



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020026197-5 A2



(22) Data do Depósito: 21/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/07/2022

(54) **Título:** MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS EM POLI (ÁCIDO LÁTICO), DISPOSITIVO IMPLANTÁVEL OBTIDO E RESPECTIVO USO

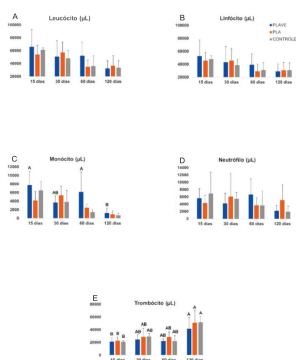
(51) **Int. Cl.:** A61K 47/32; A61K 31/355.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** GABRIEL CONDE; MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO; IVES CHARLIE DA SILVA.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS EM POLI (ÁCIDO LÁTICO), DISPOSITIVO IMPLANTÁVEL OBTIDO E RESPECTIVO USO. Trata-se de método de encapsulamento de substâncias em Poli(ácido láctico) - PLA - e dispositivo implantável obtido para uso como carreador vacinal e farmacológico para liberação controlada de substâncias como vitamina E, fármacos e agentes imunizantes permitindo, assim, fácil aplicação em animais, uma vez que, é inserido através de agulha e permite a implantação por via subcutânea e intraperitoneal viabilizando a imunização de animais em geral.

FIG.1



**“MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS EM POLI (ÁCIDO LÁTICO),
DISPOSITIVO IMPLANTÁVEL OBTIDO E RESPECTIVO USO”.**

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata de método de encapsulamento de substâncias em Poli(ácido láctico) - PLA - e dispositivo implantável obtido para uso como carreador vacinal e farmacológico para liberação controlada de substâncias como vitamina E, fármacos e agentes imunizantes permitindo, assim, fácil aplicação em animais, uma vez que, é inserido através de agulha e permite a implantação por via subcutânea e intraperitoneal viabilizando a imunização de animais em geral.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] O Poli(ácido láctico) - PLA - vem sendo pesquisado em muitas áreas do conhecimento por obter características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioabsorção, não apresenta toxicidade aparente ao organismo animal e humano, podendo ser moldado a altas temperaturas.

[003] Tais características encorajaram pesquisadores a buscar novas formas de utilização a esse material como agregar fármacos, compostos orgânicos e antígenos. Porém, o Poli(ácido láctico) - PLA - até então só poderia ser modelado à altas temperaturas o que inviabilizava a incorporação de alguns compostos.

[004] Fessi et al. (1989) publicaram metodologia nova e simples para a preparação de nanocápsulas por dissolução do Poli(ácido láctico) - PLA - em acetona, um solvente semi-polar miscível com água a partir de uma solução lipofílica para incorporação de indometacina. Essa técnica foi extremamente estudada e melhorada para a incorporação de inúmeros compostos como veículos de liberação de fármacos (O'Donnel; McGinity, 1997; Feng et al., 2002; Park et al., 2005) e antígenos vacinais (Pavot et al., 2014; Behera et al., 2010). As técnicas utilizadas pelos pesquisadores citados acima são denominadas como '*Oil-in Water*' (o/w) e '*Water-in-oil-in-Water*' (w/o/w).

[005] Ocorre que, as metodologias supracitadas necessitam de insumos e equipamentos específicos para misturar, secar e liofilizar o Poli(ácido láctico) - PLA - agregado a fármacos ou antígeno, além disso as técnicas permitem uma única forma de

apresentação que são as nanopartículas. A técnica utilizada na engenharia de materiais para misturar dois ou mais polímeros ou biopolímeros é a extrusão. Essa técnica permite dar formas aos biomateriais, porém, é necessário altas temperaturas para atingir o ponto de fusão.

[006] Tice et al. (2007) descrevem a incorporação de vitamina B12, deslorelina e risperidona por meio de extrusão a 90°C, porém, não faz menção nem requisição quanto ao formato do dispositivo no pedido de patente.

[007] Em estudo científico Li et al. (2013), utilizam processo de extrusão a 110°, 160°, 180°, 185°C para incorporar dexametasona em Poli(ácido lático) - PLA. Entretanto, os pesquisadores produziram dispositivos a partir da extrusão semelhantes ao proposto, porém, não há informação sobre as dimensões, apenas o comprimento dos dispositivos de mais ou menos 1 centímetro. Citam apenas que os dispositivos foram implantados em ratos por meio de técnica cirúrgica. A utilização de altas temperaturas para extrusão pode inviabilizar a incorporação de produtos orgânicos, fármacos e antígenos vacinais como, bactérias, vírus ou proteínas utilizadas em imunização pois, são completamente destruídos a altas temperaturas. Diferentemente, a presente tecnologia que compreende um processo que pode ser completamente realizado em temperatura ambiente.

[008] Gresser et al. (1995) propuseram um sistema biodegradável de liberação multifásica que inclui uma ou mais unidades de ruptura, ou seja, cada unidade de ruptura inclui um composto bioativo que é encapsulado e liberado em um tempo pré-determinado após a exposição a substâncias aquosas, fluidos corporais ou fluidos ambientais. Desse modo, a liberação total do composto bioativo se assemelha a utilização por via oral ou por meio de aplicação intramuscular ou subcutânea. A presente tecnologia se distingue do apresentado por Gresser et al. (1995) pois, ao ser implantada libera o composto incorporado ao Poli(ácido lático) - PLA - ao longo do tempo, sem interrupção e em pequenas doses diárias.

[009] Assim, é fato que os artigos científicos citados nos parágrafos acima, apesar de pertencerem ao mesmo campo de aplicação, não apresentam nenhuma das características do método ora requerido, uma vez que, a presente tecnologia propõe

como efeito e diferencial técnico a possibilidade de aplicação por via intraperitoneal ou subcutânea, não necessitando de procedimento cirúrgico, pois se utiliza agulha e aplicadores comerciais garantindo, assim, que o mesmo atenda aos requisitos legais de patenteabilidade.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[010] É objetivo da invenção apresentar um método de encapsulamento de substâncias em Poli(ácido láctico) - PLA - e dispositivo implantável obtido para uso como carreador vacinal e farmacológico para liberação controlada de substâncias como vitamina E, fármacos e agentes imunizantes em animais.

[011] É objetivo da invenção apresentar um dispositivo implantável obtido com fácil aplicação em animais, uma vez que, é inserido através de agulha e permite a implantação por via subcutânea e intraperitoneal.

[012] É objetivo da invenção apresentar dispositivo implantável obtido cuja liberação lenta no organismo do animal permite a incorporação do composto ao longo do tempo.

TESTES

[013] Para avaliação clínica, biocompatibilidade e biodegradação setenta e três tilápias do Nilo machos jovens (243.82 ± 56.74 g peso total) foram randomizadas e distribuídas em 3 tanques com capacidade de 1000 L de água desprovido de cloro em sistema com recirculação aerados a um fluxo de 4 L min^{-1} . Os peixes foram alimentados com ração comercial (3% de biomassa, 28% de GP e $4000 \text{ kcal de GE kg}^{-1}$). A qualidade da água foi avaliada a cada três dias para que fosse mantida dentro da faixa adequada para o conforto dos peixes (Boyd, 1990) (oxigênio dissolvido $4.07 \pm 0.89 \text{ mg L}^{-1}$; temperatura = $27.64 \pm 2.05 \text{ }^{\circ}\text{C}$; potencial hidrogênio iônico (pH) = 7.64 ± 0.54 ; e condutividade elétrica = $608.29 \pm 197.57 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$) avaliado com YSI Model MPS 556 probe. Os peixes foram mantidos neste sistema por 3 meses antes do início deste estudo. Divididos em três grupos: grupo PLAVE: PLA + Vitamina E ($n = 32$), grupo PLA: PLA puro ($n = 32$) e grupo controle ($n = 9$). Este trabalho foi aprovado Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), Jaboticabal/SP – Brasil (nº 08665/19) e seguiu as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

[014] Os dispositivos foram preparados em duas formulações, Poli(ácido láctico) - PLA - contendo 100% PLA e PLAVE contendo Poli(ácido láctico) - PLA e vitamina E. Basicamente, 500 mg de Poli(ácido láctico) (PLA grade: Ingeo 3251D), manufaturado por NatureWorks Co., Ltd, foi dissolvido em diclorometano (DMC) em agitação durante 20 minutos. Após a dissolução, vitamina E foi adicionada ao Poli(ácido láctico) - PLA - dissolvido (Mu e Feng, 2002). Assim, PLA ou PLAVE foram colocados em capilares de vidro mantidos à temperatura ambiente durante quatro dias para secagem. Os dispositivos foram retirados dos capilares e seccionados com 1 cm de comprimento. Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína (SAB) 1:10.000 (v:v) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri 63178, EUA). Os dispositivos foram imersos em etanol 70% por uma hora e seco em estufa (Ciambelli et al., 2013; Miszuk et al., 2018). Utilizando um aplicador comercial AnimalTag®, o PLAVE e PLA foram implantados por via intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC).

[015] Os peixes foram rapidamente pescados e anestesiados 15, 30, 60 e 120 dias pós-implantação. Utilizando agulha 23 x 18 e seringa de 3 ml revestida com heparina de lítio, aproximadamente 2 ml de sangue foi coletado lateralmente a partir da veia caudal. Imediatamente após a coleta, dois esfregaços de sangue foram feitos em lâminas de vidro e deixados secar ao ar. O sangue restante foi transferido para dois tubos de sangue de microhematócrito. Ato contínuo, outros 2 ml de sangue foram coletados em seringa sem heparina de lítio, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos a 4° C para obtenção de soro. Após a coleta de sangue, os peixes foram eutanasiados por exposição prolongada em SAB 1:500 (v:v).

[016] Os dispositivos implantados no SC foram retirados juntamente com tecido subcutâneo e musculatura, os implantados IP foram retirados juntamente com omento. Os implantes poliméricos juntamente com fígado, baço e rim caudal coletados foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4) por um período de 24 horas. Após, as amostras foram clivadas e desidratadas em séries crescentes de álcool, clarificadas em xilol e incluídas em parafina (Synth, Brazil), e cortes histológicos de 5,0 µm de espessura foram feitos com micrótomo.

[017] Os dispositivos foram corados com hematoxilina-eosina (HE), visualizados em

microscópio óptico (Carl Zeiss Jena, Alemanha) e as imagens capturadas utilizando software (Opton CMOS). As reações teciduais aos implantes foram classificadas quantitativamente utilizando escore de pontuação numérico: 1-reação leve, 2-reação moderada, 3-reação intensa e 4-reação severa de acordo com os critérios propostos por De Jung et al. (2005).

[018] Fígado, baço e rim caudal foram corados com HE e avaliados por microscopia óptica em busca de alterações histopatológicas. Além disso, o baço foi corado por azul de toluidina, Perl's (hemossiderina – pigmento azul férrico) e Schmorl's (lipofucsina – pigmento marron) de acordo com (Manrique et al., 2019).

[019] Para avaliação morfométrica dos centros de melanomacrófagos, cinco campos foram selecionados aleatoriamente em cada lâmina (para cada uma das três colorações supracitadas) e um total de 35 leituras para os peixes implantados com PLAVE e PLA e 15 para controle em cada período de avaliação (15, 30, 60 e 120 DPI) com ampliação de 200 x. Após cada campo ter sido fotografado (Opton CMOS TA-0124-D), a área foi medida (μm^2) e o número de MMCs por campo foi contado. A metodologia empregada na determinação morfométrica foi utilizada para determinar os pigmentos contidos nas MMCs. A medida de área e a porcentagem de cada pigmento foi analisada utilizando programa Image-J (Schneider et al., 2012).

[020] As lâminas de extensão foram coradas com corante “*May-Grunwald-Giemsa-Wright*” segundo Tavares-dias e Moraes (2003), estabelecendo percentual de cada tipo celular de interesse. A contagem direta de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer, utilizou-se a solução de Natt e Herrick na proporção de 1:100 v:v. Os eritrócitos foram quantificados nos cinco quadrantes secundários em diagonal do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 5000. A determinação total de leucócitos e trombócitos foram quantificados todos juntos nos 25 quadrantes secundários do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 1000.

[021] Para determinação da atividade respiratória de leucócitos (burst oxidativo) foi utilizada solução 0,2% de nitroblue tetrazoliu (NBT, Sigma, St. Louis, MO, EUA) pH 7,4 preparada em acordo com Biller-Takahashi et al., 2013. Para tanto, foram utilizados 100 μL de sangue heparinizado adicionados a 100 μL de solução de NBT. A mistura (sangue

+ sol. NBT) foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25 ° C. Após a incubação, a mistura foi homogeneizada, ato contínuo, foi adicionado 50 µL a 1 ml de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St. Louis, MO, EUA) homogeneizada e centrifugada a 3000 g durante 5 minutos. Imediatamente, o sobrenadante é apirado e a densidade óptica (DO) determinada no espectrofotômetro (Beckman DU-70S) a 540 nm.

[022] A glicemia dos animais foi determinada utilizando o aparelho Accu-Chek Performa. Sangue total e soro foram destinadas a avaliação da atividade hepática de fosfatase alcalina (FA), proteínas totais, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e hemoglobina utilizando reagentes comerciais (Labtest®) e analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest – Bioplus®)(Belo et al., 2012).

[023] Os dados foram verificados quanto a normalidade utilizando teste de Shapiro-Wilk test. O experimento seguiu delineamento fatorial 3 x 2 x 3 (três tratamentos, dois sítios de implantação e quatro tempos de avaliação) em concordância com Littell et al., 1998). As análises de variância para comparar os diferentes grupos experimentais foram realizadas aplicando General Linear Model (GLM) Procedure (SAS Institute Inc., 2001). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram estimadas com base no teste de Tukey (Kaps; Lamberson, 2017). As reações teciduais aos implantes classificadas quantitativamente, foram comparadas pelo teste de Friedman não paramétrico (ANOVA) para duas vias. Para tanto, as classificações foram submetidas ao Rank Procedure e posteriormente ao General Linear Model (GLM) Procedure (Thompson; Ammann, 1990). As médias foram comparadas pelo teste T ($p < 0,05$).

[024] Análises hematológicas de tilápias implantadas com dispositivo de Poli (ácido láctico) mais vitamina E (PLAVE), Poli (ácido láctico) puro (PLA) e grupo controle estão apresentados na Tabela 1. O grupo PLAVE apresentaram aumento significativo na quantidade de eritrócitos aos 120 DPI em relação a 15 ($p = 0.0095$) e 60 DPI ($p = 0.0187$). Semelhante, houve aumento de hemoglobina significativa no mesmo período ($p = 0.0076$; $p = 0.0442$ respectivamente) e, aumento significativo na porcentagem de hematócrito aos 120 DPI em relação a 15 DPI ($p = 0.0354$). O grupo PLA apresentou aumento significativo no número de eritrócitos aos 120 DPI em relação a 15 DPI ($p =$

0.0214). Não houve diferença significativa nas variáveis hematológicas analisadas entre os grupos em todo o período experimental ($p > 0.05$).

[025] Tabela 1. Média^a $\pm$ Desvio Padrão e ANOVA^b observadas em estudo hematológico em tilápias do Nilo avaliadas 15, 30, 60 e 120 dias pós-implantação (DPI) de Poli(ácido láctico) mais vitamina E (PLAVE), Poli (ácido láctico) puro (PLA) e grupo controle.

Período (DPI)	Tratamento	Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	VCM ^c (fL)	HCM ^c (pg)	CHCM ^c (g/dL)
15	PLAVE	1.69 $\pm$ 0.37 ^B	21.00 $\pm$ 3.86 ^B	6.12 $\pm$ 1.43 ^B	125.76 $\pm$ 17.39	36.10 $\pm$ 0.55	29.22 $\pm$ 4.44
	PLA	1.67 $\pm$ 0.40 ^B	23.57 $\pm$ 7.03	6.04 $\pm$ 1.56	140.09 $\pm$ 13.81	36.00 $\pm$ 0.80	25.90 $\pm$ 2.44
	Controle	1.46 $\pm$ 0.35	23.33 $\pm$ 7.57	5.20 $\pm$ 1.37	159.80 $\pm$ 23.13	35.61 $\pm$ 0.86	22.62 $\pm$ 3.54
30	PLAVE	1.87 $\pm$ 0.40 ^{AB}	22.86 $\pm$ 3.65 ^{AB}	6.80 $\pm$ 1.57 ^{AB}	111.74 $\pm$ 10.79	36.35 $\pm$ 0.56	30.42 $\pm$ 7.45
	PLA	1.82 $\pm$ 0.55 ^{AB}	24.64 $\pm$ 5.09	6.64 $\pm$ 2.15	138.99 $\pm$ 24.76	35.25 $\pm$ 0.59	26.93 $\pm$ 5.68
	Controle	2.07 $\pm$ 0.25	25.00 $\pm$ 8.66	7.61 $\pm$ 0.96	124.84 $\pm$ 53.00	36.68 $\pm$ 0.26	35.00 $\pm$ 19.86
60	PLAVE	1.76 $\pm$ 0.29 ^B	24.71 $\pm$ 4.15 ^{AB}	6.64 $\pm$ 1.29 ^B	131.91 $\pm$ 11.58	38.33 $\pm$ 8.95	26.78 $\pm$ 1.56
	PLA	1.82 $\pm$ 0.46 ^{AB}	24.00 $\pm$ 6.38	6.28 $\pm$ 1.55	133.56 $\pm$ 28.90	34.62 $\pm$ 3.84	26.87 $\pm$ 6.07
	Controle	1.86 $\pm$ 0.22	29.67 $\pm$ 0.58	7.77 $\pm$ 0.42	161.05 $\pm$ 18.68	42.07 $\pm$ 3.37	26.22 $\pm$ 1.76
120	PLAVE	2.78 $\pm$ 0.72 ^A	32.14 $\pm$ 4.66 ^A	9.43 $\pm$ 0.44 ^A	120.73 $\pm$ 28.67	35.63 $\pm$ 7.94	29.92 $\pm$ 4.69
	PLA	2.82 $\pm$ 0.80 ^A	27.00 $\pm$ 4.81	8.39 $\pm$ 1.09	99.38 $\pm$ 17.09	31.64 $\pm$ 8.26	31.52 $\pm$ 4.17
	Controle	2.29 $\pm$ 0.64	23.33 $\pm$ 5.77	7.16 $\pm$ 0.90	102.83 $\pm$ 7.26	32.21 $\pm$ 5.07	31.25 $\pm$ 3.45
Tratamento		0.23	0.04	0.56	1.40	1.34	0.27
Tempo		10.62	1.90	6.66	6.27	2.79	2.44
Tratamento x Tempo		0.53	1.46	1.33	1.85	0.91	0.90
CV		24.95%	23.13%	21.29%	18.55%	13.05%	22.50%

a Médias PLAVE e PLA ($n = 7$), controle ($n = 3$) por período experimental seguidas da mesma letra não diferem no teste Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

b Letras maiúsculas nas colunas comparam cada tratamentos no período experimental 15,30,60 e 120 dias pós implantação.

c VCM = Volume corpuscular médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular média; CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.

[026] O leucograma (Figura 1) revelou redução na quantidade de monócitos em todos os grupos estudados, porém, apenas PLAVE apresentou significância ($p < 0.05$) (Fig.1C). Diferentemente, observou-se aumento na quantidade de trombócitos em todos os

grupos (Fig.1E). Pode ser observado redução aos 120 DPI em relação aos 15 DPI na quantidade de leucócitos totais (51.15%, 32.21% e 54.68%) e linfócitos totais (45.24%, 32.86% e 35.52%) nos grupos PLAVE, PLA e controle respectivamente, porém, sem significância estatística ($p > 0.05$).

[027] Foi observada correlação positiva ($p = 0.0040$) entre os valores da atividade respiratória de leucócitos e número absoluto de trombócitos nas 28 amostras de sangue do grupo PLAVE (Figura 2). Enquanto, os outros grupos avaliados não apresentaram significância. A correlação entre o número absoluto de neutrófilos mais monócitos e atividade respiratória dos grupos avaliados demonstrou correlação negativa sem significância para PLAVE e PLA. Por outro lado, o grupo controle apresentou correlação negativa significativa ($p = 0.0074$).

[028] Testes bioquímicos (Figura 3) apontaram aumento ($p < 0.05$) na enzima Alanina Aminotransferase (ALT) somente no grupo PLAVE aos 30 DPI (Figura 3A). O mesmo grupo, apresentou aumento significativo na quantidade de proteína total plasmática aos 120 DPI em relação a 15 e 30 DPI (Figura 3D).

- Análises macroscópicas e histológicas

A avaliação macroscópica revelou aderência dos dispositivos ao omento e as alterações histológicas observadas nos grupos PLAVE e PLA implantados pela via IP e SC estão apresentadas na Tabela 3. Em todas as lâminas histológicas de implantações intraperitoneal e subcutânea pudemos observar infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear difuso (linfócitos e macrófagos) (Figura 4A; E) (Figura 5A; E). O grupo PLAVE implantado por via SC, demonstrou infiltrado inflamatório elevado aos 30 DPI em relação a PLAVE IP ($p = 0,0071$), PLA IP ($p = 0,0235$), PLA SC ($p = 0,0182$) e aos períodos experimentais 15 e 120 DPI ($p = 0,0182$; $p = 0,0201$) respectivamente. Sessenta dias pós implantação PLA IP apresentou menor infiltrado inflamatório em relação a PLAVE IP ($p = 0,0356$), PLAVE SC ($p = 0,0201$) e PLA SC ($p = 0,0129$).

[029] A primeira avaliação aos 15 dias pós-implantação foi possível constatar pavimentação dos macrófagos entre o implante e a cápsula. Nas avaliações seguintes os macrófagos pavimentados adjacentes a cápsula fibrosa, emitiram projeções citoplasmáticas envolvendo partes dos polímeros (Figuras 4B, 4C, 4D, 4F, 4G e 4H)

(Figuras 5B, 5C, 5D, 5F, 5G e 5H). Em torno dos implantes de PLAVE implantados SC, pode-se observar formação de cápsula moderada presente aos 15 DPI sendo superior a PLA SC ($p = 0,0108$). Aos 30 DPI, PLAVE IP obteve capsula mais delgada em relação à PLAVE SC e PLA IP ($p = 0,0302$; $p = 0,0089$) respectivamente. O mesmo período foi inferior aos 60 e 120 DPI ($p = 0,0355$; $p = 0,0250$). O grupo PLA SC apresentou cápsula mínima em relação a todos os períodos estudados sendo significativo em relação aos 60 DPI ($p = 0,0392$). Neovascularização na cápsula fibrosa pode ser verificada com maior intensidade aos 15 e 30 DPI, aos 60 e 120 DPI uma menor intensidade de vasos foi observado ao longo da cápsula. Porém, aos 60 e 120 DPI, foi observado notável aumento no diâmetro de vasos sanguíneos próximos há células gigantes de corpo estranho (CGCE).

[030] Junto as CGCE pontos focais de fagocitose principalmente aos 60 DPI os grupos PLAVE IP e SC foram superiores ao PLA IP ($p \leq 0,0024$). Aos 120 DPI nas implantações PLAVE e PLA IP foram observados maiores pontos de fagocitose (Figuras 4D, 4H) (Figuras 5D; 5H). Além disso, aos 15 DPI houve crescimento celular no interior do dispositivo em um único animal implantado com PLAVE por via IP. Um maior crescimento celular pode ser observado no grupo PLAVE IP aos 30 e 60 DPI em relação a 15 DPI e 120 DPI ($p \leq 0,0233$). No mesmo período (30 e 60 DPI) PLAVE IP e SC apresentaram crescimento celular dentro do disposto significativo em relação a PLA IP e SC ($p \leq 0,0046$) (Figuras 4D e 4H) (Figuras 5D e 5H). Ademais não foram observadas alteração estruturais e celulares em tecido hepático e renal.

[031] Tabela 3. Escores de pontuação (Média $\pm$ DP) e análise de variância (ANOVA) utilizados para classificação das variáveis cápsula, infiltrado inflamatório, fagocitose, degradação e crescimento celular analisadas por microscopia óptica dos dispositivos de PLAVE e PLA nos de momentos 15, 30, 60 e 120 dias após implantação intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC) em tilápias do Nilo.

Período DPI	Tratamento	Local de implantação	Cápsula	Infiltrado Inflamatório	Fagocitose	Crescimento Celular
15	PLA VE	IP	5,70 $\pm$ 3,01 ^{ABab}	6,60 $\pm$ 4,01	6,00 $\pm$ 0,00	6,60 $\pm$ 2,46 ^B
	PLA	IP	6,25 $\pm$ 3,89 ^{ab}	5,50 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00 ^{AB}	5,50 $\pm$ 0,00 ^{AB}
	PLAVE	SC	9,00 $\pm$ 0,00 ^a	5,50 $\pm$ 0,00 ^B	6,00 $\pm$ 0,00 ^B	5,50 $\pm$ 0,00

	PLA	SC	3,50 ± 0,00 ^{Bb}	5,50 ± 0,00	6,00 ± 0,00	5,50 ± 0,00
30	PLAVE	IP	4,50 ± 0,00 ^{Bb}	5,50 ± 0,00 ^b	8,13 ± 3,25	10,38 ± 2,25 ^{Aa}
	PLA	IP	8,30 ± 3,62 ^a	6,80 ± 2,91 ^b	6,50 ± 0,00 ^{AB}	4,50 ± 2,24 ^{Bb}
	PLAVE	SC	8,50 ± 5,66 ^a	12,00 ± 0,00 ^{Aa}	6,50 ± 0,00 ^{AB}	10,00 ± 2,12 ^a
	PLA	SC	7,25 ± 3,89 ^{ABab}	5,50 ± 0,00 ^b	6,50 ± 0,00	3,50 ± 0,00 ^b
60	PLAVE	IP	7,50 ± 0,00 ^A	8,10 ± 3,13 ^a	8,70 ± 3,83 ^{ab}	10,70 ± 2,46 ^{Aa}
	PLA	IP	7,50 ± 0,00	4,25 ± 3,50 ^b	4,50 ± 0,00 ^{Bc}	5,50 ± 2,89 ^{ABb}
	PLAVE	SC	7,50 ± 0,00	9,50 ± 0,00 ^{ABa}	11,50 ± 0,00 ^{Aa}	7,75 ± 6,72 ^{ab}
	PLA	SC	7,50 ± 0,00 ^A	9,50 ± 0,00 ^a	6,83 ± 4,04 ^{bc}	4,66 ± 2,89 ^b
120	PLAVE	IP	7,50 ± 0,00 ^A	7,50 ± 2,65	8,07 ± 3,56	8,00 ± 3,42 ^{AB}
	PLA	IP	7,50 ± 0,00	8,50 ± 0,00	9,25 ± 4,60 ^A	19,50 ± 4,95 ^A
	PLAVE	SC	7,50 ± 0,00	6,17 ± 4,04 ^B	6,00 ± 0,00 ^B	6,00 ± 0,00
	PLA	SC	7,50 ± 0,00 ^{AB}	8,50 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Tratamento			1,98	1,01	0,94	5,10
Tempo			1,03	1,31	1,09	0,69
Tratamento x tempo			1,26	1,86	1,42	1,53
CV			29,00%	37,23%	35,07%	38,77%

^a Médias ± desvio padrão calculados pelo PROC RANK dos escores de pontuação: 1-reação leve, 2-reação moderada, 3-reação intensa e 4-reação severa de acordo com os critérios propostos por De Jung et al. (2005) seguidos da mesma letra não diferem no teste T (P < 0.05). Letras maiúsculas comparam cada tratamentos no período experimental 15,30,60 e 120 dias pós implantação. Letras minúsculas comparam tratamentos (PLAVE e PLA intraperitoneal e subcutâneo) no período experimental 15,30,60 e 120 dias após implantação.

^b Dispositivos de Poli(ácido láctico) acrescido de vitamina E (PLAVE) e Poli(ácido láctico) puro (PLA).

- Avaliação morfométrica e pigmentação de centros de melanomacrófagos

[032] As análises médias de área, quantidade de centros de melanomacrófagos (CMM) e porcentagem de ocupação dos CMM (Tabela 4), não apresentaram diferença significativa nas comparações.

[033] Coloração de azul de toluidina demonstra presença de melanina, Perl's hemossiderina e '*Schmorl's lipofucsina*' nos MMCs (Figura 6). Pode-se observar na tabela

5 que, aos 15, 60 e 120 DPI houve diferença nos grupos estudados ($p < 0.05$). Ao longo do tempo, porcentagem de melanina foi superior aos 15 e 30 DPI no grupo PLAVE em relação a 60 DPI ($p = 0.0155$; $p = 0.0158$, respectivamente). PLA apresentou porcentagem superior aos 120, 60 e 30 DPI em relação ao início do experimento ($p = 0.033$; $p = 0.0091$; $p = 0.0302$, respectivamente). O grupo PLAVE apresentou alta concentração de hemossiderina aos 60 DPI em relação ao PLA ($p = 0.0070$), controle ($p = 0.0040$) e comparados aos outros períodos ($p \geq 0.0077$). A porcentagem de lipofucsina no grupo controle foi inferior aos 60 DPI ao PLA ($p = 0.0440$) e aos 120 DPI em relação a PLAVE e PLA ($p = 0.0001$) (Tabela 4). PLAVE obteve maior porcentagem aos 120 DPI sendo significativa em relação aos demais períodos experimentais ($p \geq 0.0002$). PLA apresentou porcentagem superior aos 60 DPI em relação 30 DPI ($p = 0.0364$).

[034] Tabela 4: Valores médios^a (Média $\pm$ DP) e análise de variância (ANOVA) das medidas de área (μm^2)^b e número de MMCs^c presentes no baço de '*Oreochromis niloticus*'.

Período (DPI)	Tratamento	Área de MMC	Número de MMCs	% de Ocupação
15	PLAVE	8289.72 $\pm$ 4422.32	3.03 $\pm$ 1.10	8.43%
	PLA	4402.20 $\pm$ 1637.33	3.11 $\pm$ 0.82	4.71%
	CONTROLE	6551.73 $\pm$ 2563.79	4.20 $\pm$ 1.25	7.00%
30	PLAVE	8564.57 $\pm$ 4714.59	2.47 $\pm$ 1.24	9.00%
	PLA	7566.30 $\pm$ 2938.29	3.04 $\pm$ 1.75	8.00%
	CONTROLE	5567.34 $\pm$ 2046.60	2.87 $\pm$ 0.64	5.66%
60	PLAVE	7901.05 $\pm$ 4438.85	2.91 $\pm$ 2.74	8.14%
	PLA	8611.94 $\pm$ 6459.42	2.51 $\pm$ 0.46	9.00%
	CONTROLE	3281.91 $\pm$ 1363.81	3.60 $\pm$ 0.53	3.33%
120	PLAVE	4746.04 $\pm$ 2159.95	2.83 $\pm$ 1.38	5.17%
	PLA	4619.24 $\pm$ 2586.10	3.70 $\pm$ 1.91	5.00%
	CONTROLE	4718.35 $\pm$ 4965.37	3.50 $\pm$ 1.27	5.00%
Tratamento		1.41	0.94	1.32
Tempo		0.82	0.55	0.69
Tratamento x Tempo		0.90	0.33	0.85
CV		59.49%	48.65%	60.27%

^a Valores médios PLAVE e PLA ($n = 35$); controle ($n = 15$) por período experimental seguidos de mesma letra não diferem no teste Tukey-Kramer ($P < 0.05$). ^b Resultados

apresentados em micrometros quadrados (μm^2) obtidos por meio do programa Image-J. c MMCs médios contados em 35 campos / peixes / tratamento (PLAVE; PLA) e em 15 campos / peixes / tratamento (controle) com aumento de 200 x.

[035] Tabela 5. Valores médios e análise de variância (ANOVA)^b das porcentagens de pigmentos contidos nos MMCs nos baços de '*Oreochromis niloticus*'.

Período (DPI)	Tratamento	Melanina (%)	Hemossiderina (%)	Lipofuscina (%)
15	PLAVE	0,55 $\pm$ 0,31 ^{Aa}	0,29 $\pm$ 0,37 ^B	0,17 $\pm$ 0,11 ^B
	PLA	0,11 $\pm$ 0,05 ^{Bb}	0,02 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,03 ^{AB}
	CONTROLE	0,26 $\pm$ 0,12 ^b	0,02 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,05
30	PLAVE	0,53 $\pm$ 0,39 ^{AB}	0,34 $\pm$ 0,18 ^B	0,22 $\pm$ 0,14 ^B
	PLA	0,42 $\pm$ 0,09 ^A	0,31 $\pm$ 0,21	0,12 $\pm$ 0,06 ^B
	CONTROLE	0,24 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,10
60	PLAVE	0,21 $\pm$ 0,18 ^{Cb}	0,73 $\pm$ 0,56 ^{Aa}	0,24 $\pm$ 0,06 ^{Bab}
	PLA	0,49 $\pm$ 0,38 ^{Aa}	0,28 $\pm$ 0,11 ^b	0,27 $\pm$ 0,12 ^{Aa}
	CONTROLE	0,34 $\pm$ 0,07 ^{ab}	0,17 $\pm$ 0,17 ^b	0,10 $\pm$ 0,05 ^b
120	PLAVE	0,35 $\pm$ 0,09 ^{BCab}	0,43 $\pm$ 0,21 ^B	0,45 $\pm$ 0,22 ^{Aa}
	PLA	0,55 $\pm$ 0,21 ^{Aa}	0,16 $\pm$ 0,12	0,14 $\pm$ 0,10 ^{ABb}
	CONTROLE	0,15 $\pm$ 0,07 ^b	0,18 $\pm$ 0,15	0,12 $\pm$ 0,07 ^b
Tratamento		2.69	6.81	9.24
Tempo		0.40	3.09	2.05
Tratamento x Tempo		3.55	0.96	3.58
CV		61.65%	87.70%	54.91%

^a Valores médios PLAVE e PLA (n = 35); controle (n = 15): por período experimental seguidos de mesma letra não diferem no teste Tukey-Kramer (P < 0.05); letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro de cada período experimental; letras minúsculas comparam cada tratamentos ao longo do período experimental específico.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[036] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de desenhos, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[037] a Figura 1 revela Leucograma (média $\pm$ DP); PLAVE e PLA (n = 7), controle (n = 3) seguidas da mesma letra não diferem no teste Tukey-Kramer (P < 0.05). Letras

maiúsculas comparam cada tratamentos no período experimental de Tilápias de Nilo (*Oreochromis Nilotica*) implantadas com dispositivo de Poli (ácido láctico) mais vitamina E (PLAVE), Poli (ácido láctico) puro (PLA) e grupo controle aos 15, 30, 60 e 120 dias pós implantação;

[038] a figura 2 mostra uma tabela de análise de correlação entre os valores da atividade respiratória de leucócitos (burst oxidativo) e número absoluto de neutrófilos mais contagem de monócitos e contagem absoluto de trombócitos no sangue de Tilápias do Nilo implantadas com dispositivo de Poli (ácido láctico) mais vitamina E (PLAVE) e Poli (ácido láctico) puro (PLA) e controle.

^a Leucócitos = Números absolutos de neutrófilos mais monócitos contados no sangue; Trombócitos = número absoluto de trombócitos contados no sangue; Atividade respiratória de leucócitos (NBT assays);

^b Correlação entre todos dos animais (n = 28) PLAVE e PLA; (n = 12) controle.

^c p é o coeficiente de correlação de Spearman; Prob> |p| é a significância de probabilidade para o valor de p;

Gráficos de dispersão da relação do percentual de leucócitos (neutrófilos mais monócitos) e trombócitos pelo percentual da atividade respiratória de leucócitos. ● Neutrófilos mais monócitos; ▲ trombócitos; - linha de tendência (trombócitos x burst); -- linha de tendência (Leucócitos x burst). (Figura 2A) PLAVE; (Figura 2B) PLA e (Figura 2C) Controle;

[039] as figuras 3A, 3B, 3C, 3D e 3E mostram gráficos das análises bioquímicas (média $\pm$ DP) PLAVE e PLA (n = 7), controle (n = 3) seguidas da mesma letra não diferem no teste Tukey-Kramer (P < 0.05). Letras maiúsculas comparam cada tratamentos no período experimental de Tilápias de Nilo (*Oreochromis Nilotica*) implantadas com dispositivo de Poli (ácido láctico) mais vitamina E (PLAVE), Poli (ácido láctico) puro (PLA) e grupo controle aos 15, 30, 60 e 120 dias pós implantação. ALT = Alanina Aminotransferase; AST = Aspartato Aminotransferase; FA = Fosfatase Alcalina;

[040] as figuras revelam fotomicrografias de PLAVE 4A, 4B 4C, 4D e as figuras 4E, 4F, 4G e 4H revelam fotomicrografias de PLA de tilápias do Nilo '*Oreochromis Niloticus*' submetidos a implantação por via intraperitoneal corados com o método da

Hematoxilina-eosina analisados sob microscopia óptica. Quinze dias pós-implantação PLAVE (A) e PLA (E). Infiltrado inflamatório difuso mononuclear no omento e adjacentes a cápsula fibrótica (ca), vasos sanguíneos na cápsula (neovascularização), em omento (setas finas). (DV) região de localização do polímero (A; barra=50µm; E; barra=100µm). Trinta dias pós-implantação PLAVE (B) e PLA (F). Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos e projeções citoplasmáticas no polímero (seta preta grossa), (CC) crescimento celular dentro do polímero. (DV) região de localização do polímero (barra=20µm). Sessenta dias pós-implantação PLAVE (C) e PLA (G) Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos e projeções citoplasmáticas no polímero e projeções citoplasmáticas dos macrófagos envolvendo o polímero (seta preta grossa). (CC) crescimento celular dentro do polímero. (DV) região de localização do polímero (barra=20µm). Cento e vinte dias pós-implantação PLAVE (D) e PLA (H) Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos e projeções citoplasmáticas no polímero e projeções citoplasmáticas dos macrófagos envolvendo o polímero (seta preta grossa) e pontos de fagocitose (*). (CC) crescimento celular dentro do polímero. (DV) região de localização do polímero (barra=20µm);

[041] as figuras 5A, 5B, 5C e 5D mostram fotomicrografias de PLAVE e as figuras 5E, 5F, 5G e 5H mostram fotomicrografias de PLA todas de tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) submetidos a implantação por via subcutânea corados com o método da Hematoxilina-eosina analisados sob microscopia óptica. Quinze dias pós-implantação PLAVE (A) e PLA (E). Infiltrado inflamatório difuso mononuclear no omento e adjacentes a cápsula fibrótica (ca), vasos sanguíneos na cápsula (neovascularização), e tecido cutâneo (setas finas). (DV) região de localização do polímero (barra=20µm). Trinta dias pós-implantação PLAVE (B) e PLA (F). Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos e projeções citoplasmáticas no polímero (seta preta grossa), (CC) crescimento celular dentro do polímero. (DV) região de localização do polímero (barra=20µm). Sessenta dias pós-implantação PLAVE (C) e PLA (G) Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos e projeções citoplasmáticas no polímero e projeções citoplasmáticas dos macrófagos envolvendo o polímero (seta preta grossa). (CC) crescimento celular dentro do polímero, em (C) crescimento celular conecta os

extremos do polímero (ponte celular). Pontos de fagocitose (*). (DV) região de localização do polímero (barra=50µm). Cento e vinte dias pós-implantação PLAVE (D) e PLA (H) Cápsula fibrótica (ca) com pavimentação de macrófagos e projeções citoplasmáticas no polímero e projeções citoplasmáticas dos macrófagos envolvendo o polímero (seta preta grossa) e pontos de fagocitose (*). (CC) crescimento celular dentro do polímero. (DV) região de localização do polímero (D; barra=20µm; E; barra=50µm);

[042] a figura 6 mostra as fotomicrografias corados por azul de toluidina, perl's e schmorl's de centos de melanomacrófagos em baço 15 e 120 dias pós implantação (DPI) de dispositivo de Poli (ácido láctico) + vitamina E (PLAVE); Poli (ácido láctico) puro (PLA) em Tilápias do Nilo (OREOCHROMIS NILOTICA) (barra = 20 µm);

[043] As figuras 7A, 7B, 7C e 7D apresentam os materiais necessários para produção de dispositivos comprimidos de Poli (ácido láctico) em Figura 7A: tubo cônico tipo falcon. Em Figura 7B: Poli (ácido láctico) – PLA. Em Figura 7C: Agitador de tubos utilizado para dissolução de PLA em Diclorometano. Em Figura 7D: Seringa descartável (60 mL), ponteira 50 µL, tubos de vidro com 3,2 mm de diâmetro (parte interna) e 15 cm de comprimento;

[044] as figuras 8A, 8B, 8C, 8D e 8E apresentam o processo de dissolução de Poli (ácido láctico) em diclorometano. Em Figura 8A mostra o Poli (ácido láctico) – PLA (500 mg). Em Figura 8B Diclorometano - DCM. Em Figura 8C PLA + DCM quando se mistura. Em Figura 8D PLA + DCM após 25 minutos de agitação nota-se a total dissolução do PLA. EM Figura 8E PLA + DCM após 25 minutos de agitação notando-se a total dissolução do PLA como representado em Figura 8C. Nesse momento adicionou-se 50 mg de vitamina E (α-tocoferol) a essa mistura no mesmo tubo cônico e agitou-se novamente em agitador de tubos durante 10 minutos;

[045] as figuras 9A, 9B, 9C e 9D representam esquema montado para envase das soluções finais nos tubos de vidro. Em Figura 9A visão geral de ponteira acoplada à seringa e tubo de vidro encaixado a ponteira. Em Figura 9B Visão aproximada do encaixe da ponteira na seringa. Em Figura 9C visão aproximada do encaixe de tubo de vidro em ponteira. Em Figura 9D Tubos de vidro preenchidos com solução final obliterados com algodão (Círculo vermelho);

[046] as figuras 10A, 10B, 10C, 10D e 10E mostram tubos de vidro preenchidos obliterado com algodão observados imediatamente após o envase e um dia após envase. Em Figura 10A: tubo de vidro preenchido com solução final de PLA puro dissolvido em DCM imediatamente após envase. Em Figura 10B: tubo de vidro preenchido com solução final de PLA + vitamina E dissolvido em DCM imediatamente após envase. Em Figura 10C: tubos de vidro preenchidos com PLA um dia após o envase em que é possível notar bolhas e pequena parte mais opaca. Em Figura 10D: tubos de vidro preenchidos com PLA + vitamina E um dia após o envase em que é possível notar bolhas e pequena parte mais opaca apontada com círculo vermelho. Em Figura 10E: Aumento da parte delimitada por círculo vermelho que mostra sinalizado por setas finas pretas: bolhas de ar; parte do PLA seco mas com aspecto de canudo, ou seja, sem preenchimento interno; e parte líquida que será deslocada para que preencha o espaço vazio fazendo com que o material seja compacto;

[047] as figuras 11A, 11B, 11C e 11D mostram tubos de vidro preenchidos obliterado com algodão observados dois e três dias após envase. Em Figura 11A: Nos tubos preenchidos o círculo vermelho aponta para o material seco em forma de “canudo”. Em Figura 11B: Introdução de haste metálica empurrando algodão como um embolo empurrando a solução ainda líquida para dentro do material já seco sem preenchimento (canudo) (elipse vermelha). Em Figura 11C: Demonstra a entrada da solução líquida no interior do material já seco sem preenchimento (canudo) dois dias após envase (seta vermelha). Em Figura 11D: três dias após envase e compressão do algodão como embolo preenchendo o material seco, notar o deslocamento do algodão (seta vermelha);

[048] as figuras 12A, 12B, 12C, 12D, 12E e 12F representam os processos finais de preparo do dispositivo, bem como, sua colocação no interior da agulha acoplada a aplicador e implantação. Em Figura 12A: Régua demonstrando o comprimento do tubo utilizado e do PLA completamente seco. Em Figura 12B: Dispositivo já seccionado com um centímetro de comprimento pronto para ser utilizado. Em Figura 12C: Agulha 2,6 mm x 3 cm acoplado a um aplicador comercial de microchips AnimalTag®. Em Figura 12D: Dispositivo colocado no interior da agulha já acoplada ao aplicador (círculo vermelho). Em Figura 12E: Processo de implantação do dispositivo por via

intraperitoneal em tilápia do Nilo. Em Figura 12F: Processo de implantação do dispositivo por via subcutânea em tilápia do Nilo; e

[049] a figura 13 mostra desenho esquemático do dispositivo obtido em questão.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[050] A presente patente de invenção se refere à “MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS EM POLI (ÁCIDO LÁTICO), DISPOSITIVO IMPLANTÁVEL OBTIDO E RESPECTIVO USO”.

[051] Segundo a presente invenção, dito método de encapsulamento de substâncias em Poli(ácido láctico) - PLA – é compreendido pelas etapas:

- a) O método de encapsulamento inicia-se com a separação dos materiais (ver figura 7), seguindo para a pesagem do Poli (ácido láctico) na proporção de 500 mg/mL (Figura 8A);
- b) Dissolução de 500 mg de Poli (ácido láctico) - PLA - em 1,0 mL de Diclorometano - DCM. O Poli (ácido láctico) - PLA - e Diclorometano - DCM são colocados em tubo de plástico cônico tipo falcon de 50 mL (ver Figura 8B). O PLA e o DCM são colocados no mesmo tubo cônico tipo falcon (Figura 8C);
- c) Inicia-se a agitação contínua em agitador de tubos durante 25 minutos e após completa dissolução do PLA a solução apresenta aspecto viscoso (solução final) (Figura 8D). A partir deste ponto a solução final está pronta para a adição de outro componente como vitamina E α -tocoferol, fármacos e agentes imunizantes, seguindo para outra agitação em agitador de tubos durante 10 minutos (Figura 8E). Caso opte por nada ser adicionado, a solução está pronta para o envase;
- d) Para o envase da solução final (Figura 9A), uma ponteira de 50 μ L é acoplada a ponta da seringa de 60 mL (Figura 9B), ato contínuo, acopla-se o tubo de vidro a ponteira de 50 μ L (Figura 9C). Ato contínuo as extremidades são obliteradas com algodão (Figura 9D). À medida que o Diclorometano - DCM - evapora um dos algodões é empurrado para dentro do tubo de vidro como um embolo, afim de com que o Poli (ácido láctico) - PLA - fique comprimido e obtenha o formato cilíndrico do tubo de vidro. Os tubos já preenchidos com a mistura PLA+DCM são colocados em posição vertical, todo o processo de secagem dura 4 dias (Figura 10). Durante o processo de secagem, a

evaporação do DCM faz com que o PLA fique com aspecto de “canudo”, ou seja, sem preenchimento no interior (Figuras 10D e 10E). Tendo em vista essa característica indesejada, com auxílio de uma haste metálica rígida, empurra-se o algodão de uma das extremidades para dentro do tubo como um embolo (Figura 11B). Esse procedimento é realizado diariamente pois, à medida que o DCM evapora por ser extremamente volátil, parte da mistura ainda líquida preenche o espaço vazio deixado pela evaporação (Figura 11A e 11C). Então, ao empurrar o algodão como um embolo comprime-se o PLA durante toda sua secagem (Figura 11D), dando ao material geometria cilíndrica do tubo de vidro e compacta;

e) A secagem completa se dá pela evaporação total do DCM e a volta do PLA ao estado sólido. Com auxílio da haste, o PLA já com o formato do tubo vidro é empurrado para fora do tubo (Figura 12A).

[052] O dispositivo implantável obtido apresenta comprimento (c1), preferencialmente de 1 cm e diâmetro (d1) de 2mm e compreende um carreador vacinal e/ou farmacológico a depender da substancia adicionada na etapa (c) para a liberação controlada de substâncias como vitamina E, fármacos e/ou agentes imunizantes.

[053] O uso do dispositivo implantável é realizado através de implantação onde mergulha-se o dispositivo em álcool 70% e deixa-se secar em estufa a 37° C. O dispositivo é colocado no interior de uma agulha 2,6 mm x 3 cm acoplado a um aplicador comercial de microchips (Figura 12C, 12D) e o procedimento de implantação por via intraperitoneal ou subcutânea pode ser realizado (Figura 12E, 12F).

[054] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

Referências

- [055] Fessi et al. (1989); Fessi, H. P. F. D., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). ***Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement***. *International journal of pharmaceutics*, 55(1), R1-R4.
- [056] O'Donnel; McGinity, 1997; O'Donnell, P. B., & McGinity, J. W. (1997). ***Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique***. *Advanced drug delivery reviews*, 28(1), 25-42.
- [057] Feng et al., 2002; Feng, S. S., Mu, L., Chen, B. H., & Pack, D. (2002). ***Polymeric nanospheres fabricated with natural emulsifiers for clinical administration of an anticancer drug paclitaxel (Taxol®)***. *Materials Science and Engineering: C*, 20(1-2), 85-92.
- [058] Park et al., (2005); Park, J., Ye, M., & Park, K. (2005). ***Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs***. *Molecules*, 10(1), 146-161
- [059] Pavot et al., 2014; Pavot, V., Berthet, M., Rességuier, J., Legaz, S., Handké, N., Gilbert, S. C., ... & Verrier, B. (2014). ***Poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery***. *Nanomedicine*, 9(17), 2703-2718.
- [060] Behera et al., (2010); Behera, T., Nanda, P. K., Mohanty, C., Mohapatra, D., Swain, P., Das, B. K., ... & Sahoo, S. K. (2010). ***Parenteral immunization of fish, Labeo rohita with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses***. *Fish & shellfish immunology*, 28(2), 320-325.
- [061] Tice et al. (2007); PT 1781264E – “**Métodos para fabricio de dispositivos de administração e dispositivos para a mesma**”. Inventor: Thomas R. Tice, Arthur J. Tipton, Jay K. Staas, Bruce W. Hudson. Portugal. 2007.
- [062] Li et al. (2013); Li, D., Guo, G., Fan, R., Liang, J., Deng, X., Luo, F., & Qian, Z. (2013). ***PLA/F68/dexamethasone implants prepared by hot-melt extrusion for controlled release of anti-inflammatory drug to implantable medical devices: I. Preparation, characterization and hydrolytic degradation study***. *International journal of pharmaceutics*, 441(1-2), 365-372.

- [063] Gresser et al. (1995); 5,429,822 - US5429822A – **“Biodegradable Bursting Release System”** Inventor: Joseph D. Gresser, Donald L. Wise, Abdul G. Jimoh, Don C. Augenstein, Dean O. Kuethe, Debra J. Trantolo. Estados Unidos da América. 1995.
- [064] Manrique et al., 2019; Manrique, W. G., Figueiredo, M. A. P., Charlie-Silva, I., de Andrade Belo, M. A., & Dib, C. C. (2019). **Spleen melanomacrophage centers response of Nile tilapia during *Aeromonas hydrophila* and *Mycobacterium marinum* infections.** *Fish & Shellfish Immunology*, 95, 514-518.
- [065] Schneider et al., 2012; Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- [066] Belo et al., 2012; de Andrade Belo, M. A., Soares, V. E., de Souza, L. M., da Rosa Sobreira, M. F., Cassol, D. M. S., & Toma, S. B. (2012). **Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats.** *Experimental and toxicologic pathology*, 64(3), 155-165.
- [067] Biller-Takahashi et al., 2013; Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Saita, M. V., Gimbo, R. Y., & Urbinati, E. C. (2013). **Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*.** *Brazilian Journal of Biology*, 73(2), 425-429.
- [068] Thompson; Ammann, 1990; Thompson, G. L., & Ammann, L. P. (1990). **Efficiencies of interblock rank statistics for repeated measures designs.** *Journal of the American Statistical Association*, 85(410), 519-528.

REIVINDICAÇÕES

- 1) **“MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS EM POLI (ÁCIDO LÁTICO)”**, caracterizado por método de encapsulamento de substâncias em Poli(ácido lático) - PLA - ser compreendido pelas etapas:
 - a) o método de encapsulamento inicia-se com a separação dos materiais, seguindo para a pesagem do Poli (ácido lático) na proporção de 500 mg/mL;
 - b) dissolução de 500 mg de Poli (ácido lático) - PLA - em 1,0 mL de Diclorometano – DCM; o Poli (ácido lático) - PLA - e Diclorometano - DCM são colocados em tubo de plástico cônico tipo falcon de 50 mL; o PLA e o DCM são colocados no mesmo tubo cônico tipo falcon;
 - c) inicia-se a agitação contínua em agitador de tubos durante 25 minutos e após completa dissolução do PLA a solução apresenta aspecto viscoso (solução final); a partir deste ponto a solução final está pronta para a adição de outro componente como vitamina E α -tocoferol, fármacos e agentes imunizantes, seguindo para outra agitação em agitador de tubos durante 10 minutos; caso opte por nada ser adicionado, a solução está pronta para o envase;
 - d) para o envase da solução final uma ponteira de 50 μ L é acoplada a ponta da seringa de 60 mL ato contínuo, acopla-se o tubo de vidro a ponteira de 50 μ L; ato contínuo as extremidades são obliteradas com algodão; à medida que o Diclorometano - DCM - evapora um dos algodões é empurrado para dentro do tubo de vidro como um embolo, afim de com que o Poli (ácido lático) - PLA - fique comprimido e obtenha o formato cilíndrico do tubo de vidro; os tubos já preenchidos com a mistura PLA+DCM são colocados em posição vertical, todo o processo de secagem dura 4 dias; durante o processo de secagem, a evaporação do DCM faz com que o PLA fique com aspecto de “canudo”, ou seja, sem preenchimento no interior; tendo em vista essa característica indesejada, com auxílio de uma haste metálica rígida, empurra-se o algodão de uma das extremidades para dentro do tubo como um embolo; esse procedimento é realizado diariamente pois, à medida que o DCM evapora por ser extremamente volátil, parte da mistura ainda líquida preenche o espaço vazio deixado pela evaporação; então, ao empurrar o algodão como um embolo comprime-se o PLA durante toda sua secagem

dando ao material geometria cilíndrica do tubo de vidro e compacta;

e) a secagem completa se dá pela evaporação total do DCM e a volta do PLA ao estado sólido; com auxílio da haste, o PLA já com o formato do tubo vidro é empurrado para fora do tubo.

2) **“DISPOSITIVO IMPLANTÁVEL OBTIDO”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dispositivo implantável obtido apresentar comprimento (c1) de 1 cm e diâmetro (d1) de 2mm.

3) **“DISPOSITIVO IMPLANTÁVEL OBTIDO”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por dispositivo implantável obtido compreender um carreador vacinal e/ou farmacológico a depender da substancia adicionada na etapa (c) para a liberação controlada de substâncias como vitamina E, fármacos e/ou agentes imunizantes.

4) **“USO”**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por uso do dispositivo implantável ser realizado através de implantação onde mergulha-se o dispositivo em álcool 70% e deixa-se secar em estufa a 37° C; o dispositivo é colocado no interior de uma agulha 2,6 mm x 3 cm acoplado a um aplicador comercial de microchips e o procedimento de implantação por via intraperitoneal ou subcutânea pode ser realizado.

FIG.1

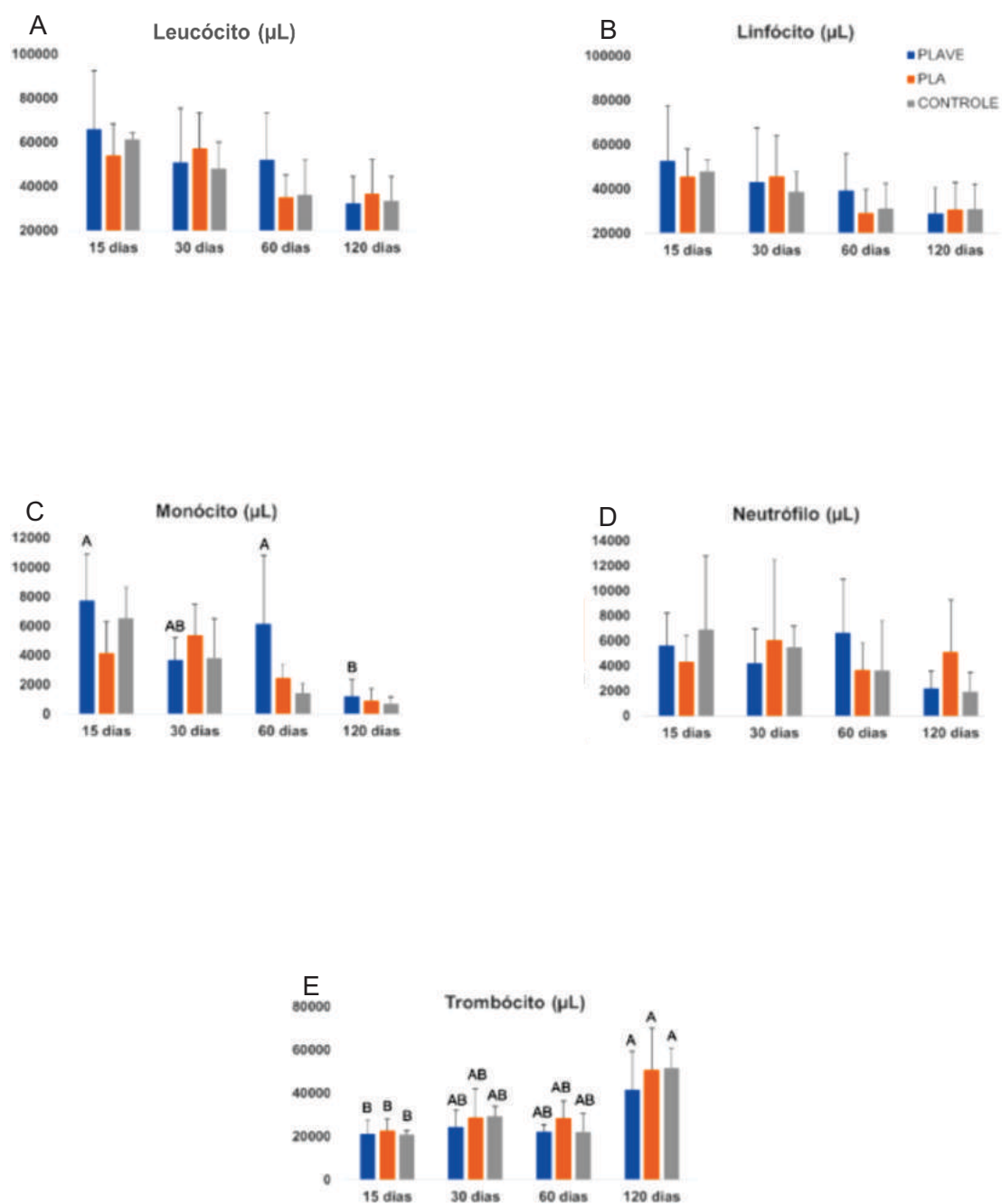


FIG.2

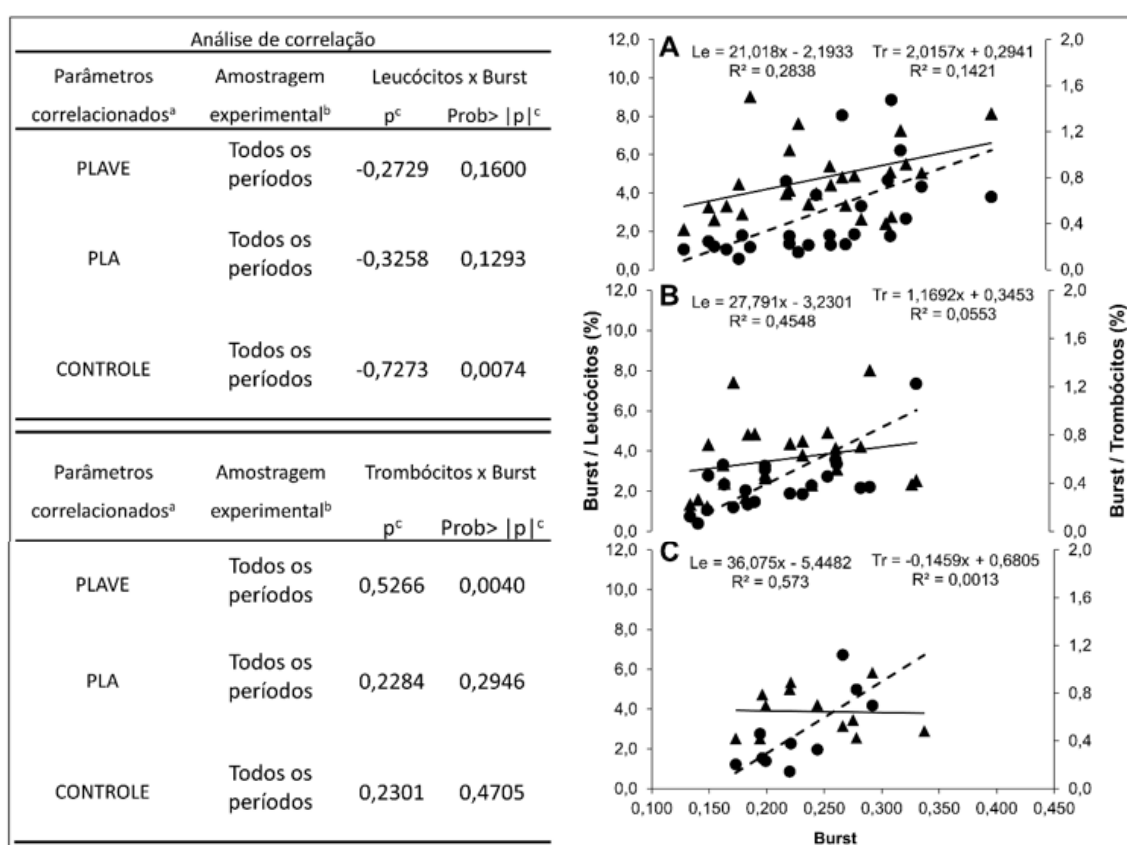


FIG.3A

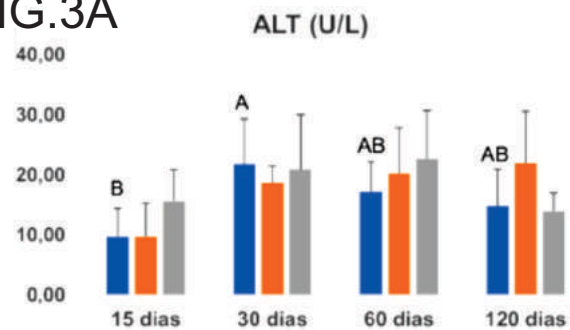


FIG.3B

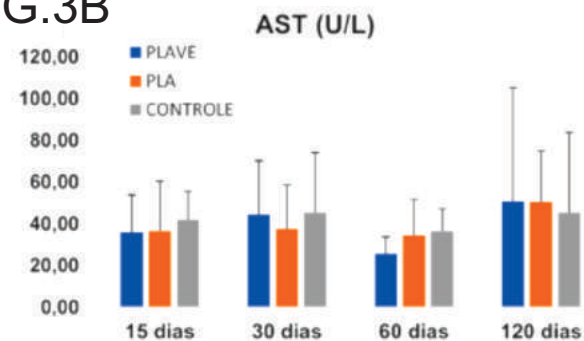


FIG.3C

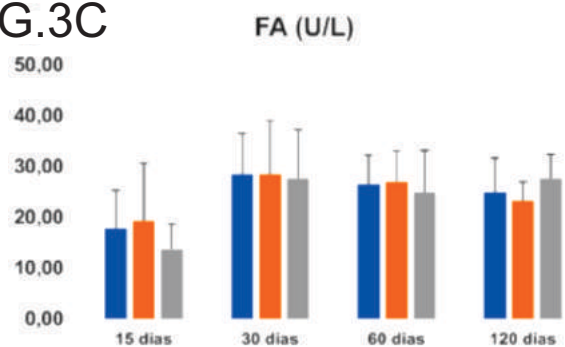


FIG.3D

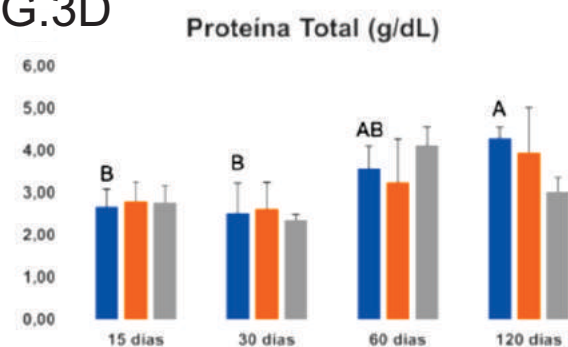
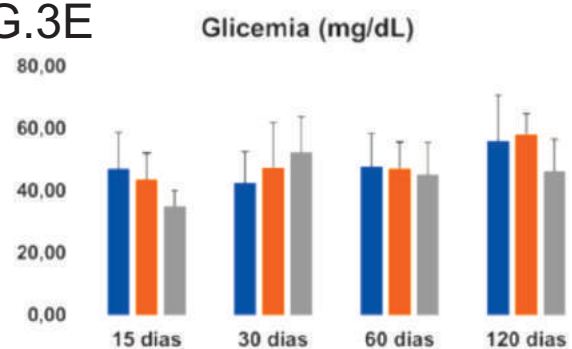


FIG.3E



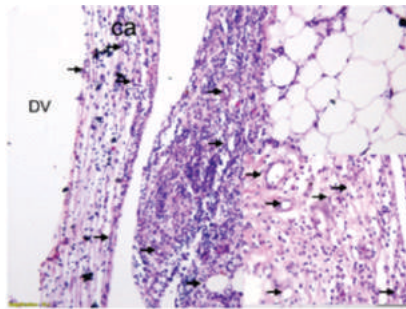


FIG.4A

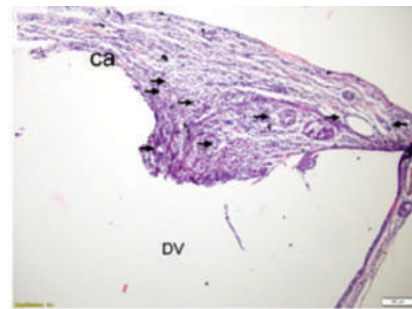


FIG.4E

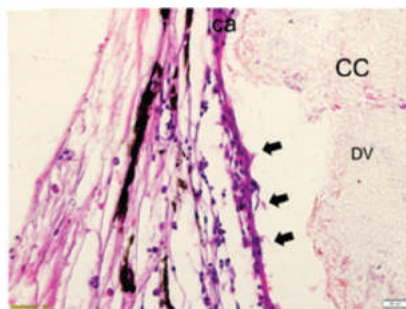


FIG.4B

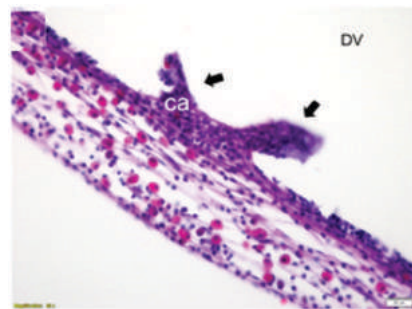


FIG.4F

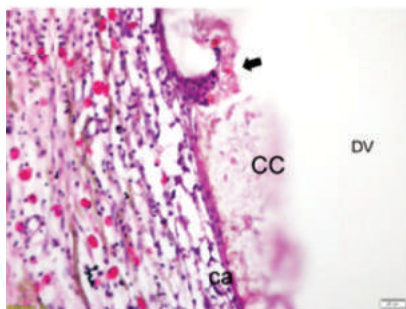


FIG.4C

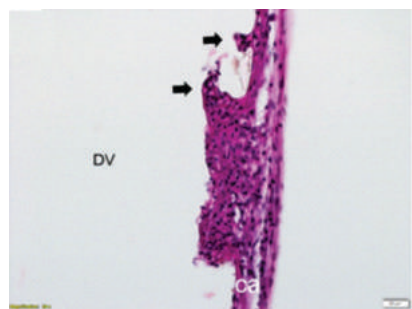


FIG.4G

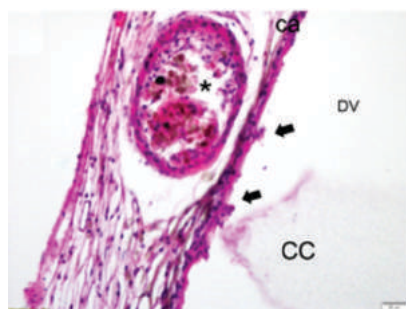


FIG.4D

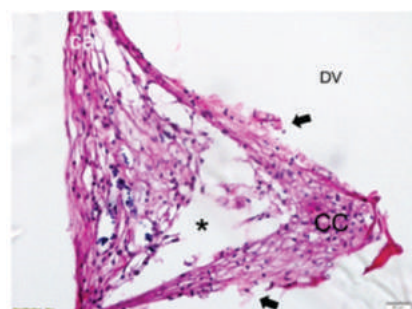


FIG.4H

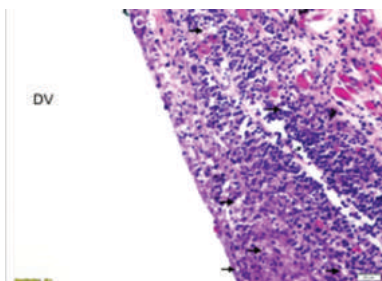


FIG.5A

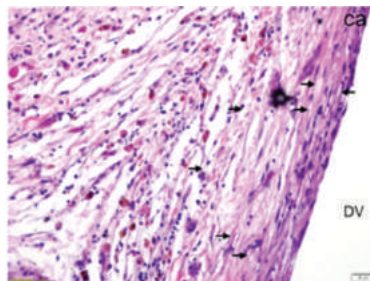


FIG.5E

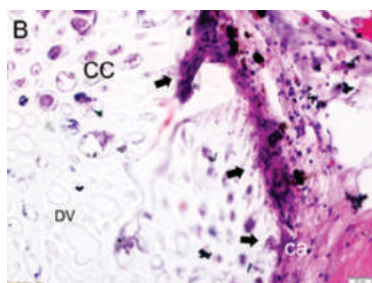


FIG.5B

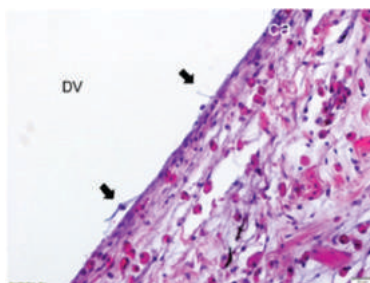


FIG.5F

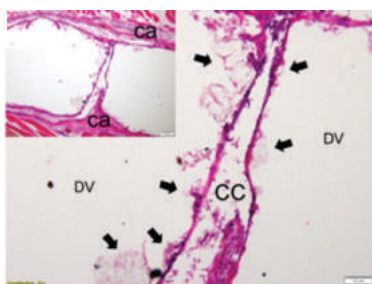


FIG.5C

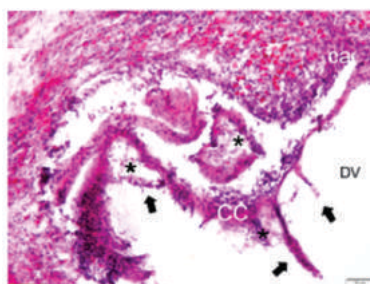


FIG.5G

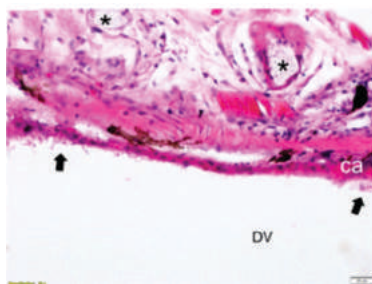


FIG.5D

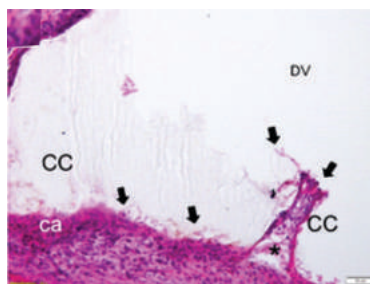


FIG.5H

FIG.6

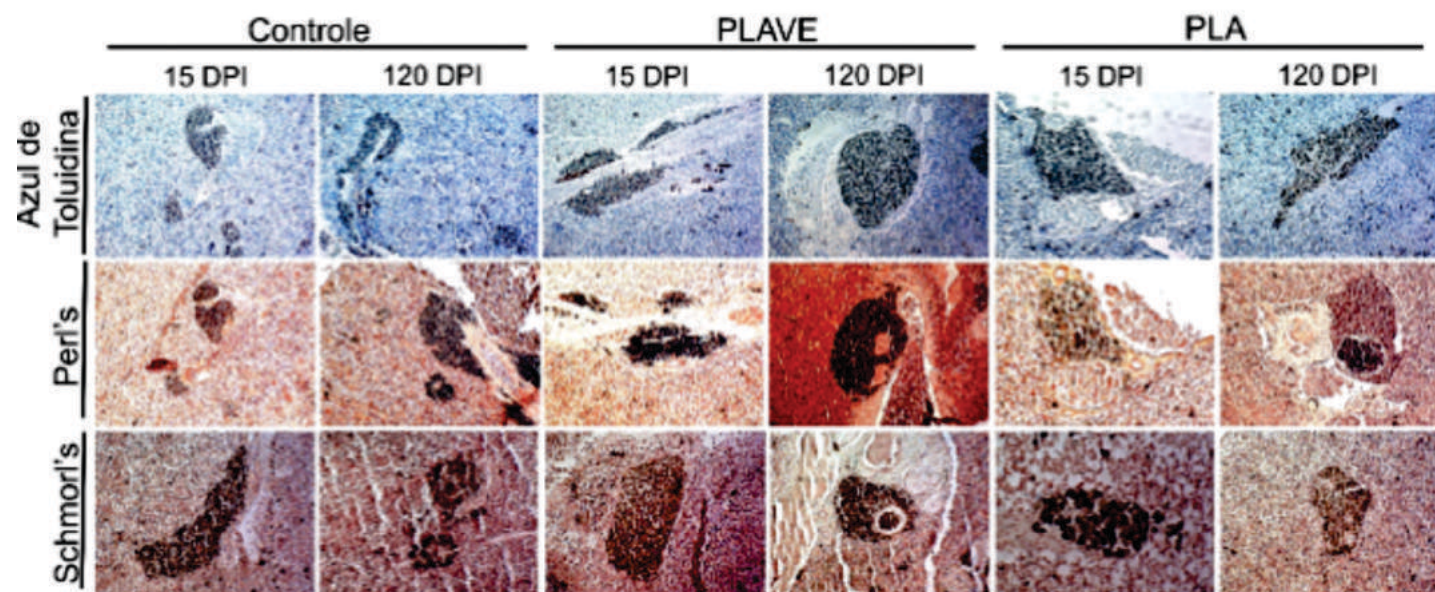


FIG.7A

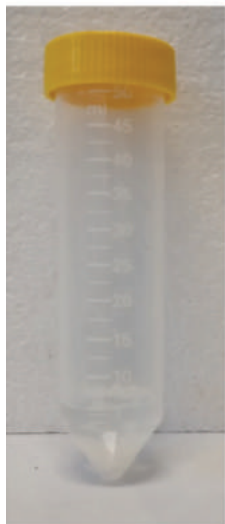


FIG.7B



FIG.7C

FIG.7D

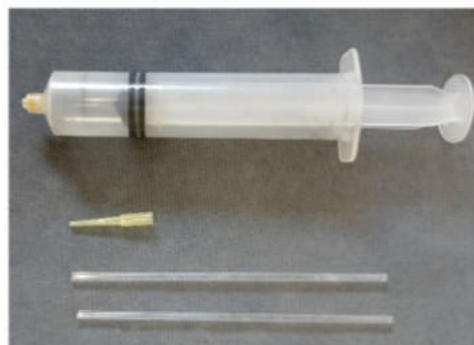


FIG.8A



+

FIG.8B



=

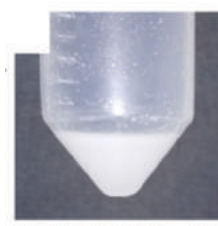
FIG.8C



FIG.8D



FIG.8E



PLA + DCM + VE

FIG.9A

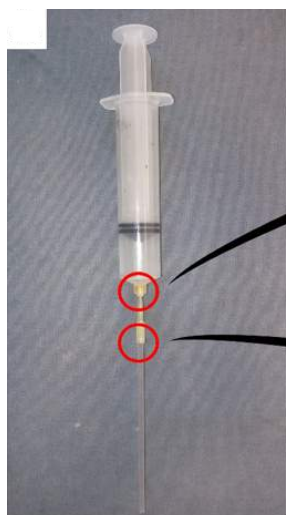


FIG.9B

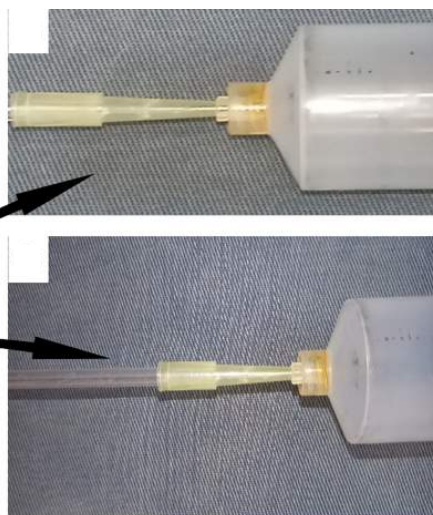


FIG.9D



FIG.9C

FIG.10A

Imediatamente
após envase



PLA

FIG.10C



PLA +



PLA

FIG.10B

FIG.10E



Bolha de ar

PLA com aspecto de
"canudo"

PLA + DCM em
estado líquido. Ao
empurrar o algodão,
essa parte líquida
preenche o espaço
vazio

PLA +
vitamina E

FIG.10D

FIG.11A

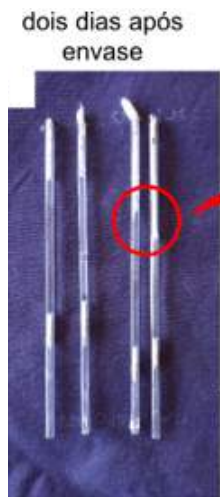


FIG.11C



FIG.11D

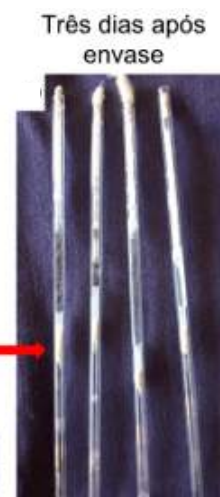


FIG.11B



FIG.12A



FIG.12B



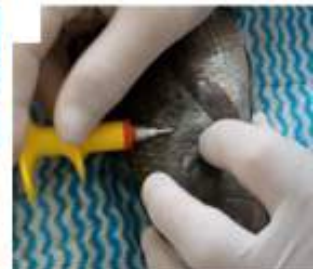
FIG.12C



FIG.12E



FIG.12F



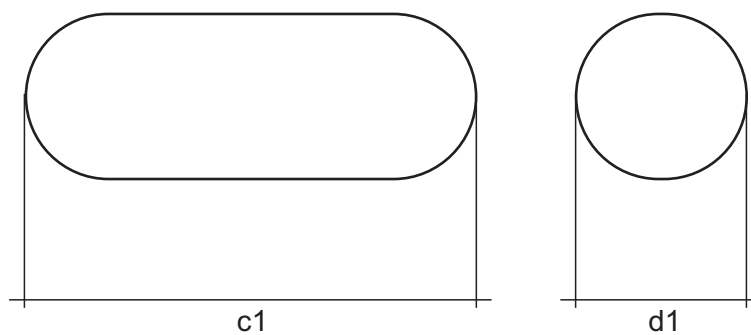
Implantação
intraperitoneal

Implantação
subcutânea

FIG.12D



FIG.13



RESUMO

**“MÉTODO DE ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS EM POLI (ÁCIDO LÁTICO),
DISPOSITIVO IMPLANTÁVEL OBTIDO E RESPECTIVO USO”.**

Trata-se de método de encapsulamento de substâncias em Poli(ácido láctico) - PLA - e dispositivo implantável obtido para uso como carreador vacinal e farmacológico para liberação controlada de substâncias como vitamina E, fármacos e agentes imunizantes permitindo, assim, fácil aplicação em animais, uma vez que, é inserido através de agulha e permite a implantação por via subcutânea e intraperitoneal viabilizando a imunização de animais em geral.