervalo 24 horas de cinética, que permaneceu constante ao longo do tempo.

Vasconcelos (2007), realizando o processo de adsorção, obteve uma adsorção de 55% ou $0,55\text{gm}^{-2}$ utilizando albumina em nanopartículas de quitosana – poli (ácido metacrílico) em pH 5,6.

A cinética de adsorção pode ocorrer de duas formas: física ou química. Na forma física, a interação adsorvente-adsorbato é considerada não específica e geralmente rápida e reversível, sustentado por forças de Van der Waals. Porém a adsorção química é do tipo específico entre os sítios de ligação do adsorvente e do adsorbato (FURUSAKI *et al.*, 1996).

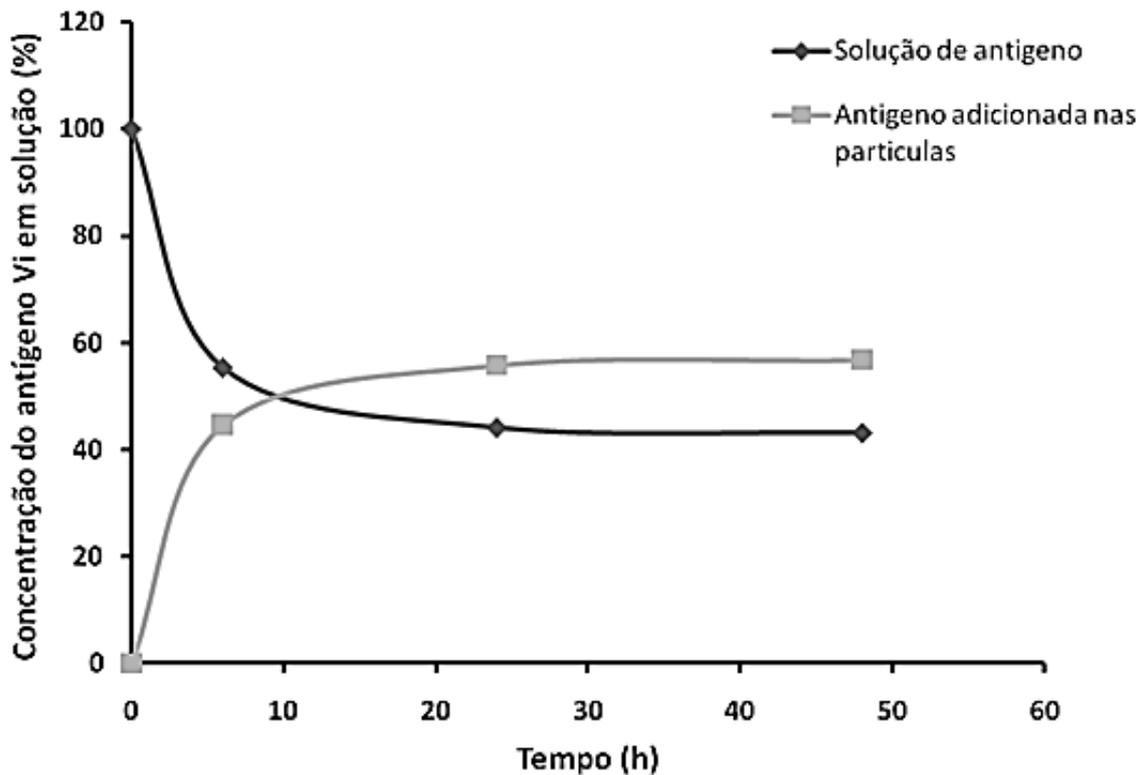


Figura 18: Gráfico da cinética de adsorção do antígeno Vi em solução nas nanopartículas de quitosana 1,0% - 1,0% (QS - PMAA).

Assim, considera-se que o processo de adsorção ocorreu através de uma interação química baseada na atração eletrostática da superfície positiva das QS-PMAA (1,0% - 1,0%), com a carga negativa do antígeno Vi em meio de pH 7.2. Estudos referem que a negatividade do antígeno Vi ocorre no grupo carboxílico; enquanto que a positividade das nanopartículas, no grupo amina. Com isso, provavelmente, deu-se uma ligação química entres esses grupos no processo da cinética de adsorção (LEGNANI *et al.*, 2011).

6 CONCLUSÃO

O antígeno Vi capsular foi isolado com sucesso a partir de cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, independente das diferentes técnicas empregadas para a morte ou inativação da bactéria. O antígeno foi caracterizado qualitativamente pelas

técnicas de espectroscopia do infravermelho e ressonância magnética nuclear, que confirmaram a presença do antígeno Vi nas suspensões finais, tendo como comparação o antígeno utilizado como referência. No espectro de RMN das amostras foram evidenciados os cinco picos correspondentes ao hidrogênio da estrutura antigênica. Na espectroscopia de infravermelho foram notificadas as bandas características do antígeno com o ácido carboxílico e os grupos O-acetil e N-acetil, além de estruturas polissacarídicas. Assim, certificou-se que as suspensões antigênicas mantiveram os seus grupamentos químicos característicos, apresentando total similaridade em relação ao antígeno Vi puro.

A caracterização das nanopartículas de QS – PMAA é fundamental para demonstrar que houve realmente a formação das diferentes formulações e que suas propriedades podem ser moldadas conforme sua composição. As nanopartículas apresentaram formato esférico e regular.

A análise térmica demonstrou que as nanopartículas são mais estáveis termicamente em relação à quitosana pura e que quanto maior a concentração de quitosana na solução, maior a temperatura de degradação. Além disso, as nanopartículas se apresentaram bastantes estáveis em alta temperatura.

O potencial zeta das partículas foi averiguado em pH 7.2, que foi o mesmo do antígeno Vi puro, e todas apresentaram cargas catiônicas. Ao contrário, o antígeno apresentou carga negativa. A determinação da carga da superfície das partículas e do tamanho foi determinante para escolha do sistema que seria realizada a cinética de adsorção do antígeno.

Na cinética de adsorção obteve-se 55% do antígeno, contido na solução, adsorvido na matriz polimérica, confirmando que realmente houve atração do antígeno pelas nanopartículas, através de uma ligação eletrostática entre os grupamentos do antígeno com os das partículas.

Por fim, considera-se que os resultados obtidos neste trabalho foram importantes no sentido de mostrar que é possível obter um sistema de liberação controlada de nanopartículas de quitosana contendo antígeno capsular Vi de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, sendo fundamental para estudos futuros ligados

a vacinas contra a febre tifóide, atribuindo à eficiência das nanopartículas de quitosana e à imunogenicidade do antígeno.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Propriedade gerais das respostas imunológicas. In: ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6° ed. São Paulo: Elsevier, 2008, cap. 1, p.3 - 17.

ABDEL – FATTAH, W. I.; JIANG, T.; EL – BASSYOUNI, G. E. T.; LAURENCIN, C. T. Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan for microsphere matrices for bone tissue engeneering. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 503 – 514, 2007.

ACKERS, M. L.; PUHR, N. D.; TAUXE, R. V.; MINTZ, E. D. Laboratory - based surveillance of *Salmonella* serotype Typhi infections in the United States: antimicrobial resistance on the rise. **Jama**, v. 283, p. 2668 - 2673, 2000.

ALLEN, T. **Particles size measurement**, 5 ed., v.1, London: Chapman and Hall, 1997.

ALVES,J. **Amapá digital- Surto de Febre tifóide: Surto sobe para risco de epidemia**. Disponível em: <www.amapadigital.net> . Acesso em 12 fev. 2012.

ANGERAMI, R. N. Febre tifóide. In: NETO, A.; BALLALAI, I. **Guia de vacinação do viajante brasileiro**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de imunizações, 2009. p. 39 – 40.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Quim. Nova**, v. 30, n. 6, p. 1484 - 1490, 2007.

ARCHARYA, I.; et al. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella* Typhi. **N. Engl. J. Med.** v. 317, p. 1101-1104, 1987.

ASHCROFT, M. T.; MORRISON-RITCHIE, J.; NICHOLSON, C. C. Controlled field trial in British Guyana school-children of heat-killed phenolized and acetone-killed lyophilized typhoid vaccines. **Am. J. Hyg.** v. 79, p. 196 - 206, 1964.

ASHCROFT, M. T.; SINGH, B.; NICHOLSON, C. C.; RITCHIE, J. M.; SORRYAN, E.; WILLIAMS, F. A seven-year field trial of two typhoid vaccines in Guyana. **Lancet**, v. 2, p. 1056 - 1059, 1967.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de adsorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros, Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 13, n.4, p. 223 – 228, 2003.

AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; SOUZA, A. A.; ENGELSBERG, M. Continuous wave free precession practical analytical tool for low-resolution nuclear magnetic resonance measurements. **Anal. Chim. Acta**, v. 478, n.2, p. 313 – 320, 2003.

AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Monografia correspondente à avaliação do curso tópicos especiais em química inorgânica - Instituto de Química, Universidade de Campinas, São Paulo, 2002.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. Quitina e quitosana: Aplicações como biomateriais. **Rev. Eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, p. 27 – 34, 2007.

AZEVEDO, E. P. C. **Nanopartículas biodegradáveis de PLGA, recoberta com DMSA contendo intraconazol para o tratamento da Paracoccidioidomicose**, 2011, 96f. Dissertação (Doutorado em ciências da Saúde). Faculdade de ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BARROS, F. C. F.; CAVALCANTE, R.N.; CARVALHO, T. V.; DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; VASCONCELLOS, L. C. G.; NASCIMENTO, R. F. Produção e caracterização de esferas de quitosana modificada quimicamente. **Rev. Iberoamericana de Polímeros**, v. 7, p. 232 – 246, 2006.

BASTOS, F. C.; LIMA, K. V. B.; SÁ, L. C.; SOUZA, C. O.; LOPES, M. L.; RAMOS, F. L. P. Variabilidade genética de amostras de *Salmonella* Typhi isoladas de surtos e de casos esporádicos ocorridos em Belém, Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, Rio de Janeiro, v. 44, n.4, p. 271 – 276. 2008.

BEDÉ, P. M. **Produção e Caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas**, 2010, 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Instituto Militar de Engenharia – Secretaria de ciências e tecnologia, Rio de Janeiro, 2010.

BENOIT, J. P.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Carrier or modulated distribution forms, new systems for drug administration. **J. Pharm. Belg.**, v. 41, p. 319 - 329, 1986.

BLANCO, M. A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS™**. 2011.78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de materiais) – Programa de pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BOYD, R. F. *Salmonella*. In: BOYD, R. F. **Basic med. microbiology**, library of congress, 1995, cap. 21, p.298 - 302.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G.; GOLIMOWSKI, J.; URBAN, P. L. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Manag**, v. 29, p. 2587- 2595, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Febre Tifoide**. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, 2002, caderno 5, p. 49 – 60.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Integrado de Vigilância e Controle da febre tifóide. Brasília, 2010, serie A, p. 7-17.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº2325/GM**. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2003/GM/GM-2325.htm>>. Acesso em: 02 jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência nacional de vigilância sanitária**. Doenças e agravos de interesse de saúde, 2007. Disponível em <<http://portal.saude.org.br/portal/agravos/pdf/ftifoide-2006-pdf>>. Acesso em 17/ 02/ 11.

BURJACK, J.R. **Produção de exopolissacarídeos e polissacarídeos de parede celular de leveduras negras de interesse clínico**. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas). Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do paraná, Curitiba, 2010.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5^o Ed. São Paulo: Atheneu, 2008, cap. 43, p. 319 – 328.

CAROLEI, L. **Determina o de surfactantes e água em formula es de sabonetes líquidos e Shampoos por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR)**. 2005. 108 f. Disserta o (Doutorado em química) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CAVALHEIRO, E. T. G.; IONASHIRO, M.; BREVIGLIERI, S. T.; MARINO, G.; CHIERICE, G. O. A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. **Quim. Nova**, v. 18, p. 305 – 308, 1995.

CHALLA, G. TAN, Y. Y. Template polymerisation. **Pure & Appl. Chem.** v. 53, p. 627-641, 1981.

CHAVES, J. A. P.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S.; SANTANA, S. A. A. Caracteriza o e aplica o do biopolímero quitosana como removedor de corante têxtil presente em meio aquoso. **Cad. Pesq.** v. 16, n. 2, p. 2009.

CHINWA, S.; MASCHERETTI, M.; CHAVES, T. S. S.; LOPES, M. H. Vacina o dos viajantes: experiência do ambulatório dos viajantes do hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Rev. da Sociedade Bras. de Med. Tropical**, v. 41, p. 474 – 478, 2008.

COIMBRA, P. M. A. **Prepara o e Caracteriza o de sistemas de libera o controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. (2010). 268 f. Disserta o(Doutorado em engenharia química) – Faculdade de ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**, 3 ed., San Diego: Academic Press, 1990, p. 1 – 215.

CONNOR, B. A.; SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. **Lancet Infect. Dis.** v. 5, p.623 – 628, 2005.

CRUMP, J. A.; LUBY, S.P.; MINTZ, E. R. The global burden of typhoid fever. **WHO**, v. 82, p. 346 - 352, 2004.

CUI, C.; CARBIS, R.; AN S. J.; JANG, H.; CZERKINSKY, C.; SZU, S. C.; CLEMENS, J. D. Physical and chemical characterization and immunologic properties of *Salmonella* enterica serovar Typhi capsular polysaccharide – diphtheria toxoid conjugates. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.1, p. 73 – 79, 2010.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; DE FRANCISCO, A.; TEXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr.**, v. 16, n2, p. 195-205, abr/jun. 2005.

DANIELS, E.M.; SCHNEERSON, R.; EGAN, W. M.; SZU, S. C.; ROBBINS, J. B. Characterizations of the *Salmonella* Paratyphi C Vi polysaccharide. **Infect. Immun.** v.57, p. 3159 - 3164, 1989.

DAUGHERTY, A. I.; MRSNY, R. J. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, p. 686 – 706, 2006.

DENKBAS, E. B.; KILIC, E.; BIRLIKSEVEN, C.; OZIURK, E. Magnetic chitosan microspheres: Preparation and characterization. **Reactive and Functional Polymers**, v.50, p. 225 - 232, 2002.

DUARTE, C, J. **Precessão livre de onda contínua (CWFP) como ferramenta para a supressão do sinal de solvente em RMN de alta resolução**. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em química) – Departamento de química, universidade de São Carlos, São Paulo, 2011.

EDWARDS, P. R.; EWING, W. H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 4 ed. New York: Elsevier, p.536, 1986.

ENGELS, E. A.; FALAGAS, M. E.; LAU, J. BENNISH, M. L. Typhoid fever vaccines a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity. **BMJ**. v. 316, p. 110 - 116, 1998.

ESCHER, F. F. N. **Determinação da microestrutura e relação com as propriedades dos terpolímeros de etileno – propileno – α – olefinas**. 2004. 156 f. Dissertação (Doutorado em Química) – Programa de pós – graduação em química – Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

FAJARDO, A. R. **Caracterização de complexos polieletrólíticos de quitosana/sulfato de condroitina em diferentes condições de pH e tempos de imersão**, 2009, 97 f. Dissertação (Mestrado de Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. **Drug. Dev. Ind. Pharm.** v. 24, p. 93 – 979, 1998.

FERREIRA, R. V. **Síntese e Caracterização de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com núcleo magnético de magnetita**. 2009. 104f. Dissertação (Mestrado em química) – Departamento de química – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FIDAN, I.; YESILYURT, E.; GURELIK, F. C.; ERDAL, B.; IMIR, T. Effects of recombinant interferon- γ on cytokine secretion from monocyte-derived macrophages infected with *Salmonella* Typhi. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 467 – 475, 2008.

FILHO, G. B.; PITELLA, J. E. H.; PEREIRA, F. E. L.; BAMBIRRA, E. A.; BARBOSA, A. J. A. infecções por *Salmonellas*. In: FILHO, G. B.; PITELLA, J. E. H.; PEREIRA, F. E. L.; BAMBIRRA, E. A.; BARBOSA, A. J. A. **Patologia Bogliolo**, 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 1994, p. 315 - 318.

FRIEDE, M.; AGUADO, M. T. Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 325 – 331, 2005.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. L. C. Polissacarídeo de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Seminários: Ciências Agrárias**. v.30, n.1, p.117-134, 2009.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionichidocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate e chitosan a review. **J. Control. Release**, v. 114, p. 1 – 14, 2006.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, métodos e aplicações**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002, p. 39 – 43.

GONSALVES, A. A. G.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação da quitosana. **Quím. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215 – 1223, 2011.

GUERIM, H. ***Exophiala Spinifera*: Polissacarídeos da parede celular, exopolissacarídeos e antígenos**. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GUIMARÃES, T. F. **Nanopartículas de quitosana como carreadores de etoposide**, 2005, 102f. Dissertação (Mestrado de Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005

GULIYEVA, V.; ONER, F.; OZSOY, S.; HAZIROGLU, R. Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system. **Euro. J. Pharm. and Biopharm.**, v. 62, p. 17 – 25, 2006.

GUZMAN, A. C.; BORSUTZKY, S.; GRIOT-WENK, M.; METCALFE, C. I.; PEARMAN, J.; COLLIOD, A.; FAVRE, D.; DIETRICH, G. Vaccines against typhoid fever. **Sciences Direct**, p. 3804 – 3811, 2006.

HAACH, M. S. **Análise de materiais por espectroscopia no infravermelho dentro do sistema de gestão de qualidade conforme ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 2010.

50 f. Dissertação (Graduação em Bacharel em Química) – Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HASHIMOTO, Y.; LI, N.; YOKOYAMA, H.; EZAKI, T. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of Via B region encoding Vi antigen in *Salmonella* Typhi. **J. Bacteriol.** v. 175, 4456 - 4465, 1993.

HAUSNER, H. H. Powder characteristics and their effect on powder processing. **Powder Technol.** v. 30, p. 3 – 8, 1981.

HEYNS, K. *et al.* D-Galaktosaminuornsäure (2-amino-2-desoxy-D-galakturonsäure) als Baustein des Vi-Antigens. **Chem. Ber.** v.92, p.2435 - 2437, 1959.

HESSEL, L.; DEBOIS, H.; FLETCHER, M.; DUMS, R. Experience with *Salmonella* TyphiVi capsular polysaccharide vaccine. **Euro. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis**, p. 609 – 620, 1999.

HOFFNER, R. ; SLAVE, E.; PEREZ, J.; MAGANA, R. N.; HENDERSON, S. O. Emergency department presentations of typhoid fever. **The J. Emergency Medic.**, v. 19, n 4, p. 317 - 321, 2000.

HOLAND, W.; RHEINBERGER, V.;APEL, E.; RITZBERGER, C.; ROTHBRUST, F.; KAPPERT, H.; KRUMEICH, F.; NESPER, R. Future perspectives of biomaterials for dental restoration. **J. Eur. Ceram. Soc.**, v. 29, p. 1291-1297, 2009.

HONE, D. M.; ATTRIDGE, S. R.; FORREST, B.; MORONA, R.; DANIELS, D.; La BROOY, J. T.; CHIRON, R. BARTHOLOMEUSZ, A.; SHEARMAN, D. J. C.; HACKETT, J. A galE⁻ (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella* Typhi Ty2 retains virulence in humans. **Infect. Immun.** v. 56, p. 1326 - 1333, 1988.

HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; GE, H.; YUAN, Y.;YANG, C. Synthesis and characterization of chitosan – poly (acrylic acid) nanoparticles. **Biomaterials**, v. 23, p. 3193 – 3201, 2002.

IKINCI, G.; SENEL, S.; AKINCIBAY, H.; HAS, S.; ERCIS, S.; WILSON, C. G. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Int. J. Pharm**, v. 235, p. 7 – 121, 2002.

IVANOFF, B.; LEVINE, M. M.; LAMBERT, P. H. Vaccination against typhoid fever: present status. **Bulletin of the World Health Organization**, v.72, p. 957- 971, 1994.

JIA, Z.; SHEN, D.; XU, W. Kinetic analysis of interaction between lipopolysaccharide and biomolecules. **Carbohydr. Res**, v. 333, p. 1 - 46, 2001.

JOHNSON, E. M.; BARON, L. S. Genetic transfer of the Vi antigen from *Salmonella* typhosa to *Escherichia Coli*. **J. Bacteriol.** v. 99, p. 355 - 359, 1969.

JOHNSON, E. M.; KRAUSKOPF, B.; BARON, L. S. Genetic analysis of the VIA – his chromosomal region in *Salmonella*. **J. Bacteriol**, v. 92, p. 1457 – 1463, 1966.

JOHNSON, E. M.; KRAUSKOPF, B.; BARON, L. S. Genetic mapping of Vi and somatic antigenic determinants in *Salmonella*. **J. Bacteriol.** V. 90, p. 302 - 308, 1965.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERES, V. T.; KIMURA, I. Y. Liberação da eosina impregnada em microesferas de copolímeros de quitosana e poli(ácido acrílico). **Polímero: Ciência e Tecnologia**, v. 10, n. 3, p. 116 - 121, 2000.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detection and reverse field gradients in the composition structure of organic compounds. **Quím. Nova**, v. 23, p. 231 - 236, 2000.

KALYANPUR, M. Downstream processing in the biotechnology industry. **Molecular Biotechnology**, v. 22, p. 87 – 98, 2002.

KARAKAWA, W. W.; VANN, W. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus Aureus*. In: WEINSTEIN, L.; FIELDS, B. N. **Seminars in infectious diseases. IV. Bacterial vaccines**. New York: Theimestratton, inc, 1982, p. 285 - 29.

KEDDY, K. H.; *et al.* Persistence of antibodies to the *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine in South African school children ten years after immunization. **Vaccine**, v. 17, p.110 - 133, 1999.

KOSSACK, R. E.; GUERRANT, R. L.; DENSEN, P.; SCHADELIN, J.; MANDELL, G. L. Diminished neutrophil oxidative metabolism after phagocytosis of virulent *Salmonella Typhi*. **Infect. Immun.** , v. 31, p. 674 - 678, 1981.

KOSSACZKA, Z.; LIN, F. Y.; HO, V. A.; THUY, N. T.; VAN BAY, P.; THANH, T. C.; KHIEM, H. B.; TRACH, D. D.; KARPAS, A.; HUNT, S.; SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B.; SZU, S. C.; BRYLA, D. A. Safety and immunogenicity of Vi conjugate vaccines for typhoid fever in adults, teenagers, and 2- to 4-year-old children in Vietnam. **Infect. Immun.** v. 67, p. 5806 – 5810, 1999.

LANDI, G. T. **Desenvolvimento de um gerador de nanopartículas e caracterização de nanopartículas de cobalto**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LANDY, M. Studies on Vi antigens: immunization of human beings with purified Vi antigen. **Am. J. Hyg.**, v. 60, p. 52 - 62, 1954.

LANGER, R.; TIRRELL, D. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, p. 487 – 492, 2004.

LEDER, K.; WELLER, P. F.; WILSON, M. E. Travel vaccines and elderly persons: Review of vaccines available in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.1553 - 1566, 2001.

LEGNANI, L.; COMPOSTELLA, F.; GRAZIOSO, G.; ALBINI, F. M.; TOMA, L. Molecular dynamics simulations of the *Salmonella Typhi* Vi antigenic polysaccharide and effects of the introduction of a zwitterionic motif. **Org. Biomol.Chem**, v. 9, p. 5554–5559, 2011.

LEMERCINIER, X.; MARTINEZ-CABRERA, I.; JONES, C. Use and validation of an NMR test for the identity and O-acetyl content of the *Salmonella Typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine. **Biologicals**, v.28, p 17- 24, 2000.

LEVINE, M. M. Can needle-free administration of vaccines become the norm in global immunization?. **Nat Med**, v. 9, p. 99 – 103, 2003.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Bastonetes gram – negativos relacionados ao trato entérico: *Salmonella*. In: LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunológica**, 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, cap.18, p.133 – 135.

LI, Q. *et al.* Applications and properties of chitosan. In: GOOSEN, M. F. A. Applications of chitin and chitosan. **Basel: Technomic**, 1997, p. 3 – 29.

LIN, F. Y.; HO, V. A.; KHIEM, H. B.; TRACH, D. D.; BAY, P. V.; THANH, T. C.; KOSSACZKA, Z.; BRYLA, D. A.; SHILOACH, J.; ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R.; SZU, S. C. The efficacy of a *Salmonella* Typhi Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. **N. Engl. J. Med.** v. 334, p. 1263 - 1269, 2001.

LODISH, H.; BERK, H.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, S. L.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. In: LODISH, H.; BERK, H.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, S. L.; DARNELL, J. 2003, cap. 1, p. 147 – 196.

LOONEY, R. J.; STEIGBIGEL, R. T. Role of the Vi antigen of *Salmonella* Typhi in resistance to host defense in vitro. **J. Lab. Clin. Med.** , v. 108, p. 506 - 516, 1986.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrófilos. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 2, p. 143 - 154, 2005.

LUNA, D. M. N.; ANDRADE, C. A. S. Nanotecnologia aplicada à odontologia. *Int. J. Dent.* v. 10, n. 3, p. 161-168, 2011

LUXEMBURGER, C.; MCGREADY, R.; KHAM, A. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in a area of low malaria transmission. **American J. of Epidemiology**, v. 154, p. 459 - 465, 2001.

MAHLE, W. T.; LEVINE, M. M. *Salmonella* Typhi infection in children younger than Five years of age. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 12, p. 627- 631, 1993.

MAI, N. L.; PHAN, V. B.; VO, A. H.; TRAN, C. T.; LIN, F. Y.; BRYLA, D. A.; CHU, C.; SCHILOACH, J.; ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R.; SZU, S. C. Persistent efficacy of Vi conjugate vaccine against typhoid fever in young children. **N. Engl. J. Med.** v. 349, p. 1390 - 1391, 2003.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermo analytical study of praziquantel – loaded PLGA nanoparticles. **Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, 523 - 530, 2006.

MALLMANN, E. J. J. **Obtenção de um novo composto biológico com propriedades magnéticas**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MARQUES, N. D. B. **Caracterização molecular e fenotípica de *Salmonella* Typhi isolada de casos de febre tifóide no Estado do Pará, no período de 1970 a 2009**. 2011. 93f. Dissertação (Mestrado em biologia dos agentes infecciosos e parasitários) – Instituto de ciências biológicas – Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

MARTÍNEZ, L. S.; ÁLVAREZ, E. G.; ÁLVAREZ, P. A.; ZAPATA, M. R. Infecciones por *Salmonella*. Fiebre tifoidea y salmonelosis no tifoideas. **Medicine**, v. 9, p. 3439 – 3448, 2006.

MARTÍNEZ, L.; MUÑOZ, Y.; RIVERÓN, L.; DUARTE, M.; JONES, C.; LEMERCINIER, X.; NÁPOLES, L.; MUNÓZ, X. Caracterización físico-química del polissacárido Vi de *Salmonella* Typhi. **VacciMotor**, n.5, p. 6 - 12, 1999.

MATUDA, T. G. **Análise térmica da massa de pão francês durante os processos de congelamento e descongelamento: otimização do uso de aditivos**, 2004, 162 f. Dissertação (mestrado em engenharia). Escola politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MELO, R. C. N. **Células e microscopia: princípio básicos e práticas**. In: MELO, R. C. N. Juiz de Fora: UFJF, 2002, p. 1 – 144.

MERMIN, J. H.; TOWNES, J. M.; GERBER, M.; DOLAN, N.; MINTZ, E. D.; TAUXE, R. V. Typhoid fever in the United States, 1985 - 1994. **Arch. Intern. Med.** v. 158, p. 633 - 638, 1998.

MILLER, R. M.; GARBUS, J.; HORNICK, R. B. Lack of enhanced oxygen consumption by polymer phonuclear leukocytes on phagocytosis of virulent *Salmonella* Typhi. **Science**, v. 175, p. 1010 - 1011, 1972.

MOHAPATRA, S. S.; MATSURE, H.; BEHERA, A. K.; KUMAR, M. **Method of intranasal gene transfer for protection against respiratory infection**. US N. PI 6, 48930682, 3 dezembro 2002.

MONTEIRO, G. M. M. **Análise de revestimentos orgânicos por espectroscopia de infravermelho**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos materiais) – Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2006.

MORENO, N. M. R. **Identificación de *Salmonella spp.* entortugasmotelo (*Geochelonedenticulata*) de um criadero de laciudad de Iquitos, región Loreto**. 2009. 68 f. Tese (Título profissional de Médico Veterinário) – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Nacional Superior de San Marcos, Lima, 2009.

MOTHÉ, C. G.; ARAUJO, C. R. Caracterização térmica e mecânica de compósitos de poliuretano com fibras de curauá. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 14, n. 4, p. 274 – 278, 2004.

MOURA, M.R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **J. of Colloid and Interface Science**, v. 312, p. 477- 483, 2008.

MOURA, R. E. **Síntese de nanopartículas à base de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em química) – Programa de Pós-graduação em química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MUZZARELLI, C.; MUZZARELLI, R. A. Natural and artificial chitosan – inorganic composites. **J. Inorg. Biochem.**, v. 92, p. 89 – 94, 2002.

MUZZARELLI, R. A.; TANFANI, F.; SCARPINI, G.; LATERZA, G. The degree of acetylation of chitin by gás chromatography and infrared spectroscopy. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.2, p. 299 - 306, 1980.

NEEDLEMAN, I. G.; MARTINS, G. P.; SMALES, F. C. Characterization of bioadhesives for periodontal and oral mucosa drug delivery. **J. Clin. Periodontal**, v. 25, p. 74 – 82, 1998.

NETO, C. G. T.; GIACOMETTI, J. A.; JOB, A. E.; FERREIRA, F. C.; FONSECA, J. L. C.; PEREIRA, M. R. Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydrates Polymers**. v. 62, p. 97-103, 2005.

NGAH, W. S. W.; GHANI, S. A.; KAMARI, A. Adsorption behaviour of Fe (II) and Fe (III) íons in aqueous solution on chitosan and cross linked chitosan beads. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 443 – 450, 2005.

OLIVEIRA, M. E. P.; SOARES, M. R. A. L.; COSTA, M. C. N. C.; MOTA, E. L. A. Avaliação da completitude dos registros de febre tifóide notificados no Sinan pela Bahia. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.18, n. 3, p. 2009.

ÖZDEMIR, D.; ÖZTÜRK, B. Genetic Multivariate Calibration Methods for Near Infrared (NIR) Spectroscopic Determination of Complex Mixtures. **Turk J. Chem**, v. 28, p. 497- 514, 2004.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 55, 329 - 347, 2003.

PAPINI, C. J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Autarquia Associada à universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PARK, I. K.; PARK, Y. H.; SHIN, B. A.; CHOI, E. S.; KIM, Y. R.; AKAIKE, T. Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA Carrier. **J. Control Release**, v. 69, p. 97-108, 2000.

PARRY, C. M.; HIEN, C. C.; DOUGAN, G. G.; WHITE, N. J.; FARRAN, J. J. Typhoid fever the new England. **J. Medicine**. v.347, p. 1770 – 1780, 2002.

PARRY, C. M.; WIJEDORU, L.; ARJYAL, A.; BAKER, S. The utility of diagnostic tests for enteric fever in endemic locations. **Expert Rev. Anti Infect Ther**. v. 9, p. 711- 725, 2011.

PAULA, H. C. B.; SOMBRA, F. M.; ABREU, F. O. M. S.; DE PAULA, R. C. M. Preparação e caracterização de nanopartículas de goma angico e quitosana contendo o óleo essencial de *lippiasidoides*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 10., 2009, Foz do Iguaçu. **Anais do 10° congresso brasileiro de polímeros**. Foz do Iguaçu: Associação Brasileira de Polímeros, 2009. P. 1-2.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **J. Macromolecular Sciences**, v. 32, p. 629 – 640, 1995.

PICCOLI, R.; MEXIAS, A.; FIGUEIRA, R.; MONTEDO, O.; BERTAN, F. Características das principais técnicas analíticas aplicadas à caracterização de materiais. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e ciências dos materiais, 17., 2006, Foz do Iguaçu. **17° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais**. Foz do Iguaçu: Associação Brasileira de Engenharia e ciências dos Materiais, 2006, p. 289 – 300.

PLOTKIN, S. A.; BOUVERET LE CAM, N. N. A new typhoid vaccine composed of the Vi capsular polysaccharide. **Archives of Internal Med.** v. 155, p. 2293 - 2299, 1995.

POLOWINSKI, S. Template polymerization and co-polymerisation. **Prog. Polym. Sci.** v. 27, p. 537 - 577, 2002.

RATHKE, T. D.; HUDSON, S. M. Determination of the degree of N – deacetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy. **Polym. Sci**, p. 31 – 49, 1993.

RAVI KUMAR, N. M. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Funtional Polymers**, v. 46, p. 1 – 27, 2000.

REGE, P. R.; SHUKLA, D. J.; BLOCK, L. H. Chitosans as tableting excipients for modified release delivery systems. **Int. J. Pharm**, v. 181, p. 49 – 60, 1999.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.57, p.1109 - 1143, 2005.

REIMER, L. **Trasmission electron microscopy**. In: REIMER, L. 4 ed. Berlin: Springer Verlag, 1997.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Prog. Polym. Sci**, v. 31, p. 603 – 632, 2006.

RINAUDO, M.; DOMAKD, A.; Solution properties of chitosan. In: SKJAK – BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. **Chitin and chitosan, sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London and New York: Elsevier, 1989, p. 71 – 86.

RISH, S. J. Encapsulation: overview of uses and technique. In: RISH, S. J.; REINECCIUS, G. A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**, Washington, DC, 1995, p. 8 - 25.

RITOTA, M.; MARINI, F.; SEQUI, P.; VALENTINI, M. Metabolomics characterization of italian sweet pepper (*Capsicum annum L.*) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 58, p. 9675 - 9684, 2010.

ROBBINS, J. D.; ROBBINS, J. B. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella* Typhi. **J. Infect. Dis.**, v. 150, p. 436 – 449, 1984.

SÁFADI, M. A. P.; BARROS, A. P. Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 3, p. 35 - 44, 2006.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future nanotechnology in human health care. **Clinical Nanomedicine**. v. 3, p. 20 - 31, 2007.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; FILHO, S. P. C.; CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros, Ciências e Tecnologia**, v.13, p. 242 – 249, 2003.

SANTOS, E. A. S. B. **Caracterização da glicerina etoxilada fosfatada**. 2007. 101f. Dissertação (Mestrado em química) – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SANTOS, M. S.; PETKOWIEZ, C. L. O.; HAMINIUK, C. W. I.; CÂNDIDO, L. M. B. Polissacarídeos extraídos da Gabiroba (*Campomanesia Xanthocarpa Berg*): Propriedade químicas e perfil reológico. **Polímeros**, v. 20, p. 352 – 358, 2010.

SASHINAMI, H.; YAMAMOTO, T.; NAKANE, A. The cytokine balance in the maintenance of a persistente infection with *Salmonella* enterica sorovar *Typhimurium* in mice. **Cytokine**. v. 33, p. 212 – 218, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leuko Biol.**, v. 75, p. 163 – 189, 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SCONDRO, R. B. L.; PÁDUA, R. A. F.; GHIRALDI, L. D.; FARAH, S. M. S.; DIAS, J. R. C. D.; SIQUEIRA, V. L. D.; CARDOSO, R. F. Relatos de caso de febre tifóide no município de Maringá, Estado do Paraná. **Rev. da Soc. Bras. de Medicina Tropical**, v. 41, p. 657 – 679, 2008.

SENEL, S.; IKINCI, G.; KAS, S.; YOUSEFI- RAD, A.; SARGO, M. F.; HINCAL, M. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **Int. j. Pharm**, v. 193, p. 197 – 203, 2000.

SERRATO, R. V. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas**. 2008. 177 f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de bioquímica e biologia molecular, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical review in food science and nutrition**, v.33, n.6, p. 501- 547, 1993.

SHANDERA, W. X.; TAYLOR, J. P.; BETZ, T. G.; BLAKE, P. A. An analysis of economic cost associated with an outbreak of typhoid fever. **Am. J. Public Health**, v. 75, p. 3 - 71, 1985.

SHINWA, S.; *et al.* Synergy of Eed and Tsix in the repression of Xist gene and X – chromosome inactivation. **EMBOJ**. v. 27, p. 1816 - 1826, 2008.

SILVA, G. F. B. L. **Nanotecnologia: Avaliação e análise dos possíveis impactos à saúde ocupacional e segurança do trabalhador no manuseio, síntese e incorporação de nanomateriais em compósitos refratários de matriz cerâmica**.2008. 91 f. Monografia (Especialização em engenharia de segurança do trabalho), Escola de Engenharia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SILVA, G. L. **Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatógenos: *Salmonella Entérica, Shigella e Escherichia Coli EPEC***. 2005. 100 f. Dissertação (mestrado em bioengenharia), Escola de Engenharia de são Carlos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, 2005.

SILVA, H. S. R.C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim Nova**, v. 29, n 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; VASCONCELOS, A.F.D.; IZELI, N. L.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas e suas aplicações biotecnológicas. **Quim. Nova**, v, 29, n. 1, p. 85 - 92, 2006.

SINHA, V. R.; SIGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan micropheres as a potential carriers for drugs. **Int. J. Pharm**, v. 274, p. 1 – 33, 2004.

SOARES, C. M. **Estudo químico da alga *Lithothamnion Calcarium* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos**, 2009, 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drugs delivery devices. **J. Control Release**, v. 70, p.1 - 20, 2001.

SOUZA, C. O.; RAMOS, F. L. P.; MOTA, C. M.; SANTOS, L. V. S.; LOPES, M. L. Resistência antimicrobiana de *Salmonella Typhi* identificada no Estado do Pará, Brasil. **Rev. Pan-Amaz. de saúde**, v.1, p. 61 – 65, 2010.

SOUZA, K. V. **Desenvolvimento de espécies de ferro imobilizadas em matrizes poliméricas e sua utilização na remediação de resíduos industriais**. 2009. 192 f. Tese (Doutorado em química orgânica) – Instituto de química, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2009.

STONE, A. L.; SZU, S. C. Application of optical properties of the Vi capsular polysaccharide for quantitation of the Vi antigen in vaccines for typhoid fever. **J. Clinical Microbiology**, v. 26, n.4, p.719 - 725, 1988.

SZEWCZYK, B.; TAYLOR, A. Diversity of Vi-related antigens in the microcapsule of *Salmonella* Typhi **Infect. Immun.** v. 30, n. 3, p. 661 - 667, 1980.

TACKET, C. O. ; FERRECCIO, C. ; ROBBINS, J. B. ; TSAI, C. M. ; SCHULZ, D. ; CADOS, M. ; GOODEAU, A. ; LEVINE, M. M. Safety and immunogenicity of two *Salmonella* Typhi Vi capsular polysaccharide vaccines. **J. Infect. Dis.** , v.154, p. 323 - 345, 1986.

TABOGA, S. R. Microscopia. In: RECCO - PIMENTEL, S. M.; CARVALHO, H. F. **A célula**. 2001, cap. 2, p. 06 – 14.

TAKEUCHI, H.; MATSUI, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. **J. Control. Release**, v. 86, p. 42 – 235, 2003.

TANG, M.; DOU, H.; SUN, K. One – step synthesis of dextran – based stable nanoparticles assisted by self – assembly. **Polymer**, v. 47, p. 728 - 734, 2006.

TAPA, S.; CVJETANOVIC, B. Controlled field trial on the effectiveness of one and two doses of acetone-inactivated and dried typhoid vaccine. **Bull World Health Organ.** v. 52, p. 75 - 80, 1975.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Quim. Nova.** v. 25, n. 6, p. 943 - 948, 2002.

VAN de GRAMPPEL, H. T.; TAN, Y. Y.; CHALLA, G. Template polymerization of N-Vinylimidazole along Poly (methacrylic acid) in water. 1. Influence of template concentration. **Macromoléculas.** v. 23, p. 5209-5216, 1990.

VASCONCELOS, C. L. **Obtenção de dispersões de complexos polieletrólíticos à base de quitosana e poli (ácido metacrílico) e análise de adsorção de albumina bovina sérica.** 2007. 99 f. Dissertação (Doutorado em química) – Departamento de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

VAZQUEZ – TORRES, A.; JONES – CARSON, J.; BAUMLER, A. J.; *et al.* Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18 – expressing phagocytes. **Nature.** v. 401, p. 804 – 808, 1999.

VELEMA, J. P.; VAN WIJNEN, G.; BULT, P.; JOTA, S. Typhoid fever in Ujung Pandang, Indonesia- high risk groups and high risk behaviours. **Trop. Med. Int. Health**, v. 11, p.1088 - 1094, 1997.

VILA, A.; SANCHES, M.; TOBIO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **J. Controlled Release**, v. 78, p. 15 – 24, 2002.

VIRLOGEUX-PAYANT, I.; POPOFF, M. Y. The Vi antigen of *Salmonella* Typhi. **Bull. Int. Pauster.** v. 94, p. 237 - 250, 1996.

WANG, Y.; ZHANG, Y.; DU, W.; WU, C.; ZHAO, J. Intelligent core-shell nanoparticles and hollow spheres based on gelatin and PAA via template polymerization. **J. Colloid and Interface Sciences**, v. 334, p. 153 - 160, 2009.

WONG, K. H.; FEELEY, J. C. Isolation of Vi antigen and a simple method for its measurement. **American Society for Microbiology**, v.24, n. 4, p. 628 – 633. 1972.

WONG, K. H.; FEELEY, J. C.; PITTMAN, M. Effect of a Vi-degrading enzyme on potency of Typhoid vaccines in mice. **J. Infectious Diseases**. v. 125. n.4, p. 360 - 366, 1972.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: Cenário mundial e nacional de investimento. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 2, p. 95 - 101, 2008.

ZHANG, X. L.; JEZA, V. T.; PAN, Q. *Salmonella* Typhi: from a human pathogen to a Vaccine Vector. **Cellular e Molecular Immunology**, v. 5, p. 91 – 97, 2008.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, p. 66 - 80, 2009.

ZHOU, D.; GALÁN, J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. **Microbes Infect.** v. 3, 1293 - 1298, 2001.

ZUÑIGA, A. E. K. Reacción de widal – interpretación clínica. **Rev. Panam. Infectol.** v.8, p. 40 – 44, 2006.