



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA**

**Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas à Base de  
Quitosana para Liberação Sustentada de Hormônios Adeno-  
hipofisários e Avaliação de seus Efeitos *in vitro* na  
Reprodução Animal**

**ARYANA DIAS DE ABREU**

**2014**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E  
NANOBIOTECNOLOGIA

**Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas à Base de  
Quitosana para Liberação Sustentada de Hormônios Adeno-  
hipofisários e Avaliação de seus Efeitos *in vitro* na  
Reprodução Animal**

ARYANA DIAS DE ABREU

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

**ORIENTADOR:** DR. LUCIANO PAULINO DA SILVA

Brasília-DF

Junho, 2014.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANBIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Aryana Dias de Abreu

Título:

**“Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas à base de quitosana para liberação sustentada de hormônios adeno-hipofisários e avaliação de seus efeitos *in vitro* na reprodução animal.”**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva  
*Presidente / Orientador*  
UnB / Nano

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti  
*Membro Titular Interno Vinculado ao Programa*  
UnB / Nano

Profa. Dra. Grazieli Marinheiro Machado  
*Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa*  
Embrapa

Brasília, 20 de junho de 2014.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço minha mãe e minha tia pelo amor, carinho, cuidado e, principalmente, paciência. E ao meu pai pela confiança depositada em mim.*

*Ao meu namorado Leonardo D'ávila por sempre estar à disposição, nas horas felizes, e complicadas quando ligo pedindo encarecidamente que me busque por conta de alguns contratempos nos experimentos.*

*Ao meu orientador, Luciano Paulino por seus ensinamentos, pela paciência e por sempre estar disposto a ajudar e aconselhar.*

*Às antigas amigas, Anna Júlia Portz e recentes, Naiara Araújo, pelas saídas para descontrair e pelo apoio.*

*Ao grupo do laboratório de reprodução animal da Embrapa-Cenargen, em especial à Dr<sup>a</sup>. Margot Dode e doutoranda Ligiane Leme pelos ensaios in vitro com os oócitos bovinos e por seus conhecimentos.*

*À Cíntia C. Bonatto e ao José Cardozo por me auxiliarem na utilização de equipamentos e pelos incentivos em relação ao meu projeto.*

*Aos colegas do Laboratório de Espectrometria de Massa, onde foi desenvolvida a maior parte deste projeto.*

*Ao Dr<sup>o</sup>. Marcelo Bemquerer pela ajuda nos conhecimentos para a realização da síntese do ACTH.*

*À Dr<sup>a</sup>. Sônia Freitas e ao Laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília pelo auxílio no uso do DLS/Zeta.*

*À todos os colegas do Grupo de Nanotecnologia pelos ensinamentos diversos.*

*Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro o qual possibilitou o desenvolvimento deste estudo.*

## RESUMO

A superestimulação ovariana em bovinos é uma técnica caracterizada pelo aumento do número de folículos ovarianos que continuam o seu crescimento até à ovulação. Essa técnica consiste na administração de múltiplas injeções de hormônios gonadotrópico para manter o crescimento folicular, e com a finalidade de buscar novas formas de aplicações para diminuição do custo e do manejo dos animais o estudo *in vitro* apresenta-se como o passo inicial. A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos compreende de três etapas, a maturação dos oócitos, a fecundação e o cultivo embrionário, sendo muito utilizada para fins econômicos e de pesquisa. O presente estudo visa ao desenvolvimento de micro e nanopartículas poliméricas para entrega sustentada, em sistemas de PIV, de hormônios adeno-hipofisários com o intuito de testar as suas atividades na expansão das células do *cumulus*. Após análise de produtos comerciais que oferecem atividade de FSH, por meio de espectrometria de massa MALDI TOF/TOF, a proteína precursora do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) foi identificada em algumas frações. Portanto, foi realizada sua síntese manualmente, pelo método da fase sólida, e purificação em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e, em uma etapa subsequente foi realizada uma avaliação do papel do ACTH não encapsulado na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Posteriormente, foram formuladas nanopartículas (NPs) de quitosana pelo método de geleificação iônica para encapsular o ACTH e hormônio folículo estimulante (FSH). As NPs apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 85 nm (ACTH) e de 159 nm (FSH), potencial Zeta de  $51,83 \pm 1,67$  mV (ACTH) e  $48,5 \pm 5,41$  mV (FSH) onde se obteve eficiência de encapsulamento de 30% (ACTH) e 60% (FSH). A microscopia de forma atômica (MFA) possibilitou uma avaliação qualitativa no que diz respeito à morfologia das NPs, onde as contendo ACTH apresentaram formatos variados e pequenos aglomerados, enquanto que as contendo FSH, formato aproximadamente esférico sem aglomerados. As NPs contendo FSH apresentaram atividade semelhante ao hormônio livre mesmo com 40% a menos do ativo, enquanto as ACTH-NPs não foram ativas sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. No que se refere à fecundação, a taxa de clivagem e de produção de blastocistos foi satisfatória apenas com as FSH-NPs. Conclui-se que as NPs contendo FSH são efetivas no processo de PIV de embriões bovinos, provendo a expansão das células do *cumulus* e a produção de blastocistos.

**Palavras-chaves:** PIV, bovinos, nanopartícula, quitosana, FSH e ACTH.

## ABSTRACT

The ovarian superstimulation in bovine is a technique characterized by an increase in the number of ovarian follicles which continue their growth until ovulation. This technique consists of administering multiple injections of gonadotropin hormones to maintain follicular growth, and in order to pursue new forms of applications to decrease the cost and handling of animals the *in vitro* study is presented as an initial step. *In vitro* production (PIV) of bovine embryos comprises three steps, oocyte maturation, fertilization and embryo culture, commonly used for economic and research purposes. This study aims at the development polymeric micro-and nanoparticles for sustained delivery *in vitro* production systems, hormones of the pituitary in order to test their activities in the expansion of *cumulus* cells. After analyzing the commercial product Folltropin-V that provides FSH activity through of MALDI TOF/TOF mass spectrometry, the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was identified in some fractions. Therefore, its synthesis was performed manually by the solid phase method and following purification by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), and in a subsequent evaluation step it was investigated the role of ACTH unencapsulated on bovine oocytes maturation *in vitro*. Subsequently, chitosan NPs were formulated by the ionic gelation method in order to encapsulate both adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and follicle stimulating hormone (FSH). The NPs presented a mean hydrodynamic diameter of 85 nm (ACTH) and 159 nm (FSH), Zeta potential of  $51,83 \pm 1,67$  mV (ACTH) and  $48,5 \pm 5,41$  mV (FSH) in which was obtained encapsulation efficiency of 30% (ACTH) and 60% (FSH). The atomic force microscopy (AFM) allowed a qualitative assessment with regard to the morphology of NPs where the ACTH containing showed various shapes and small agglomerates, whereas FSH, shape approximately spherical without agglomerates. NPs containing FSH showed similar activity to that of the free hormone with 40% less active, whereas ACTH-NPs were not active on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. With regard to fertilization, cleavage rate and blastocyst production were satisfactory only in the case of FSH-NPs. We conclude that NPs which contained FSH are effective in the PIV bovine embryos, providing the expansion of the *cumulus* cells and producing blastocysts.

**Keywords:** PIV, bovine, nanoparticle, chitosan, FSH and ACTH.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA (albumina sérica bovina)
- CHCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico)
- CCOs (complexos-*cumulus*-oócitos)
- CRH (hormônio liberador de corticotropina)
- DIPEA (N, N' - diisopropiletilamina)
- DMF (N, N – dimetilformamida)
- DTT (ditiotreitól)
- EE (eficiência de encapsulamento)
- FSH (hormônio folículo estimulante)
- GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas)
- HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônio)
- IGFBP (fator de crescimento semelhante à insulina de proteínas de ligação)
- IGF (fator de crescimento semelhante à insulina)
- IM (intramuscular)
- LAV (meio de lavagem)
- LH (hormônio luteinizante)
- Nanômetro (nm)
- MALDI/TOF (ionização por dessorção à laser assistida por matriz/tempo de voo)
- MFA (microscopia de força atômica)
- MIV (maturação *in vitro*)
- NPs (nanopartículas)
- PdI (índice de polidispersividade)
- PEG (polietilenoglicol)
- PG (prostaglandina)
- PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E<sub>2</sub>)
- PIV (produção *in vitro* de embriões)
- PVP (polivinilpirrolidona)
- rFSH (hormônio folículo estimulante recombinante)
- RP-HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa)
- TFA (ácido trifluoroacético)
- TPF (tripolifosfato de sódio)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular da subunidade beta do hormônio folículo estimulante (FSH)..... 8
- Figura 2.** Estrutura molecular da quitina onde R= COCH<sub>3</sub> e da quitosana, R=H.....12
- Figura 3.** Representação em esquema da metodologia seguida ao longo do trabalho. As setas indicam as etapas seguintes.....17
- Figura 4.** Espectros de massa obtidos em espectrômetro de massa MALDI-TOF operado em modo refletido positivo dos produtos comerciais FSH da Sigma, Folltropin-V, Pluset, rFSH e Lutropin após hidrólise enzimática completa com tripsina imobilizada..... 39
- Figura 5.** Cromatogramas analíticos em fase reversa dos produtos comerciais da marca Sigma; Folltropin-V; Pluset e Lutropin obtidos por RP-HPLC FAST após a hidrólise com tripsina..... 41
- Figura 6.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento da proopiomelanocortina, região “NPP”) a partir do produto comercial Sigma após separação por RP-HPLC FAST e posterior hidrólise trípica.... 43
- Figura 7.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento da proopiomelanocortina, região do ACTH) a partir do produto comercial Sigma após separação por RP-HPLC FAST e posterior hidrólise trípica.... 44
- Figura 8.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (cadeia alfa fragmento da hemoglobina) a partir do produto comercial Folltropin-V após separação por RP-HPLC FAST e posterior hidrólise trípica..... 47

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 9.</b> Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento do precursor da secretogranina I) a partir do produto comercial Pluset após separação por RP-HPLC FAST e posterior hidrólise trípica.....  | 48 |
| <b>Figura 10.</b> Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento da albumina sérica suína) a partir do produto comercial Pluset após separação por RP-HPLC FAST e posterior hidrólise trípica.....   | 49 |
| <b>Figura 11.</b> Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento da cadeia alfa da gonadotropina) a partir do produto comercial Lutropin após separação por RP-HPLC FAST e posterior hidrólise trípica.....  | 50 |
| <b>Figura 12.</b> Espectro de massa apresentando o íon correspondente à massa molecular do hormônio adrenocorticotrópico, obtido por síntese em fase sólida.....   | 52 |
| <b>Figura 13. Figura 13.</b> A) Cromatograma analítico em fase reversa do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) obtido por RP-HPLC após a síntese manual em fase sólida. B) Espectro de massa apresentando o íon correspondente à massa molecular do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), obtido por síntese em fase sólida, após purificação por RP-HPLC..... | 53 |
| <b>Figura 14.</b> Características físicoquímicas das nanopartículas de quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG.....  | 56 |
| <b>Figura 15.</b> Características físicoquímicas das nanopartículas brancas de quitosana revestidas com BSA e PEG/BSA.....   | 59 |
| <b>Figura 16.</b> Imagens topográficas adquiridas por microscopia de força atômica operada em modo dinâmico de nanopartículas brancas de quitosana revestidas com BSA e PEG/BSA.....   | 61 |
| <b>Figura 17.</b> Histogramas de distribuição de classes de altura média das nanopartículas brancas de quitosana revestidas com BSA e PEG/BSA.....   | 62 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 18.</b> Características físicoquímicas das nanopartículas de quitosana/BSA com duas diferentes concentrações de BSA.....  | 64 |
| <b>Figura 19.</b> Características físicoquímicas das nanopartículas de quitosana/BSA na ausência ou na presença de TPF.....   | 65 |
| <b>Figura 20.</b> Imagens topográficas adquiridas por microscopia de força atômica operada em modo dinâmico de NPs de quitosana/BSA com TPF no mesmo dia da formulação (A) e 4 dias após a formulação.....                            | 67 |
| <b>Figura 21.</b> Características físicoquímicas das nanopartículas contendo ACTH.....  | 69 |
| <b>Figura 22.</b> Imagem topográfica adquirida por microscopia de força atômica operada em modo dinâmico de NPs de quitosana contendo o ACTH.....   | 70 |
| <b>Figura 23.</b> Características físicoquímicas das nanopartículas contendo FSH.....   | 71 |
| <b>Figura 24.</b> Imagem topográfica adquirida por microscopia de força atômica operada em modo dinâmico de NPs de quitosana contendo o FSH.....  | 72 |
| <b>Figura 25.</b> Imagens dos grupos de oócitos bovinos antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas do tratamento com os hormônios.....  | 78 |
| <b>Figura 26.</b> Imagens dos grupos de oócitos bovinos antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas do tratamento com diferentes concentrações de ACTH livre.<br>.....   | 79 |
| <b>Figura 27.</b> Gráficos de diagrama de caixa das medidas relativas ao comprimento em zero hora e em 24 horas, e à largura em zero hora e em 24 horas dos grupos controle negativo, FSH e ACTH nas três concentrações testadas..... | 80 |
| <b>Figura 28.</b> Imagens dos grupos de oócitos bovinos antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas com o tratamento com ACTH e FSH livres e ACTH nanoencapsulado.....   | 82 |

**Figura 29.** Gráficos de diagrama de caixa das medidas relativas ao comprimento em zero hora e em 24 horas, e à largura em zero hora e em 24 horas dos grupos de nanopartículas brancas, nanopartículas contendo ACTH, ACTH livre e do controle positivo, ou seja, do FSH livre.....83

**Figura 30.** Imagens dos grupos de oócitos bovinos antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas com o tratamento com FSH livre e FSH nanoencapsulado..... 84

**Figura 31.** Gráficos de diagrama de caixa das medidas relativas ao comprimento em zero hora e em 24 horas, e à largura em zero hora e em 24 horas dos grupos de nanopartículas brancas, nanopartículas contendo o FSH e do FSH livre..... 85

**Figura 32.** Representação gráfica das taxas de clivagem e da produção de blastocistos em diferentes grupos: NP branca; NP ACTH1: ACTH livre e FSH da marca Sigma livre..... 86

**Figura 33.** Representação gráfica das taxas de clivagem e da produção de blastocistos em diferentes grupos: NP branca; NP FSH da marca Sigma e FSH da marca Sigma livre..... 86

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>TABELA 1.</b> Representação esquemática das composições das partículas quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG brancas e contendo os ativos Folltropin-V e FSH da marca Sigma.....     | 25 |
| <b>TABELA 2.</b> Representação esquemática das composições das partículas brancas de quitosana revestidas com BSA e com PEG/BSA.....  | 26 |
| <b>TABELA 3.</b> Representação esquemática das partículas brancas de quitosana/BSA com diferentes concentrações de BSA.....   | 27 |
| <b>TABELA 4.</b> Representação esquemática das composições das partículas brancas de quitosana/BSA na ausência ou na presença de TPF.....   | 28 |
| <b>TABELA 5.</b> Estabilidade coloidal avaliada por meio do potencial Zeta de nanopartículas em água (ASTM, 1985).....  | 30 |
| <b>TABELA 6.</b> Apresentação esquemática das quatro condições testadas para maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos, e os respectivos grupos de cada condição.....            | 33 |
| <b>TABELA 7.</b> Eficiência de encapsulamento dos hormônios adeno-hipofisários, ACTH e FSH, em nanopartículas de quitosana comparadas com demais parâmetros.....                    | 73 |
| <b>TABELA 8.</b> Quadro esquemático com os dados referentes ao diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e PdI no dia da formulação das NPs e quatro dias após, armazenadas a 4°C..... | 73 |
| <b>TABELA 9.</b> Apresentação esquemática dos resultados <i>in vitro</i> da expansão das células do <i>cumulus</i> de bovinos.....  | 75 |

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....  | iv   |
| <b>RESUMO</b> .....  | v    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | vi   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....   | vii  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | viii |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | xii  |
| <b>SUMÁRIO</b> .....   | xiii |
| <b>1. Introdução</b> .....   | 1    |
| 1.1 Superestimulação ovariana em bovinos.....  | 1    |
| 1.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....  | 3    |
| 1.3 Desenvolvimento folicular.....   | 6    |
| 1.4 Hormônio folículo estimulante .....  | 7    |
| 1.5 Limitações do uso de FSH em protocolos de superestimulação ovariana .....                | 8    |
| 1.6 Nanotecnologia na Medicina Veterinária .....   | 10   |
| 1.7 Micro e nanopartículas poliméricas na liberação sustentada de fármacos .....             | 11   |
| <b>2. Hipótese</b> .....   | 13   |
| <b>3. Justificativa</b> .....  | 14   |
| <b>4. Objetivos</b> .....  | 15   |
| 4.1 Objetivo geral .....   | 15   |
| 4.2 Objetivos específicos .....  | 15   |
| <b>5. Material e Métodos</b> .....   | 16   |
| 5.1 Estratégia experimental.....   | 16   |
| 5.2 Hidrólise trípica das amostras de produtos comerciais com atividade de FSH e de LH ..... | 17   |
| 5.3 Separação dos componentes moleculares .....  | 19   |
| 5.4 Espectrometria de massa MALDI-TOF.....   | 19   |
| 5.5 Síntese e purificação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).....                       | 20   |
| 5.6 Confirmação da pureza e identidade molecular do ACTH.....                                | 22   |
| 5.7 Quantificação do ACTH .....  | 22   |
| 5.8 Purificação de quitosana comercial para formulação de nanopartículas .....               | 23   |
| 5.9 Formulação das partículas .....  | 23   |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 5.9.1     | Formulação de partículas de quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG brancas e contendo os ativos Folltropin-V e FSH da marca Sigma .....                                     | 24        |
| 5.9.2     | Formulação de partículas brancas de quitosana revestidas com BSA e com PEG/BSA .....   | 25        |
| 5.9.3     | Formulação de partículas brancas de quitosana/BSA com duas diferentes concentrações de BSA.....  | 26        |
| 5.9.4     | Formulação de partículas brancas de quitosana/BSA na ausência ou na presença de TPF.....   | 27        |
| 5.9.5     | Formulação de partículas contendo ACTH.....  | 28        |
| 5.9.6     | Formulação de partículas contendo FSH (Sigma).....   | 29        |
| 5.10      | Caracterização estrutural e fisicoquímica das partículas com ou sem os hormônios .....   | 29        |
| 5.11      | Avaliação da eficiência de encapsulamento .....  | 31        |
| 5.12      | Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo ACTH ou FSH da marca Sigma .....   | 32        |
| 5.13      | Ensaio <i>in vitro</i> em oócitos bovinos para determinar o meio de cultura de maturação e avaliar a possível ação do ACTH .....                                       | 32        |
| 5.14      | Testes <i>in vitro</i> com oócitos bovinos em condição de meio de cultura e de busca e seleção pré-estabelecidos .....   | 34        |
| 5.15      | Testes <i>in vitro</i> com oócitos bovinos utilizando nanopartículas contendo ACTH ou nanopartículas contendo FSH da marca Sigma .....                                 | 34        |
| 5.16      | Medições da expansão das células do <i>cumulus</i> de complexos- <i>cumulus</i> -oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> antes dos tratamentos e após 24 horas ..... | 35        |
| 5.17      | Fecundações <i>in vitro</i> após maturação com nanopartículas contendo ACTH ou com nanopartículas contendo FSH da marca Sigma.....                                     | 35        |
| 5.18      | Cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....   | 36        |
| 5.19      | Análises estatísticas .....  | 37        |
| <b>6.</b> | <b>Resultados e Discussão.....</b>   | <b>38</b> |
| 6.1       | Comparação dos componentes moleculares dos produtos comerciais por meio de espectrometria de massa.....  | 38        |
| 6.2       | Fracionamento e identificação dos componentes moleculares presentes nos produtos comerciais contendo FSH da Sigma, Folltropin-V, Pluset e Lutropin .....               | 40        |
| 6.3       | Confirmação da identidade molecular para certificar o sucesso na síntese do ACTH.....  | 51        |
| 6.4       | Caracterização de nanopartículas de quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG..  | 54        |
| 6.5       | Caracterização de nanopartículas brancas de quitosana revestidas com BSA e PEG/BSA .....   | 58        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 6.6       | Caracterização de nanopartículas de quitosana/BSA com duas diferentes concentrações de BSA .....   | 63        |
| 6.7       | Caracterização de nanopartículas de quitosana/BSA na ausência ou na presença de TPF.....   | 64        |
| 6.8       | Caracterização de nanopartículas contendo ACTH .....   | 68        |
| 6.9       | Caracterização de nanopartículas contendo FSH (Sigma).....   | 70        |
| 6.10      | Eficiência de encapsulamento das nanopartículas contendo ACTH e FSH da marca Sigma .....   | 72        |
| 6.11      | Avaliação da estabilidade das NPs contendo ACTH e das NPs contendo FSH da marca Sigma.....   | 73        |
| 6.12      | Teste <i>in vitro</i> com o ACTH .....   | 74        |
| 6.13      | Testes <i>in vitro</i> com oócitos bovinos, em condição de meio de cultura e de meio de busca e seleção pré-estabelecidos, com o ACTH..... | 76        |
| 6.14      | Testes <i>in vitro</i> com complexos- <i>cumulus</i> -oócitos bovinos com nanopartículas contendo ACTH.....                                | 81        |
| 6.15      | Testes <i>in vitro</i> em complexos- <i>cumulus</i> -oócitos bovinos com nanopartículas contendo FSH .....                                 | 83        |
| 6.16      | Fecundação <i>in vitro</i> após tratamento com nanopartículas de quitosana contendo ACTH ou FSH da marca Sigma.....                        | 85        |
| <b>7.</b> | <b>Conclusões.....</b>   | <b>88</b> |
| <b>8.</b> | <b>Referências Bibliográficas .....</b>  | <b>89</b> |

## 1. Introdução

### 1.1 Superestimulação ovariana em bovinos

O produto interno bruto (PIB) do agronegócio brasileiro, estimado pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), fechou com alta de 4,45% em 2013, sendo que a pecuária bovina se destacou com crescimento mais expressivo (CEPEA, 2013). E somando-se a isso, a demanda por proteínas de origem animal cresce a cada dia, mesmo no Brasil considerado o maior exportador de carne bovina. Diante desse contexto, surge a necessidade de melhorar cada vez mais os índices reprodutivos com o aporte de tecnologias. Por esse motivo, o desenvolvimento e o aprimoramento de várias técnicas, como a superestimulação ovariana para a obtenção de índices reprodutivos cada vez melhores é crucial (ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA, 2013).

A superestimulação ovariana é um processo caracterizado pelo aumento do número de folículos que se desenvolvem e chegam à ovulação em uma fêmea, por meio da alteração da homeostasia hormonal mediante o emprego de hormônios exógenos sob a forma de fármacos. O principal objetivo da superestimulação em vacas é a obtenção de um número máximo de embriões fertilizados e transferíveis, acompanhada de elevada probabilidade para produção de gestações (MAPLETOFT *et al.*, 2002). O uso de gonadotropinas (hormônios gonadotrópicos) para induzir a superovulação em vacas tem sido investigado por muitos estudos, sendo que alguns foram realizados há anos (CASIDA *et al.*, 1943; BELLOWS *et al.*, 1969; SEIDEL *et al.*, 1971; ELSDEN *et al.*, 1978; CHUPIN *et al.*, 1983; TAKAHASHI *et al.*, 1985).

Em 1943, Casida e colaboradores induziram a superestimulação de quatro vacas em um grupo de sete, lançando-se mão de extratos de glândula hipófise contendo hormônio folículo estimulante (FSH) e em seguida de hormônio luteinizante (LH). Já

em 1983, pesquisadores reportaram que doses decrescentes de FSH, em um período de quatro dias, foram mais efetivas em induzir ovulações quando comparadas com a administração de doses iguais no mesmo período (CHUPIN *et al.*, 1983). Outro estudo mostrou que doses crescentes de FSH aumentaram significativamente o número de ovulações até atingir um platô e que, a partir deste ponto não é possível aumentar mais o número de ovulações, podendo inclusive causar efeitos opostos (KANITZ *et al.*, 2002). Um importante fato observado na literatura é que a ausência de um folículo dominante no início do tratamento aumenta a eficácia da superestimulação (BARUSELLI *et al.*, 2006).

A tentativa de aumentar a eficácia dos tratamentos e também diminuir o número de injeções hormonais diárias necessárias durante estas práticas de indução de ovulação é antiga. Experimentos já foram realizados comparando uma dose diária por três dias com o protocolo padrão utilizado atualmente, o qual consiste em duas aplicações diárias por quatro dias, mostrando resultados similares (KANITZ *et al.*, 2002). Outro artigo científico comparou programas de oito injeções via intramuscular (IM), duas vezes ao dia por 4 dias, com apenas duas injeções com concentração de 5 - 10 mg/mL de ácido hialurônico, sendo duas injeções por 1 dia, e verificou maior número de óvulos fertilizados e embriões transferíveis no programa de oito injeções (TRÍBULO *et al.*, 2012). Mesmo com um número de estudos expressivos, ainda não é possível obter os mesmos resultados de superovulação apenas com uma única injeção quando comparado com as oito injeções utilizadas no protocolo padrão. Além disso, existe grande variação entre os diferentes produtos comerciais ou até mesmo em um mesmo produto de diferentes lotes no que diz respeito à bioatividade, sendo outro fator importante que pode influenciar no sucesso da superestimulação (KANITZ *et al.*, 2002), sugerindo uma reprodutibilidade baixa nos protocolos de obtenção dos hormônios e/ou diferenças de

suscetibilidade dos animais aos tratamentos hormonais (BARUSELLI, *et al.*, 2006; KANITZ, *et al.*, 2002; MONTEIRO, *et al.*, 2010; TRÍBULO *et al.*, 2012). Outra hipótese ainda não averiguada é relacionada à composição molecular de cada um desses diferentes produtos com atividade de FSH reportada.

Vários são os produtos disponíveis no mercado utilizados para a superestimulação, dentre eles podemos citar o Folltropin-V, o Pluset e o FSH da Sigma, todos provenientes de extrato hipofisário de suínos que, após a purificação ainda possuem um percentual de contaminação por outros hormônios hipofisários, como o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o hormônio luteinizante (LH), a prolactina, hormônio de crescimento (GH), dentre outros. Também existe a técnica de DNA recombinante que utiliza células de mamíferos para incorporar os genes que codificam as subunidades alfa e beta e, assim, produzir o FSH recombinante (rFSH) (MAGALHÃES *et al.*, 2009). A faixa de preço dos dois primeiros é bem próxima, enquanto que o FSH da Sigma, o preço é cerca de 6 vezes maior.

O sucesso da superestimulação é fortemente influenciado por fatores como a preparação das gonadotropinas, a via de administração escolhida, o *status* ovariano, o tratamento complementar (hormonal/mecânico), a espécie doadora e o meio ambiente. Diante dessas variáveis que continuam a representar um obstáculo significativo na produção de embriões, uma estimulação ovariana efetiva requer tanto o conhecimento básico dos conceitos da dinâmica folicular bem como o papel das gonadotropinas no desenvolvimento folicular e na ovulação (GORDON, 2004).

## 1.2 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é uma técnica que compreende três etapas, a maturação dos oócitos, a fecundação e o cultivo embrionário, e tem sido

muito utilizada tanto para fins econômicos como de pesquisa. Essa última contribuiu para o estudo da fisiologia de todas as três etapas e proporciona o desenvolvimento de outras técnicas, como clonagem e transferência de genes (COELHO *et al.*, 2000).

Na maturação dos oócitos *in vitro*, considerado um processo complexo que dura de 22-24 horas, ocorrem mudanças nucleares e citoplasmáticas que irão torná-los capazes de serem fecundados e formarem embriões viáveis (CAIXETA *et al.*, 2010). Sendo importante ressaltar que a retomada da meiose e a sua finalização ocorre espontaneamente pela remoção dos oócito de dentro do folículo, quando há, então, a quebra da vesícula germinativa e, esse processo está relacionado com a maturação nuclear. Outros eventos presentes nas mudanças nucleares são o desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e a formação do segundo fuso meiótico (GOTTARDI *et al.*, 2009).

As alterações que ocorrem durante a maturação citoplasmática envolvem vários eventos, como redistribuição das organelas, dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e maturação molecular. No primeiro evento, a mitocôndria de oócitos bovinos, por exemplo, se desloca de uma posição mais periférica para uma distribuição mais dispersa pela ação de microfilamentos (filamentos de cinesinas) do citoesqueleto e microtubos (filamentos de tubulina). Outro evento, os grânulos corticais, compostos por diversas proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos, são distribuídos ao longo da superfície interna, próximos da membrana plasmática (FERREIRA *et al.*, 2009; GOTTARDI *et al.*, 2009). Os filamentos do citoesqueleto são estruturas dinâmicas e adaptáveis e se modificam de acordo com as necessidades celulares, sendo responsáveis pela segregação cromossômica para a divisão celular. Já o evento de maturação molecular envolve a transcrição, armazenamento e processamento dos mRNAs expressos pelos cromossomos, que em etapa seguinte, são traduzidos pelos

ribossomos em proteínas (FERREIRA *et al.*, 2009; GOTTARDI *et al.*, 2009). Apesar de serem processos distintos, a maturação nuclear e citoplasmática são interligadas por eventos que ocorrem simultaneamente em determinados momentos (GOTTARDI *et al.*, 2009).

Outro processo que ocorre durante a maturação é a expansão das células do *cumulus*. *In vivo*, o LH é o hormônio que induz a retomada da meiose, a expansão das células do *cumulus* e a ruptura do folículo. A expansão dessas células ocorre pela liberação e deposição de ácido hialurônico entre elas, formando uma matriz gelatinosa. Esse evento, apesar de *in vitro* não ter uma função relevante, *in vivo* é fundamental para que o ócito liberado na ovulação seja captado pelas frímbrias do oviduto e transportado até o local da fecundação. *In vitro*, quando se utiliza ócitos imaturos, o FSH e não o LH induz a expansão das células do *cumulus* e melhora a capacidade de desenvolvimento dos ócitos (FERREIRA *et al.*, 2009).

Para a maturação de ócitos bovinos *in vitro*, o meio base para cultivo de tecido TCM 199 é o mais usualmente utilizado. De acordo com diferentes protocolos, pode ser modificado por meio de suplementações proteicas (soro e albumina sérica bovina, polivinilpirrolidona, etc.), energéticas (glicose e piruvato) e hormonais (hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante) (GOTTARDI *et al.*, 2009).

Na fecundação *in vitro*, espermatozoides e ócitos maturados são coincubados em meio específico por aproximadamente 18 horas. O preparo do sêmen e a indução da capacitação espermática, a qual requer a seleção e recuperação de espermatozoides viáveis para permitir a penetração desses através da zona pelúcida do ócito, são eventos cruciais. A separação por gradiente descontínuo de *Percoll*, constituído de partículas de sílica (15 a 30 nm de diâmetro) recoberto por polivinilpirrolidona (PVP), é um método muito utilizado para melhorar a viabilidade do sêmen após o

descongelamento por meio da separação dos espermatozoides viáveis dos mortos e demais constituintes do sêmen (COELHO *et al.*, 2000; RYNKOWSKA *et al.*, 2011). No último estágio da produção *in vitro*, os embriões são transferidos para o cultivo embrionário onde permanecem por um período de sete dias até desenvolvimento do estágio de blastocisto (RYNKOWSKA *et al.*, 2011).

### 1.3 Desenvolvimento folicular

O desenvolvimento folicular gonadotropina-dependente, durante o ciclo estral, ocorre em padrão de ondas, sendo que bovinos podem apresentar de 2-3 ondas com duração de 7 a 9 dias cada, tendo o padrão de 4 ondas foliculares ocorrendo em menor frequência. Essa variação pode ser explicada por fatores como idade, raça, dieta, manejo, entre outros (ALVES *et al.*, 2002; AERTS *et al.*, 2010).

Durante cada onda, um grupo de folículos de determinado diâmetro inicia o crescimento no momento do pico transitório de FSH. É interessante notar que o diâmetro e o número de folículos variam de acordo com os relatos presentes na literatura (ROSALES-TORRES *et al.*, 2012). Em bovinos, apenas um folículo é selecionado para continuar com o crescimento e se tornar dominante em relação aos demais que acabam sofrendo atresia. O folículo dominante selecionado tem maior expressão de receptores de LH e FSH nas células da teca e da granulosa. Assim, esse folículo responde a níveis de FSH baixos e a níveis pré-ovulatórios de LH, sendo que fatores foliculares como o estradiol e a inibina são os prováveis responsáveis pelas concentrações de FSH diminuídas (AERTS, *et al.*, 2010; GINTHER, *et al.*, 2000; ROSALES-TORRES *et al.*, 2012).

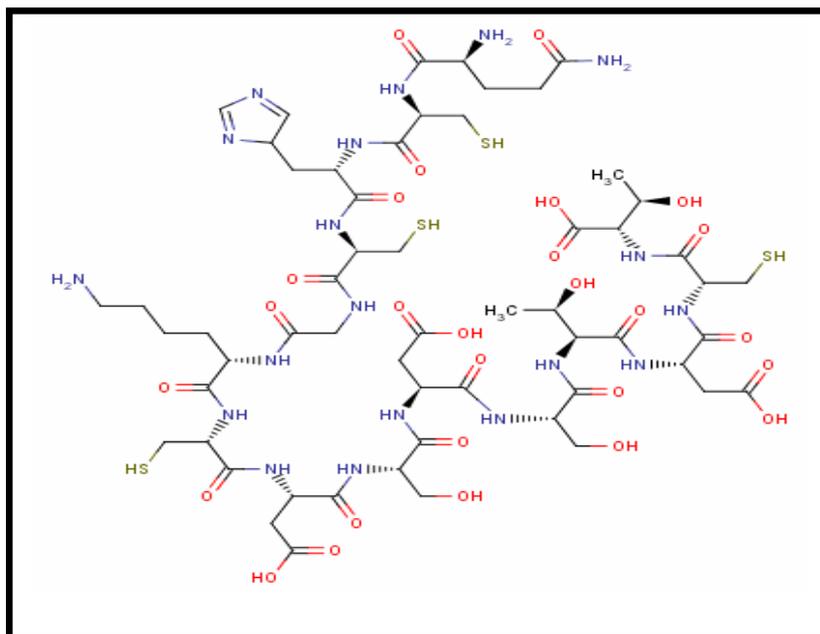
Embora a resposta às gonadotropinas e à capacidade de produzir prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sejam fatores importantes para a seleção do folículo dominante, existem

outros fatores que regulam esse processo, como o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) e o fator de crescimento semelhante à insulina de proteínas de ligação 4 e 5 (IGFBP-4 e IGFBP-5) (ROSALES-TORRES *et al.*, 2012).

#### 1.4 Hormônio folículo estimulante

O FSH (Figura 1) é um dos componentes da família dos hormônios glicoproteicos produzidos na adeno-hipófise e que estimula o desenvolvimento folicular mediante interação com receptores específicos nas células da granulosa (SANTANA *et al.*, 2008). Dessa forma, induz o aumento na divisão dessas células e da atividade da aromatase (enzima que catalisa a conversão de andrógenos a estrógenos), assim como aumenta a expressão de genes envolvidos com a produção de proteínas que apresentam envolvimento crucial na maturação folicular e na formação de receptores do LH (GORDON, 2004). A glândula responsável pela produção de FSH também produz e libera outros hormônios, como o LH, o ACTH, o GH, o hormônio estimulante da tireóide (TSH) e a prolactina.

O FSH apresenta duas subunidades glicosiladas, não idênticas e ligadas entre si por meio de interações não covalentes (ERWIN *et al.*, 1983). A subunidade alfa, similar aos outros hormônios glicoproteicos da pituitária (hipófise), apresenta 96 resíduos de aminoácidos e, a subunidade beta, exclusiva deste hormônio, possui 109 resíduos de aminoácidos (ERWIN *et al.*, 1983; SANTANA *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Estrutura molecular da subunidade beta (81-95) do hormônio folículo estimulante (FSH). Modificado de *Chemical Trading Guide*.

### 1.5 Limitações do uso de FSH em protocolos de superestimulação ovariana

Devido à meia vida biológica curta do FSH, de aproximadamente cinco horas, existe a necessidade de aplicações de injeções a cada 12 horas, em um período de quatro dias, para alcançar taxas de ovulação altas (TRÍBULO *et al.*, 2012). Esse manejo reprodutivo em excesso é estressante para o animal e pode resultar em resposta superovulatória reduzida por meio do comprometimento da função gonadal cíclica normal devido alteração da função adrenal (ARMSTRONG, 1986). Essa suposição defendida há muitos anos, recentemente corroborada por dados científicos, afirma que o estresse causa prejuízos à reprodução em qualquer espécie, inclusive bovinos (SÁ FILHO, *et al.*, 2008). De forma mais detalhada, o estímulo estressante pode provocar a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH), produzido principalmente por neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (GUELFÍ *et al.*, 2011). Esses neurônios projetam o CRH para o sistema porta hipofisário, transportando-o até a

glândula pituitária, onde irá estimular a liberação do ACTH. Esse hormônio, por sua vez, promove a secreção de glicocorticóides, como o cortisol, por meio da estimulação da glândula adrenal (GUELFY *et al.*, 2011; TRÍBULO *et al.*, 2012), podendo estar, portanto, envolvido indiretamente na reprodução animal.

Evidências mostram que o cortisol inibe ou atrasa o pico de LH, pois seus receptores nas células da granulosa diminuem, segundo estudo *in vitro*, resultando em taxa de crescimento folicular baixa após o desvio (KAWATE *et al.*, 1993; MACEDO, *et al.*, 2012). O aumento desse hormônio, também, altera a produção e a secreção de outros hormônios, como a insulina, tendo como resultado final, a redução da fertilidade dos animais. Dessa forma, a necessidade de reduzir os estímulos estressantes durante o uso de técnicas de reprodução assistida é clara, quando se procura melhores respostas de superestimulação ovariana (SÁ FILHO, *et al.*, 2008).

Em virtude das dificuldades descritas acima, o desenvolvimento de um sistema de entrega de hormônios que aperfeiçoe a ação farmacêutica, diminua a quantidade de ativo necessário (menor custo, principalmente quando se trata grandes rebanhos), bem como diminua a quantidade de injeções necessárias é uma tarefa desafiadora. O uso de polímeros no desenvolvimento de sistemas de entrega, tem se tornado importante e pode ser empregado com a finalidade de melhorar a estabilidade do ativo (hormônio que se pretende encapsular) e modificar as características de liberação (SHAIK *et al.*, 2012). Sistemas constituídos por micro- e/ou nanopartículas poliméricas biodegradáveis combinadas com hormônios glicoproteicos para uma liberação lenta e sustentada seria uma alternativa para simplificar os protocolos de superestimulação ovariana, por meio da redução de aplicações de injeções, e conseqüentemente, do manejo intenso das fêmeas doadoras de embriões/óvulos e do estresse ao animal (TRÍBULO *et al.*, 2012).

### 1.6 Nanotecnologia na Medicina Veterinária

A nanotecnologia, tendo o prefixo “nano” do grego que significa “anão”, é conhecida como a tecnologia que manipula e faz experimentos com estruturas que apresentam, pelo menos, uma das dimensões (altura, comprimento ou largura) na escala do nanômetro (nm), variando de 1 a 100 nm (KRUG *et al.*, 2011). Sendo que seu marco inicial ocorreu durante a palestra intitulada “Há mais espaços lá embaixo” ministrada pelo físico Richard Feynman em 1959, que introduziu a ideia de que seria possível a manipulação dos átomos (TOUMEY, 2008). Seguido por Richard Small que fez uma importante descoberta no que diz respeito aos fulerenos (VERMA, *et al.*, 2012).

A manipulação de materiais em nanoescala proporciona numerosas aplicações diagnósticas como biossensores, nanossondas de imagem para agentes de contraste em ressonância magnética, e também aplicações terapêuticas por meio de sistemas de entrega sustentada de drogas e direcionada a alvos específicos (DILBAGHI, *et al.*, 2012). Os recentes avanços científicos da pesquisa em nanotecnologia estão revolucionando a medicina moderna voltada para os seres humanos, bem como a medicina aplicada aos animais, principalmente, no que diz respeito à saúde, à nutrição e às áreas envolvidas com a reprodução animal, modificando potencialmente a prática dessa área.

A nanotecnologia na medicina veterinária possui um enorme potencial para revolucionar o campo da reprodução biológica e superar as barreiras para o sucesso reprodutivo em animais via uso de sistemas nanoestruturados de entrega sustentada de hormônios (SENEL *et al.*, 2004). Esses sistemas podem melhorar a eficácia terapêutica por meio do aumento da meia vida da biomolécula, devido à proteção proporcionada pela matriz nanoestruturada, e também pela possibilidade do uso de menor quantidade de ativo, visto que a escala nanométrica apresenta propriedades como grande área de

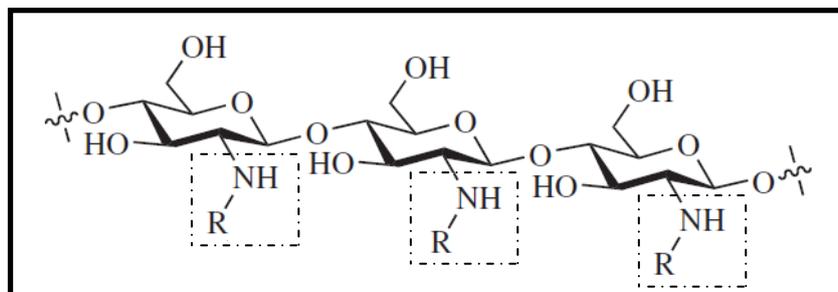
superfície em relação ao volume, o que confere propriedades físicoquímicas únicas (SENEL *et al.*, 2004).

### 1.7 Micro e nanopartículas poliméricas na liberação sustentada de fármacos

O uso de polímeros como veículos de entrega sustentada de fármacos há muito é explorado por apresentarem aplicações em diversas áreas, como também pelo aumento da eficácia terapêutica dos medicamentos, e consequente redução dos efeitos adversos indesejáveis. A liberação sustentada ocorre quando um polímero, no caso natural (biopolímero), é combinado com o agente ativo de tal maneira, que esse é liberado de forma constante ou cíclica e, pode ser influenciado pelo ambiente. Sendo que a liberação do ativo pode ocorrer por difusão, osmose ou erosão do polímero (SHAIK *et al.*, 2012).

Diversos polímeros têm sido utilizados no desenvolvimento de micro- e nanossistemas poliméricos, sendo eles tanto de origem natural quanto sintética. A quitosana, um polímero natural, tem sido amplamente utilizada como carreadora de ativos quando estruturada na escala micro- e nanométrica, em busca de uma garantia de estabilidade do ativo bem como de partículas estáveis e biocompatíveis para aplicação (FAN *et al.*, 2012; SHAIK *et al.*, 2012). A quitosana é produzida pela N-desacetilação parcial da quitina, presente em exoesqueletos de crustáceos, como caranguejos, siris, camarões e lagostas (Figura 2). Propriedades biológicas como a biocompatibilidade, e a biodegradabilidade, bem como o custo baixo e carga de superfície positiva tornam a quitosana muito atrativa no que diz respeito ao transporte e entrega de drogas (TIYABOONCHAI, 2003; FAN *et al.*, 2012). Fatores como massa molecular e grau de desacetilação da quitosana afetam a formação de sistemas de entrega de fármacos baseados em quitosana, influenciando no tamanho e carga de superfície desses sistemas.

Observa-se que a interação da droga com a quitosana ocorre, principalmente, por meio de interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (TIYABOONCHAI, 2003).



**Figura 2.** Estrutura molecular da quitina onde  $R = \text{COCH}_3$  e da quitosana,  $R = \text{H}$ . Modificado de GONSALVES *et al.*, 2011.

Dentre os vários métodos de preparação de partículas de quitosana o mais amplamente utilizado é a geleificação iônica, descrito inicialmente por CALVO *et al.*, 1997, devido a não necessidade do uso de solventes orgânicos e à praticidade (FAN *et al.*, 2012). Essa metodologia se baseia na interação eletrostática entre o grupo amino da quitosana e a carga negativa de um composto polianiónico, como tripolifosfato de sódio (TPF), um agente para formar ligações cruzadas (*crosslinking*), não tóxico e com propriedades multivalentes. Primeiramente, a quitosana é dissolvida em água ultrapura acidificada com ácido acético, e então o TPF é acrescentado de forma lenta e constante sob agitação magnética, à temperatura ambiente. Dessa forma, as partículas são formadas espontaneamente. Dependendo da concentração de quitosana utilizada, a dissolução pode ser realizada sem a necessidade de acidificar a água (TIYABOONCHAI, 2003; FAN *et al.*, 2012).

Em janeiro de 2013, Rather e colaboradores publicaram um artigo em que nanoconjugados de quitosana foram utilizados para entrega do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), hormônio peptídico hipotalâmico responsável pela liberação

de FSH e LH, em peixes. Antes dessa publicação, não existiam relatos de nanopartículas à base de quitosana para entrega de hormônios relacionados à reprodução.

Outro polímero muito utilizado no desenvolvimento de partículas poliméricas é o polietilenoglicol (PEG). O PEG é um surfactante hidrofílico não iônico que, quando utilizado em conjunto com a quitosana, aumenta a biocompatibilidade e estabilidade da nanopartícula por favorecer a não agregação e dificultar o reconhecimento pelas proteínas do sistema complemento, consequentemente evadindo ao sistema imunológico (TIYABOONCHAI, 2003).

No intuito de aumentar a biocompatibilidade, outra possibilidade é a utilização de sistemas de entrega de drogas contendo proteínas circulantes no sangue, como é o caso da albumina sérica bovina (BSA). A BSA é uma proteína globular com massa molecular de aproximadamente 66,5 kDa, presente, de forma mais abundante no plasma sanguíneo bovino (50 mg/mL) e atua, principalmente, como transportadora. Suas propriedades de ligante incluem afinidade por ácidos graxos, metais, íons, hormônios endógenos e substâncias exógenas ao plasma. Apresenta biocompatibilidade e é estável no sangue (TETZNER, 2007). Por conta dessas características, a BSA é amplamente utilizada como carregador biodegradável para entrega de drogas e tem uma longa história em aplicações farmacêuticas no desenvolvimento de novas formulações.

## **2. Hipótese**

As nanopartículas contendo hormônios adeno-hipofisários utilizadas em sistemas de produção *in vitro* proporcionam expansão dos complexos *cumulus*-oócitos e maiores taxas de produção de blastocitos devido à entrega sustentada do ativo.

### 3. Justificativa

A possibilidade de diminuir a variabilidade na resposta de superestimulação ovariana de fêmeas bovinas após tratamentos com produtos comerciais que oferecem atividade de FSH, bem como reduzir as aplicações de injeções diárias tem despertado crescente interesse em diversos grupos de pesquisa (BARUSELLI *et al.*, 2006). E para alcançar essa diminuição o primeiro passo é testar os produtos nanoencapsulados contendo os produtos comerciais em matriz polimérica, como a quitosana que apresenta baixo custo, em sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos. Sendo que PIV ainda necessita de avanços no que diz respeito à maturação de oócitos quando comparada com resultados *in vivo*, essa etapa torna-se também essencial para aprimorar as respostas às gonadotropinas, e conseqüentemente melhorar os resultados da PIV (HAVLICEK *et al.*, 2005).

De acordo com a literatura, ainda são poucas as pesquisas relacionando nanotecnologia à reprodução animal, na medicina veterinária, mesmo diante das aplicações ilimitadas. Assim, a busca por novas formas de aplicações dos ativos que promovam uma melhora na eficiência das técnicas de reprodução assistida e que, se possível previnam o estresse provocado pelo manejo intensivo, se faz muito atrativo. Para alcançar essas expectativas, uma das formas seria desenvolver um sistema de liberação sustentada à base de polímeros para o encapsulamento dos ativos, capazes de compartimentalizar e promover a liberação progressiva do ativo (MEDEIROS *et al.*, 2011). Para testar a efetividade dos nanoencapsulados em sistemas *in vitro*, a avaliação da expansão das células do *cumulus* é um instrumento viável, pois são células que possuem receptores para o FSH e o ACTH (MAGALHÃES *et al.*, 2009; AMWEG *et al.*, 2011), além de possuir a facilidade de realização na rotina de laboratório, antes de ser testado *in vivo*.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo geral

- Identificar os ativos presentes em produtos comerciais com atividade de FSH e aprisioná-los em estruturas poliméricas micro- e nanométricas à base de quitosana para liberação sustentada *in vitro*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a composição molecular dos produtos comerciais Folltropin-V, Pluset, FSH recombinante (rFSH) e também o FSH da marca Sigma;
- Formular e caracterizar sistemas de entrega de hormônios adeno-hipofisários com quitosana (polímero biodegradável), polietilenoglicol (PEG) e albumina sérica bovina (BSA) para liberação sustentada *in vitro* dos fármacos de ação sobre o sistema reprodutor;
- Avaliar a possível atividade do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), outro hormônio da pituitária, presente nos produtos comerciais, sobre a expansão das células do *cumulus* de complexos-*cumulus*-oócitos bovino;
- Avaliar comparativamente a atividade do FSH e ACTH livres e nanoencapsulados sobre a expansão das células do *cumulus* de complexos-*cumulus*-oócitos bovino;
- Avaliar a taxa de clivagem (D2) e de blastocistos (D7 e D8) após a fecundação *in vitro*, comparando os hormônios livres e encapsulados.

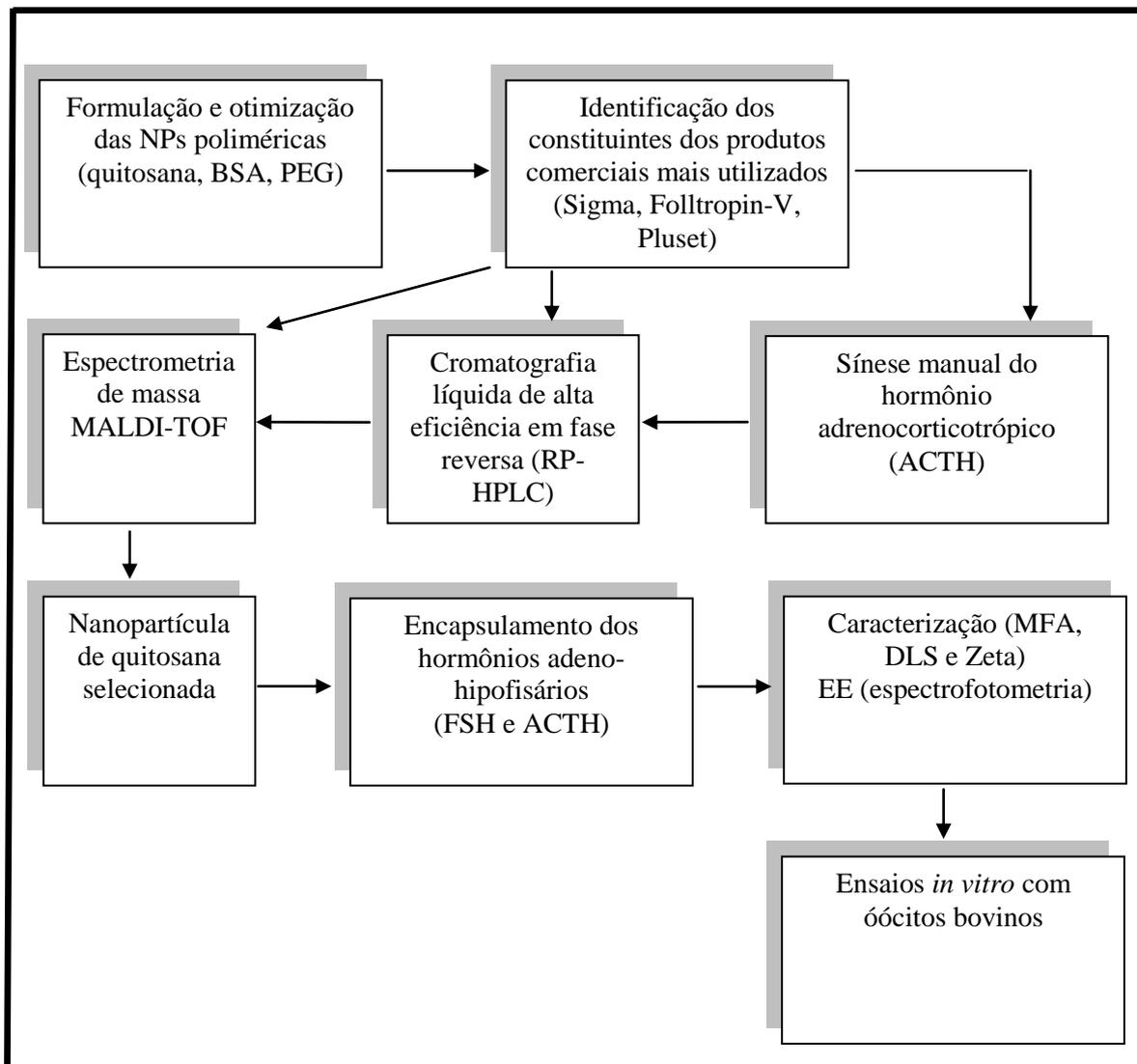
## 5. Material e Métodos

### 5.1 Estratégia experimental

A metodologia do presente trabalho seguiu o esquema representado abaixo (Figura 3), onde foram formuladas nanopartículas poliméricas com a utilização de quitosana (polissacarídeo catiônico), BSA (proteína mais abundante no sangue bovino), e polietilenoglicol (PEG) para revestimento das NPs com a finalidade de aumentar a estabilidade coloidal. A otimização foi buscada com base nas diferentes concentrações de BSA, com a presença ou ausência de PEG bem como modificações no método de produção padrão de NPs de quitosana, a geleificação iônica, onde se buscou formulações na ausência do íon polianiónico tripolifosfato de sódio (TPF). Concomitantemente foram realizados experimentos em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e espectrometria de massa MALDI-TOF para a separação e identificação dos constituintes dos produtos comerciais mais utilizados em superestimulação bovina. A detecção de fragmento da precursora do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) em espectrometria de massa possibilitou assim, a etapa de síntese manual desse hormônio, com confirmação do sucesso da síntese por MALDI-TOF e purificação por RP-HPLC.

Após a seleção da nanopartícula de quitosana, pelo método de geleificação iônica com TPF, foram encapsulados os hormônios adeno-hipofisários, FSH e ACTH. A caracterização dessas NPs foi por meio de microscopia de força atômica (MFA), avaliação da morfologia, espalhamento de luz dinâmico (DLS), para obter informações a respeito do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão, e Zeta, para obter a carga de superfície das NPs formuladas. Também foi realizado análise de eficiência de encapsulamento por espectrofotometria (método indireto) para as NPs contendo FSH ou

ACTH. Por fim, essas NPs foram aplicadas em ensaios *in vitro* para avaliação da maturação do complexos-*cumulus*-oócitos e, após fecundação, a taxa de produção de blastocistos.



**Figura 3.** Representação em esquema da metodologia seguida ao longo do trabalho. As setas indicam as etapas seguintes.

## 5.2 Hidrólise trípica das amostras de produtos comerciais com atividade de FSH e de LH

As amostras dos produtos comerciais, FSH do fabricante Sigma (Aldrich, EUA), Folltropin-V (Bioniche, Canadá), Pluset (Serono, Itália) e Lutropin (Bioniche, Canadá),

bem como o rFSH (Serono, Itália) foram submetidos à hidrólise trípica para análise direta dos componentes moleculares por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF em equipamento UltraFlex III ou AutoFlex Speed (Bruker Daltonics, Alemanha). As hidrólises das amostras foram realizadas com tripsina imobilizada (Pierce, EUA) em meio reacional de bicarbonato de amônio (solução tampão) seguida da redução com ditioneitol (DTT) e alquilação com iodoacetamida, todos a 0,05 M.

De forma mais detalhada, primeiramente foi preparada uma solução de 6 mL da solução de bicarbonato de amônio (0,05 M), chamada de solução 1. Em seguida, 1 mL da solução 1 foi adicionado ao DTT (0,05 M) em pó em microtubo de polipropileno com capacidade de 2,0 mL, sendo que apenas 45  $\mu$ L dessa solução de bicarbonato de amônio e DTT foram adicionados aos produtos comerciais ( $< 1$  mg ressuspensionado em 5  $\mu$ L de água ultrapura) e deixada incubada em banho maria Q-334M (Quimis, Brasil) por 1 hora à 60°C. Logo depois, 1 mL da solução 1 foi adicionada em microtubo contendo iodoacetamida (0,05 M) em pó e, então 50  $\mu$ L desta solução foram adicionados ao microtubo já contendo os produtos comerciais, previamente reduzidos com DTT em solução, e foi incubada por 45 minutos à 37°C. Posteriormente, tripsina imobilizada, lavada por 4 (quatro) vezes com solução de bicarbonato de amônio (0,05 M) para retirada de um inibidor enzimático, foi adicionada aos microtubos contendo os produtos, reduzidos (DTT) e alquilados (iodoacetamida) e incubado a 37°C por 12 horas, sendo retirada a tripsina das amostras após a digestão. Concluída essa etapa, as amostras dos produtos comerciais hidrolisados com tripsina foram analisadas por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF, procedimento que será descrito posteriormente.

### 5.3 Separação dos componentes moleculares

As amostras dos produtos comerciais hidrolisadas com tripsina (FSH, Folltropin-V, Pluset e Lutropin) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa ultrarrápida, RP-HPLC FAST, (Shimadzu, Japão) utilizando uma coluna semipreparativa C<sub>18</sub> (Vydac, EUA), com gradiente linear, variando a concentração de 0,1% de acetonitrila e ácido trifluoroacético, de 5 a 95% com fluxo contínuo de 0,4 mL/min, com monitoramento sendo conduzido nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm. Para a separação molecular dos componentes, uma pequena quantidade (< 1 mg) da amostra hidrolisada foi ressuspensa em 50 µL de água ultrapura Milli-Q (Billerica, EUA). A separação ocorreu à temperatura ambiente e as frações foram coletadas manualmente em microtubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL, sendo então rotaevaporadas por aproximadamente 2 horas e armazenadas a 4°C até análise por espectrometria de massa. O rFSH após hidrólise com tripsina foi analisado por espectrometria de massa MALDI-TOF sem passar por essa etapa.

### 5.4 Espectrometria de massa MALDI-TOF

As frações obtidas por RP-HPLC FAST a partir dos produtos comerciais, Folltropin-V, Pluset, FSH da marca Sigma e Lutropin, foram ressuspensas em 5 µL de água ultrapura (Milli-Q). Em seguida, as frações dos produtos comerciais ressuspensas foram co-cristalizadas em matriz constituída por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (Bruker Daltonics, Alemanha) na proporção de 1:3 (v:v) para análise em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics, Alemanha). A preparação da matriz (10 mg/mL) foi conduzida mediante a adição de 250 µL de acetonitrila, 200 µL de água ultrapura e 50 µL de ácido

trifluoroacético 3% em 5 mg de CHCA. O volume de 1  $\mu$ L das misturas de matriz:amostra foram aplicadas em triplicata em uma placa de aço inox de 96 poços tipo Anchorchip 800/384 (Bruker Daltonics, Alemanha) e secas à temperatura ambiente, com subsequente formação aleatória de uma camada de cristais de matriz:amostra, sendo a placa introduzida após secagem, posteriormente em uma região de baixa pressão do espectrômetro (fonte de íons). A metodologia das aquisições foi configurada no modo autoexecutável de acordo com o padrão do equipamento para análises proteômicas com aquisições conduzidas em modo refletido/positivo em uma faixa de m/z 700-3500 e os íons com intensidade e resolução apropriadas de acordo com os padrões do equipamento foram submetidos à fragmentação em modo LIFT<sup>TM</sup> (MS/MS). Em ambos os casos utilizando calibração externa com a mistura de peptídeos *Peptide Calibration Standard I* (Bruker Daltonics, Alemanha). A interpretação dos espectros obtidos nas análises por MS/MS foi realizada de forma manual utilizando o software *FlexAnalysis* (Bruker Daltonics, Alemanha), e as sequências obtidas comparadas com banco de dados *Protein BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Sendo importante ressaltar que os critérios utilizados para a escolha dos espectros a serem analisados foram baseadas nos íons mais intensos, os que se faziam presente em mais de um produto comercial e, por fim, na melhor resolução dos espectros.

### 5.5 Síntese e purificação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH)

O hormônio peptídico adrenocorticotrópico (ACTH<sub>(1-39)</sub>) suíno (*Sus scrofa domesticus*), com sequência de resíduos de aminoácidos (SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYPNGAEDELAEAFPLEF), previamente detectado nos produtos comerciais contendo atividade de FSH, proveniente de extratos

de hipófise suína, foi sintetizado manualmente em suporte sólido utilizando-se a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonila) (BRAY, 2003), sendo 0,61 mmol/g o grau de substituição do suporte para a síntese de denominação PSLEM 12/034 de acordo com a biblioteca de peptídeos sintetizados no laboratório.

O grupo Fmoc, protetor do grupamento funcional amina da resina, necessitou ser desprotegido para iniciar o processo de síntese, e, para tanto, foi utilizada uma solução de 25% de piperidina (v/v) em *N, N*-dimetilformamida (DMF), pelo fato do Fmoc ser lábil à base. A resina foi tratada com esta solução por duas vezes, por 15 minutos cada, sob agitação (BRAY, 2003).

Após a etapa descrita acima, foi conduzido o acoplamento do primeiro derivado Fmoc-aminoácido, o qual foi adicionado de acordo com sua massa molecular, em excesso molar de seis vezes. Também foram adicionados 227,55 mg de hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônio (HBTU), 2 mL de DMF e 190 µL de *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA) e por fim, deixado sob agitação pendular durante 60 minutos. A partir do 35º resíduo de Fmoc-aminoácido, passou-se a utilizar um excesso molar de quatro vezes: 159,7 mg de HBTU, 1 mL de DMF e 126,6 µL de DIPEA, devido a um incidente que resultou na perda de, aproximadamente,  $\frac{2}{3}$  do material. As etapas de desproteção do grupamento Fmoc e acoplamento dos respectivos derivados de aminoácidos (Fmoc-AA-OH) foram repetidas, sucessivamente, até a adição e posterior desproteção do último resíduo de aminoácido, sendo que, após cada uma destas, a resina foi lavada com DMF e 2-propanol, alternadamente por quatro vezes.

O teste de Kaiser (ninhidrina), que detecta a presença de aminas livres na cadeia peptídica, foi utilizado para validar o sucesso de cada etapa. Assim, quando o grupo protetor Fmoc tinha sido removido, após a etapa de desproteção, o resultado era azul e

quando havia a ligação peptídica entre o derivado de aminoácido adicionado e o grupamento N-terminal da cadeia em formação, após a etapa de acoplamento, o resultado era uma coloração amarelada (BRAY, 2003).

Após a síntese, a reação de desproteção das cadeias laterais reativas e a clivagem da ligação peptídeo-resina foram conduzidas por meio da adição de ácido trifluoroacético (TFA). Este processo de clivagem durou 90 minutos, e, em seguida borbulhou-se nitrogênio dentro do tubo de reação para remover o TFA.

Para purificar o produto bruto resultante da síntese, foram aplicados 2 mg da amostra, ressuspensa em 1000 µL de água ultrapura em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa em equipamento HPLC (Shimadzu, Japão). Foi utilizada uma coluna semipreparativa (1,0 cm × 25 cm) *n*-octadecil (C<sub>18</sub>) (Vydac, EUA) com gradiente linear, sob fluxo de eluição de 2 mL/min e monitorado a 216 nm e 280 nm, sendo as separações cromatográficas conduzidas à temperatura ambiente (CONLON, 2007).

### 5.6 Confirmação da pureza e identidade molecular do ACTH

A pureza e identidade molecular do ACTH sintetizado foram confirmadas em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III operado em modo positivo e refletido de maneira semelhante aos relatados anteriormente para análise dos hidrolisados e frações dos produtos contendo FSH comerciais.

### 5.7 Quantificação do ACTH

Para realizar os ensaios *in vitro* em oócitos bovinos, descritos posteriormente, foi necessário realizar a quantificação do ACTH purificado. A quantificação seguiu a lei de *Lambert-Beer*:

**A=abc**

onde “A” é a absorvância a 280 nm; “a” é o coeficiente de extinção molar do ACTH, obtido na literatura (4567,2 L/mol × cm) (GILL *et al.*, 1989); “b” é o caminho óptico (1 cm); e “c” é a concentração desejada (mol/L).

**5.8 Purificação de quitosana comercial para formulação de nanopartículas**

O volume de 5 mL de quitosana (2,5 mg/mL) de baixa massa molecular com grau de desacetilação de 75% (Sigma, EUA) foi dissolvida em 15 µL de ácido acético a 1% por aproximadamente 12 horas e filtrada, com o auxílio de uma seringa de 1 mL, em membrana com poros de 0,22 µm (TPP, Alemanha). A solução filtrada foi precipitada com NaOH (0,1 M) e centrifugada a 5071 g por 20 minutos. O pellet formado foi ressuspenso em água ultrapura e congelado a -80°C antes da liofilização (JOHN *et al.* 2012). Essa quitosana foi utilizada para a formulação das partículas de quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG brancas e contendo os ativos Folltropin-V e FSH da marca Sigma, descrito posteriormente.

**5.9 Formulação das partículas**

Foram realizadas diversas formulações, cada uma com modificações do preparo convencional de NPs de quitosana e com a adição de outros polímeros, PEG e BSA, objetivando obter uma metodologia reprodutível, onde a BSA, em diferentes concentrações, foi testada tanto como composição da matriz polimérica como para revestimento de NPs.

### 5.9.1 Formulação de partículas de quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG brancas e contendo os ativos Folltropin-V e FSH da marca Sigma

Essa primeira formulação teve o propósito de verificar a capacidade de formação das NPs com a BSA e o revestimento com PEG, bem como avaliar o tamanho e a forma das mesmas. Quando se trata das NPs contendo os ativos, o objetivo foi de averiguar o possível aprisionamento dos mesmos.

Nesse procedimento, partículas poliméricas de quitosana/BSA brancas (sem ativos) foram obtidas gradualmente combinando 1% de BSA a 1% de quitosana purificada (item 4.7), ambas em solução aquosa e pH 4,5. Para produzir as partículas, 600  $\mu$ L de quitosana foram adicionados de forma gradual com o auxílio de bomba de infusão de seringa única KDS10 (KdScientific, EUA) (120  $\mu$ L a cada 30 segundos) a 580  $\mu$ L de BSA sob agitação magnética. Após a adição do volume total de quitosana, a solução permaneceu sob agitação por 15 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente o pH foi ajustado com solução de NaOH (0,1 M) para a neutralização (pH  $\sim$ 7,0), prevenindo agregação adicional. As partículas foram centrifugadas a 1223 g por 20 minutos a 4°C para a remoção de partículas maiores, caso existissem, com o intuito de utilizar apenas àquelas que permanecessem em suspensão. Para a formulação das partículas brancas de quitosana/BSA/PEG, 20  $\mu$ L de PEG 8000 (4,16 mg/mL) foram adicionados após a quitosana, e em seguida o pH foi ajustado.

Para o procedimento de formulação das partículas contendo os ativos, 20  $\mu$ L de Folltropin-V (60 mg/mL) ou de FSH da marca Sigma (60 mg/mL) foram adicionados à BSA e agitados magneticamente por 10 minutos antes da quitosana, sendo válido tanto para as partículas peguiladas e não peguiladas. No final de todas as formulações, seis condições foram desenvolvidas: 1) quitosana e BSA; 2) quitosana, BSA e ativo 1 (Folltropin-V); 3) quitosana, BSA e ativo 2 (Sigma), e as outras condições foram estas

já citadas, mas com a adição de PEG 8000. Vale resaltar que quando não houve a adição de ativo ou de PEG, água ultrapura foi adicionada, em volume equivalente, como pode ser observado na Tabela 1.

**TABELA 1. Representação esquemática das composições das partículas quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG brancas e contendo os ativos Folltropin-V e FSH da marca Sigma.**

| Partículas          | Quitosana | BSA    | PEG   | Água  | Folltropin-V | FSH Sigma | Água  |
|---------------------|-----------|--------|-------|-------|--------------|-----------|-------|
| Q/BSA branca        | 600 µL    | 580 µL | —     | 20µL  | —            | —         | 20 µL |
| Q/BSA F             | 600 µL    | 580 µL | —     | 20 µL | 20 µL        | —         | —     |
| Q/BSA S             | 600 µL    | 580 µL | —     | 20 µL | —            | 20 µL     | —     |
| Q/BSA/PEG<br>branca | 600 µL    | 580 µL | 20 µL | —     | —            | —         | 20 µL |
| Q/BSA/PEG F         | 600 µL    | 580 µL | 20 µL | —     | 20 µL        | —         | —     |
| Q/BSA/PEG S         | 600 µL    | 580 µL | 20 µL | —     | —            | 20 µL     | —     |

Quitosana (2,5 mg/mL); BSA (10,33 mg/mL); PEG (4,16 mg/mL); Folltropin-V (60 mg/mL ); FSH da Sigma (60 mg/mL). Todas as concentrações são iniciais. F (Folltropin-V); S (Sigma).

### 5.9.2 Formulação de partículas brancas de quitosana revestidas com BSA e com PEG/BSA

Essa formulação teve o mesmo propósito avaliar o potencial da BSA como revestimento, onde as partículas de quitosana foram preparadas pelo método de geleificação iônica com tripolifosfato de sódio (TPF) e com diferentes concentrações de BSA. Primeiramente foi preparada 5 mL de solução de quitosana a 2,5 mg/mL e ácido acético 0,3% (15 µL em volume), a qual permaneceu em agitação magnética por 90 minutos à temperatura ambiente, sendo filtrada após dissolução em membrana de poro de 0,22 µm (TPP, Alemanha). Em seguida, 1 mL de TPF (1 mg/mL) foi acrescentado de forma lenta e gradual, em 2 mL de quitosana, sempre sob agitação magnética, e após a adição do volume total de TPF, a agitação ainda foi mantida por 15 minutos.

Depois desse procedimento, dois grupos distintos foram separados, no primeiro grupo, objetivou-se o revestimento com diferentes concentrações de BSA e sem a presença de PEG, sendo que no segundo, além das diferentes concentrações de BSA também foi utilizado PEG (4,16 mg/mL). As concentrações de BSA foram de zero (controle); 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; e 0,32 mg/mL, como pode observado na Tabela 2. O grupo que não continha PEG, o BSA foi acrescentado após adição de TPF e deixado sob agitação magnética por 15 minutos. Enquanto que o grupo com PEG, este foi adicionado anteriormente à BSA, sendo que após a adição de cada um, a agitação magnética foi mantida durante 15 minutos.

**TABELA 2. Representação esquemática das composições das partículas brancas de quitosana revestidas com BSA e com PEG/BSA.**

| Partículas | Quitosana | TPF  | BSA    | PEG 8000 |
|------------|-----------|------|--------|----------|
| QBSA1/PEG  | 2 mL      | 1 mL | ---    | 0,5 mL   |
| Q/BSA2/PEG | 2 mL      | 1 mL | 0,2 mL | 0,5 mL   |
| Q/BSA3/PEG | 2 mL      | 1 mL | 0,2 mL | 0,5 mL   |
| Q/BSA4/PEG | 2 mL      | 1 mL | 0,2 mL | 0,5 mL   |
| Q/BSA5/PEG | 2 mL      | 1 mL | 0,2 mL | 0,5 mL   |
| Q/BSA6/PEG | 2 mL      | 1 mL | 0,2 mL | 0,5 mL   |

Quitosana (2,5 mg/mL); TPF (1 mg/mL); BSA1 (0 mg/mL); BSA2 (0,02 mg/mL); BSA3 (0,04 mg/mL); BSA4 (0,08 mg/mL); BSA5 (0,16 mg/mL); BSA6 (0,32 mg/mL); PEG (4,16 mg/mL). Todas as concentrações são iniciais. \*Esses grupos também foram formulados sem a presença de PEG.

### 5.9.3 Formulação de partículas brancas de quitosana/BSA com duas diferentes concentrações de BSA

Foram preparados 8 mL de solução de quitosana (2,5 mg/mL) contendo ácido acético 0,3% (24 µL em volume) e 2 mL de solução de TPF (1 mg/mL), ambas concentrações iniciais para serem utilizadas nas formulações. As concentrações de BSA utilizadas foram de 0,21 e 0,41 mg/ml (concentrações iniciais), sendo que essa foi

dissolvida em solução de 1× de PBS (100 nM), partindo de solução estoque de 10× de PBS e 9 mL de Milli-Q. Foram realizadas três condições, onde a primeira, como controle, foi utilizado o método de formulação de NPs de quitosana padrão (2,5 mg/mL), com 1 mL de TPF (1 mg/mL) sendo adicionado, de forma lenta e constante, à 2 mL de quitosana sempre sob agitação magnética. E após a adição do volume total de TPF, a solução permaneceu sob agitação por mais 15 minutos à temperatura ambiente. Para a segunda condição, 1 mL de BSA (0,41 mg/mL) foi adicionado, de forma lenta e constante, à 2 mL de quitosana (2,5 mg/mL), sem a presença de TPF, sendo que após a adição total de BSA, a solução permaneceu sob agitação magnética por 15 minutos. Na terceira, 1 mL de BSA (0,21 mg/mL) foi adicionado, da mesma forma que a condição anterior, à 2 mL de quitosana, também sem a presença de TPF e agitado por 15 minutos após adição total da BSA (Tabela 3).

**TABELA 3. Representação esquemática das partículas brancas de quitosana/BSA com diferentes concentrações de BSA.**

| Partículas | Quitosana | TPF  | BSA  |
|------------|-----------|------|------|
| Q/TPF      | 2 mL      | 1 mL | —    |
| Q/BSA (+)  | 2 mL      | —    | 1 mL |
| Q/BSA (-)  | 2 mL      | —    | 1 mL |

Quitosana (2,5 mg/mL); TPF (1 mg/mL); BSA (+) (0,41 mg/mL); BSA (-) (0,21 mg/mL). Todas as concentrações são iniciais.

#### 5.9.4 Formulação de partículas brancas de quitosana/BSA na ausência ou na presença de TPF

Essa formulação teve o intuito de avaliar se a BSA poderia substituir o TPF, como agente *crosslinking* na formação de partículas de quitosana, proporcionando assim, maior praticidade nas formulações. Foi preparada uma solução estoque de 6 mL de quitosana (2,5 mg/mL) e de 3 mL de TPF (1 mg/mL). Na primeira formulação foram

adicionados à solução de 2 mL de quitosana, 1 mL de TPF (1 mg/mL) e, posteriormente 1 mL de BSA (0,41 mg/mL), em pH 4. Essa solução total, foi então deixada sob agitação magnética por 15 minutos, para a formação espontânea das NPs. Para a segunda formulação foi adicionado apenas 1 mL de BSA (0,41 mg/mL), em pH 7, sem a presença do TPF, sendo que após a adição total de BSA, a solução permaneceu sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Nesse caso, onde não houve adição de TPF, o volume equivalente de água ultrapura foi utilizado (Tabela 4).

**TABELA 4. Representação esquemática das composições das partículas brancas de quitosana/BSA na ausência ou na presença de TPF.**

| Partículas | Quitosana | TPF  | BSA (pH 4) | BSA (pH 7) |
|------------|-----------|------|------------|------------|
| Q/BSA      | 2 mL      | 1 mL | 1 mL       | —          |
| Q/TPF/BSA  | 2 mL      | —    | —          | 1 mL       |

Quitosana (2,5 mg/mL); TPF (1 mg/mL) BSA (0,41 mg/mL). Todas as concentrações iniciais.

#### 5.9.5 Formulação de partículas contendo ACTH

As NPs de quitosana contendo ACTH foram produzidas pelo método de geleificação iônica, já citado anteriormente. Foi preparada uma solução estoque de 5 mL de quitosana (2,5 mg/mL) acrescidos de ácido acético 0,3% para sua melhor dissolução e 2 mL de TPF (1 mg/mL). Para a formulação, em 1 mL de quitosana foram adicionados 50 µL de solução de ACTH (0,2 µg/µL) que permaneceu sob agitação magnética por 15 minutos para então, posteriormente, ser acrescido, de forma lenta e constante, 0,5 mL de TPF. Após a adição total de TPF a solução permaneceu sob agitação por mais 15 minutos para a formação espontânea das NPs contendo o ativo. Após a formulação, a solução de nanopartículas foi filtrada em ultrafiltro Amicon®

Ultra 10 kDa, sendo utilizado centrífuga Mini Spin (Eppendorf, Alemanha) para a separação do hormônio não encapsulado e posterior quantificação por método indireto.

O procedimento descrito acima foi repetido por mais duas vezes, porém com volumes de 5  $\mu\text{L}$  e de 153  $\mu\text{L}$  de ACTH (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), sendo que para a realização dos testes *in vitro* com os oócitos bovinos, foram utilizadas as NPs formuladas com a concentração de 153  $\mu\text{L}$  de ACTH (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Vale relatar que o ACTH, após sua síntese e purificação, foi armazenado à  $-80^{\circ}\text{C}$ , logo quando precisava ser utilizado, era descongelado à temperatura ambiente e adicionado sob a forma de solução à quitosana.

#### 5.9.6 Formulação de partículas contendo FSH (Sigma)

A formulação das NPs contendo FSH foi procedida de forma semelhante às NP contendo ACTH, onde 4,5 mg de FSH (3 mg/mL) do fabricante Sigma foram adicionados diretamente a solução de 1 mL de quitosana (2,5 mg/mL), e então, posteriormente, 0,5 mL de TPF (1 mg/mL) foram adicionados, de forma lenta e constante, sempre sob agitação magnética à temperatura ambiente. E após a adição do volume total de TPF, a agitação magnética ainda foi mantida por 15 minutos. A solução de NP contendo FSH, então, foi filtrada em ultrafiltro Amicon<sup>®</sup> Ultra 100 kDa, sendo utilizado centrífuga Mini Spin (Eppendorf, Alemanha) para a separação do hormônio não encapsulado e posterior quantificação.

#### 5.10 Caracterização estrutural e fisicoquímica das partículas com ou sem os hormônios

O diâmetro hidrodinâmico e a polidispersividade (PdI) das formulações de partículas foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), enquanto que a carga de superfície foi determinada por medidas de potencial Zeta de

superfície (Tabela 5) por meio de equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA) utilizando laser He-Ne (4 mW) operando a 633 nm. As amostras, foram diluídas 10× em água ultrapura à temperatura ambiente, foram aplicadas em cubeta descartável cujas medições foram realizadas em triplicata no modo automático à temperatura de 25°C, índice de refração 1,33 e ângulo de 173°.

Um microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu, Japão), equipado com escâner com área máxima de varredura de 125 × 125 µm e ponteira de nitreto de silício com formato retangular e raio de curvatura de 10 nm e constante de mola de aproximadamente 42 N/m. As imagens foram adquiridas com resolução de 512 × 512 pixels e operado em modo dinâmico em duas áreas de varredura (10 µm × 10 µm e 20 µm × 20 µm), visando avaliar a morfologia e a altura média das partículas, onde a preparação das amostras consistiu na aplicação de 1-3 µL da amostra diluída (10× a 100×) sobre a superfície de mica muscovita recém-clivada, e deixada secar a temperatura ambiente. As imagens foram processadas com correção de plano automática (*planefit auto*), eixo x (*average at each point X-line*) e plano de fundo do eixo x (*background x*) utilizando o software-9600 off-line.

**TABELA 5. Estabilidade coloidal avaliada por meio do potencial Zeta de nanopartículas em água (ASTM, 1985).**

| <b>Potencial Zeta (mV)</b> | <b>Estabilidade do coloide</b> |
|----------------------------|--------------------------------|
| <b>0±5</b>                 | Rápida coagulação              |
| <b>±10 a ±30</b>           | Instável                       |
| <b>±30 a ±40</b>           | Moderada                       |
| <b>±40 a ±60</b>           | Boa                            |
| <b>Mais de ±61</b>         | Excelente                      |

### 5.11 Avaliação da eficiência de encapsulamento

A eficácia do encapsulamento (EE) foi determinada, indiretamente, por meio do espectrofotômetro UV-Visível-UVmini-1240 (Shimadzu, Japão), com leitura de absorvância de 216 nm (ACTH) e 280 nm (FSH) das soluções filtradas em ultrafiltros tipo Amicon. A concentração dos hormônios livres foi calculada com base na comparação com curvas de concentração previamente obtidas para os dois hormônios separadamente, variando de 0 % a 100%, em relação ao máximo de hormônio possível em cada formulação com variações de 10% em 10%.

O material referente às NPs de ACTH foram centrifugadas em centrífuga Mini Spin (Eppendorf, Alemanha), de 500  $\mu$ L em 500  $\mu$ L, até o volume total de 1500  $\mu$ L, por 10 minutos a 8030 g, à temperatura ambiente, em um microtubo de 1,5 mL acoplado ao ultrafiltro Amicon de poros com diâmetro de 10 kDa, visto que a capacidade máxima do reservatório do ultrafiltro é de 500  $\mu$ L. O procedimento de quantificação de ACTH foi realizado por três vezes para as seguintes concentrações finais: 10,5  $\mu$ g/mL, 2,3  $\mu$ g/mL e 462  $\mu$ g/mL. Quanto ao FSH, o procedimento foi o mesmo citado anteriormente, porém com ultrafiltro Amicon utilizado apresentando poros com diâmetro de 100 kDa e concentração final de 3 mg/mL do hormônio. Dessa forma, a quantidade de ativo associado com as partículas de quitosana foi calculada com base na diferença entre a quantidade total utilizada para a preparação das partículas e a quantidade de ativo presente na fase aquosa após a centrifugação.

### 5.12 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo ACTH ou FSH da marca Sigma

As NPs contendo os ativos foram analisadas por meio de DLS no dia da formulação, onde foram utilizadas para o teste de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, bem como 4 dias após e foram estocadas em suspensão à temperatura de 4°C.

### 5.13 Ensaio *in vitro* em oócitos bovinos para determinar o meio de cultura de maturação e avaliar a possível ação do ACTH

O transporte de ovários provenientes de vacas de abatedouros, até o laboratório foi realizado em frascos de vidro contendo solução salina 0,9% (NaCl, Merck, Alemanha) à temperatura de 35°C a 36°C. A aspiração de oócitos a partir de folículos desses ovários foi realizada com uma agulha de 18G acoplada tanto a uma bomba a vácuo quanto a uma seringa de 5 mL, com a qual foram aspirados todos os folículos presentes na superfície dos ovários com diâmetro entre 3 a 8 mm. Durante esse procedimento os ovários foram mantidos em banho maria a aproximadamente 36°C

O líquido folicular aspirado, juntamente com os oócitos, foi colocado em tubos plásticos cônicos de 15 mL e deixado em repouso por 20 minutos, em banho maria (36°C) para a sedimentação das células. Em seguida, o *pellet* contendo os oócitos foi removido e colocado em placas de *Petri* 100 × 20 mm, que com o auxílio de estereomicroscópio Stemi SV- 6 (Zeiss Alemanha) foram realizadas a seleção morfológica, levando em consideração o número e a compactação das camadas de células do *cumulus* e a homogeneidade do citoplasma. Sendo que apenas os oócitos de Grau 1 (citoplasma homogêneo com múltiplas camadas compactas de células do *cumulus*) e Grau 2 (citoplasma homogêneo com, pelo menos, 5 camadas de células do *cumulus* não muito expandidas) foram selecionados (CAIXETA, 2009).

Os complexos *cumulos*-oócitos foram maturados *in vitro* por 24 horas em meio TCM-199 (Gibco, EUA), suplementado com PVP360 (0,8 mg/mL) ou BSA (8 mg/mL), L-glutamina (10 mg/mL) e amicacina (250 mg/mL) (Tabela 6), cobertos com óleo mineral. Todos os cultivos foram realizados em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 39°C. Após o cultivo, os complexos *cumulus*-oócitos foram visualmente classificados de acordo com o grau de expansão para isso utilizaram-se sinais de cruzes com gradação de zero a três. Vale ressaltar que o número de oócitos utilizados em cada gota de maturação (150 µL) foi dependente do número de ovários que eram obtidos diariamente, com o máximo de 24 oócitos/gota. Para esse procedimento foram utilizados materiais esterilizados em capela de fluxo laminar.

**TABELA 6. Apresentação esquemática das quatro condições testadas para maturação *in vitro* de oócitos bovinos, e os respectivos grupos de cada condição.**

|                   | <b>Meio de<br/>Cultura de Maturação</b> | <b>Busca e<br/>Seleção</b> | <b>Grupos</b>                                     |
|-------------------|---|----------------------------|---|
| <b>Condição 1</b> | MIV com BSA<br>(4 mg/mL)                | Líquido folicular          | 1. FSH<br>2. Controle (-)<br>3. ACTH1             |
| <b>Condição 2</b> | MIV com PVP<br>(4 mg/mL)                | LAV com soro               | 1. FSH<br>2. Controle (-)<br>3. ACTH1             |
| <b>Condição 3</b> | MIV com PVP<br>(4 mg/mL)                | Líquido folicular          | 1. FSH<br>2. Controle (-)<br>3. ACTH1<br>4. ACTH2 |
| <b>Condição 4</b> | MIV com PVP ou BSA<br>(4 mg/mL)         | LAV com PVP                | 1. FSH<br>2. Controle (-)<br>3. ACTH1             |

\*FSH (1 UI/mL); ACTH1(1,13 µg/µL); ACTH2 (0,57 µg/mL) MIV: maturação *in vitro*; BSA: albumina sérica bovina; PVP: polivinilpirrolidona; LAV: meio de lavagem. \*Na condição 4 todos os 3 grupos foram testados utilizando PVP como ou BSA no meio de maturação.

#### 5.14 Testes *in vitro* com oócitos bovinos em condição de meio de cultura e de busca e seleção pré-estabelecidos

Após o estabelecimento do meio de cultura a ser utilizado como sendo o meio de maturação *in vitro* (MIV) com polivinilirrolidona (PVP) e a busca e seleção realizada em meio de lavagem (LAV) com PVP, foram realizados testes adicionais com diferentes concentrações finais de ACTH (0,0009 µg/µL; 0,002 µg/µL; 0,007 µg/µL) para avaliar a sua possível ação na expansão dos complexos *cumulus*-oócitos. Como grupo controle, foi estabelecido um negativo, onde continha apenas o meio de maturação, sem a presença de qualquer hormônio, e um positivo contendo FSH (Sigma, EUA) (1 UI/mL), hormônio cuja participação na expansão das células do *cumulus* já é bem estabelecida.

O procedimento para a obtenção e aspiração dos oócitos foram os mesmos citados anteriormente nesse trabalho e a quantidade de oócitos por gota (150 µL) sofreu variação de acordo com os ovários que eram obtidos diariamente.

#### 5.15 Testes *in vitro* com oócitos bovinos utilizando nanopartículas contendo ACTH ou nanopartículas contendo FSH da marca Sigma

Após a formulação das NPs contendo os hormônios ACTH e FSH, descritos nos itens 4.8.5 e 4.8.6, respectivamente, como etapa subsequente, essas foram testadas para avaliar suas possíveis ações na expansão das células do *cumulus* de bovinos. O meio de maturação utilizado foi MIV com PVP e o meio de busca e seleção foi o LAV com PVP, sendo que o procedimento para obtenção dos ovários e aspiração dos oócitos foi realizado em conforme com os experimentos anteriormente citados. Durante os ensaios de atividade biológica para as NP contendo ACTH a concentração final utilizada foi de 0,007 µg/µL e para as NPs de FSH, 0,06 µg/µL.

#### 5.16 Medições da expansão das células do *cumulus* de complexos-*cumulus*-oócitos bovinos maturados *in vitro* antes dos tratamentos e após 24 horas

As imagens foram adquiridas por máquina digital DS-L3 (Nikon, Japão) acoplada ao estereomicroscópio SMZ 800 (Nikon, Japão) antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas, para posterior medição dos complexos *cumulus*-oócitos por meio do programa *ImageJ*. Após a aquisição das imagens (0 e 24 horas), foi realizado uma conversão de pixel para  $\mu\text{m}$  com o auxílio da barra de medida presente nas imagens e em seguida, foram obtidas as medidas de comprimento, tomada como a maior distância entre dois pontos, e de largura, tomada como a menor distância, de todos os complexos, sendo respeitado o ângulos de 90 graus entre as medidas, e os valores médios por grupos de oócitos foi, então, determinado (CALADO *et al.*, 2005).

#### 5.17 Fecundações *in vitro* após maturação com nanopartículas contendo ACTH ou com nanopartículas contendo FSH da marca Sigma

Após a maturação *in vitro* com as NPs contendo ACTH ou FSH, foi realizada a fecundação *in vitro* com sêmen de touro nelore previamente testado. Esse sêmen foi primeiramente descongelado em banho maria, por 30-60 segundos à 37°C. Logo após, a motilidade (0 - 100%) e o vigor (0 - 5) foram avaliados visualmente com o auxílio de um estereomicroscópio, antes e após a seleção espermática realizada por gradiente de *Percoll* em duas fases (45% e 90%) no volume de 400  $\mu\text{L}$  cada, método que proporciona maior porcentagem de espermatozoides viáveis e menor tempo necessário para sua realização (RYNKOWSKA *et al.*, 2011). Os espermatozoides foram adicionados sob o *Percoll* para a separação dos viáveis, que após centrifugação de 700 g por 20 minutos a 30°C, permaneceram no fundo. Esse material sedimentado foi então ressuspenso em meio de capacitação com solução *Tyrodes* com albumina, lactado e

piruvato (TALP), e novamente foi centrifugado a 700 g por 5 minutos a 30°C. Todo esse procedimento se faz necessário porque os espermatozoides necessitam ser selecionados, uma vez que a criopreservação pode ocasionar danos celulares. O pellet formado foi ressuspensionado em meio de fecundação - TALP (FERT-TALP) para a obtenção da dose inseminante, que é calculada para uma concentração final de  $1 \times 10^6$  mL. Os oócitos e os espermatozoides foram então coincubados por 18 horas em estufa (38,8°C), cobertas com óleo mineral, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e atmosfera úmida, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado dia zero (D0).

#### 5.18 Cultivo *in vitro* de embriões bovinos

Posteriormente ao período de coincubação, os possíveis zigotos foram pipetados delicadamente para provocar desnudamento discreto, e transferidos para gotas de 150 µL do meio de cultivo Fluido Sintético de Oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (SOF<sub>aa</sub>) e 0,34 mM de tri-citrato de sódio (Sigma, Aldrich, EUA), 2,77 mM de mio-inositol (Sigma, Sigma, Aldrich, EUA) e 5% de soro fetal bovino. Então, foram cobertos com óleo mineral e incubados a 39°C em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>. O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela taxa de clivagem no dia 2 (D2) e pela produção de blastocistos nos dias 7 e 8 (D7 e D8) (GOTTARDI *et al.*, 2009).

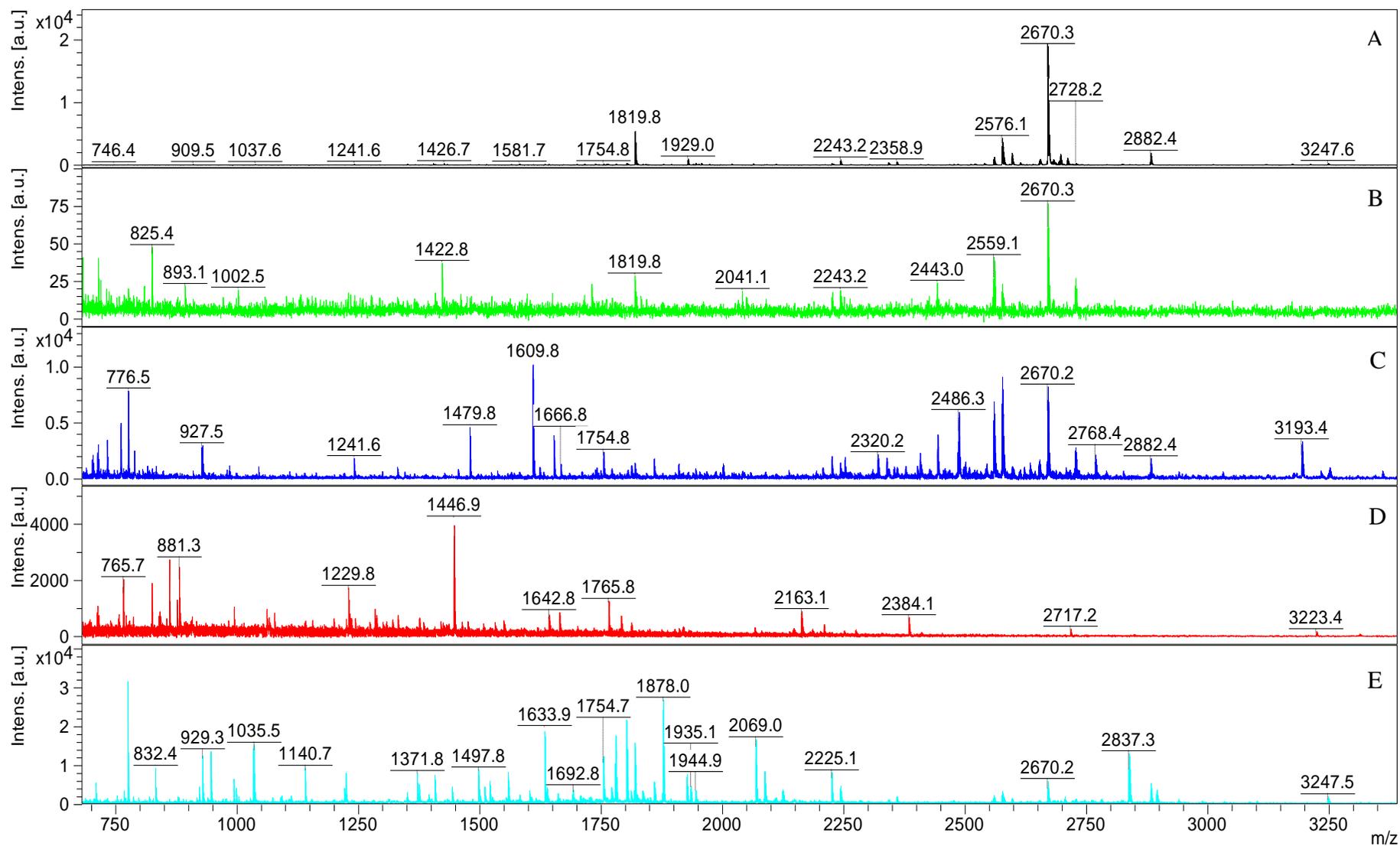
### 5.19 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) utilizando programa OriginPro 8.0 para obtenção de gráficos. A análise da diferença estatística dos complexos *cumulus*-oócitos foi realizada utilizando o programa PAST3 (HAMMER, 2001) por análise de variância (ANOVA) com teste estatístico de Tukey, com um nível de significância fixado em  $P < 0,05$ .

## 6. Resultados e Discussão

### 6.1 Comparação dos componentes moleculares dos produtos comerciais por meio de espectrometria de massa

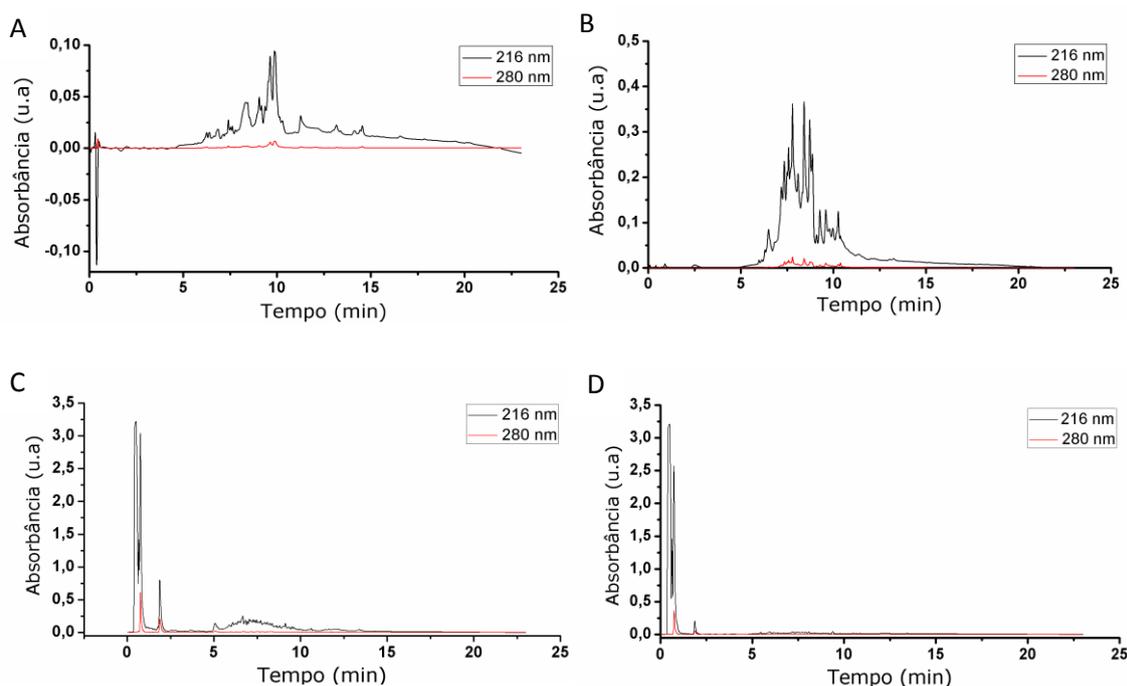
Além dos produtos comerciais com atividade de FSH, o Lutropin também foi analisado com o intuito de averiguar se essa técnica utilizada é capaz de identificar o componente gonadotrópico, quando presente. Na figura 4, pode-se observar o resultado da ionização das moléculas em matriz sólida de CHAC por meio espectrometria de massa MALDI-TOF nos hidrolisados trópticos dos produtos comerciais e no qual foi identificado o componente com massa molecular de  $[M+H]^+ = 2670$  Da nos produtos FSH da Sigma, Folltropin-V, Pluset e Lutropin (oferece atividade de LH e foi usado como controle nesse experimento), porém com menor intensidade nesse último. Diversos outros componentes moleculares foram compartilhados pelos quatro produtos, principalmente pelos três primeiros com a atividade de FSH relatada pelos fabricantes. A perspectiva até o momento é de que seriam íons relacionados ao hormônio glicoproteico FSH, mas isso só poderia ser averiguado por experimentos de MS/MS, realizados posteriormente, e que permitem a identificação molecular. A presença de diferenças moleculares poderia ser esperada devido à drástica diferença de custo e de aplicação desses produtos em diferentes procedimentos seja *in vivo* ou *in vitro*. Quanto ao espectro do rFSH é notável que os íons detectados não são os mesmos compartilhados pelos demais produtos comerciais, demonstrando que o ativo, se algum, presente no rFSH é diferente daquele ou daqueles observados nos demais produtos.



**Figura 4.** Espectros de massa obtidos em espectrômetro de massa MALDI-TOF operado em modo refletido positivo dos produtos comerciais FSH da Sigma (A), Follropin-V (B), Pluset (C), rFSH (D) e Lutropin (E) após hidrólise enzimática completa com tripsina imobilizada.

## 6.2 Fracionamento e identificação dos componentes moleculares presentes nos produtos comerciais contendo FSH da Sigma, Folltropin-V, Pluset e Lutropin

Os hidrolisados trópticos dos produtos comerciais foram fracionados em sistema cromatográfico RP-HPLC FAST (Figura 5) com a finalidade de separação dos componentes moleculares presentes. Foram coletadas 18, 23, 23 e 9 frações do FSH da Sigma, Folltropin-V, Pluset e Lutropin, respectivamente. Cada pico representa a eluição de peptídeos fragmentados, e que ocorre de acordo com as características estruturais. É possível observar que no cromatograma referente ao Folltropin-V (Figura 5B), os fragmentos foram mais numerosos, ou pelo fato da digestão com tripsina ter sido mais efetiva, ou por esse produto apresentar mais lisinas e argininas, aminoácidos alvo da ação da enzima. No cromatograma do FSH da Sigma (Figura 5A), o pico negativo pode ser devido a impurezas (presença de ar) na fase móvel, que mascarou inicialmente, a real concentração da amostra. Entretanto, podemos observar que após esse pico, a eluição ocorreu em conformidade com os demais.



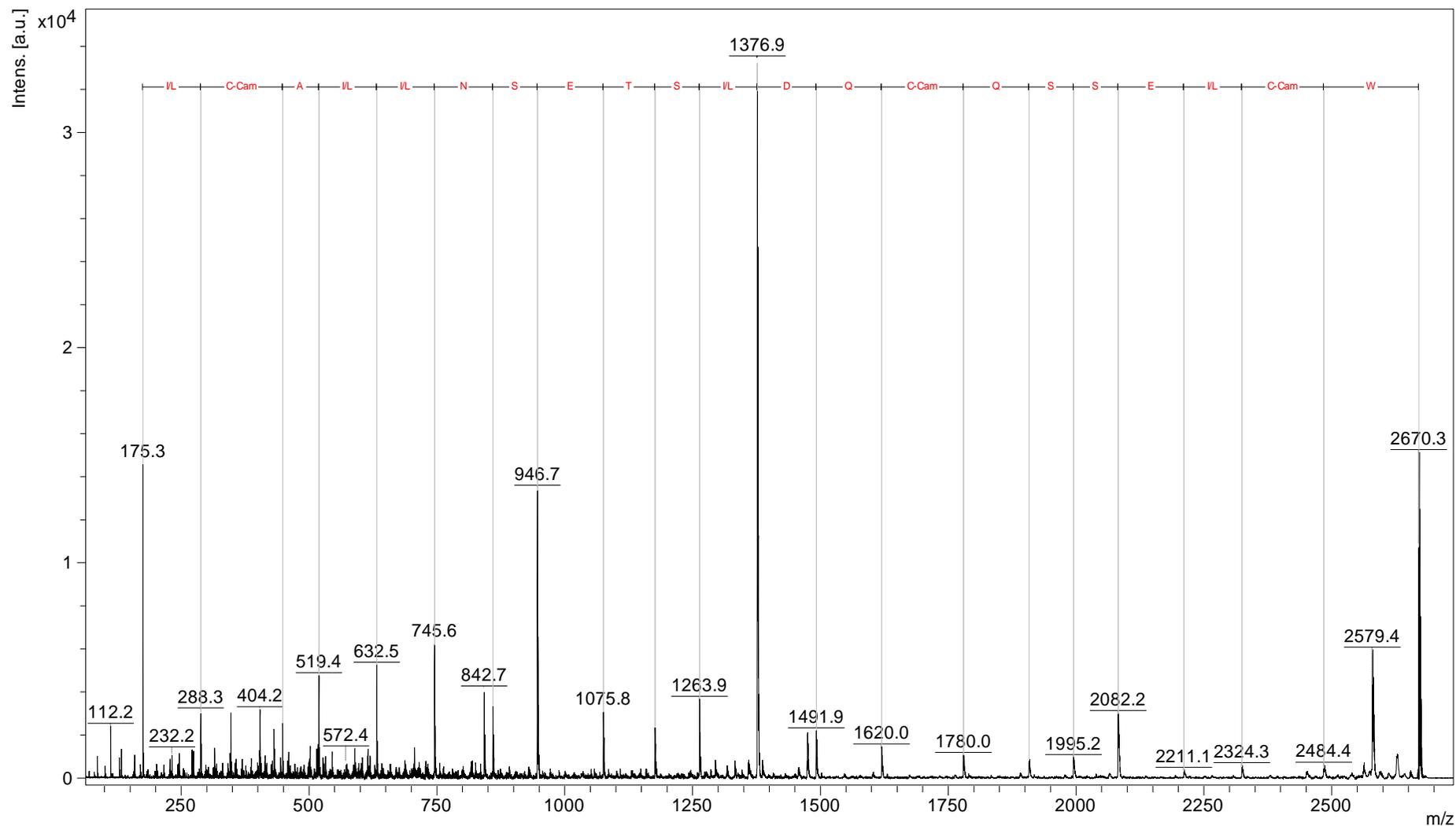
**Figura 5.** Cromatogramas analíticos em fase reversa dos produtos comerciais da marca Sigma (A); Folltropin-V (B); Pluset (C) e Lutropin (D) obtidos por RP-HPLC FAST após a hidrólise com tripsina. O monitoramento foi conduzido nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho) e a coleta das frações realizadas manualmente.

Em seguida, as frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massa MALDI TOF/TOF a fim de elucidar as estruturas primárias de seus componentes por meio de experimentos de MS/MS sob o modo de operação LIFT<sup>TM</sup>.

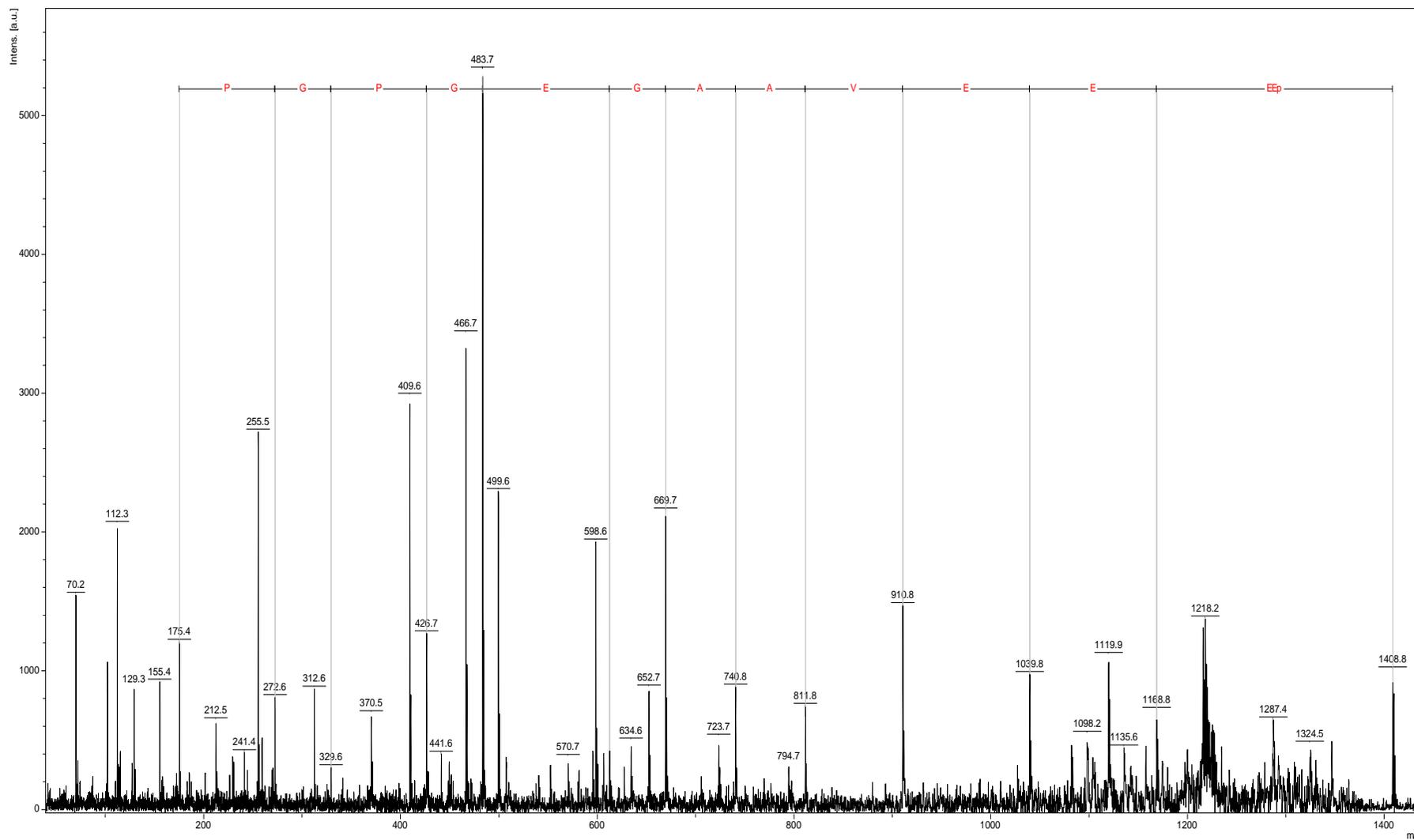
A presença do prohormônio proopiomelanocortina (POMC) foi observada em fragmentos detectados por espectrometria de massa (Figuras 6 e 7), e essa molécula é convertida, por ação enzimática proteolítica, no hormônio ACTH, como também no hormônio estimulador de melanócitos beta ( $\beta$ MSH) e nas lipotropinas (BROWN, 1994; RAFFIN-SANSON *et al.*, 2003). Esse prohormônio, assim como o FSH, também é encontrado na adeno-hipófise, hipotálamo, trato gastrointestinal e na placenta, sendo produzido pela primeira.

A maioria dos hormônios peptídicos, como o caso do ACTH, é sintetizada a partir de um “pré-prohormônio” formados por longas cadeias de aminoácidos

produzidos nos ribossomos de células endócrinas. Enzimas proteolíticas no Golgi clivam esses pré-prohormônios em sítios específicos para converter assim, em cadeias menores de aminoácidos, dando origem ao prohormônio (POMC). Esse por sua vez, é clivado em hormônios ativos por processo enzimático dentro do complexo de Golgi (BROWN, 1994).



**Figura 6.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento da proopiomelanocortina, região “NPP”) a partir do produto comercial Sigma após separação por RP-HPLC FAST (8,73 minutos) e posterior hidrólise triptica. A sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra de resíduos de aminoácidos para a série y, e as massas representadas em preto. Sequência (sentido direita para a esquerda): WCLESSQCQDLSTESNLLACLR.



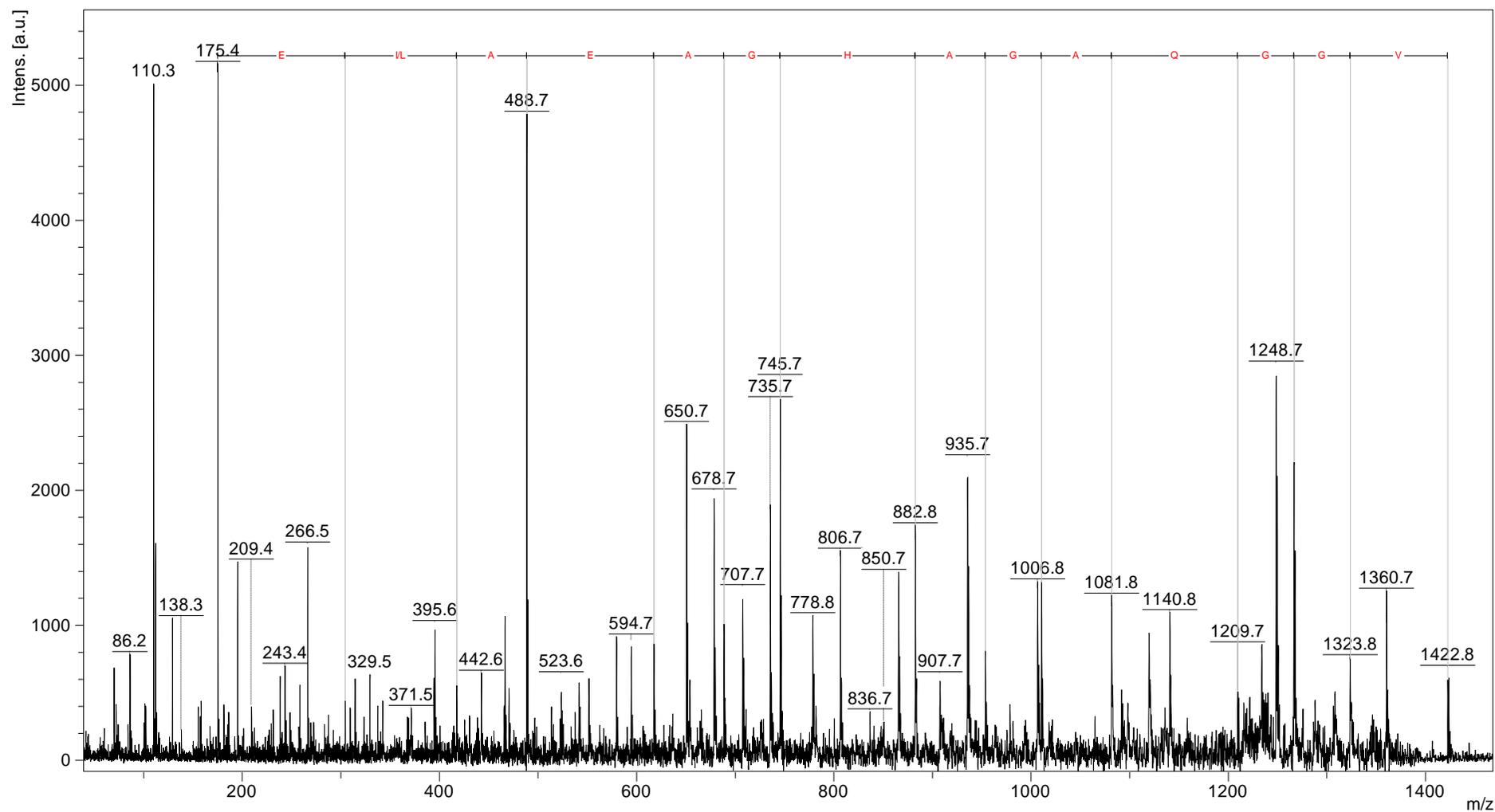
**Figura 7.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento da proopiomelanocortina, região do ACTH) a partir do produto comercial Sigma após separação por RP-HPLC FAST (6,39 minutos) e posterior hidrólise trípica. A sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra de resíduos de aminoácidos para a série y, e as massas representadas em preto. Sequência (sentido direita para a esquerda): pEEEEVAAGEGPGP. (pE = piroglutamil).

Também foram identificados vários outros fragmentos de moléculas como cadeia alfa da hemoglobina (Figura 8), secretogranina (Figura 9), albumina sérica suína (Figura 10) e a cadeia alfa de hormônio gonadotrófico da pituitária (Figura 11), sendo importante ressaltar que essa subunidade é comum a todos os hormônios glicoproteicos e apresenta como papel fundamental o de conferir ação biológica por meio de transdução de sinal (HSIEH *et al.*, 2001). As presenças de hemoglobina e albumina sérica ocorrem em função de sangue circulante na hipófise no momento em que a glândula é retirada dos animais no instante da coleta. Um passo de perfusão da glândula com algum tampão antes da sua homogeneização poderia facilmente remover ou pelo menos minimizar a presença dessas duas proteínas nos produtos comerciais.

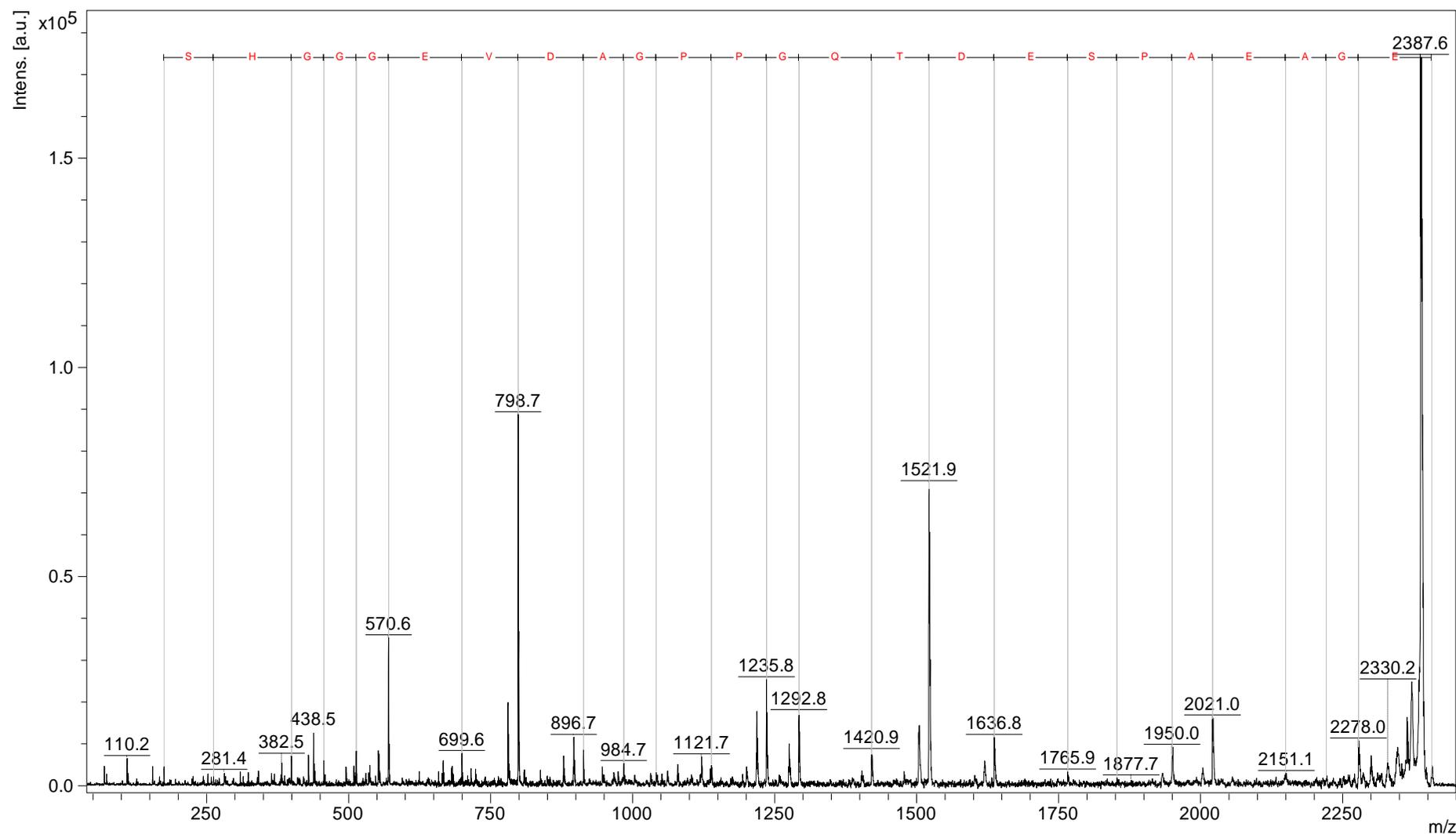
A secretogranina I, também conhecida como cromogranina A, é uma glicoproteína ácida com massa molecular de 49 kDa, sendo amplamente expressa em grânulos nucleares de células neuroendócrinas (GIOVANELLA, 2005; CAMPANA *et al.*, 2007). A presença da secretogranina, assim como eventualmente outros hormônios que podem sequer estar presentes na adeno-hipófise, mas sim na neuro-hipófise, pode ser relacionada com a falta de uma dissecação das partes da glândula antes da homogeneização da mesma visando à obtenção dos concentrados.

A não detecção do FSH, ainda que a atividade de FSH seja reportada nos produtos, pode estar relacionada com a baixa concentração do mesmo na glândula ou com limitações relacionadas com a estratégia de detecção analítica utilizada, visto que os carboidratos presente no FSH, que exibem mono a múltiplas estruturas ramificadas, podem interferir no processo de hidrólise enzimática (RAFFERTY *et al.*, 1995). Por outro lado, considerando que no produto com atividade de LH (Lutropin) foi possível a detecção da subunidade alfa desse hormônio, sugere que a metodologia foi apropriada e que de fato por outros motivos a detecção do FSH não foi possível. Uma possibilidade

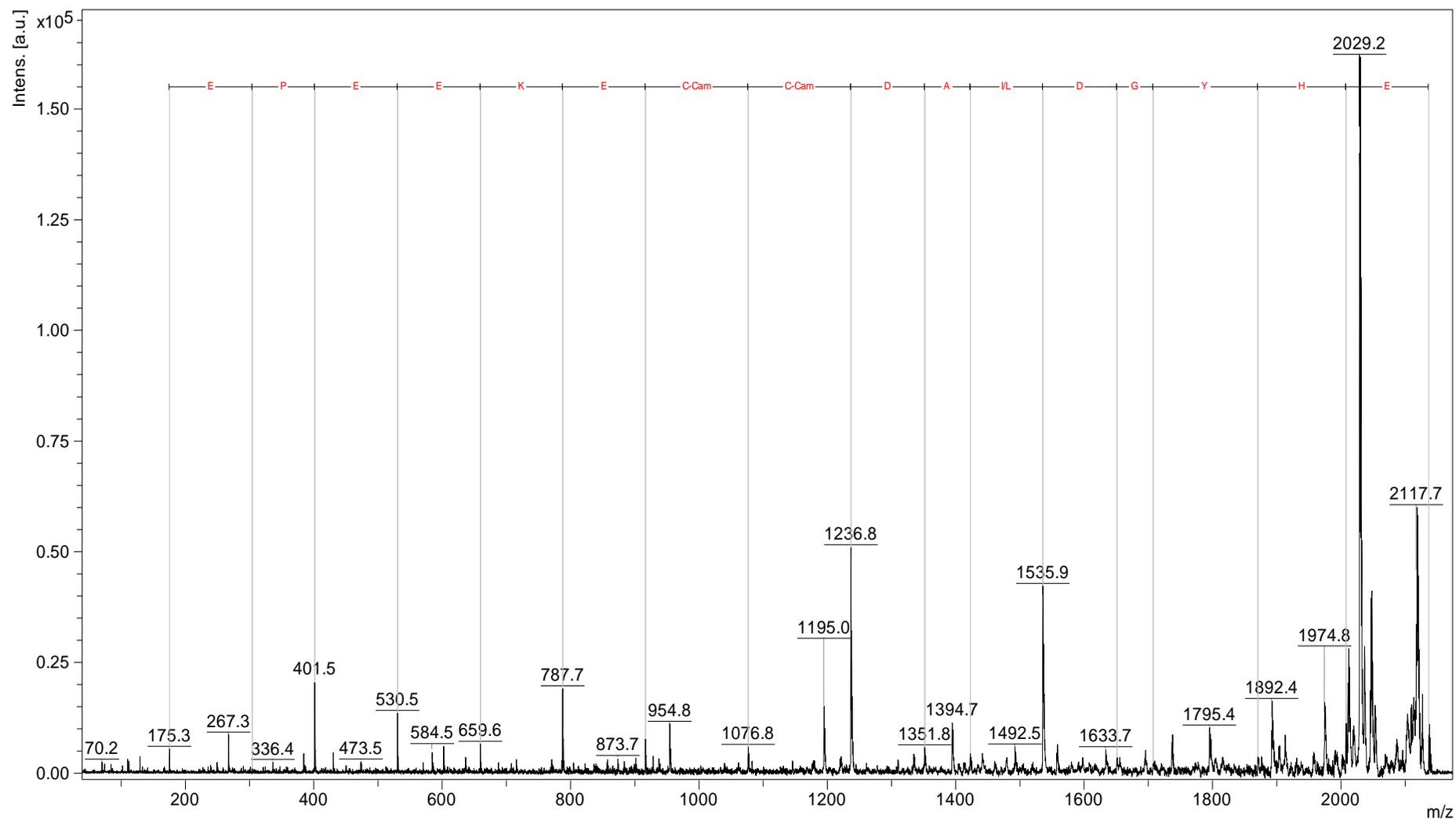
pode ser relacionada com características fisiológicas dos animais utilizados para obtenção desses produtos. Não obtivemos detalhes de quais animais são utilizados, mas uma hipótese é a de que sejam fêmeas imaturas sexualmente, animais velhos ou até mesmo machos com baixos níveis de FSH.



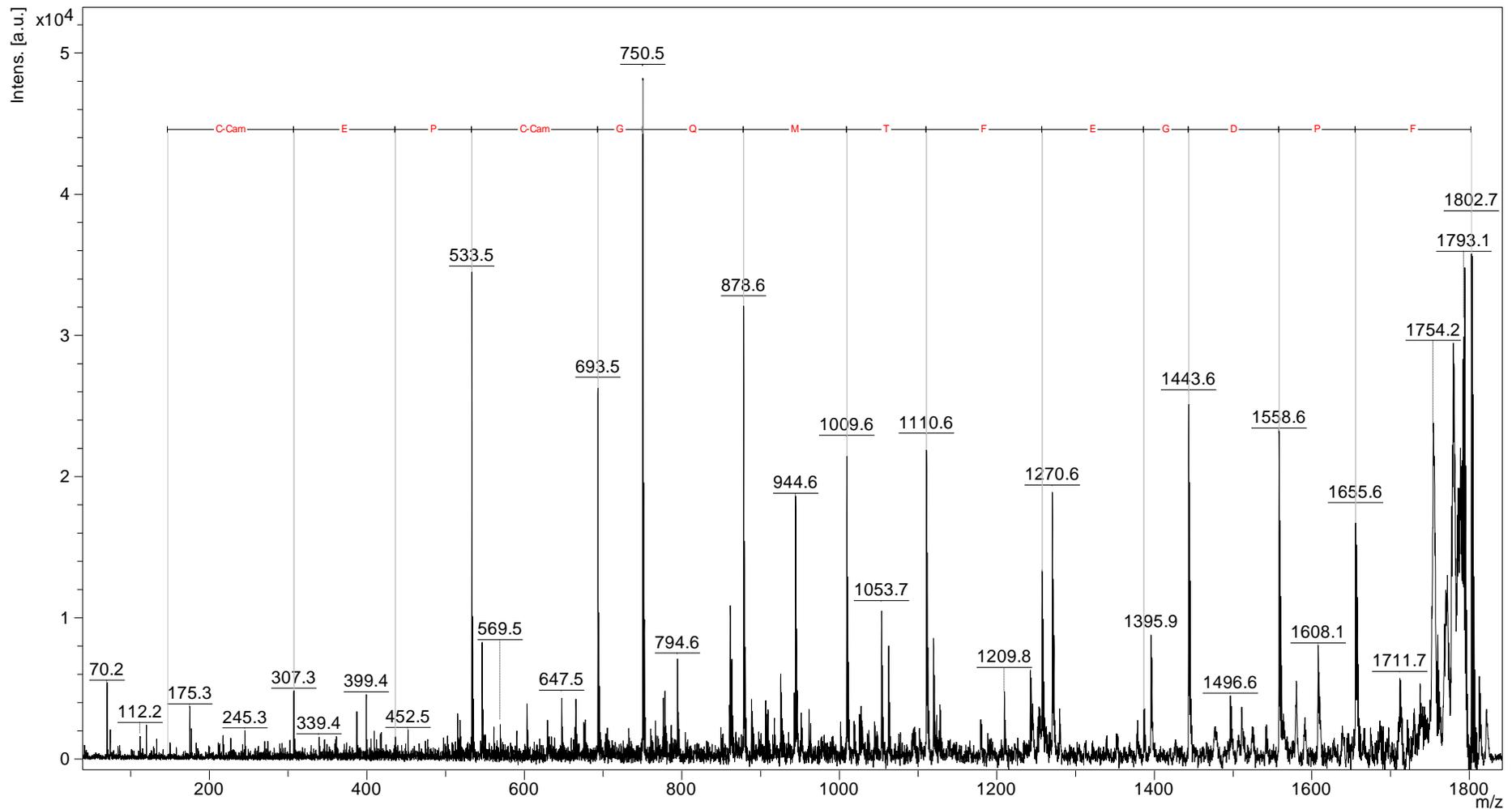
**Figura 8.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (cadeia alfa fragmento da hemoglobina) a partir do produto comercial Folltropin-V após separação por RP-HPLC FAST (7,70 minutos) e posterior hidrólise trípica. A sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra de resíduos de aminoácidos para a série y, e as massas representadas em preto. Sequência (sentido direita para a esquerda): VGGQAGAHGAEALER.



**Figura 9.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento do precursor da secretogranina I) a partir do produto comercial Pluset após separação por RP-HPLC FAST (6,40 minutos) e posterior hidrólise trípica. A sequência esta representada na parte superior do espectro por código de uma letra de resíduos de aminoácidos para a série y, e as massas representadas em preto. Sequência (sentido direita para a esquerda): EGAEAPSEDTQGPPGADVEGGHSR.



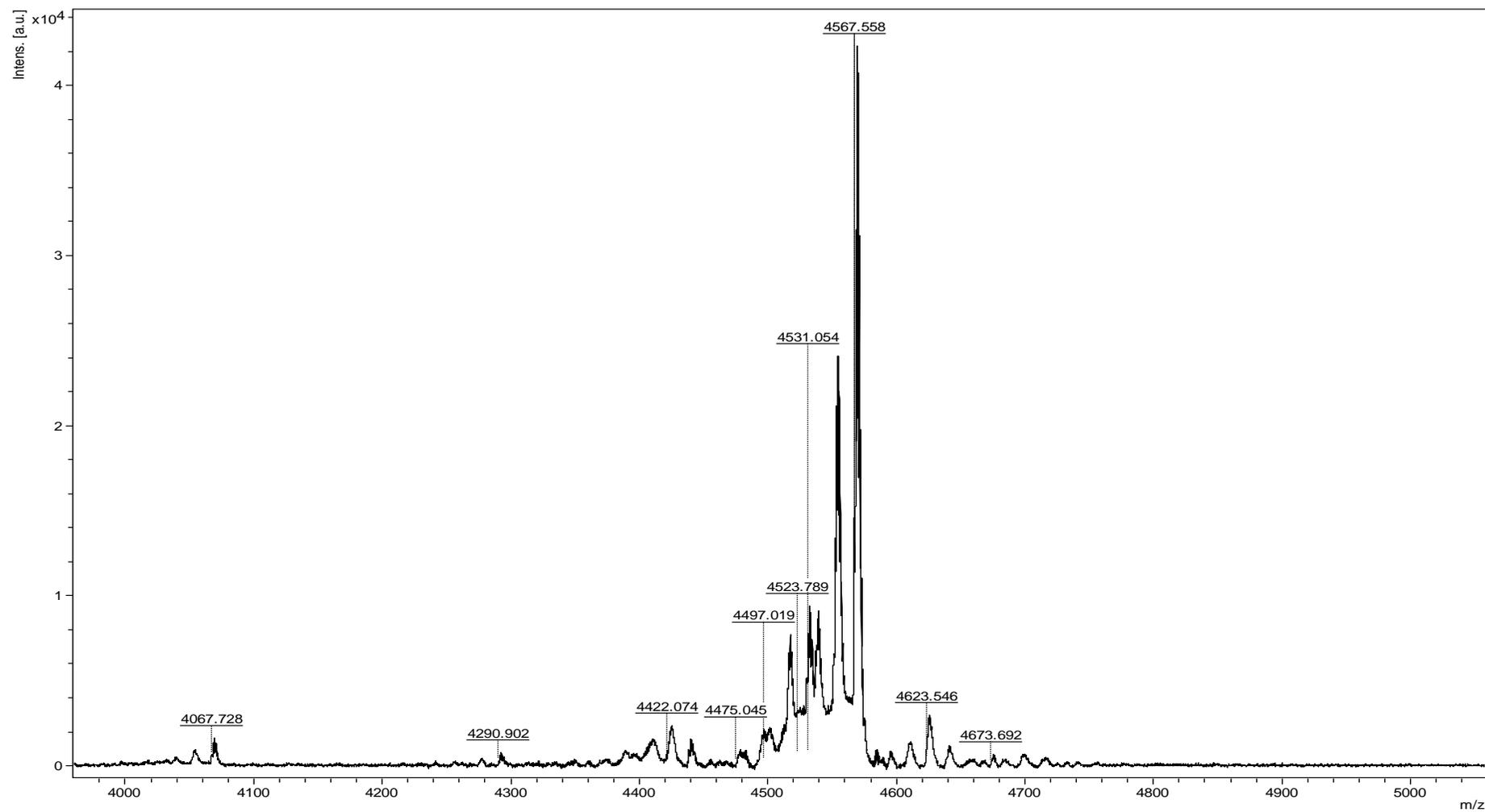
**Figura 10.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento da albumina sérica suína) a partir do produto comercial Pluset após separação por RP-HPLC FAST (6,80 minutos) e posterior hidrólise trípica. A sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra de resíduos de aminoácidos para a série y, e as massas representadas em preto. Sequência (sentido direita para a esquerda): EHYGDLADCCEKEEPER.



**Figura 11.** Espectro de massa MS/MS de um íon correspondente a um peptídeo identificado (fragmento da cadeia alfa da gonadotropina) a partir do produto comercial Lutropin após separação por RP-HPLC FAST (6,17 minutos) e posterior hidrólise triptica. A sequência está representada na parte superior do espectro por código de uma letra de resíduos de aminoácidos para a série y, e as massas representadas em preto. Sequência (sentido direita para a esquerda): FDPGEFTMQGCPECR.

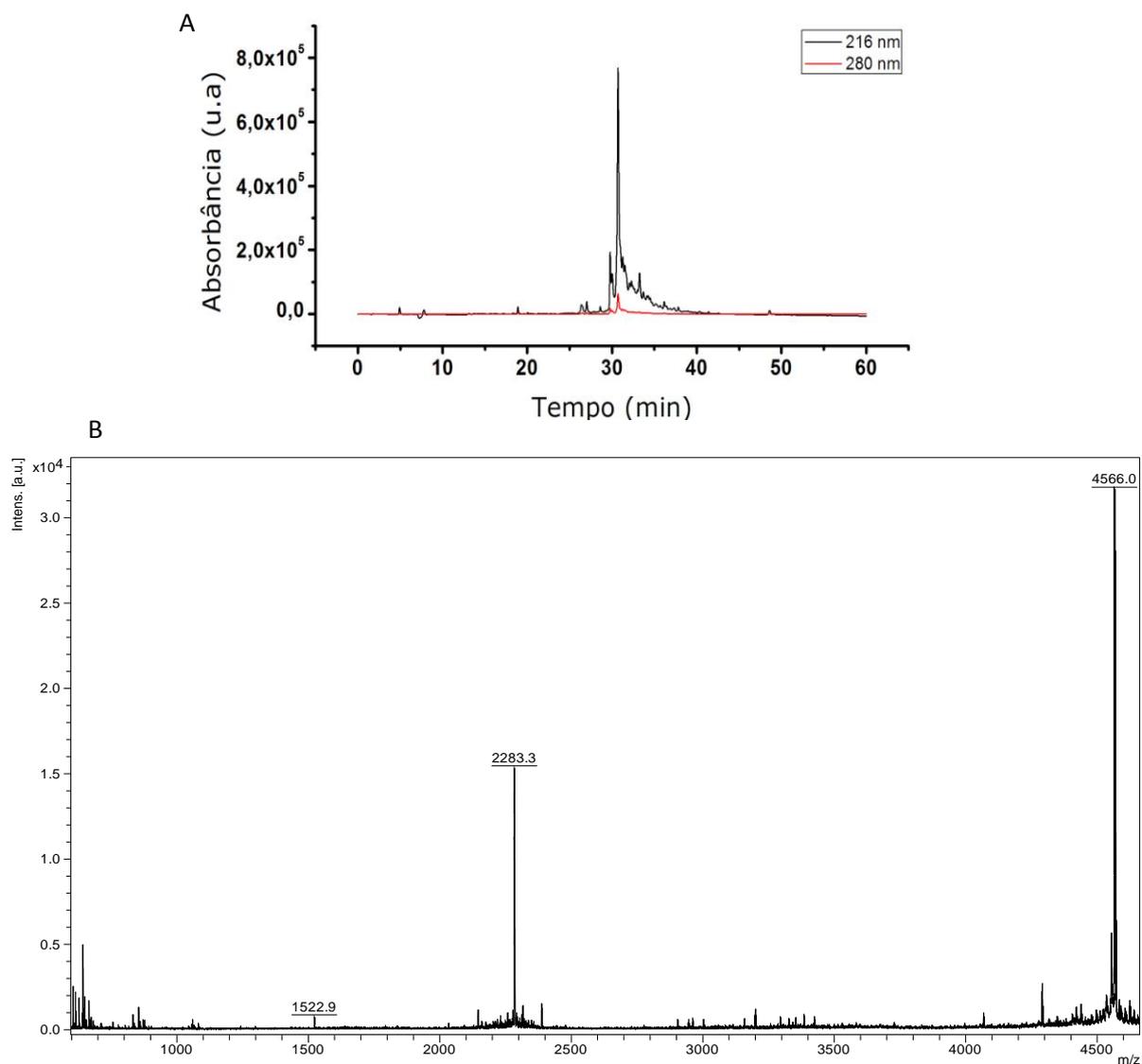
### 6.3 Confirmação da identidade molecular para certificar o sucesso na síntese do ACTH

Como um fragmento da proteína do ACTH foi detectado nas análises de identidade molecular do hormônio, foi sugerida a hipótese de que o ACTH poderia ser um dos hormônios envolvidos nos mecanismos de ação desses produtos. Por esse motivo, ele foi escolhido para a realização de síntese química em fase sólida. O sucesso na realização dessa síntese, assim como a identidade do ACTH sintético foram confirmados mediante análise da massa molecular por espectrometria de massa MALDI-TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Alemanha) como mostra a figura 12, evidenciando que o método de síntese de peptídeos empregado no presente trabalho é eficaz.



**Figura 12.** Espectro de massa apresentando o íon correspondente à massa molecular  $[M+H]^+$  do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), obtido por síntese em fase sólida.

Após a síntese o produto foi submetido ao processo de purificação em RP-HPLC FAST (Figura 13A), sendo que a fração correspondente ao peptídeo ACTH eluiu em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa em 30,7 minutos, o que correspondeu a um percentual de acetonitrila de 47%. E novamente foi realizada espectrometria de massa MALDI-TOF (Figura 13B) para confirmação da purificação do hormônio sintético.



**Figura 13.** A) Cromatograma analítico em fase reversa do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) obtido por RP-HPLC após a síntese manual em fase sólida. Monitoramento conduzido nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho). B) Espectro de massa apresentando o íon correspondente à massa molecular  $[M+H]^+$  do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), obtido por síntese em fase sólida, após purificação por RP-HPLC.

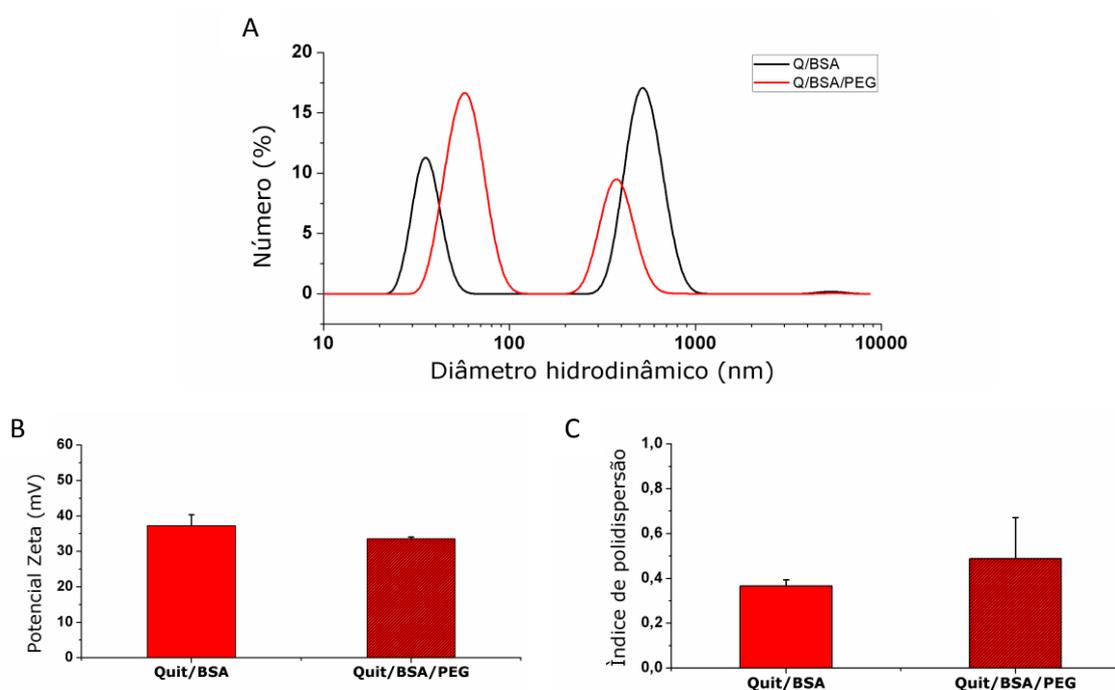
SIVANANDIAIAH e colaboradores (1989) utilizaram a técnica de Fmoc, mesma utilizada no presente trabalho, para síntese de análogos do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), composto por 10 resíduos de aminoácidos. LIN e colaboradores (2013) sintetizaram com sucesso relaxina canina utilizando essa mesma técnica. Segundo dados da literatura, a técnica de Fmoc utilizada para síntese de hormônio peptídico é amplamente utilizada, e com sucesso, porém com quantidade de resíduos de aminoácidos bem menores do que os 39 do ACTH.

O ACTH produzido endogeneamente no mesmo local que o FSH (adeno-hipófise), apresenta importância ímpar na regulação de glicocorticóides adrenais, o qual apresenta atividade antiinflamatória e de imunossupressão, e na síntese de androgênios. A ação indireta do ACTH na reprodução, liberado pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH) em resposta ao estresse, implica em estimular a secreção de cortisol que modifica o comportamento sexual, podendo causar infertilidade mediante supressão do pico de LH. Porém sua atribuição na regulação direta da função ovariana ainda é pobremente compreendida. Este hormônio tem como receptor particular o melanocortina tipo 2 (MC2R), ligado a proteína G, com sete domínios transmembrânicos, sendo detectado na glândula suprarrenal, como também nos ovários, testículos e diversos outros órgãos, incluindo pulmão, cérebro e medula espinhal em embriões de camundongo com padrões de expressão específicos temporais (CAREY, 2005; GUELFY, 2011; SCRIPES, 2009; SLAWIK, 2004).

#### 6.4 Caracterização de nanopartículas de quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG

Não foi possível realizar a medição por meio de DLS de todas as seis condições, citadas anteriormente no item 4.8.1, pois a sensibilidade da faixa de leitura do equipamento não foi compatível com o tamanho micrométrico das estruturas presentes,

deste modo somente NPs de quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG brancas foram analisadas. Ambas as NPs tiveram distribuição bimodal e o diâmetro maior apresentou apenas uma pequena variação na proporção entre as populações, sendo que as sem PEG ficou em torno de 500 nm, e as com PEG entre 500 nm e 600 nm, avaliado pela medida de número das NPs presentes na suspensão (Figura 14A). O potencial Zeta de superfície das partículas foi um pouco maior nas NPs sem PEG ( $37,3 \pm 3,1$  mV) quando comparado com as que apresentavam PEG ( $33,6 \pm 0,5$  mV) (Figura 14B); e as duas apresentaram sinais positivos, com moderada estabilidade, segundo ASTM (1985). A carga de superfície das nanopartículas é considerada muito importante no que diz respeito à entrega de fármacos, pois, ao variar a interação eletrostática pode-se obter uma adsorção de proteínas de forma seletiva, sendo que as NPs com carga de superfície positiva apresentam mais adsorção quando comparadas com as que apresentam carga negativa (HONARY et al., 2013). Quanto à polidispersividade, o PdI foi menor na ausência de PEG, como pode ser observado na figura 14C. O ligeiro aumento no diâmetro das NPs com PEG pode ser explicado pelo fato de que ocorreu revestimento com esse polímero, porém não tão efetivo, uma vez que o PdI foi maior nas NPs com PEG.



**Figura 14.** Características físicoquímicas das nanopartículas de quitosana/BSA e quitosana/BSA/PEG. A) Histograma de diâmetro hidrodinâmico em função do número medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS); B) Potencial Zeta; C) Índice de polidispersão. Quit/BSA = NPs de quitosana contendo BSA. Quit/BSA/PEG = NPs de quitosana contendo BSA e PEG, como revestimento.

No trabalho de GAN e colaboradores (2007), com base no método da incorporação, a BSA (1 mg/mL) foi pré-misturada à solução de quitosana (2,5 mg/mL), e o pH ajustado para 5,5 e mantido a temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente, com a adição de TPF, sob agitação magnética por 60 minutos à mesma temperatura citada acima, as nanoestruturas foram formadas espontaneamente, com diâmetro médio de 344,5 nm, e potencial Zeta médio de + 48,3 mV. Esse método de incorporação foi o buscado para a formulação das NPs do presente trabalho, porém o pH foi ajustado para 7, e a temperatura mantida a  $25^\circ\text{C}$ , e ainda a concentração de BSA foi 10 vezes maior. Quando GAN e colaboradores utilizaram o método de incubação, as NPs de quitosana (2,5 mg/mL) foram primariamente formadas via coacervação com TPF, e posteriormente com BSA (1 mg/mL) foi adicionada a solução, e obtiveram NPs com diâmetro médio de 623,7 nm, e potencial Zeta médio de + 46,3 mV (GAN *et al.*, 2007).

Esse trabalho reflete a capacidade da BSA tanto como parte integrante da matriz polimérica como potencial proteína de revestimento, no método de incubação.

QI e colaboradores (2010), produziram NPs de quitosana e BSA, conjugando dextrano (62 kDa) à BSA (0,5 mg/mL), com base na reação de Maillard. Eles obtiveram NPs de  $131 \pm 11$  nm de diâmetro hidrodinâmico e PdI de  $0,12 \pm 0,05$ , quando utilizaram quitosana de 50 kDa e grau de desacetilação de 95,5%, e  $144 \pm 12$  nm e PdI de  $0,25 \pm 0,05$ , quando quitosana de 80 – 190 kDa e grau de desacetilação de 85%. Já em 2012, pesquisadores utilizaram o mesmo procedimento de preparação de nanoestruturas do presente estudo, porém sem a utilização de PEG e substituindo a BSA pela heparina. Eles obtiveram NPs entre 200 e 1000 nm, avaliadas pelas medidas de intensidade, e potencial Zeta ligeiramente positivo que, quando observado pelo gráfico, parece bem próximo do zero (JOHN *et al.*, 2012).

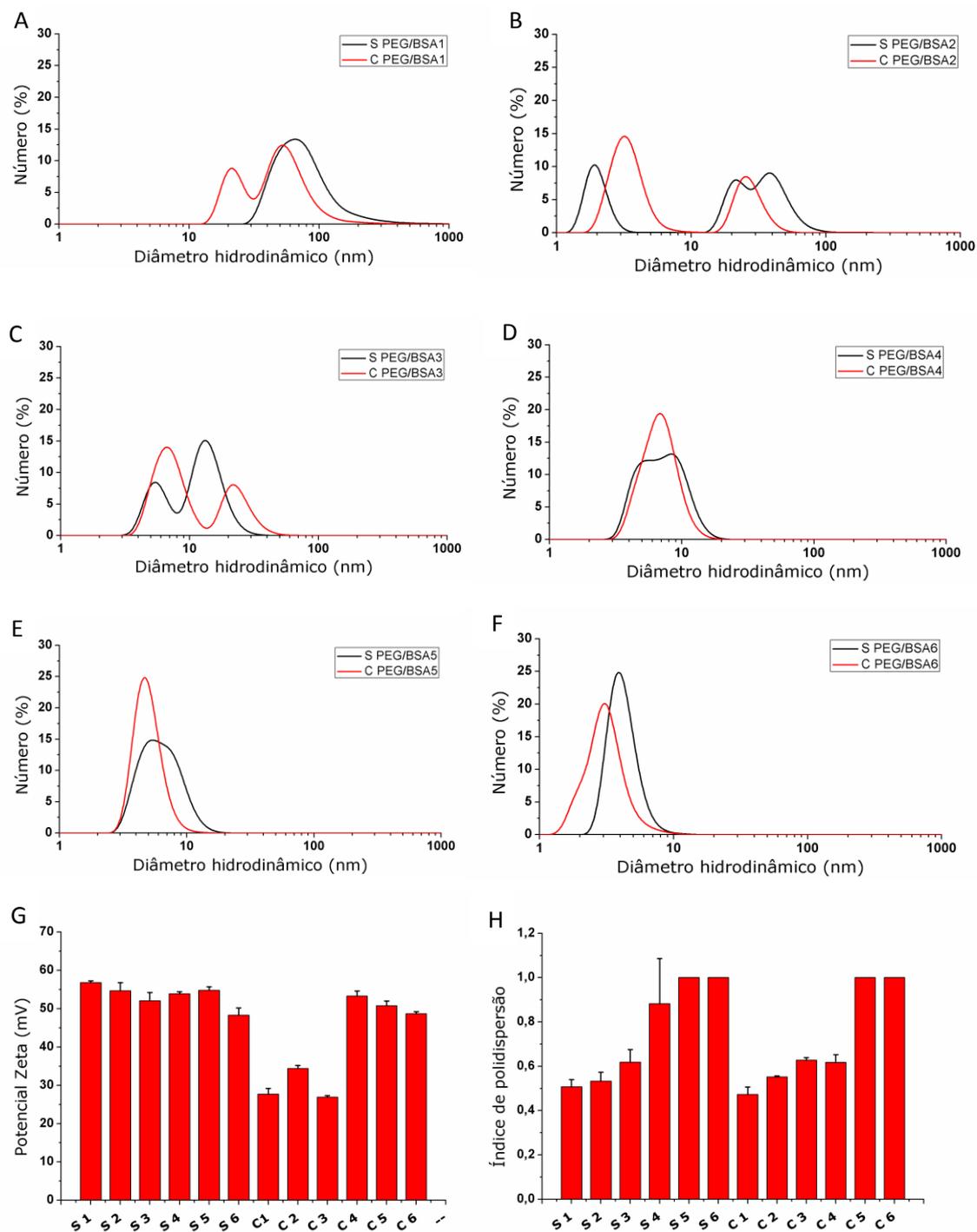
Observa-se que, no presente estudo, as NPs apresentaram diâmetro hidrodinâmico maior, na segunda população, visto que apresentaram distribuição bimodal, quando comparado com os dados da literatura. Esse fato pode ser explicado pela utilização de uma maior concentração de BSA (10,33 mg/mL), o que pode ter provocado uma aglomeração dessa albumina às moléculas de quitosana, aumentando assim o diâmetro das NPs, mesmo àquelas sem PEG. O potencial Zeta positivo ocorre devido à carga de superfície do grupo amino da quitosana e da BSA uma vez que a carga dessa albumina é dependente do pH do meio, sendo que quando menor o pH, a tendência é apresentar carga positiva. Esse excesso de cargas positivas pode prejudicar a atração eletrostática, fato que pode ter dificultado o revestimento com PEG, visto que o diâmetro não sofreu grandes modificações quando em sua presença. Polímeros hidrofílicos, como o PEG, permitem a redução da adesão de opsoninas à superfície das nanoestruturas, resultando em diminuição da adsorção de NPs por macrófagos do

sistema reticulo-endotelial e prolongado, assim, tempo de circulação sanguínea. E sua presença tende a aproximar o potencial Zeta ao ponto de 0 mV, como pode ser observado na figura 12B, onde o potencial Zeta diminui na presença do PEG (XIAO et al., 2011; BRUXEL, *et al.*, 2012).

#### 6.5 Caracterização de nanopartículas brancas de quitosana revestidas com BSA e PEG/BSA

Com a finalidade de selecionar as melhores condições, no que diz respeito à formação e tamanho das NPs revestidas com BSA e com PEG/BSA, bem como a sua estabilidade, diferentes formulações, apresentadas no item 4.8.2, foram desenvolvidas e caracterizadas por DLS e MFA.

O diâmetro hidrodinâmico em função do número variou foi em todas as condições testadas (Figura 15). Permanecendo um pouco acima de 100 nm apenas na condição em que não se utilizou BSA. Nas condições em que a concentração de BSA foi de 0,16 e 0,32 mg/mL, o diâmetro ficou abaixo de 10 nm, tanto na presença quanto na ausência de PEG. Esses resultados evidenciam que nas concentrações maiores de BSA não houve formação de nanoestrutura, apenas a presença desses elementos em sua forma livre. Os potenciais Zeta das NPs com PEG (C/PEG) e com as concentrações de 0 (zero), 0,02 e 0,04 mg/mL de BSA foram abaixo de 40 mV (C/PEG BSA2) e abaixo de 30 mV (C/PEG BSA 1 e 3). O PdI das condições de concentração de BSA de 0,16 e 0,32 mg/mL foram iguais a 1 devido à abundância de proteína não ligada na suspensão a qual aumenta a heterogeneidade do sistema.

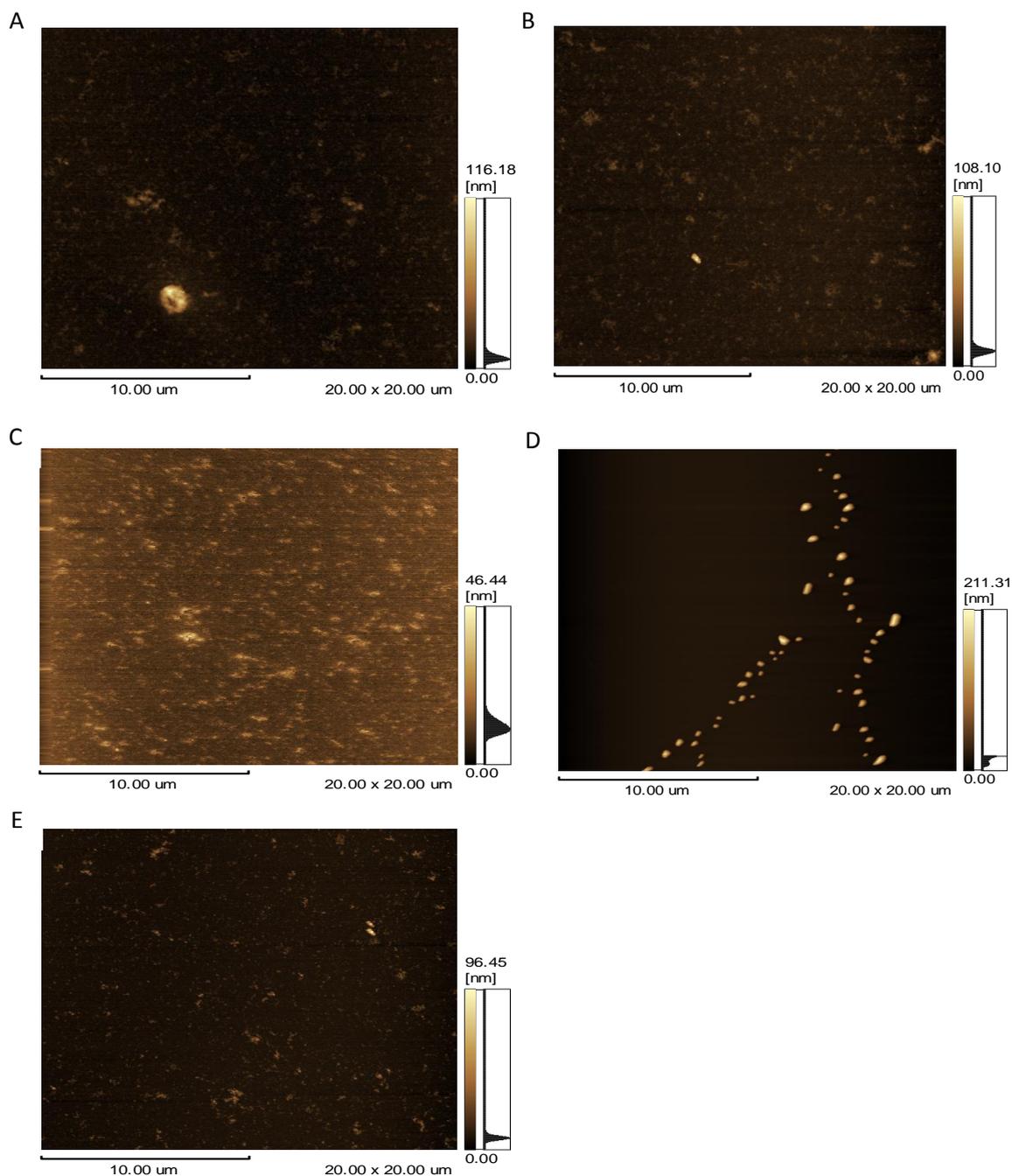


**Figura 15.** Características físico-químicas das nanopartículas brancas de quitosana revestidas com BSA e PEG/BSA. (A-F) Histogramas de diâmetros hidrodinâmicos em função do número medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS); (G) Potencial Zeta; (H) Índice de polidispersão. S/PEG = sem PEG; C/PEG = com PEG; BSA 1 = 0 mg/mL; BSA 2 = 0,02 mg/mL; BSA 3 = 0,04 mg/mL; BSA 4 = 0,08 mg/mL; BSA 5 = 0,16 mg/mL; BSA 6 = 0,32 mg/mL; S1 = S/PEG/BSA1; S2 = S/PEG/BSA2; S3 = S/PEG/BSA3; S4 = S/PEG/BSA4; S5 = S/PEG/BSA5; S6 = S/PEG/BSA6; C1 = C/PEG/BSA1; C2 = C/PEG/BSA2; C3 = C/PEG/BSA3; C4 = C/PEG/BSA4; C5 = C/PEG/BSA5; C6 = C/PEG/BSA6.

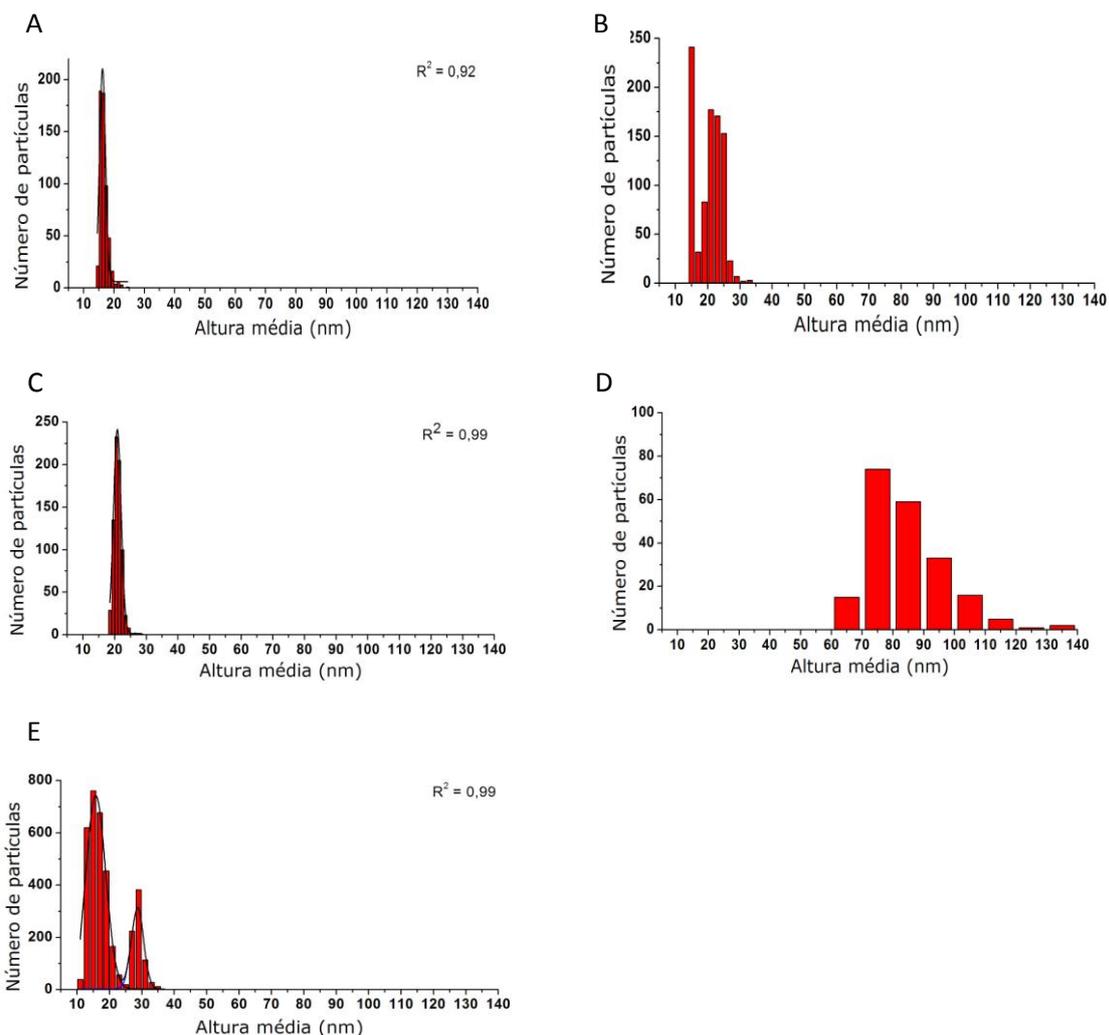
Para análise por MFA (Figura 16) foram selecionadas a condição controle, que não continha PEG nem BSA (S/PEG BSA1), e também a condição com PEG, porém sem BSA (C/PEG BSA1). As condições de concentração de 0,02 mg/mL e de 0,16 mg/mL também foram analisadas. A primeira para avaliação em menor concentração de BSA e, a segunda por apresentar uma maior concentração de BSA e potencial Zeta mais apropriado, quando comparado com condição 6 (0,32 mg/mL de BSA). Na amostra C/PEG BSA5 não foi possível realizar a varredura, pois o material contaminava muito a ponteira e as imagens obtidas tinham resolução precária. Isso se deu provavelmente à dissolução das nanoestruturas formadas ou mesmo pela presença em excesso dos constituintes em sua forma livre (não estruturados). Já a amostra C/PEG BSA1, ou seja, NPs de quitosana com PEG, porém sem BSA, teve resolução alta, em que é possível visualizar NPs de formato aproximadamente esférico e com maior altura média (Figura 17). E com base nos histogramas de distribuição de classes de altura média, pode-se aferir que as NPs sem S/PEG BSA 1 e 5 e a C/PEG BSA 2, apresentaram distribuição normal, com  $R^2$  acima de 0,90, sendo que essa última ainda apresentou duas curvas. As demais, quando foi aplicado o ajuste para distribuição normal, mostraram valores de  $R^2$  abaixo de 0,90.

A altura média, medidas por MFA, das NPs sem PEG e sem BSA foi de 20 nm enquanto que, por DLS ficou acima de 50 nm. As NPs sem PEG com 0,02 mg/mL de BSA apresentaram altura média de 25 nm, e diâmetro hidrodinâmico com distribuição bimodal, com uma classe atingindo 50 nm. O fato das alturas médias apresentarem menor valor em relação ao diâmetro pode ser explicado pelos diferentes estados da amostra durante a leitura nos dois equipamentos. Ou seja, quando no estado seco (MFA) a altura média apresenta-se menor e, quando em suspensão (DLS) o diâmetro médio é maior devido à capacidade de intumescimento da matriz polimérica. Porém quando

observamos as NPs sem PEG e com 0,16 mg/mL de BSA a altura média (20 nm) é maior que o diâmetro médio (10 nm). Nesse caso, podemos explicar pelo fato da não formação de nanoestruturas, onde as moléculas livres apresentaram uma pequena aglomeração quando em solução nas leituras por DLS.



**Figura 16.** Imagens topográficas adquiridas por microscopia de força atômica operada em modo dinâmico de nanopartículas brancas de quitosana revestidas com BSA e PEG/BSA. A) NP s de quitosana sem PEG e sem BSA (S/PEG BSA 1); B) NPs de quitosana sem PEG e com 0,02 mg/mL de BSA (S/PEG BSA 2); C) NPs de quitosana sem PEG e com 0,16 mg/mL de BSA (S/PEG BSA 5); D) NPs de quitosana com PEG e sem BSA (C/PEG BSA 1); E) NPs de quitosana com PEG e com 0,02 mg/mL de BSA (C/PEG BSA 2).



**Figura 17.** Histogramas de distribuição de classes de altura média das nanopartículas brancas de quitosana revestidas com BSA e PEG/BSA. A) NPs de quitosana sem PEG e sem BSA (S/PEG BSA 1); B) NPs de quitosana sem PEG e com 0,02 mg/mL de BSA (S/PEG BSA 2); C) NPs de quitosana sem PEG e com 0,16 mg/mL de BSA (S/PEG BSA 5); D) NPs de quitosana com PEG e sem BSA (C/PEG BSA 1); E) NPs de quitosana com PEG e com 0,02 mg/mL de BSA (C/PEG BSA 2).

Para a formulação dessas NPs procurou-se diminuir a concentração de BSA que variou de 0 a 0,32 mg/mL, em busca de uma menor concentração possível de BSA capaz de formar nanoestruturas, e a partir dos dados obtidos conclui-se que as NPs sem BSA foram únicas que apresentaram diâmetro próximos a 100 nm e potencial Zeta que confere estabilidade coloidal boa, segundo ASTM (1985).

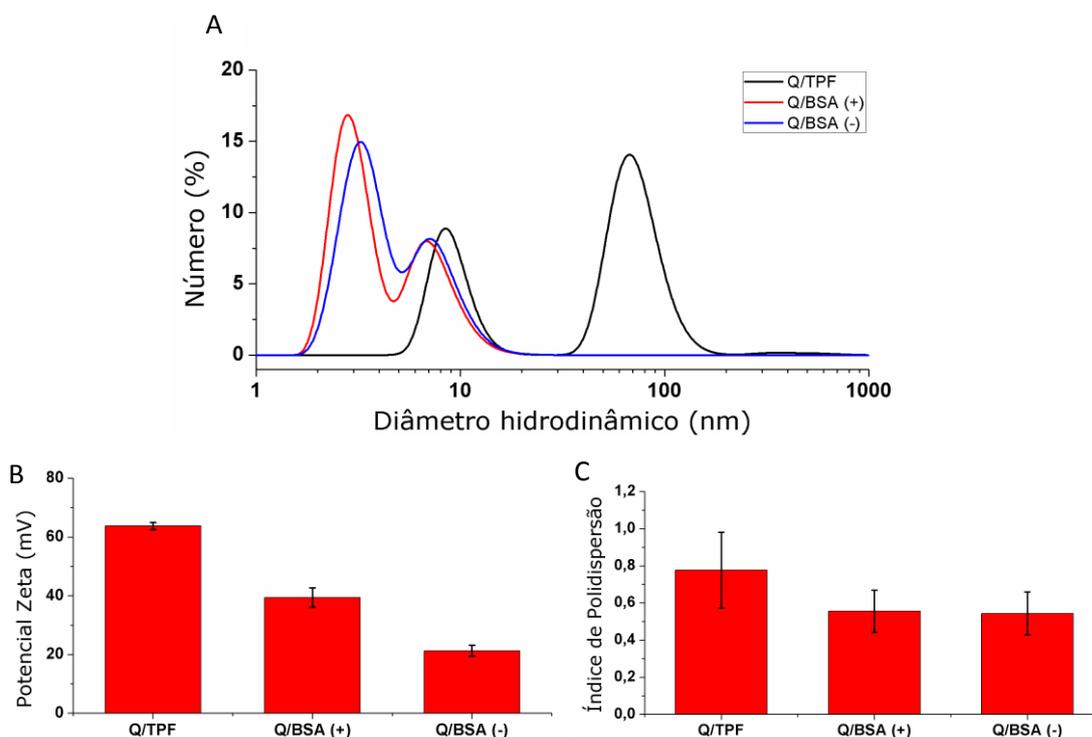
A insistência de formulações com BSA sem a utilização de solventes, que são muito tóxicos e os processos para sua retirada são trabalhosos, foi devido à presença de

receptores dessa molécula em ovários bovinos, logo facilitaria tanto os ensaios *in vitro*, como poderia, em futura aplicação *in vivo*, evitar ou mesmo anular os efeitos adversos em decorrência da introdução de sistemas nanoparticulados em organismo de bovídeos, pois a BSA já se faz presente na circulação sanguínea desses animais.

#### 6.6 Caracterização de nanopartículas de quitosana/BSA com duas diferentes concentrações de BSA

Pelo fato das concentrações de BSA utilizadas anteriormente não terem apresentado resultados atraentes quanto ao seu potencial como revestimento, outras duas concentrações foram testadas, de aproximadamente 10 vezes e 20 vezes maior que 0,02 mg/mL.

É possível dizer que as formulações com as duas diferentes concentrações de BSA (Figura 18) não obteve sucesso quanto à formação de NPs, pois o diâmetro hidrodinâmico máximo desses dois grupos ficou abaixo de 10 nm, enquanto que no grupo controle (quitosana com TPF) apresentou diâmetro médio de 90 nm. Adicionalmente, a NP com BSA de menor concentração apresentou estabilidade instável ( $21,3 \pm 1,84$  mV). O reduzido diâmetro das estruturas com as duas diferentes concentrações de BSA sugere que a atração eletrostática não ocorreu de forma satisfatória o suficiente para a formação das nanoestruturas, permanecendo essa proteína em sua forma livre. Esse fato reforça a importância do poliânion TPF durante as formulações de NPs, onde a sua carga superficial negativa, já conhecida, interage com a carga positiva dos grupos amino da quitosana e promovendo, assim, rápida capacidade de geleificação.



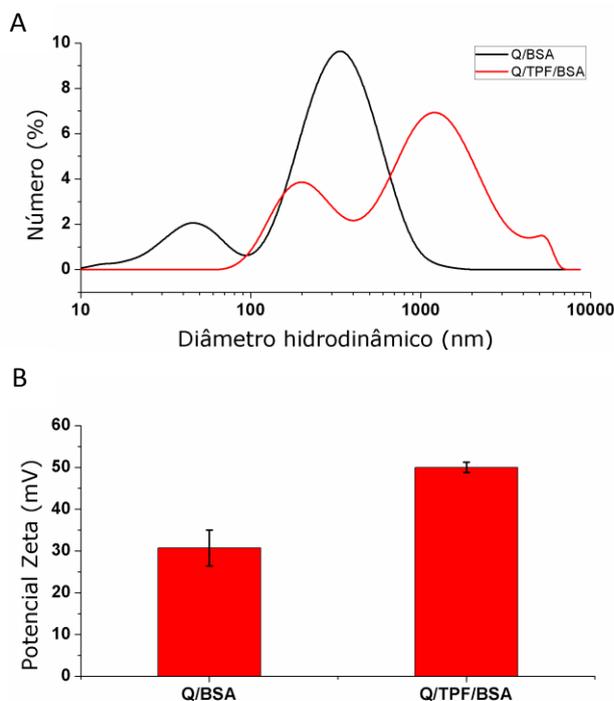
**Figura 18.** Características físico-químicas das nanopartículas de quitosana/BSA com duas diferentes concentrações de BSA. A) Histograma de diâmetros hidrodinâmicos em função do número medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS); Potencial Zeta (B); Índice de polidispersão (C). Q/TPF = NPs produzidas sem BSA; Q/BSA (+) = NPs com 0,41 mg/mL de BSA; Q/BSA (-) = NPs com 0,21 mg/mL BSA.

### 6.7 Caracterização de nanopartículas de quitosana/BSA na ausência ou na presença de TPF

A busca por outras formas de formulações utilizando a BSA, porém agora como parte integrante da matriz polimérica e não apenas como revestimento, resultou na mudança de pH visto que essa proteína pode apresentar carga positiva ou negativa, e a concentração de BSA escolhida foi de 0,41 mg/ml, a maior das concentrações de revestimento testadas.

O diâmetro hidrodinâmico das NPs sem TPF com base no número foi menor quando comparado com as NPs com TPF, como pode ser observado na figura 19. Quanto ao potencial Zeta, ambas NPs apresentaram carga de superfície positiva, porém àquelas que continham TPF apresentaram potencial Zeta de superfície bem maiores, indicando

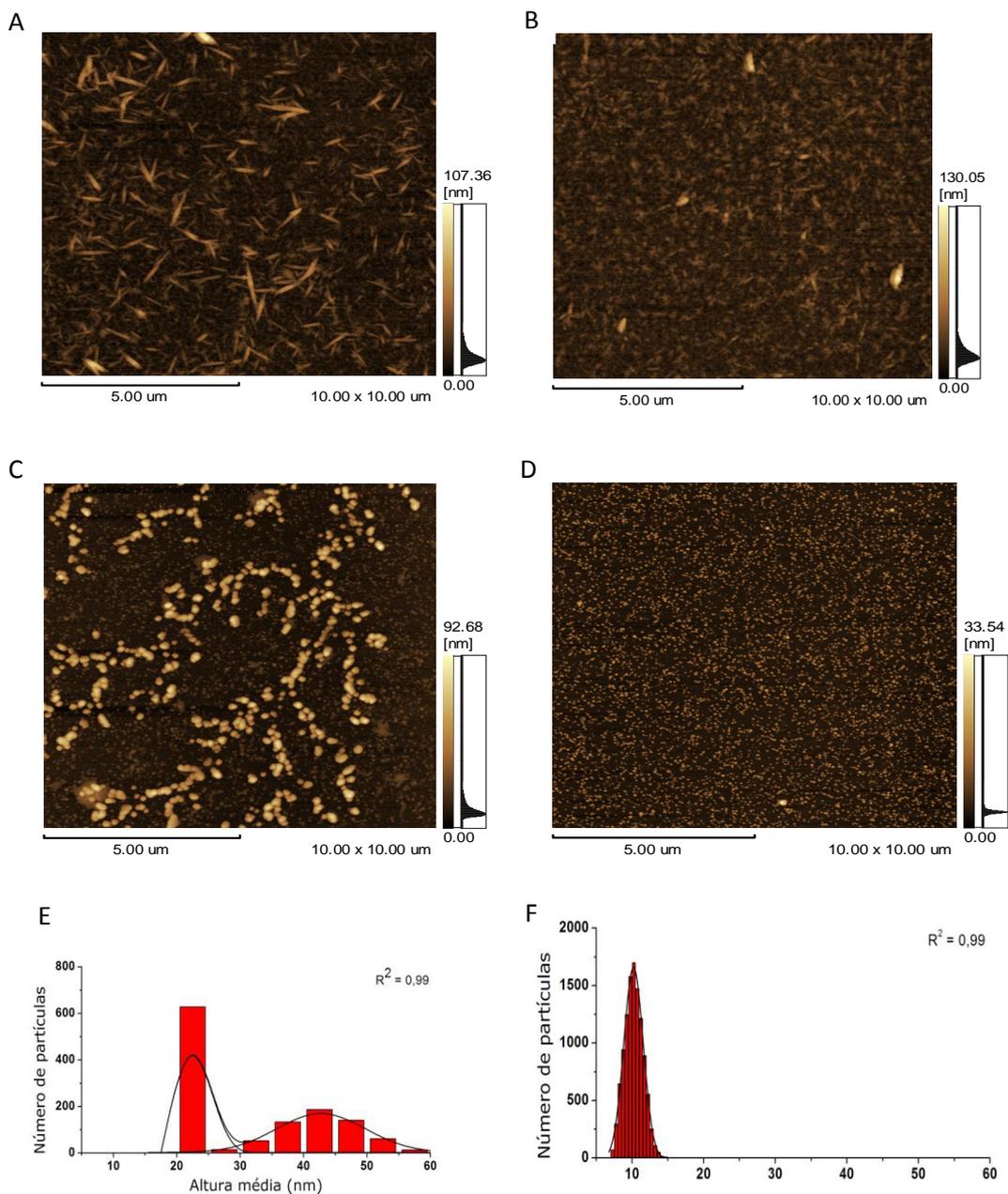
assim uma maior estabilidade coloidal (ASTM, 1985). Esse resultado pode sugerir que o poliânion TPF proporciona maior interação com os grupos amino da quitosana quando comparado com a BSA em diferentes pHs (4 e 7) e que a BSA nessa concentração apesar de ter formado nanoestruturas, não apresenta estabilidade coloidal atrativa.



**Figura 19.** Características físicoquímicas das nanopartículas de quitosana/BSA na ausência ou na presença de TPF. A) Histograma de diâmetros hidrodinâmicos em função do número medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS), Potencial Zeta (B). S/TPF = NPs de quitosana/BSA sem TPF; C/TPF = NPs de quitosana/BSA com TPF.

Foram adquiridas imagens por meio de MFA das NPs produzidas na ausência ou na presença de TPF no dia em que foi desenvolvida a formulação e 4 dias após a formulação, com a finalidade tanto de verificar a morfologia bem como estabilidade (Figura 20). As estruturas observadas nas formulações de quitosana/BSA com TPF apresentaram formato de fibras, sendo que a imagem de 4 (quatro) dias após a formulação evidencia a dissolução dessas estruturas. Devido à alta concentração, mesmo após a diluição da formulação estoque, não foi possível obter um histograma de distribuição de alturas médias.

As NPs de quitosana/BSA sem TPF, no dia da formulação, apresentaram duas classes de altura média, com uma predominante entre 20 e 25 nm (possivelmente consistindo de monômeros de quitosana ou de BSA) e a outra mais abundante distribuída entre 30 e 60 nm. Podemos inferir desses resultados que a BSA estava em uma concentração alta, pois muitas não tiveram interação com as moléculas de quitosana, permanecendo livres (primeira classe de altura média). E após 4 (quatro) dias estocadas a 4°C, as NPs de quitosana/BSA sem TPF se dissolveram, mostrando estabilidade baixa.

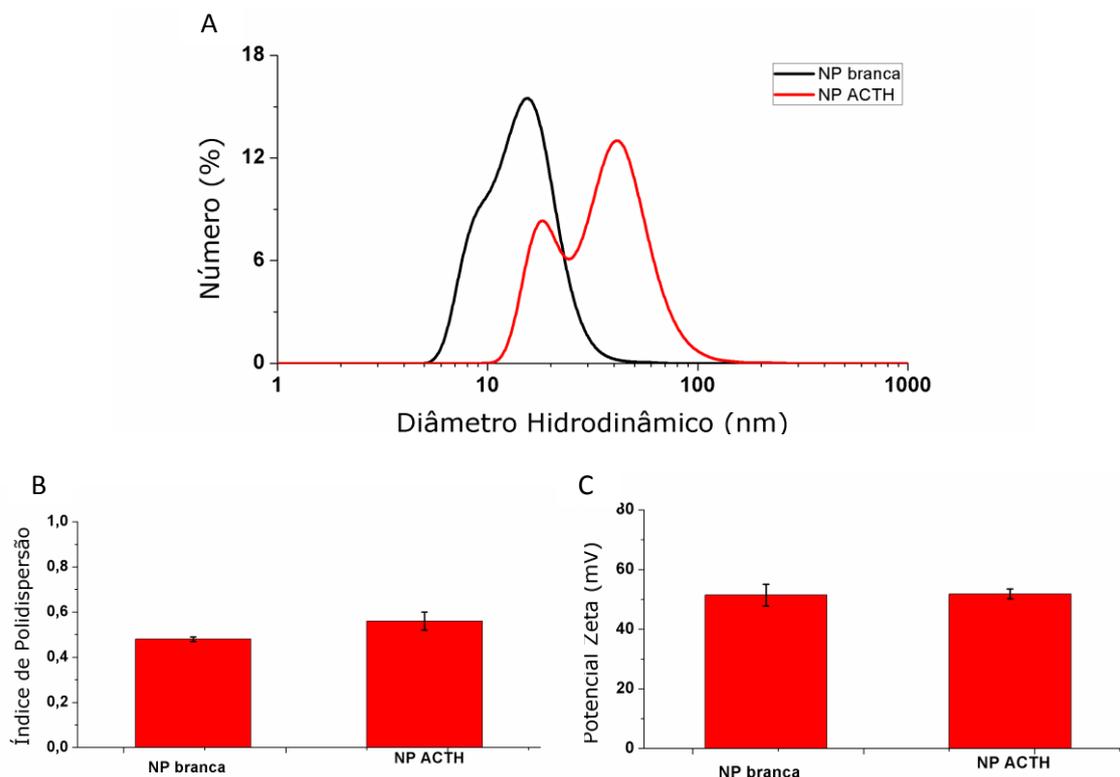


**Figura 20.** Imagens topográficas adquiridas por microscopia de força atômica operada em modo dinâmico de NPs de quitosana/BSA com TPF no mesmo dia da formulação (A) e 4 dias após a formulação(B) e as NPs de quitosana/BSA sem TPF no mesmo dia da formulação (C) e 4 dias após a formulação (D). Histogramas de distribuição de classes com valores variados de altura média de NPs de quitosana/BSA sem TPF no dia da formulação (E) e 4 dias após a formulação (F).

## 6.8 Caracterização de nanopartículas contendo ACTH

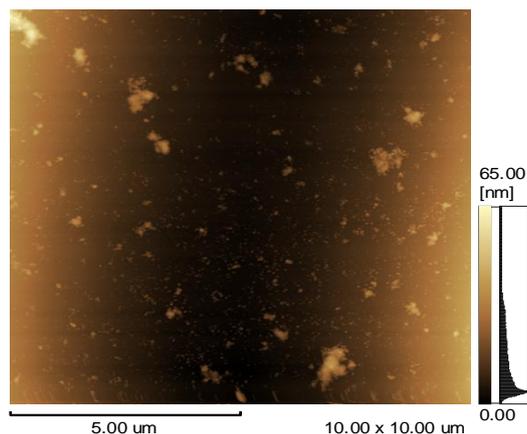
As NPs de quitosana/TPF foram escolhidas para o encapsulamento dos hormônios, pois apesar de todas as tentativas, se mostrou a formulação mais reprodutível. O diâmetro hidrodinâmico das NPs brancas (sem o ativo) foi menor quando comparado com o das NPs contendo o ACTH como pode ser observado na Figura 21, sendo que ambas ficaram abaixo de 100 nm. O aumento do diâmetro hidrodinâmico pode ser explicado pela possibilidade de aprisionamento do ACTH, que apresenta alto peso molecular (4.540 Da). O índice de polidispersão foi um pouco maior nas NPs contendo o ACTH. O potencial Zeta não sofreu grandes variações quando se compara as NPs brancas ( $51,47 \pm 3,66$ ) com as NP contendo ACTH ( $51,83 \pm 1,67$ ), indicando nos dois grupos uma estabilidade coloidal ( $\pm 40$  a  $\pm 60$ ) (ASTM, 1985). A manutenção da carga de superfície observada pode ser devido à pequena interação do ACTH com o TPF e os grupos amino da quitosana (NARAYANAN *et al.*, 2012).

No trabalho de DOUNIGHI e colaboradores (2012), onde se utilizou o mesmo procedimento de geleificação iônica do presente trabalho, porém com concentração inicial de 2 mg/mL e baixo peso molecular de quitosana, o diâmetro hidrodinâmico das partículas brancas foi  $260 \pm 3$  2,1 nm, PdI de 0,2 e potencial Zeta,  $50,3 \pm 2,2$  mV. Nesse mesmo ano, NARAYANAN e colaboradores utilizaram quitosana de 100-150 kDa e grau de desacetilação de 80%, combinando 1% de TPF em 10 mL de quitosana 0,1%, sob agitação magnética, e obtiveram nanoestruturas com diâmetro médio de 40 nm e potencial Zeta médio de +60 mV. Podemos observar que o potencial Zeta apresenta valores bem próximos quando comparados com o presente estudo, porém com grandes variações no que diz respeito ao diâmetro médio, que pode ser explicado pelo tipo de quitosana (massa molecular e grau de desacetilação) utilizada para as formulações, bem como a sua concentração.



**Figura 21.** Características físicoquímicas das nanopartículas contendo ACTH. A) Histograma de diâmetros hidrodinâmicos em função do número medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS); Índice de Polidispersão (B); Potencial Zeta (C).

A imagem de MFA (Figura 22), nesse caso, assim como para as NPs de FSH foram obtidas para agregar informações qualitativas a respeito da morfologia das NPs, visto que por conta da propriedade de mucoadesão da quitosana, a aquisição de imagens suficientes para o histograma de distribuição de partículas (avaliação quantitativa) em tempo preciso não foi possível. Podemos observar que existem pequenas aglomerações e que as estruturas presentes apresentam pequenas variações de formato. Com base nos resultados obtidos, juntamente com dados referentes à eficiência de encapsulamento, apresentados posteriormente, infere-se que o processo de nanoencapsulamento foi realizado com sucesso.

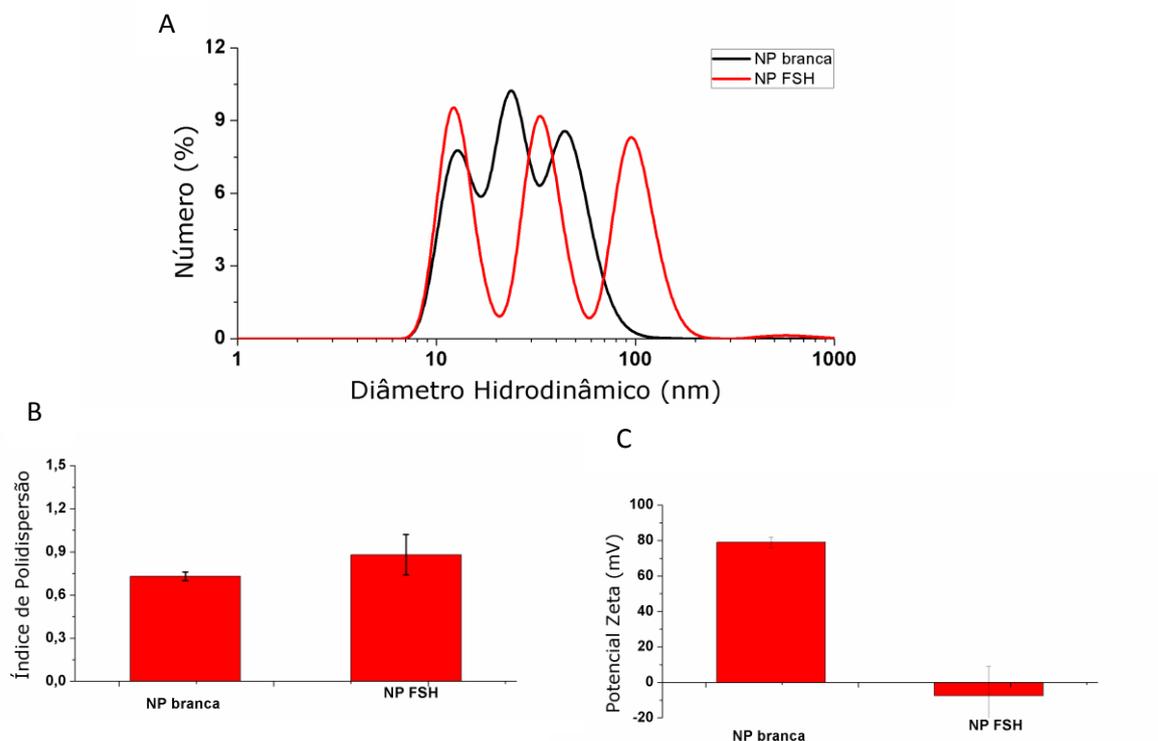


**Figura 22.** Imagem topográfica adquirida por microscopia de força atômica operada em modo dinâmico de NPs de quitosana contendo o ACTH.

### 6.9 Caracterização de nanopartículas contendo FSH (Sigma)

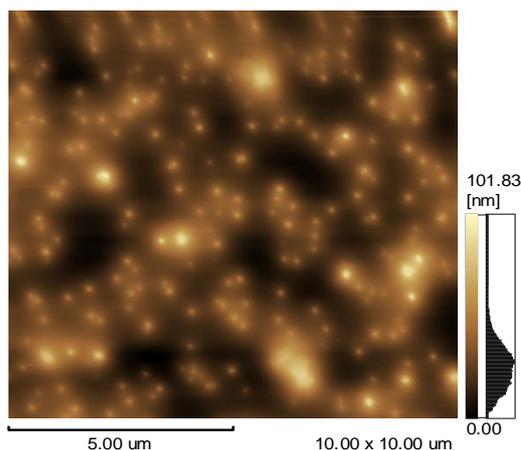
O diâmetro hidrodinâmico evidenciou a presença de três populações de nanopartículas, sendo que as NPs brancas ficaram entre 10 nm e 100 nm, enquanto que as NP contendo FSH apresentaram-se um pouco maiores do que 100 nm. A título de comparação, as NPs brancas no item 5.8 apresentaram distribuição unimodal com diâmetro abaixo de 100 nm. Esse fato nos evidencia que a reprodutibilidade apresenta-se baixa, assim como na literatura. O PdI, assim como ocorreu com o encapsulamento de ACTH, apresentou um pequeno aumento quando o FSH foi nanoencapsulado (Figura 23). O potencial Zeta da NP branca teve estabilidade coloidal excelente (mais de  $\pm 60$ ) e a NP com o hormônio, manteve o padrão observado com as NP de ACTH. RATHER e colaboradores (2013), formularam nanopartículas de quitosana, pelo método de geleificação iônica, e de quitosana/ouro, pelo procedimento de Turkevich com pequena modificação, para liberação sustentada do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) buscando melhorar a reprodução de peixes fêmeas. Eles obtiveram NPs com diâmetro de  $114 \pm 10,3$  nm, potencial Zeta de  $-33,14 \pm 6,67$  e PdI de 0,335 para as NPs sem ouro, e diâmetro de  $192,5 \pm 19,1$  nm, potencial Zeta de  $-34,95 \pm 7,5$  e PdI de 0,47

para as nanopartículas com ouro. Apenas o parâmetro de diâmetro das NPs sem ouro pode ser comparado com os dados do presente estudo, pois o índice de polidispersão mostrou-se maior que 0,3 e, a carga de superfície foi positiva.



**Figura 23.** Características físicoquímicas das nanopartículas contendo FSH. A) Histograma de diâmetros hidrodinâmicos em função do número medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS); Índice de Polidispersão (B); Potencial Zeta (C).

Quanto à caracterização por meio de MFA das NPs contendo FSH (Figura 24), observa-se estruturas em formato próximo ao esférico e bem distribuídas, sem aglomerados, ao longo da área em que foi realizada a varredura. Em 2013, pesquisadores adquiriram imagens topográficas de NPs de PLGA preparadas pelo método de evaporação – difusão – emulsão, e observaram formato esférico, e concluíram que a MFA é hábil para caracterização morfológica, seja para informações qualitativas ou quantitativas (LAMPROU *et al.*, 2013).



**Figura 24.** Imagem topográfica adquirida por microscopia de força atômica operada em modo dinâmico de NPs de quitosana contendo o FSH.

#### 6.10 Eficiência de encapsulamento das nanopartículas contendo ACTH e FSH da marca Sigma

A EE foi realizada para as três formulações com diferentes concentrações de ACTH, porém somente aquela com concentração final de 462  $\mu\text{g/mL}$ , utilizada para os testes de maturação *in vitro*, foi caracterizada por DLS, como pode ser visualizado na Tabela 7. Nota-se que efetivamente o teste foi realizado com a concentração final de 138,6  $\mu\text{g/mL}$ , pois apenas 30% do ACTH adicionado para a formulação das NPs foi encapsulado na matriz polimérica de quitosana. Quanto ao FSH da marca Sigma, a concentração final efetiva foi de 1,8  $\text{mg/mL}$ , pois obteve-se uma EE de 60%. AL-QADI e colaboradores (2012) obtiveram EE de 53% da insulina utilizando o processo de geleificação iônica com quitosana de baixo peso molecular. NARAYANAN e colaboradores, também em 2012, encontraram EE de 40% do hormônio da paratireoide humano (1-34). O trabalho de RATHER *et al.*, 2013, que descreve eficiência de 69% para NPs de quitosana quando utilizou o GnRH como ativo, se assemelha com a eficiência obtida para o FSH neste estudo. Logo, a técnica utilizada de geleificação iônica com formação de NPs de quitosana para o encapsulamento do FSH e do ACTH

no presente estudo é viável para a obtenção de nanoestruturas visando à liberação sustentada.

**TABELA 7. Eficiência de encapsulamento dos hormônios adeno-hipofisários, ACTH e FSH, em nanopartículas de quitosana comparadas com demais parâmetros.**

| Nanopartícula | Concentração<br>final do<br>hormônio | Diâmetro<br>médio<br>(nm) | PdI  | Potencial Zeta<br>(mV) | EE<br>(%) |
|---------------|--------------------------------------|---------------------------|------|------------------------|-----------|
| NP1 ACTH      | 10,5 µg/mL                           | —                         | —    | —                      | 30        |
| NP2 ACTH      | 2,3 µg/mL                            | —                         | —    | —                      | 30        |
| NP3 ACTH      | 462 µg/mL                            | 85,02                     | 0,56 | 51,83                  | 30        |
| NP FSH        | 3 mg/mL                              | 217,23                    | 0,88 | -7,6                   | 60        |

#### 6.11 Avaliação da estabilidade das NPs contendo ACTH e das NPs contendo FSH da marca Sigma

A estabilidade foi avaliada por meio de DLS porque apresenta curto tempo de análise e grande sensibilidade quanto à presença de aglomerados. Logo, as medidas de diâmetro hidrodinâmico, PdI e potencial Zeta foram adquiridas novamente após quatro dias da formulação das NPs como pode ser visualizado na Tabela 8.

**TABELA 8. Quadro esquemático com os dados referentes ao diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e PdI no dia da formulação das NPs e quatro dias após, armazenadas a 4°C.**

|            | Diâmetro hidrodinâmico<br>médio (nm) |        | Potencial Zeta (mV) |             | PdI         |            |
|------------|--------------------------------------|--------|---------------------|-------------|-------------|------------|
|            | 1 dia                                | 4 dias | 1 dia               | 4 dias      | 1 dia       | 4 dias     |
| NP<br>ACTH | 85,02                                | 84,20  | 51,83± 1,67         | 52,03± 1,89 | 0,56 ± 0,04 | 0,49± 0,02 |
| NP<br>FSH  | 217,23                               | 158,77 | -7,6± 16,68         | 48,5 ± 5,41 | 0,88 ± 0,14 | 0,78± 0,04 |

Observa-se que, para as NPs contendo ACTH, os quatro dias não provocou aglomeração nem mudanças na estabilidade, apresentam-se então, como um sistema estável. As NPs contendo FSH apresentaram uma diferença significativa no diâmetro hidrodinâmico médio, podendo ser explicado pelo fato de que com o tempo correu erosão da matriz polimérica e o FSH foi liberado, assim como a alteração drástica, inclusive de sinal, no potencial Zeta de superfície das nanopartículas. No mais, o potencial Zeta das nanopartículas contendo FSH no primeiro dia pode ter apresentado falha durante análise, pois o intervalo entre as medições mostrou-se muito curto quando comparado com as medições das NPs brancas, realizadas no mesmo dia. Esse fato corrobora com dados obtidos após 4 dias da formulação, onde o valor obtido foi positivo e maior, 48,5 mV ( $\pm 5,41$ ), indicando estabilidade do sistema.

#### 6.12 Teste *in vitro* com o ACTH

Foram realizados os testes em diferentes meios de cultura, assim como em diferentes meios de procura e seleção dos oócitos visando obter uma condição mais propícia para a avaliação do ACTH e, posteriormente, das nanopartículas de quitosana/BSA. Os resultados dos ensaios para expansão dos oócitos pode ser observada na Tabela 9.

Na condição 3, onde foi utilizado PVP como suplemento (ALI *et al.*, 2002) e líquido folicular como busca e seleção apresentou 100% dos oócitos com expansão do *cumulus* em todos os grupos, mesmo aquele em que não foi utilizado nenhum hormônio, dito como controle negativo. Isso sugere a forte influência do líquido folicular no processo de expansão das células do *cumulus*, pois esse fluido é composto por vários elementos, dentre eles vários hormônios e fatores de crescimento. O líquido folicular

também foi utilizado no grupo 1, onde observou-se 50% de expansão citoplasmática para os grupos controle e ACTH (1,13 µg/µL).

No grupo 4, onde foi realizado a comparação de MIV com PVP ou BSA, os resultados foram idênticos, com 100% de expansão para o grupo tratado com FSH, 0% para o controle negativo e o ACTH (1,13 µg/µL). Esses resultados evidenciam que o líquido folicular possui grande influência sobre a expansão do *cumulus* e de que o PVP pode ser utilizado como suplemento no meio de maturação, pois sua taxa de expansão equipara-se com a da BSA.

**TABELA 9. Apresentação esquemática dos resultados *in vitro* da expansão das células do *cumulus* de bovinos**

|                   | Tratamento    | Nº de oócitos | Expansão: células do <i>cumulus</i> (24h) |
|-------------------|---------------|---------------|---|
| <b>CONDIÇÃO 1</b> | FSH           | 24            | (+++)                                     |
|                   | Controle (-)  | 23            | (+)                                       |
|                   | ACTH1         | 24            | (+)                                       |
| <b>CONDIÇÃO 2</b> | FSH           | 18            | (+++)                                     |
|                   | Controle (-)  | 19            | (0)                                       |
|                   | ACTH1         | 19            | (0)                                       |
| <b>CONDIÇÃO 3</b> | FSH           | 21            | (+++)                                     |
|                   | Controle (-)  | 22            | (+++)                                     |
|                   | ACTH1         | 22            | (+++)                                     |
|                   | ACTH2         | 22            | (+++)                                     |
| <b>CONDIÇÃO 4</b> | FSH           | 23            | (+++)                                     |
|                   | Controle (-)  | 23            | (0)                                       |
|                   | ACTH1         | 22            | (0)                                       |
|                   | FSH *         | 22            | (+++)                                     |
|                   | Controle (-)* | 23            | (0)                                       |
|                   | ACTH1*        | 22            | (0)                                       |

FSH(1 UI/mL); Controle (-); ACTH1 (1,13 µg/µL); ACTH2 (0,57 µg/µL). (0) = nenhum oócito com expansão citoplasmática; (+) = < 50% oócito com expansão citoplasmática; (++) = 50-70% oócito com expansão citoplasmática; (+++) = 100% oócito com expansão citoplasmática. Condição 1 (MIV com BSA, busca e seleção com fluido folicular); Condição 2 (MIV com PVP, busca e seleção LAV com soro); Condição 3 (MIV com PVP, busca e seleção com fluido folicular); Condição 4 (MIV com PVP ou BSA, busca e seleção com LAV e PVP). \* Substituição da BSA pelo PVP no MIV.

6.13 Testes *in vitro* com oócitos bovinos, em condição de meio de cultura e de meio de busca e seleção pré-estabelecidos, com o ACTH

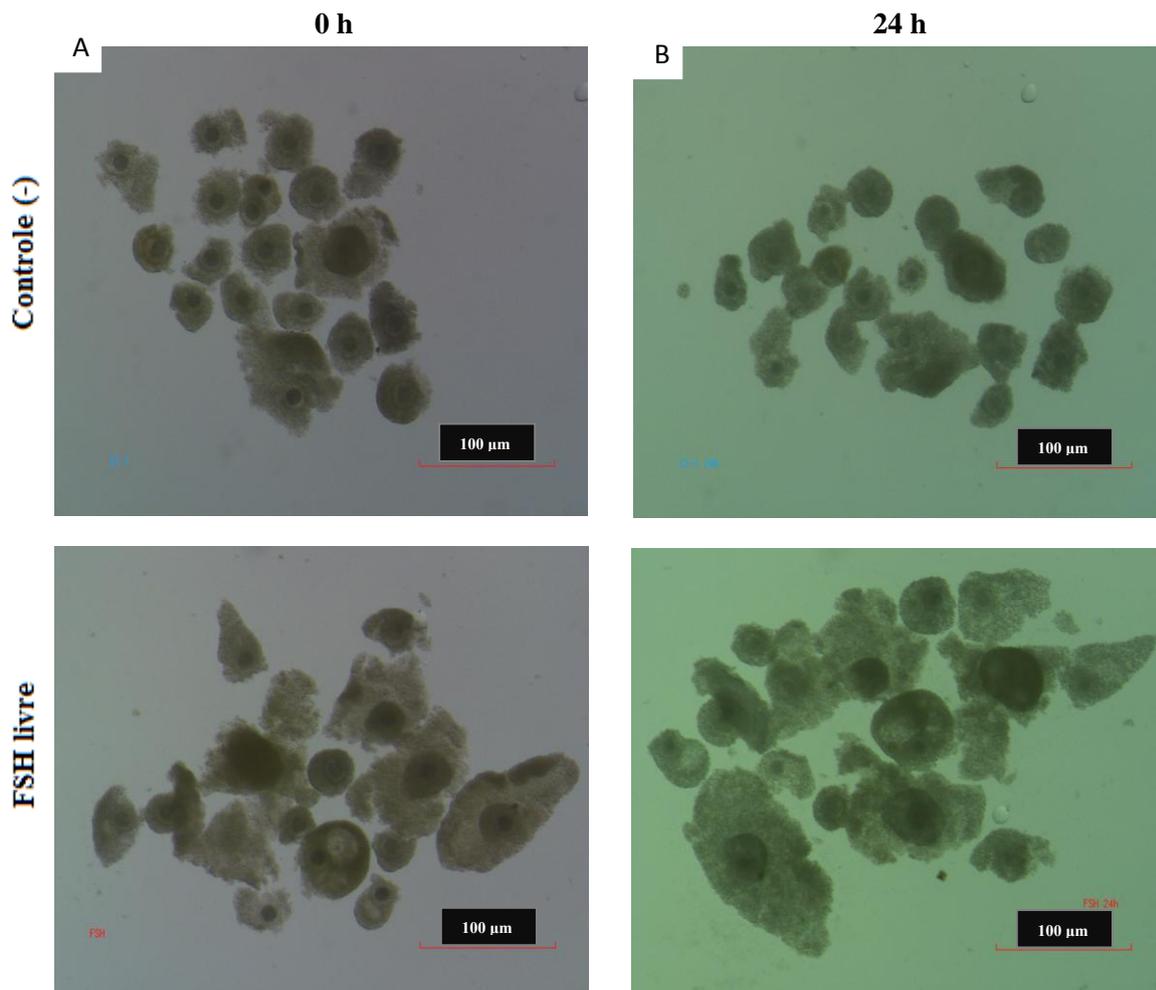
A BSA, como suplemento do meio de cultura não foi escolhida, mesmo apresentando algumas vantagens citadas anteriormente, devido à possibilidade de utilização de formulação de NPs contendo BSA, o que poderia interferir ou interagir com o meio de maturação. A albumina, por ser de origem animal, também apresenta risco de contaminação e por possuir composição não totalmente definida, pode ocorrer variações entre lotes do produto prejudicando assim, a produção de embriões e a comercialização com alguns países (MINGOTI *et al.*, 2011). Estudos realizados com meio de cultura TCM-199 sem fluido folicular, TCM-199 suplementado com 25% de fluido e outro grupo somente com fluido, demonstrou que nos dois últimos grupos a taxa de maturação foi superior (CRUZ *et al.*, 2014). E tendo, o fluido folicular, componentes como eletrólitos, hormônios (FSH, LH), aminoácidos, fatores de crescimento, dentre outros, pode afetar substancialmente o processo de expansão citoplasmática dos oócitos bovinos (CRUZ *et al.*, 2014). Portanto, esse não foi selecionado nem como meio de maturação nem de como meio de seleção e procura.

O meio com PVP, então foi selecionado, com a finalidade de padronização do procedimento. Essa macromolécula sintética é solúvel em água e possui baixa citotoxicidade. Ela também é útil no que diz respeito à prevenção de perda de oócitos por aderência à superfície de vidro ou de plástico das placas de cultura (CHUNG *et al.*, 2007). Mas vale destacar, que o principal motivo da escolha do PVP foi a de eliminar qualquer efeito de alguma outra substância presente no meio de MIV, uma vez que o objetivo era de avaliar a atividade dos hormônios livres e nanoencapsulados.

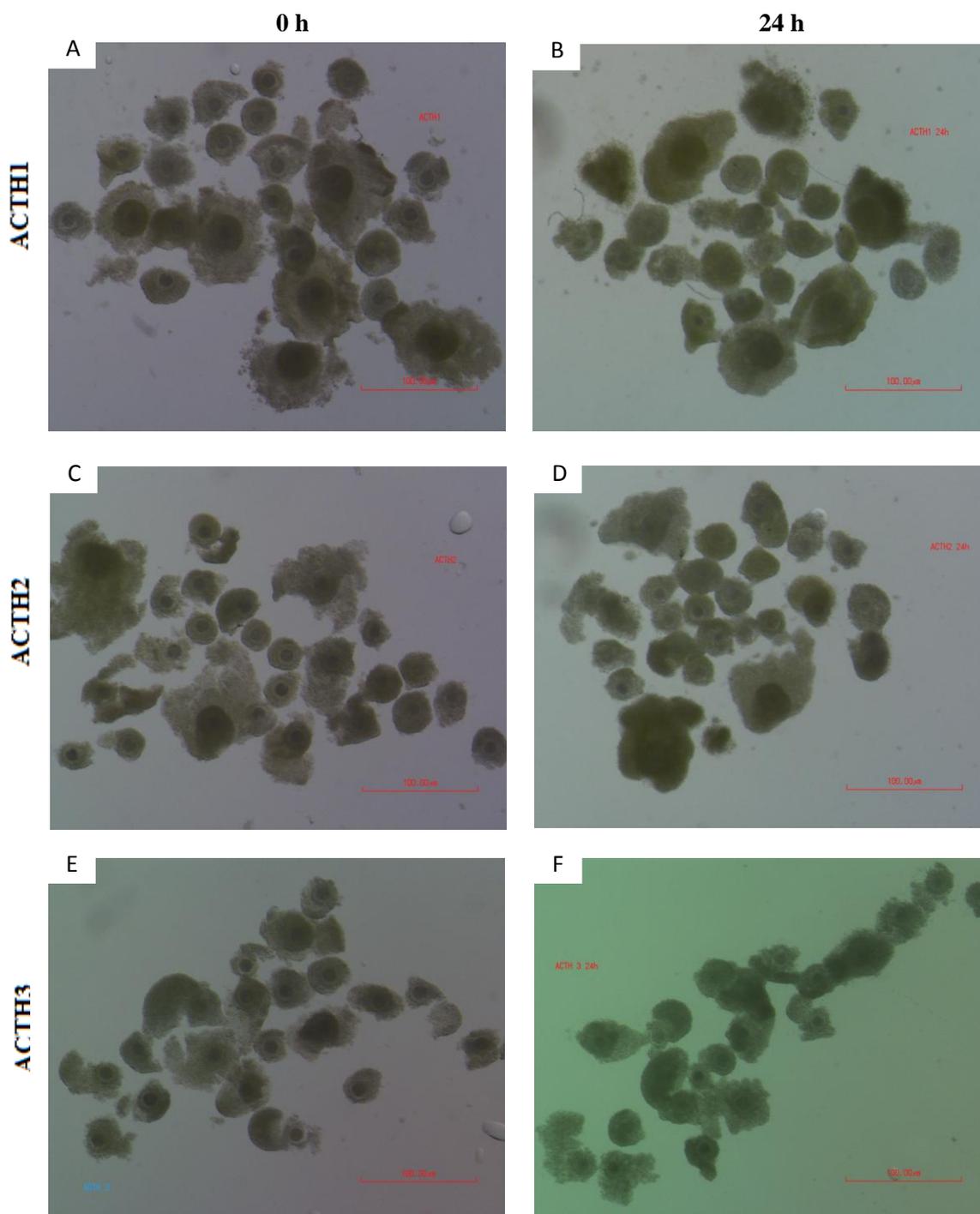
Quanto à atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, essa é essencial para a manutenção do sistema tampão enquanto que a temperatura de 39°C (corresponde à temperatura

corporal de bovinos) fornece melhores resultados de maturação, pois resulta em maior porcentagem de produção de embriões (STAIGMILLER, 1988). Para os testes, três concentrações de ACTH foram escolhidas de forma aleatória, pois não existem relatos na literatura de testes semelhantes, buscando a avaliação direta do ACTH na expansão oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Podemos observar nas figuras 25 e 26, que as diferentes concentrações de ACTH não influenciaram na expansão das células. Porém o grupo positivo (grupo com FSH livre) também obteve pouca expansão, menor do que o esperado. Esse resultado foi confirmado através de análises estatísticas, onde não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos, principalmente em relação ao FSH livre. Isso pode ser explicado pelo fato de que a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, apresenta uma quantidade significativa de variáveis (estado nutricional dos animais, a qualidade dos ovários coletados, a época do ano, etc.) podendo alguma dessas ter interferido nos testes. A taxa de produção de blastocistos no Laboratório de Reprodução Animal foi de 27% e 42,5% para os dias em que foi realizada a maturação *in vitro* com diferentes concentrações de ACTH. Isso sugere que a qualidade dos oócitos se interferiu, foi muito pouco, no processo de expansão citoplasmática, pois das seis réplicas realizadas em dias diferentes, apenas a primeira foi realizada no dia em que a taxa de produção de blastocistos foi de 27%.

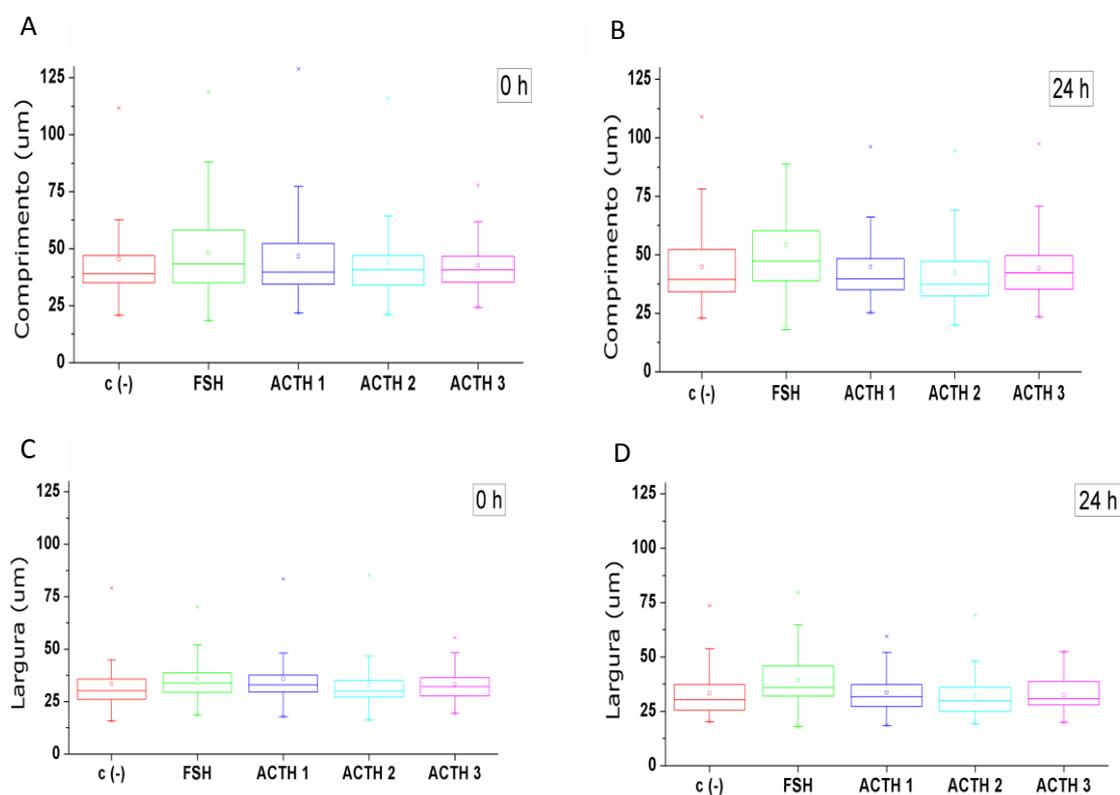


**Figura 25.** Imagens dos grupos de oócitos bovinos antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas do tratamento com os hormônios. A) controle negativo, com 98 oócitos avaliados, [c(-)] em zero hora; B) controle negativo [c(-)] em 24 horas; C) FSH livre, com 99 oócitos avaliados, em zero hora; D) FSH livre em 24 horas.



**Figura 26.** Imagens dos grupos de oócitos bovinos antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas do tratamento com diferentes concentrações de ACTH livre. A) ACTH1 em zero hora; B) ACTH1 em 24 horas; C) ACTH2 em zero hora; D) ACTH2 em 24 horas; E) ACTH3 em zero hora; F) ACTH3 em 24 horas. ACTH1 = 0,007  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; ACTH2 = 0,002  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e ACTH3 = 0,0009  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Nos gráficos de caixa (Figura 27), o valor numérico que separa a metade superior de uma amostra de dados a partir da metade inferior está representado como uma linha que divide a caixa em duas partes. Nota-se que ela se encontra deslocada para o quadrante inferior na maioria dos grupos, diante disso, pode-se inferir que existe menor dispersamento entre os valores de comprimento a partir do primeiro quartil até a mediana desses grupos. Entre 0 e 24 horas observa-se aumento na mediana dos comprimento dos complexos, no grupo de FSH (99 oócitos avaliados), enquanto nos grupos ACTH1 (98 oócitos avaliados) e ACTH2 (100 oócitos avaliados) e ACTH3 (96 oócitos avaliados) não houve alteração. A precursora do ACTH foi detectada nos produtos comerciais que oferecem atividade de FSH, entretanto, com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que a atividade *in vitro* do ACTH, nas concentrações testadas, não se assemelha a do FSH livre.

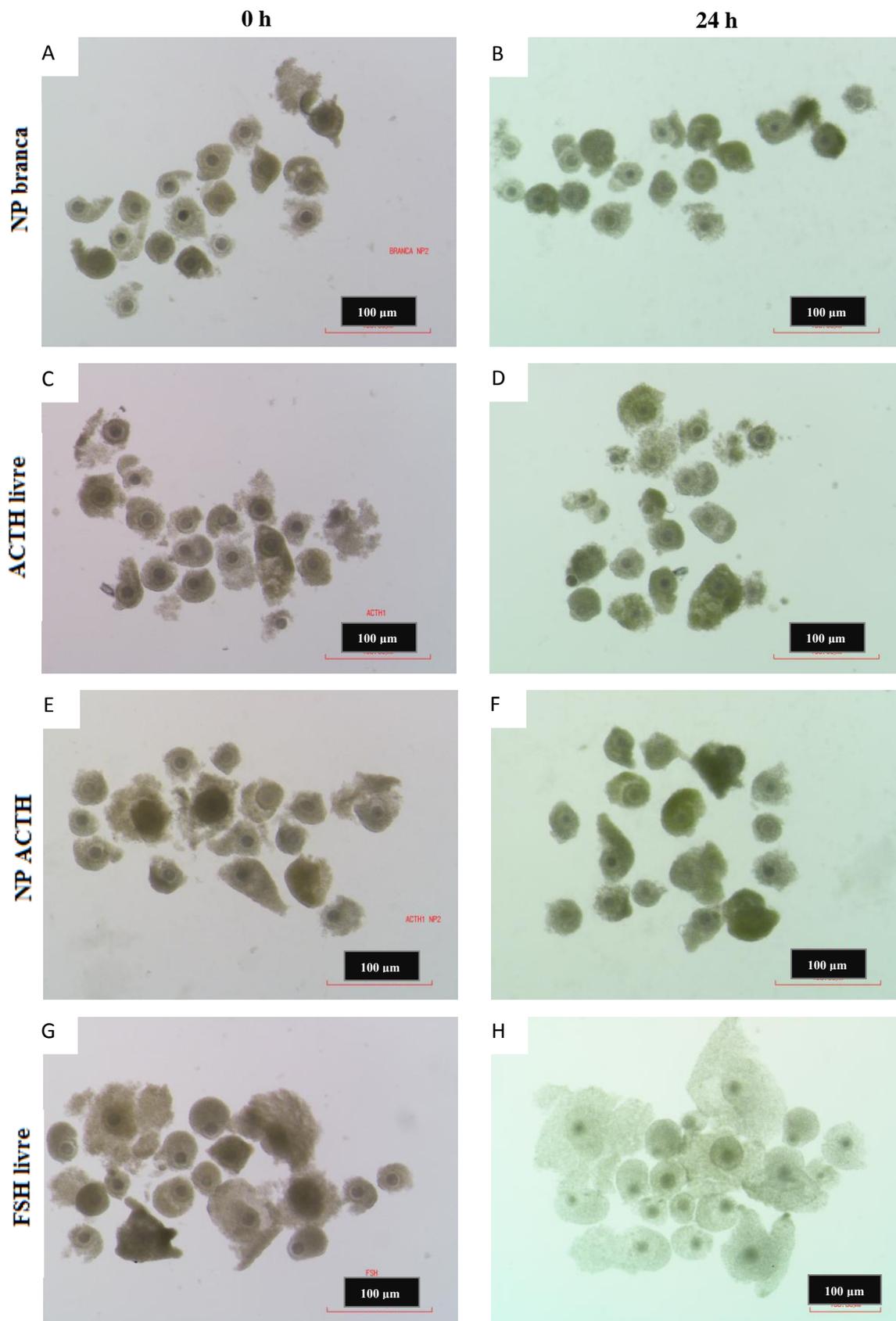


**Figura 27.** Gráficos de diagrama de caixa das medidas relativas ao comprimento em zero hora (A) e em 24 horas (B), e à largura em zero hora (C) e em 24 horas (D) dos grupos controle negativo [c(-)], FSH e ACTH nas três concentrações testadas, onde ACTH1 = 0,007  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; ACTH2 = 0,002  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e ACTH3 = 0,0009  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Análise estatística sem diferença significativa entre os grupos.

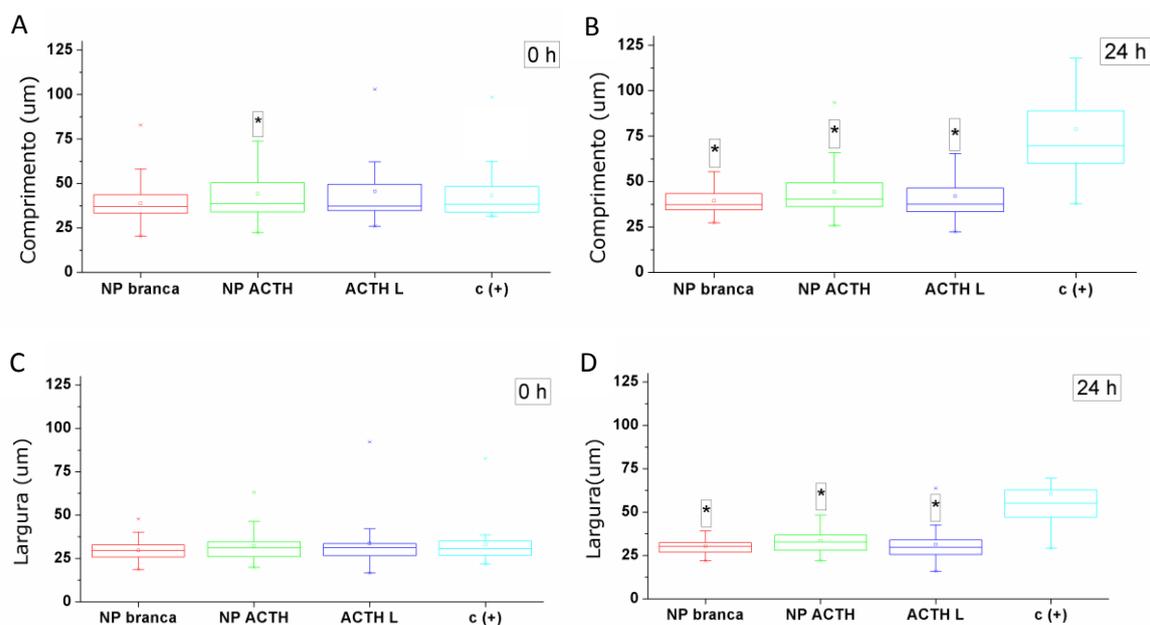
#### 6.14 Testes *in vitro* com complexos-*cumulus*-oócitos bovinos com nanopartículas contendo ACTH

Para os testes com as NPs contendo ACTH, com 68 oócitos avaliados, foi utilizada a maior concentração utilizada nos testes dos hormônios livres (0,007  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), com o intuito de verificar se a liberação sustentada proporcionada pelo nanossistema iria influenciar na de células do cumulus dos CCOs bovinos. O procedimento para medição foi o mesmo citado no item 5.13 desse trabalho.

É possível verificar na figura 28 e nos dados estatísticos da figura 29 que a nanoencapsulação não interferiu no processo de expansão do *cumulus*, permanecendo os resultados bem similares com o ACTH livre, com 53 oócitos avaliados. O aumento na mediana do comprimento dos complexos apenas ocorreu no grupo controle (FSH livre), com 35 oócitos avaliados, e nesse mesmo grupo houve aumento nos valores máximo e mínimo do comprimento. Pode-se dizer o mesmo para os valores de largura. Dessa forma, deduz-se que o ACTH livre nas concentrações específicas testadas, assim como o nanoestruturado não apresenta ação, negativa nem positiva, sob a expansão. Apenas observa-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) do grupo controle (FSH livre) quando comparado com os demais. A média das taxas de produção de blastocistos do Laboratório de Reprodução Animal nos dois dias em que os testes com as NPs de ACTH foram realizados ficou em 47%, o que mostra que os oócitos utilizados nessa fase do experimento eram de boa qualidade. E que, portanto, a qualidade dos oócitos não afetou a resposta, reforçando a não influência do ACTH, seja livre ou encapsulado. Com esses dados, é certo afirmar que o sistema de nanopartículas não se diferenciou dos resultados obtidos para o ACTH livre, em diferentes concentrações.



**Figura 28.** Imagens dos grupos de oócitos bovinos antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas com o tratamento com ACTH e FSH livres e ACTH nanoencapsulado. A) Nanopartículas brancas (NP branca), ou seja, sem o hormônio em zero hora; B) NP branca em 24 horas; C) ACTH livre em zero hora; D) ACTH livre em 24 horas; E) Nanopartículas contendo ACTH (NP ACTH) em zero hora; F) Nanopartículas contendo ACTH em 24 horas; G) FSH livre, controle positivo, em zero hora; H) FSH livre, controle positivo, em 24 horas.



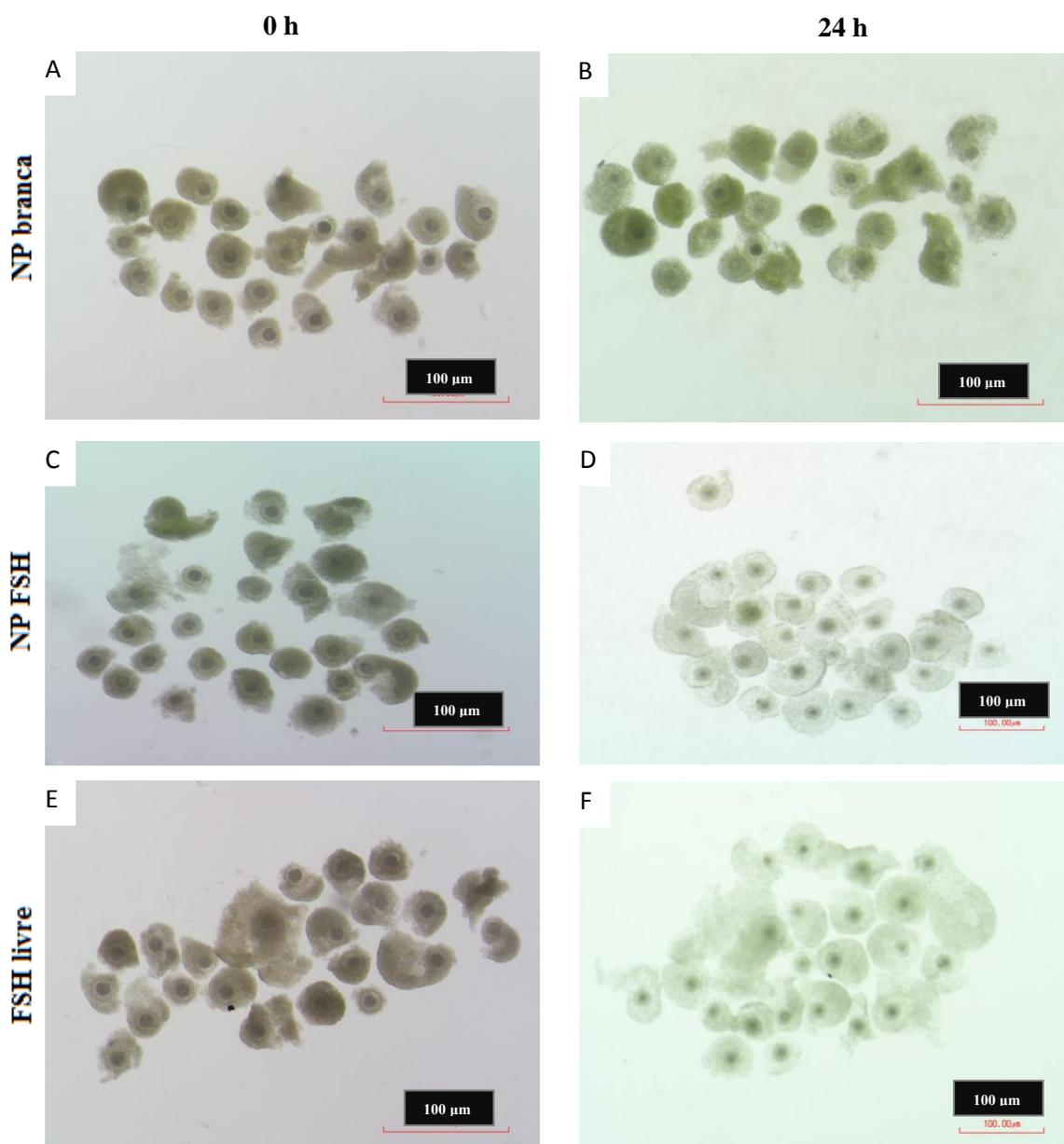
**Figura 29.** Gráficos de diagrama de caixa das medidas relativas ao comprimento em zero hora (A) e em 24 horas (B), e à largura em zero hora (C) e em 24 horas (D) dos grupos de nanopartículas brancas (NP brancas), nanopartículas contendo ACTH (NP ACTH), ACTH livre (ACTH L) e do controle positivo [c(+)], ou seja, do FSH livre. \* Diferença significativa a partir do grupo c (+), ( $P < 0,05$ ).

### 6.15 Testes *in vitro* em complexos-cumulus-oócitos bovinos com nanopartículas contendo FSH

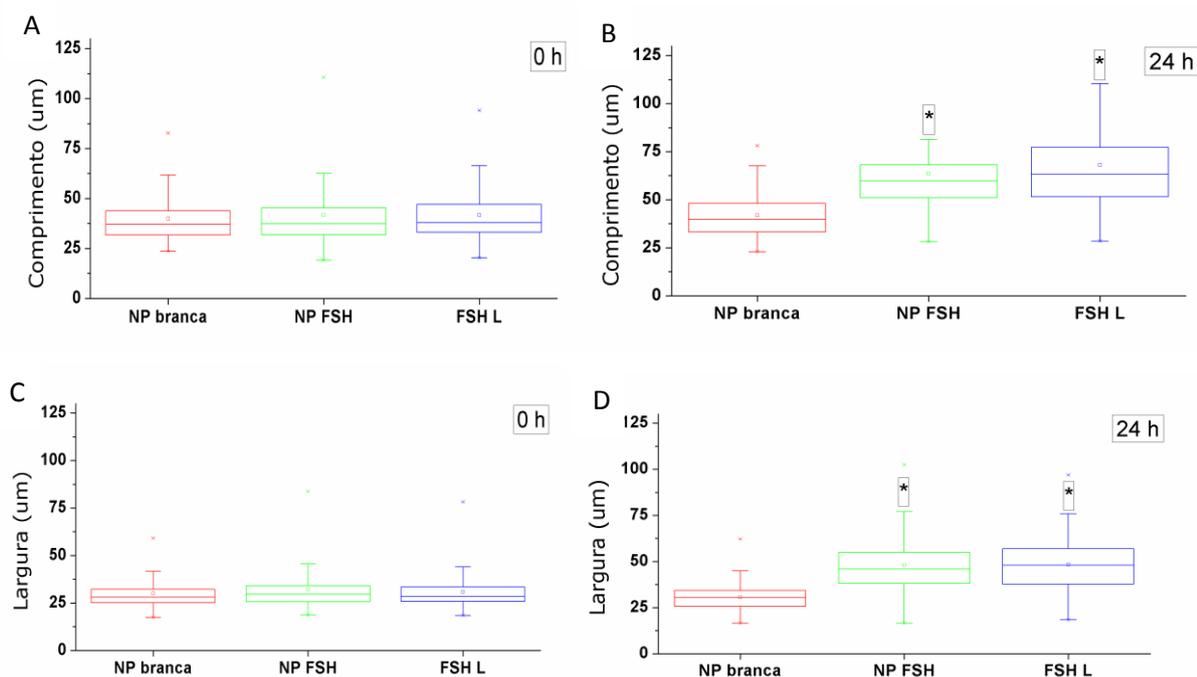
A avaliação dos efeitos das NPs contendo FSH, com 94 oócitos avaliados, no que diz respeito à possível atuação na expansão do *cumulus* de CCOs bovinos foi realizada da mesma forma que o descrito no item 5.13.

É possível observar na figura 30 que as NPs brancas (94 oócitos avaliados), ou seja, sem o hormônio, não interferiram na expansão e que os dados obtidos com o FSH livre (94 oócitos avaliados) e o nanoencapsulados revelaram-se semelhantes. Nas análises estatísticas (Figura 31), foi nítida a diferença ( $P < 0,05$ ) na expansão dos grupos tratados com NPs branca em relação aos tratados com FSH livre e nanoencapsulado. Sendo que o aumento na mediana dos comprimentos dos complexos foi observado tanto no grupo de FSH livre quanto no grupo desse hormônio nanoencapsulado, porém o valor máximo do comprimento em 24 horas do FSH livre foi maior em comparação

com do FSH nanoestruturado. Esses resultados evidenciam que as nanopartículas formuladas no presente trabalho para encapsular o FSH funcionam em estudos *in vitro*. Uma importante utilização das NPs apresentadas no presente trabalho poderá ser de testá-las em sistemas de superestimulação *in vivo*, pois é promissora no que diz respeito à tentativa de diminuição de doses diárias necessárias, por meio da liberação sustentada.



**Figura 30.** Imagens dos grupos de oócitos bovinos antes da maturação, ou seja, em zero hora, e após 24 horas com o tratamento com FSH livre e FSH nanoencapsulado. A) Nanopartículas brancas (NP branca), ou seja, sem o hormônio em zero hora; B) Nanopartículas brancas (NP branca) em 24 horas; C) Nanopartículas contendo o FSH (NP FSH) em zero hora; D) Nanopartículas contendo o FSH (NP FSH) em 24 horas; E) FSH livre em zero hora; F) FSH livre em 24 horas.



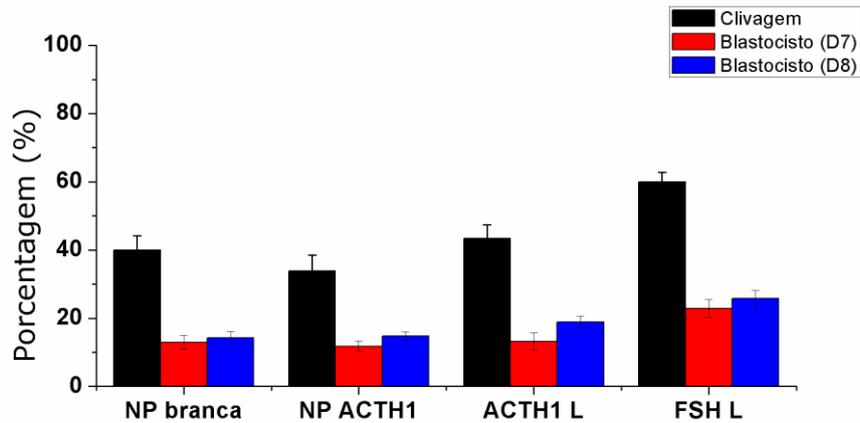
**Figura 31.** Gráficos de diagrama de caixa das medidas relativas ao comprimento em zero hora (A) e em 24 horas (B), e à largura em zero hora (C) e em 24 horas (D) dos grupos de nanopartículas brancas (NP branca), nanopartículas contendo o FSH (NP FSH) e do FSH livre (FSH L).

#### 6.16 Fecundação *in vitro* após tratamento com nanopartículas de quitosana contendo ACTH ou FSH da marca Sigma

Para avaliar o possível efeito do ACTH (livre e nanoencapsulado) e do FSH nanoencapsulado na capacidade dos oócitos de produzirem embriões *in vitro* foi utilizada como parâmetros a taxa de clivagem (D2) e a produção de blastocistos (D7 e D8) a partir de CCOs oriundos do processo de maturação com as NPs contendo ACTH ou FSH. Como grupos controle têm-se as NPs brancas, o FSH da marca Sigma livre e, no caso do ACTH, esse hormônio livre.

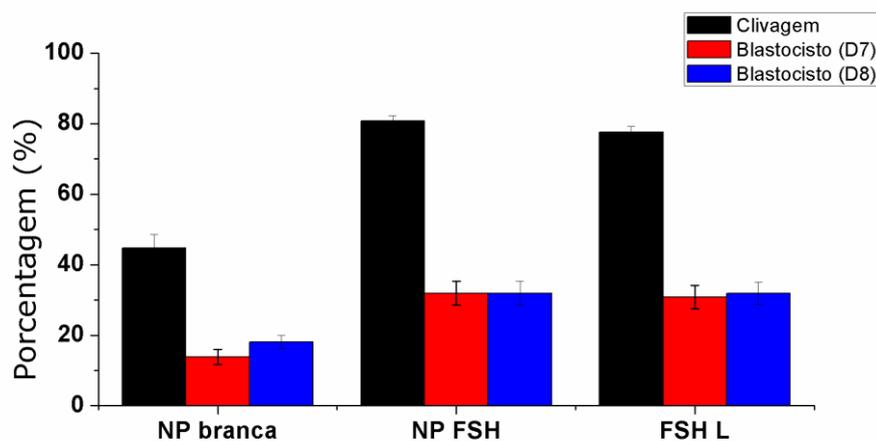
No procedimento testado para avaliação das NPs de ACTH (Figura 32) observa-se que não houve diferença significativa quanto ao ACTH livre e nanoencapsulado, permanecendo os dois com baixas taxas de clivagem e blastocistos ( $P < 0,05$ ). Então,

conclui-se que o sistema de entrega sustentada á base de quitosana não modificou os resultados já obtidos para o ACTH livre.



**Figura 32.** Representação gráfica das taxas de clivagem e da produção de blastocistos em diferentes grupos: NP branca; NP ACTH1: ACTH livre e FSH da marca Sigma livre.

Quanto às NPs de FSH (Figura 33), podemos observar a similaridade dos parâmetros, com taxa de clivagem de 80,85% e 77,66% e taxa de blastocisto (D7) de 31,91% e 30,85% para os grupos FSH encapsulado e livre, respectivamente. Esses resultados foram satisfatórios considerando que os oócitos foram maturados em MIV com PVP, sem soro, nem BSA e, uma possível explicação, talvez seja que a concentração do sêmen utilizado na FIV bem como os sistemas nanoestruturados, tenham superado a utilização do PVP (DODE *et al.*, 2002).



**Figura 33.** Representação gráfica das taxas de clivagem e da produção de blastocistos em diferentes grupos: NP branca; NP FSH da marca Sigma e FSH da marca Sigma livre.

ECKERT *et al.*, realizaram um estudo em 1994 utilizando diferentes concentrações de BSA (1 mg/mL; 6 mg/mL e 10 mg/mL) para suplementação em meio de maturação e observaram pequenas variações nas taxa de clivagem de 63,3% ( $\pm 2,8$ ) e 54,8% ( $\pm 6,3$ ) para a menor e maior concentração de BSA, respectivamente. Enquanto que para as taxas de blastocisto, houve, além de grande variação, valores muito baixos de 17,2% ( $\pm 3,4$ ) e 9,0% ( $\pm 2,3$ ) para a menor e maior concentração de BSA, respectivamente. Em 2000, COELHO *et al.*, utilizando meio básico de maturação obtiveram 65% de taxa de clivagem, porém suplementado com 5% de BSA. Outro trabalho obteve taxas de blastocisto de 34 % ( $\pm 0,8$ ) quando fez uso de PVP – 40 (ALI *et al.*, 2002). BRENNER e colaboradores (2012) obtiveram taxa de blastocisto de 54,6% com o uso de TCM199 suplementado com 10 % de soro fetal bovino. De acordo com os resultados e os dados da literatura, existe uma grande variação nas taxas de produção, logo seria interessante testar as NPs contendo FSH nos meios de maturação com as suplementações mais amplamente utilizadas, no intuito de obter taxas mais elevadas e constantes.

## 7. Conclusões

Na avaliação dos produtos comerciais que oferecem atividade de FSH não foi possível detectar o FSH com as técnicas utilizadas no presente trabalho, porém não é descartada a hipótese da presença desse ativo, mesmo em menor concentração. E que apesar da detecção de fragmentos do prohormônio POMC, molécula precursora do ACTH, ter sido encontrado nos produtos comerciais utilizados em protocolos de superestimulação ovariana, as concentrações analisadas no presente estudo do ativo livre (0,007, 0,002 e 0,0009  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e do ativo encapsulado na concentração de 0,007  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  não demonstraram ter influências na expansão das células do *cumulus* e nem mesmo na produção de blastocistos após a fecundação *in vitro*.

A síntese do ACTH foi realizada com sucesso, mesmo sendo um peptídeo de comprimento de cadeia polipeptídica considerada extensa. Quanto ao encapsulamento do produto comercial contendo atividade de FSH, hormônio cuja atividade de expansão das células do *cumulus* em estudo *in vitro* e da superestimulação em estudos *in vivo*, já é bem estabelecida na literatura, foi obtido sucesso, pois apresentou expansão semelhante ao FSH livre, mesmo com 40% a menos do ativo. Isso sugere que pelo fato de o polímero proteger o ativo de degradação, a sua ação pode ser prolongada e otimizada, e consequentemente, reduz a quantidade de ativo necessário para se obter os mesmos resultados. Porém estudos voltados para o sistema *in vivo* necessitam ser realizados.

## 8. Referências Bibliográficas

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. 2010. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**. v.45, p.180-187.

ALVES, N.G.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA, M.R.; ZAMPERLINI, B.; COSTA, F.M.J.; SANTOS, A.D.F.; NETO, T.M. 2002. Atividade ovariana em fêmeas bovinas da raça holandesa e mestiça holandês x zebu durante dois ciclos estrais normais consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 31, p.627-634.

AMWEG, A.N.; PAREDES, A.; SALVETTI, N.R.; LARA, H.E.; ORTEGA, H.H. 2011. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in bovine ovary. **Theriogenology**. v.75, p.628-637.

ARMSTRONG, D. T. 1986. Environmental stress and ovarian function. **Biology of Reproduction**. v.34, p.29-39.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA. 2013. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**. v. 65, p.77-88.

BELLOWS, R.A.; ANDERSON, D.C.; SHORT, R.E. 1969. Dose-response relationships in synchronized beef heifers treated with follicle stimulating hormone. **Journal of Animal Science**. v.28, p.638-644.

BRAY, B. L.2003 Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. **Nature reviews**. v.2, p. 587-593.

BRENNER, M.P.C.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M.C.; GARCIA, A.F.; FLORES, E.F.; CARDOSO, T. 2012. Evaluation of developmental changes in bovine in vitro produced embryos following exposure to bovine *Herpesvirus* type 5. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 10, p.1-10.

BRUXEL, F; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. 2012. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**. v.35, p.1827-1840.

CAIXETA, E.S. 2009. **Expressão de genes candidatos para aquisição da competência ovocitária em bovinos**. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CALADO, A.M.; ROCHA, E.; COLAÇO, A.; SOUSA, M. 2005. Estudo estereológico comparativo de complexos *cumulus*-ovócitos aspirados de folículos durante o ciclo estral em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.57, p.465-475.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**. v.63, p.125-132.

CAMPANA, D.; NORI, F.; PISCITELLI, L.; LABATE-MORSELLI, M.; PEZZILLI, R.; CORINALDESI, R.; TOMASSETI, P. 2007. Cromogranin A: is it a useful marker of neuroendocrine tumor? **Journal of Clinical Oncology**. v.25, p.1967-1973.

CANSECO, R.S.; GWAZDAUSKAS, F.C.; TOOLE, R.J.; RAJAMAHENDRAN, R.; WHITTIER, W.D.; VINSON, W.E. 1992. A retrospective study on the effects of FSH and prostaglandin on superovulation responses in dairy cattle. **Virginia Journal of Science**. v.43, p.325-332.

CAREY, L.C.; SU, Y.; VALEGO, N.K.; ROSE, J.C. 2006. Infusion of ACTH stimulates expression of adrenal ACTH receptor and steroidogenic acute regulatory protein mRNA in fetal sheep. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**. v 291, p.E214–E220.

CASIDA, L.E.; MEYER, R.K.; MCSHAN, W.H.; WISNICKY, W. 1943. Effects of pituitarygonadotrophins on the ovaries and induction of superfecundity in cattle. **American Journal Veterinary Research**. v.4, p.76-94.

CEPEA. Agronegócio. Piracicaba. USP: 2013 In: **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada**. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2013.

CHEMICAL TRADING GUIDE. Disponível em: <<http://www.guidechem.com/cas-132/132880-10-5.html>>. Acesso em: 1 de julho de 2014.

CHUNG, J. T.; TOSCA, L.; HUANG, T. H.; XU, L.; NIWA, K.; CHIAN, R. C. 2007. Effects of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation *in vitro* and subsequent fertilization and embryonic development. **Journal Reproductive Health Care**. v.15, p.198-207.

CHUPIN, D.; PROCUREUR, R. 1983. Efficiency of pituitary extracts (FSH) for induction of superovulation in cattle. **Animal Reproduction Science**. v.6, p.11-23.

COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; ALMEIDA JUNIOR, I.L. 2000. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, p.397-402.

CONLON, J.M. 2007. Purification of naturally occurring peptides by reversed-phase HPLC. **Nature Protocols**. v.2, p.191-197.

CRUZ, M. H. C.; SARAIVA, N. Z.; CRUZ, J. F.; OLIVEIRA, C. S.; COLLADO, M. D.; FERNANDES, H.; CASTRO, F. C.; GARCIA, J. M. 2014. Effect of follicular fluid supplementation during *in vitro* maturation on total cell number bovine blastocysts produced *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.43, p.120-126.

DILBAGHI, N.; KAUR, H.; KUMAR, R.; ARORA, P.; KUMAR, S. 2012. Nanoscale device for veterinary technology: trends and future prospective. **Advanced Materials Letters**. v.4, p.175-184.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. *In vitro* maturation, fertilization and cultured to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**. v.43, p.1211-1226.

ELSDEN, R.P.; NELSON, L.D.; SEIDEL, G.E. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. **Theriogenology**. v.9, p.17-26.

ERWIN, E.R.; CROYLE, M.L.; DONELSON, J.E; MAURER, R.A. 1983. Nucleotide sequence of cloned complementary deoxyribonucleic acid for the alpha subunit of bovine pituitary glycoprotein hormones. **Biochemistry**. v. 22, p.4856-4860.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. 2012. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**.v.90, p.21-27.

FERREIA, E.M.; VEREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANE, F.A.; NAVARRO, P.A.A.S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of development competence. **Theriogenology**. v.71, p.836-848.

GAN, Q.; WANG, T. 2007. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier – systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.59, p.24-34.

GILL, S.C.; HIPPEL, P.H.V. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. . **Analytical Biochemistry**. v.182, p.319-326.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KILICK, L.J.; KOT, K. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**. v. 63, p.383-389.

GIOVANELLA, L. 2005. Serum cromogranin A assay in differential diagnosis of incidentally discovered adrenal masses. **Anticancer Reseach**. v.25, p.1547-1550.

GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M. 2011. Diferentes estratégias para reticulação de quitosana. **Química Nova**. v.34, p.1215-1223.

GORDON, I. 2004 Superovulation. **Encyclopedia of Animal Science**. v.1:1, p.814-817.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. 2009. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, p.82-94.

GU, Z.; AIMETTI, A. A.; WANG, Q.; DANG, T.T.; ZHANG, Y.; VEISEH, O.; CHENG, H.; LANGER, R.R.; D. G. ANDERSON. 2013. Injectable Nano-Network for Glucose-Mediated Insulin Delivery. **American Chemical Society**. v.30, p.1-8.

GUELFY, G.; ZERANIC, M.; BRECCHIA, G.; PARILLO, F.; DALL'AGLIO, C.; MARANESIA, M.; BOITI, C. 2011. Direct actions of ACTH on ovarian function of pseudopregnant rabbits. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.339 , p. 63-71.

HAVLICEK, V.; LOPATAROVA, M.; CECH, S.; DOLEZEL, R.; HUBER, T.; PAVLOK, A.; BREM, G.; BESENFELDER, U. 2005. *In vivo* culture of bovine embryos and quality assessment of *in vivo* vs. *in vitro* produced embryos. **Veterinary Medicine**. v.50, p.149-157.

HONARY,S.; ZAHIR, F. 2013. Effect of Zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems – a review (part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v.12, p.265-273.

HSIEH, Y.; CHATTERJEE, A.; CHIEN, Y.; YU, J.Y. 2001. Molecular cloning of the cDNAs for pituitary glycoprotein hormone  $\alpha$  subunits of two species of duck and their gene regulation. **Journal of Molecular Endocrinology**. v.27, p.239-347.

JOHN, A.L.S.; CHAN, C.Y.; STAATS, H.F.; LEONG, K.W.; ABRAHAM, S.N. 2012. Synthetic mast-cell granules as adjuvants to promote and polarize immunity in lymph nodes. **Nature Materials**. v.11, p.250-257.

KANITZ, W.; BECKER, F.; SCHNEIDER, F.; KANITZ, E.; LEIDING, C.; NOHNER, H.; PÖHLAND, R. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. **Reproduction Nutrition Development**. v.42, p587-599.

KAWATE,N.; INABA, T.; MORI. 1992. Effects of cortisol on the amounts of estradiol-17 $\beta$  and progesterone secreted and the number of luteinizing hormone receptors in cultured bovine granulosa cells. **Animal Reproduction Science**. v.32, p.15-25.

KRUG, H.F.; WICK, P. 2011. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. **Angewandte Chemie International**. v.50, p.1260-1278.

LAMPROU, D.M.; VENKATPURWAR, V.; KUMAR, M.N.V.R. 2013. Atomic force microscopy images label-free, drug encapsulated nanoparticles in

vivo and detects difference in tissue mechanical properties of treated and untreated: a tip for nanotoxicology. **PLOS ONE**. v.8, p. 1-5.

LI, F.; TAILHADES, J.; CHAN, L.J.; BATHGATE, R.A.D, HOSSAIN, M.A.; WADE, J.D. 2013. Preparation of canine relaxin by Fmoc-solid phase synthesis and regioselective disulfide bond formation within the A-and B-chains. **Biochemical Compounds**. v.4, p.1-6.

MACEDO, G.C.; ZUCCARI, C.E.S.N.; COSTA E SILVA, E.V. 2012. Efeito do estresse na eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.36, p.10-17.

MAGALHÃES, D.M.; FERNANDES, D.D.; ARAUJO, V.R.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. 2009. Papel do hormônio folículo estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, p.171-182.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**. v.42, p.601-611.

MEDEIROS, K.A. 2011. **Desenvolvimento e Testes in vitro de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais**. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

MINGOTI, G, Z.; CASTRO, V. S. D. C.; MÉO, S. C.; BARRETTO, L. S. S.; GARCIA, J. M. 2011. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocytes maturation and embryo development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**. v.47, p.361-368.

MONTEIRO, F.M.; FERREIRA M.M.G.; POTIENS, J.R; EBERHARD, B.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C M. .2010. Influence of superovulatory protocols on *in vitro* production of nellore (*Bos indicus*) embryos. **Reproduction in Domestic Animals**. v.45, p.860-864.

NARAYANAN, D.; ANITHA, A.; JAYAKUMAR, R.; NAIR, S.V.; CHENNAZHI, K.P. 2012. Synthesis, characterization and preliminary *in vitro* evaluation of PTH 1-34 loaded chitosan nanoparticles for osteoporosis. **American Scientific Publishers**. v.8, p.1-9.

NUM, S.M.; USEH, N.M. 2013. Nanotechnology applications in veterinary diagnostics and therapeutics. **Sokodo Journal of Veterinary Sciences**. v. 11, p.10-14.

QI, J.; YAO, P.; HE, F.; YU. C.; HUANG, C. 2010. Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core – doxorubicin loading and delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 393, p.176-184.

RAFFERTY, B.; MOWER, J.A.; WARD, H.L.; ROSE, M. 1995. Differences in carbohydrate composition of FSH preparations detected with lectin-ELISA systems. **Journal of Endocrinology**. v.145, p.527-533.

RAFFIN-SANSON, M.L.; KEYZER, Y.; BERTAGNA, X. 2003. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. **European Journal of Endocrinology**. v.149, p.79-90.

RATHER, M.A.; SHARMA, R.; GUPTA, S.; FERROSEKHAN, S.; RAMYA, V. L.; JADHAO, S.B. 2013. Chitosan-Nanoconjugated Hormone Nanoparticles for Sustained Surge of Gonadotropins and Enhanced Reproductive Output in Female Fish. **Plos one**. v.8, p.1-10.

ROSALES-TORRES, A.M.; SÁNCHEZ,A.G.;AGUILAR, C.G. 2011 Follicular development in domestic ruminants. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**. v.15, p.147-160.

SÁ FILHO, O.G.; DIAS, C.C.; FILHO, E.R.R.; IWAMURA, J.; OBA, E. 2008. Concentrações séricas de cortisol e temperatura retal no momento da aspiração folicular em vacas e suas correlações com o subsequente desenvolvimento embrionário *in vivo* e prenhez. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, p.510-520.

SANTANA, A.P.; MORAES, L.P.; MURATA, L.S.; TORRES, F.A. 2008. Sequenciamento e análise dos genes das subunidades alfa e beta do hormônio foliculo estimulante de bovino (*Bos taurus indicus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p.496-505.

SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J. R.; 2010. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.34, p.206-221.

SCOTT, N. R. 2007. Nanoscience veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**. v.31, p.139-144.

SCRIPES, N. A.; MACIOSZEK, M. A.; BAHLS, L. D.; AOKI, M. N.; WATANABE, M. A. E.; MAZZUCO, T. L. 2009. Expressão de genes relacionados à função adrenocortical no estado de caquexia neoplásica. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. v. 31, p. 133-141.

SEIDEL, G. E.; LARSON, L. L.; FOOTE, R. H. 1971. Effects of age and gonadotropina treatment on superovulation in the calf. **Journal of Animal Science**. v.33, p.617-622.

SENEL, S.; MCCLURE, S.J. 2004. Potencial applications of chitosan in veterinary medicine. **Advance Drug Delivery Reviews**. v.56, p.1467-1480.

SHAIK , M. R.; KORSAPATI, M.; PANATI, D. 2012. Polymers in Controlled Drug Delivery Systems. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.2, p.112-116.

SIVANANDAIAH, K.M.; GURUSIDDAPPA, S.; GOWDA, D.C.; BABU, V.V.S. 1989. Improved solid phase synthesis of luteinizing hormone releasing hormone analogues using 9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino acid active esters and catalytic transfer hydrogenation with minimal side-chain protection and their biological activities. **Journal of Bioscience**. v.14, p.311-317.

SLAWIK,M.; REISCH, N.; ZWERMANN, O.; MASER-GLUTH, C.; STAHL, M.; KLINK, A.; REINCKE, M.; BEUSCHLEIN, F. 2004. Characterization of an Adrenocorticotropin (ACTH) Receptor Promoter Polymorphism Leading to Decreased Adrenal Responsiveness to ACTH. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.89, p.3131–3137.

STAIGMILLER, R.B. 1988. *In vitro* methods for production of viable oocytes. **Journal of Animal Science**. v.66, p.54-64.

TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. 1985. Inductions of superovulation using several FSH regimens in Holstein-Friesian heifers. **Journal of Veterinary Research**. v.33, p.45-50.

TETZNER, T.A.D. 2007. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 115f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2007.

TIYABOONCHAI, W. 2003 Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**. v.11, p. 51-66

TRÍBULO, A.; ROGAN, D.; TRÍBULO, H.; TRÍBULO, R.; MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single

intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. **Theriogenology**. v.77, p.1679-1685.

TOUMEY, C. 2008. Reading Feynman into nanotechnology: a text for a new science. **Techné: research in philosophy and technology**. v.12, p.133-168.

VERMA, A. K.; SINGH, V. P.; VIKAS, P. 2012 Application of nanotechnology as a tool in animal products processing and marketing: an overview. **American Journal of Food Technology**. v.7, p.445-451.

XIAO, K.; LI, Y.; LUO, J.; LEE, J.S.; XIAO, W.; GONIK, A.M.; AGARWAL, R.; LAM, K.S. 2011. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. **Biomaterials**. v.32, p.3435-3446.

WANG, J.J; ZENG, Z.W.; XIAO, R.Z.; XIE, T.; ZHOU, G.L.; ZHAN, X.R.; WANG, S.L. 2011. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**. v.6, p.765-774.