

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
DE ALGINATO INCORPORANDO *AEROMONAS HYDROPHILA*
INATIVADA PARA IMUNIZAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO
POR VIA ORAL**

Ana Paula Rodrigues
Autora

Profª. Drª. Ângela Maria Moraes
Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química

Campinas- São Paulo
Junho de 2004

UNIDADE	BC
VR CHAMADA	UNICAMP
	R 618p
V	EX
TOMBO BC	62096
PROC.	16 P. 0086-05
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	10/02/05
Nº CPD	

Bibrid 341468

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

R618p Rodrigues, Ana Paula ✓
Produção e caracterização de micropartículas de alginato incorporando *Aeromonas Hydrophila* inativada para imunização de tilápia do nilo por via oral / Ana Paula Rodrigues. --Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Ângela Maria Moraes. ✓
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

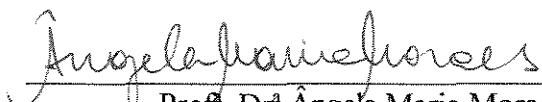
1. Alginatos. 2. Vacinação. 3. Emulsões. 4. *Aeromonas hydrophila*. 5. Micropartículas. I. Moraes, Ângela Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Produção e Caracterização de Micropartículas de Alginato Incorporando *Aeromonas hydrophila* Inativada para Imunização de Tilápia do Nilo por Via Oral

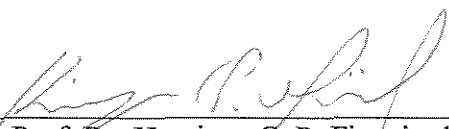
Autora: Ana Paula Rodrigues
Orientadora: Profª Drª Ângela Maria Moraes



Profª Drª Ângela Maria Moraes
Universidade Estadual de Campinas-FEQ

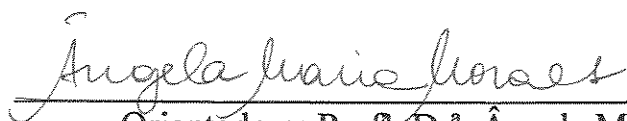


Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
Universidade Estadual de Campinas-FEQ



Prof. Dr. Henrique C. P. Figueiredo
Universidade Federal de Lavras

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Farmacêutica - Bioquímica, Ana Paula Rodrigues, e aprovada pela comissão julgadora em Junho de 2004.



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes

Aos meus pais,
Floriano (*in memoriam*) e Maria Odete,
pelo amor, incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Ângela Maria Moraes, pela sua orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Henrique C. P. Figueiredo, pela gentileza de ceder as bactérias utilizadas neste trabalho e à professora Dr^a Priscila V. R. Logato, pelas informações cedidas.

Aos professores: Dr. Theo Guenter Kieckbusch e Dr^a Lúcia Helena Innocentini Mei, pelas frutíferas sugestões fornecidas no exame de qualificação.

A todos os professores do Departamento de Processos Biotecnológicos, em especial aos professores: Dr. Everson Alves Miranda e Dr^a Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios no decorrer deste trabalho.

À aluna Daniela Hirsch, pela preparação das bactérias utilizadas.

À grande amiga, Raquel de Melo Barbosa, por sua amizade e constante acolhimento.

Aos amigos da pós-graduação, Érika Watanabe, Paula Rulf Marreco Dalan, Geórgia Barros, Fabiana Batista, Cristiane Farinas, Isa Duarte, Luciana Aquino, Oselys Justo e Cibele Lima pela amizade, apoio, incentivo e convivência durante a realização deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos e do Laboratório de Biosseparação e de Propriedades Reológicas e Coloidais. Em especial aos amigos: Tatiana, Classius, Elaine, Cristiane, Lucimara, Amós, Ivanildo, Reginaldo e Ana Paula pela amizade e apoio durante todas as etapas deste trabalho.

A Pedro Aranha, pela colaboração no laboratório.

Às funcionárias do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração, Kelly, Alessandra e Sabrina, pela simpatia e disposição.

Ao meu pai, Floriano Rodrigues (*in memorian*), que mesmo distante sempre esteve presente.

Agradeço a minha mãe, Maria Odete S. Rodrigues e aos meus irmãos, Liliane Rodrigues e Renato Rodrigues, pelo constante incentivo e apoio em todos os momentos.

A Fabiano Santinon, pelo carinho, compreensão, apoio e ajuda durante o decorrer deste trabalho.

À Suzy Cabral, pela sua constante amizade e apoio.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A vacinação de peixes por via oral é considerada como uma alternativa relevante de imunização destes animais, visto que elimina o estresse associado com a vacinação via rota parenteral, possibilita a rápida vacinação de um grande número de peixes a custos reduzidos. Entretanto, esta técnica é apenas parcialmente efetiva devido à parcial destruição da vacina no sistema digestivo dos animais e a possíveis interações desta com componentes da ração. Este trabalho abordou a preparação e caracterização de microesferas de alginato incorporando células inativadas de *Aeromonas hydrophila*, visando a imunização por via oral de peixes do tipo tilápia do Nilo, com cultivo de importância econômica considerável no Brasil, contra esta bactéria, comum na piscicultura de alta densidade animal. O uso de matérias primas de baixo custo e metodologias de preparação passíveis de utilização em escala industrial foi enfocado. Paralelamente aos estudos com *Aeromonas hydrophila*, efetuou-se estudos comparativos de incorporação de albumina de soro bovino (BSA), como antígeno modelo, nas partículas. As microesferas foram preparadas por emulsão com óleos vegetais, avaliando-se a influência das concentrações de alginato, agente ativo e tensoativo (Span® 80), da taxa de agitação e da proporção entre as fases nas características das partículas. Partículas esféricas com diâmetros médios de 55,3 µm a 143,0 µm contendo de 0,7 a 4,20 mg/mL de BSA foram obtidas, correspondendo a eficiências de incorporação da proteína de 72 a 84 % para BSA. Para as bactérias, a eficiência de incorporação atingiu 100 %, obtendo-se partículas de diâmetro de 39,2 a 82,0 µm. Partículas contendo 14,22 mg de bactérias obtidas utilizando-se 1:9 (v/v) de fase aquosa (contendo 3,5% de alginato) em relação à fase oleosa (óleo de milho e Span® 80 a 0,2%) agitadas a 2000 rpm apresentaram-se estáveis em condições equivalentes às gastrintestinais por 12 horas.

ABSTRACT

The oral vaccination of fishes has been considered a relevant alternative for the immunization of these animals, since it eliminates the stress caused by the immunological agent parenteral administration, added to the possibility of quickly vaccinating large numbers of animals with reduced costs. The effectiveness of this approach is limited, however since the vaccine can be destroyed in the fish digestive system and interactions with the feed components can occur. The purpose of this work was to produce and to characterize alginate microspheres with entrapped inactive *Aeromonas hydrophila* cells for the oral immunization of Nile tilapia, against this bacteria, commonly found in high density fish production systems. The use of low cost raw materials and of particle production methodologies easy to scale up were focused. Comparative studies with bovine serum albumin (BSA), as a model antigen, incorporated in the particles were also performed. The microspheres were prepared with vegetable oils emulsion, and the influence of alginate, active agent (BSA or bacteria) and Span® 80 surfactant concentration, stirring rate, and the ratio between aqueous alginate and oil phases on particle characteristics were evaluated. Spherical particles were obtained, with average diameters ranging from 55.3 μm to 143.0 μm containing from 0.70 to 4.20 mg/mL of BSA, corresponding to incorporation efficiencies varying from 72 to 84%. For the bacteria, the incorporation efficiency reached 100 % and the particles obtained presented mean diameters from 39.2 to 82.0 μm . Microspheres containing 14.22 mg/mL of cells prepared with 1:9 (v/v) of aqueous phase (containing alginate at 3.5% w/v) in relation to the oil phase (corn oil containing 0.2 % Span®80) under mechanical stirring at 2,000 rpm remained stable in gastrointestinal conditions for 12 hours.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
NOMENCLATURA E ABREVIACÕES.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	1
1.2. OBJETIVO	4
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A RELEVÂNCIA DA PISCICULTURA NO BRASIL.....	5
2.2. DOENÇAS INFECCIOSAS E SANIDADE EM PISCICULTURA	6
2.3. TÉCNICAS DE IMUNIZAÇÃO DE PEIXES	8
2.4. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	10
2.5. CARACTERÍSTICAS DO ALGINATO.....	11
2.6. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO.....	14
2.6.1. <i>Produção de micropartículas de alginato empregando emulsões</i>	16
2.7. UTILIZAÇÃO DE ANTÍGENOS INCORPORADOS EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO E DE OUTROS POLÍMEROS PARA A IMUNIZAÇÃO DE PEIXES	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. MATERIAIS	25
3.2. MÉTODOS	25
3.2.1. <i>Preparação das Partículas</i>	25
3.2.1.1. <i>Preparação de partículas por gelificação interna</i>	27
3.2.1.2. <i>Preparação de partículas utilizando solução gelificante e avaliação do efeito de diferentes soluções de lavagem</i>	27
3.2.1.3. <i>Avaliação do efeito da concentração da solução de alginato e da taxa de agitação no diâmetro de partículas preparadas usando solução gelificante</i>	28
3.2.1.4. <i>Avaliação do efeito da inversão da ordem de mistura da emulsão com a solução gelificante</i>	29

3.2.1.5. <i>Análise do efeito da proporção entre os volumes das fases aquosa e oleosa no diâmetro das partículas preparadas usando solução gelificante.....</i>	30
3.2.1.6. <i>Avaliação do efeito da taxa de agitação e da adição do tensoativo Span® 80 no diâmetro de partículas preparadas usando solução gelificante.....</i>	31
3.2.1.7. <i>Estudo da influência da vazão de adição da emulsão à solução gelificante nas características das partículas.....</i>	32
3.2.1.8. <i>Avaliação do efeito do tipo de óleo vegetal empregado na morfologia, no diâmetro médio e na distribuição de tamanho das partículas de alginato.....</i>	33
3.2.1.9. <i>Secagem de partículas lavadas com diferentes solventes.....</i>	33
3.2.1.10. <i>Incorporação de albumina de soro bovino nas partículas de alginato.....</i>	33
3.2.1.11. <i>Obtenção das Bactérias Inativadas para Incorporação nas Micropartículas</i>	34
3.2.1.12. <i>Encapsulação de Aeromonas hydrophila inativa nas partículas de alginato.....</i>	35
3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	35
3.2.2.1. <i>Morfologia, diâmetro e distribuição de tamanhos.....</i>	35
3.2.2.2. <i>Eficiência de incorporação da albumina de soro bovino.....</i>	35
3.2.2.3. <i>Eficiência de incorporação das bactérias inativadas</i>	36
3.2.2.4. <i>Estabilidade in vitro das partículas em água com diferentes valores de pH.....</i>	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. COMPARAÇÃO DO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO INTERNA AO BASEADO NO USO DE SOLUÇÃO GELIFICANTE ACIDIFICADA.....	38
4.1.1. <i>Preparação das partículas por gelificação interna.....</i>	39
4.1.2. <i>Preparação de Partículas Utilizando Solução Gelificante e Diferentes Soluções de Lavagem.....</i>	39
4.2. ESTUDO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NAS CARACTERÍSTICAS DAS PARTÍCULAS PREPARADAS EMPREGANDO SOLUÇÃO GELIFICANTE E INVERSÃO DA EMULSÃO	42
4.2.1. <i>Influência da concentração da solução de alginato e da taxa de agitação na morfologia e no diâmetro de partículas.....</i>	42
4.2.2. <i>Efeito da inversão da ordem de mistura da emulsão com a solução gelificante.....</i>	45

4.2.3. <i>Influência da alteração da proporção entre os volumes das fases aquosa e oleosa no diâmetro das partículas preparadas usando solução gelificante</i>	46
4.2.4. <i>Influência da taxa de agitação e da adição do tensoativo Span® 80 no diâmetro de partículas preparadas usando solução gelificante</i>	49
4.2.5. <i>Avaliação da influência da vazão de adição da emulsão à solução gelificante nas características das partículas</i>	55
4.3. INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE ÓLEOS VEGETAIS NA MORFOLOGIA, NO DIÂMETRO MÉDIO E NA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS DE ALGINATO.....	57
4.4. AVALIAÇÃO DA SECAGEM DE PARTÍCULAS LAVADAS COM DIFERENTES SOLVENTES ..	62
4.5. INCORPORAÇÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO NAS PARTÍCULAS DE ALGINATO	64
4.6. INCORPORAÇÃO DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i> NAS PARTÍCULAS DE ALGINATO	70
4.7. ESTABILIDADE EM ÁGUA E EM MEIOS QUE SIMULAM AS CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS	75
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	77
6.1. CONCLUSÕES	77
6.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

ATCC: *American Type Culture Collection*

BCA: Ácido Bicinconínico

BHI: Caldo Cérebro-Coração

Blocos G: Blocos de α -L-guluronato

Blocos M: Blocos de α -D- manuronato

BSA: Albumina de Soro Bovino

ECAM: Antígenos incorporados em microesferas com recobrimento entérico

EHL: Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

FDA/EUA: *Food and Drug Administration* / Estados Unidos da América

GALT: *Gut associated lymphoid tissue*

HLB: *Hydrophilic-Lipophilic Balance*

HGG: Gama Globulina Humana

i.p.: Intraperitoneal

PBS: Tampão fosfato-salina

PLG: Poli-DL- lactato co-glicolato

TNP / TNP-LPS / TNP- KLH: Trinitrofenil / Trinitrofenil associado a lipopolissacarídeo / Trinitrofenil associado a hemocianina

U.V.: Ultra-Violeta

1. INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa e Relevância

De acordo com a Sociedade Brasileira de Zootecnia, estima-se que a produção nacional de peixes seja superior a um milhão de toneladas por ano. Deste total, apenas 10% são provenientes da piscicultura, sendo o restante obtido por pesca extrativa em mares e rios. O consumo per capita de peixe no Brasil, em torno de 6 kg/ano, pode ser considerado baixo, atingindo apenas 50 % do valor recomendado pela Organização Mundial de Saúde. Enquanto observa-se um aumento na demanda por peixes em decorrência de recomendações para aumentar o consumo de carnes brancas, nota-se também que a capacidade dos rios e dos mares de fornecer peixes está atingindo seu limite.

Além da tradicional utilização dos peixes na alimentação, diversas espécies destes animais têm apreciável valor ornamental, podendo ser criadas de maneira intensiva com retorno econômico atraente, o mesmo se aplicando a espécies destinadas à pesca esportiva.

Diversos fatores favorecem a piscicultura no Brasil, destacando-se o clima, a topografia e o volume de água disponível na maioria das regiões brasileiras. Outros fatores relevantes são o grande número de espécies nativas e exóticas que podem ser criadas em cativeiro e a abundância de subprodutos de agroindústrias que podem ser aproveitados na piscicultura.

Embora as técnicas modernas de piscicultura forneçam meios efetivos para a produção intensiva de pescados em condições relativamente controladas, a maior parte das atividades nesta área ainda é realizada de maneira tradicional, envolvendo baixa tecnologia (Hew e Fletcher, 2001) e, em consequência, custos mais elevados. Enquanto diversos países, incluindo a Noruega, o Chile e a China, têm desenvolvido nas últimas décadas programas intensivos em aquicultura com bons resultados (Hew e Fletcher, 2001), apenas nos últimos 7 anos o Ministério da Agricultura vem apoiando mais intensivamente a piscicultura nacional, reconhecendo a potencialidade do País de ser um dos maiores produtores mundiais de pescado.

O desenvolvimento da aquicultura está fortemente associado à maior atenção devotada a problemas como a infecção dos peixes por patógenos e à queda na produtividade por elas causada, principalmente para animais cultivados em regime intensivo e em confinamento. Além da perda por mortalidade propriamente dos peixes, os patógenos têm impacto considerável no crescimento e no comportamento dos animais, em sua resistência a outros fatores de estresse, em sua susceptibilidade à predação, bem como na comercialização do peixe (Scholz, 1999).

Para que a lucratividade na piscicultura efetivamente aumente, as perdas de animais causadas por patógenos e o consumo de antibióticos para combatê-las devem, ambos, ser mantidos em níveis mínimos. A imunoprofilaxia, reconhecida pela estimulação da imunidade específica e não específica, é proposta por Gudding *et al.* (1999) como uma base sólida para o desenvolvimento sustentável da aquicultura.

Os peixes podem ser artificialmente imunizados de três maneiras, através de injeção, de imersão ou por via oral. Cada método tem características intrínsecas quanto ao nível de proteção, efeitos colaterais, praticidade e relação custo/benefício, não se podendo, a priori, apontar um deles como simultaneamente ótimo em todos os aspectos anteriormente mencionados. No caso específico de vacinação por via oral, recomendado principalmente como reforço e bastante prático do ponto de vista de aplicação, os maiores esforços de pesquisa têm se concentrado na proteção dos agentes antigênicos da digestão e decomposição durante sua passagem pelo estômago e parte anterior do intestino (Gudding *et al.*, 1999). Neste sentido, diversas estratégias têm sido propostas, como a encapsulação de agentes antigênicos em micro ou nanocápsulas, estratégia esta em franca expansão na pesquisa de vacinas orais para mamíferos.

Poucos trabalhos foram localizados na literatura abordando a encapsulação de antígenos para a vacinação oral de peixes, destacando-se os de Romalde *et al.* (2004), Polk *et al.* (1994), Joosten *et al.* (1997) e o de Lavelle *et al.* (1997), que descrevem a incorporação de antígenos em micropartículas de alginato ou de poli (DL-lactídeo-co-glicósídeo).

No caso de mamíferos, a absorção de antígenos pelo tecido linfóide associado ao intestino pode ser favorecida pela utilização do antígeno incorporado em partículas com diâmetros iguais ou menores que 10 μm (Singh e O'Hagan, 1998; Lemoine *et al.*, 1998;

O'Hagan, 1998), entretanto, formulações com partículas maiores podem ser eficientemente empregadas quando se deseja apenas a proteção do antígeno da acidez gástrica e da digestão enzimática (Singh e O'Hagan, 1998). Não se dispõe de dados similares para peixes, entretanto, embora estes animais não disponham de placas de Peyer (agregados de linfócitos ao longo do intestino, especialmente no íleo) e de células M transportadoras de antígeno, os seus enterócitos apresentam capacidade de transportar antígenos (Joosten *et al.*, 1997). Supõe-se, então, que partículas com diâmetros entre 5 e 50 μm seriam eficazes para a administração de agentes de imunização para peixes por via oral, preferencialmente com diâmetro de cerca de 10 μm com base no trabalho de Joosten *et al.* (1997).

Verifica-se a necessidade de se desenvolver mais pesquisas nessa área, principalmente tendo por base os resultados dos trabalhos mencionados, que mostram bom potencial de proteção dos antígenos e de imunização dos animais. Segundo Polk *et al.* (1994), a utilização de microcápsulas misturadas à ração para a vacinação oral de alevinos é particularmente interessante, visto que estes estão sujeitos a alta mortalidade tanto decorrente de doenças quanto do manejo associado à imunização. É também necessário o desenvolvimento de metodologias que facilitem e reduzam o custo do processamento destas partículas, possibilitando sua produção em larga escala.

Assim, propôs-se neste trabalho a preparação e caracterização de micropartículas de alginato contendo células de *Aeromonas hydrophila* inativadas para a administração em tilápia do Nilo por via oral. O polissacarídeo selecionado para a formulação (alginato) tem custo relativamente baixo e é biocompatível com o meio fisiológico, ou seja, é aceito pelo organismo sem causar reações adversas. As micropartículas à base deste material são de fácil preparação e de escalonamento factível, além de serem recomendáveis para a administração oral de agentes ativos. A espécie de peixe selecionada tem apreciável importância econômica no Brasil e sua imunização contra o patógeno em questão fundamenta-se em sua distribuição mundial, causando doenças de pele e septicemias em peixes, principalmente na piscicultura de alta densidade animal.

1.2. Objetivo

O objetivo global deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de vacinas para peixes, enfocando a formulação de microesferas de alginato para a imunização de tilápias do Nilo por via oral contra *Aeromonas hydrophila*. Inseridos neste objetivo global, este trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- Comparação de metodologias para a preparação de microesferas de alginato por processos envolvendo emulsões citados na literatura, com a finalidade de identificar aquelas que permitam a obtenção das partículas com dimensões próximas às almejadas.
- Determinação da influência de variáveis como concentração de alginato e de agente antigênico, proporção entre as fases aquosa e oleosa, intensidade de agitação e presença de tensoativos nas características finais das partículas formadas;
- Estudo do comportamento das micropartículas incorporando bactérias quanto à eficiência de incorporação, morfologia, diâmetros obtidos e a estabilidade em soluções aquosas.
- Estudo comparativo do comportamento das micropartículas incorporando a proteína modelo albumina de soro bovino (BSA) quanto à eficiência de incorporação, a morfologia e aos diâmetros obtidos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Considerações Gerais sobre a Relevância da Piscicultura no Brasil

A piscicultura pode ser considerada um recurso alimentar importante, sendo uma fonte protéica acessível através da exploração direta dos recursos naturais. Embora os recursos naturais e os peixes pareçam inesgotáveis, a ação do homem muito tem contribuído para a sua redução, tornando-se comum o cultivo artificial de peixes.

O Brasil possui enorme potencial para produção de pescado por aquicultura, tendo em vista sua localização com mais de dois terços na região tropical, além das privilegiadas e ricas bacias hidrográficas. Merecem destaque também os 5 milhões de hectares de águas represadas em açudes no Nordeste e a imensa costa litorânea (aproximadamente 8 mil quilômetros), que favorecem uma enorme e variada atividade de aquicultura de espécies marinhas e de água doce.

O cultivo de peixes é intenso nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste, onde começam a ser implantados projetos de cultivo de médio e grande porte. Segundo o Ministério do Desenvolvimento Agrário, a piscicultura destaca-se no interior do país com a criação principalmente de tilápias. As espécies de tilápia são de grande importância em locais de clima tropical e subtropical, onde constituem a principal espécie utilizada para cultivo intensivo (Caceci *et al.*, 1997). Estima-se que as tilápias cultivadas atualmente representem 60% do total comercializado deste tipo de peixe.

A tilápia do Nilo tem um mercado bastante atraente. Sua carne é rosada, tem sabor agradável e seu filé não possui espinhas. As tilápias são peixes originários do continente africano e da Ásia menor. Estão taxonomicamente classificadas em cerca de 70 espécies, são predominantemente peixes de águas quentes, sendo que a temperatura de cultivo pode variar de 20 a 30°C, embora possam suportar temperaturas em torno de 12°C. São peixes de fácil reprodução, sendo que muitas vezes podem povoar de forma exagerada os tanques. Para que isso não ocorra, geralmente é feita a reversão sexual através da adição de hormônios masculinizantes na ração, o que faz com que indivíduos que geneticamente são fêmeas desenvolvam fenótipo de machos.

Algumas das maiores dificuldades no cultivo de peixes em sistema de confinamento relacionam-se à prevenção e ao controle de doenças causadas por patógenos, pois o ambiente aquático é um meio no qual há fácil acesso e desenvolvimento de agentes patogênicos, e o cultivo de peixes em altas densidades populacionais favorece ainda mais o aparecimento de doenças.

2.2. Doenças infecciosas e sanidade em piscicultura

Os peixes podem ser acometidos por diferentes agentes patogênicos. Entre estes agentes estão parasitas, vírus e bactérias. As parasitoses mais comuns são as causadas por *Ichthyophthirius multifiliis*, *Lernaea cyprinacea* e *Argulus* sp. Dentre as bactérias, destacam-se o *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio viscosus*. Têm também papel relevante o *Streptococcus* sp., a *Photobacterium damsela* e as *Aeromonas salmonicida* e *hydrophila*, dentre outras (Gudding et al., 1999).

A *Aeromonas hydrophila* é um bastonete gram-negativo, de tamanho curto (Figura 2.1), que é normalmente encontrado em ambientes aquáticos. Sob influência de fatores predisponentes (densidade animal, qualidade da água, temperatura ambiente, dentre outros) surtos de infecções em piscicultura podem ocorrer tendo como consequência altas taxas de mortalidade. Este microrganismo pode também infectar seres humanos ocasionando surtos esporádicos de gastrinterite, celulite e septicemia, geralmente associados ao contato com águas de recreação ou consumo de pescado contaminado.

Os peixes infectados por este microrganismo apresentam sintomas como necrose de nadadeiras e úlceras de tegumento, além de septicemia hemorrágica. As doenças causadas por essa bactéria acometem peixes de água-doce, várias espécies de peixes marinhos e diversos tipos de peixes ornamentais, além de anfíbios, tendo expressivo impacto econômico no cultivo destes animais. Esta bactéria produz doenças em carpas, bagres, tilápias e trutas, dentre outros peixes (Rahman e Kawai, 2000).

A maioria das doenças infecciosas que acometem os peixes são de difícil diagnóstico, e quando se nota que um peixe encontra-se infectado, este já está debilitado, motivo pelo qual poderá não responder aos vários tipos de tratamentos preconizados. O tratamento quimioterápico de peixes em seus tanques de criação apresenta limitações como

a necessidade de tanques especiais com volumes de água menores e conhecidos para facilitar a diluição do medicamento e controlar sua liberação. Entretanto, há um consenso geral de que vários destes produtos são prejudiciais ao meio ambiente. Muitas vezes é mais apropriado e freqüentemente menos oneroso não realizar tratamento algum, visto haver reduzida comprovação científica de sua eficácia, além de não ser possível prever o prejuízo causado ao ambiente. Neste caso, é melhor sacrificar o plantel, drenar e sanitizar adequadamente o tanque para recomençar a criação (Ministério do Desenvolvimento Agrário do Brasil, 2002).

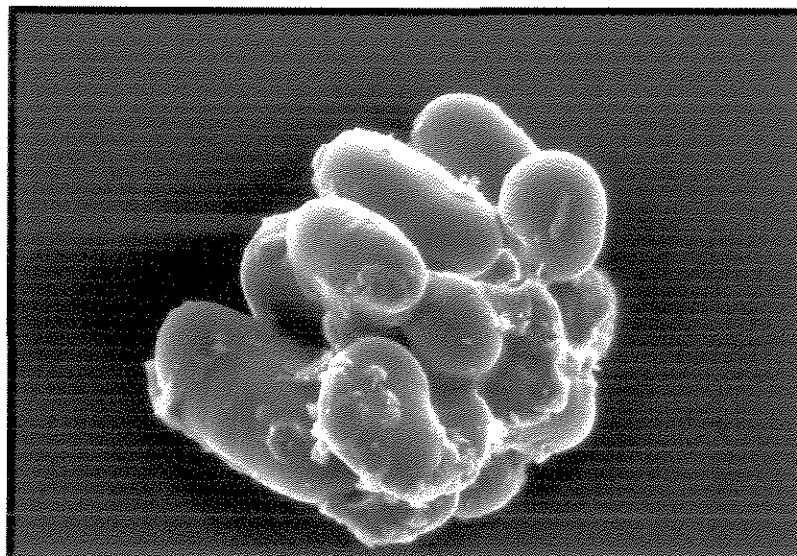


Figura 2.1: Aspecto morfológico da bactéria *Aeromonas hydrophila* em microscópio eletrônico de varredura (aumento de 4.000 X). Fotomicrografia obtida no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química / UNICAMP / 2004.

Para evitar que os peixes sejam contaminados por patógenos, pode-se adotar medidas profiláticas como a vacinação, visto que, em decorrência de desafio com um antígeno, os peixes são efetivamente capazes de produzir tanto anticorpos específicos como resposta imune mediada por células (Shao, 2001).

Especificamente no caso de imunização contra *A. hydrophila*, as estratégias incluem o uso de células mortas por calor, de extratos bacterianos inativados por calor ou com formalina, de preparações sonicadas e de células vivas (Azad *et al.*, 1999). As proteínas de membrana da superfície externa da bactéria *A. hydrophila*, são as responsáveis pela indução da resposta imune no peixe, após a vacinação.

2.3. Técnicas de Imunização de Peixes

O desenvolvimento de uma vacina efetiva inclui a identificação dos fatores de virulência relevantes, como saber quando o peixe vai possivelmente estar exposto ao patógeno, pois desta maneira pode-se determinar qual deve ser o momento mais adequado para que seja feita a vacinação. Entretanto, a maior parte das vacinas usadas na aquicultura foi desenvolvida através de processos fundamentalmente empíricos (Gudding *et al.*, 1999).

Apesar de os peixes não apresentarem medula ou nódulos linfáticos, o timo, os rins e o baço constituem órgãos importantes do sistema imunológico desses animais (Shao, 2001). A habilidade do peixe desenvolver imunidade contra uma dada doença depende basicamente de quatro fatores, o tamanho do peixe, a temperatura da água, o agente de imunização e o método de vacinação. A imunização pode ser obtida a partir do contato com patógenos inativados e atenuados, assim como a partir de proteínas recombinantes e de imunização genética com DNA, agentes estes menos comuns que os dois primeiros tipos citados (Gudding *et al.*, 1999). Os três métodos básicos para vacinação de peixes são a imersão, a injeção e a vacinação oral (Gudding *et al.*, 1999). Para os métodos de vacinação por via oral e por imersão, nos quais o contato do agente de imunização se dá com a superfície da mucosa do animal, a compreensão dos mecanismos envolvidos na absorção do antígeno e na sua apresentação é ainda bastante limitada.

Se os peixes só serão expostos a uma determinada doença durante 3 a 12 meses, e se os animais possuírem peso inferior a 50 g, a vacinação por imersão pode ser o método mais fácil, rápido e menos oneroso. Este método consiste em mergulhar o peixe em uma solução diluída e aerada de vacina por até 60 segundos. Duas pessoas podem vacinar até 500.000

peixes (com massa corpórea de 5 g) por dia. O custo é baixo, cerca de US\$ 0,001 a US\$ 0,01 por 5 g de peixe (Syndel Laboratories Ltd., 2002).

O método de vacinação por injeção é geralmente reservado para peixes de alto valor comercial, quando estes ficam expostos por longos períodos a um ou mais tipos de doenças. A injeção é um método bastante efetivo, entretanto, o custo é significativamente mais elevado que o do método de imersão, sendo de aproximadamente US\$ 0,10 a US\$ 0,20 por peixe vacinado (Syndel Laboratories Ltd., 2002).

As vacinas orais são administradas juntamente com a alimentação e, portanto, dependem do apetite dos peixes para serem consumidas. O custo é moderado, cerca de US\$ 0,01 a US\$ 0,05 por 10 gramas de peixe (Syndel Laboratories Ltd. 2002), entretanto, a vacinação oral é um meio prático e rápido de se efetuar a imunização dos peixes confinados em tanques quando comparado ao método de injeção. Além disto, a vacinação por via oral não causa estresse ao peixe.

Apenas os métodos de injeção e imersão foram desenvolvidos para uso em escala industrial, sendo parte integrada na produção comercial de salmonídeos. Os adjuvantes dos tipos oleosos e glicanos têm sido empregados comercialmente na injeção de bacterinas (vacinas à base de bactérias inativadas), com o intuito de aumentar em intensidade e duração a proteção imune, entretanto, podem causar reações inflamatórias graves no local de injeção (Gudding *et al.*, 1999).

A vacinação pela via oral, constitui-se em um método rápido e prático, uma vez que a vacina pode ser adicionada diretamente à ração do animal, não exigindo número elevado de pessoas para realizar a vacinação. Em adição, a via oral não causa estresse ao peixe. Porém, para a produção de vacinas de uso oral, faz-se necessária a proteção dos agentes antigênicos contra os meios hostis do sistema gastrointestinal. Os antígenos devem chegar ao intestino posterior, da maneira mais intacta possível, para efetivamente serem capazes de promover a imunização.

Assim, para a vacinação oral, pesquisas recentes têm focado a proteção dos agentes imunizadores contra a degradação por ácidos estomacais e por proteases intestinais (Polk *et al.* 1994; Joosten *et al.*, 1997; Lavelle *et al.*, 1997). Neste sentido, uma estratégia que pode aumentar a eficiência da imunização por via oral é a incorporação dos agentes

imunizadores em dispositivos de liberação controlada, como micropartículas preparadas à base de polímeros naturais e sintéticos biocompatíveis.

2.4. Sistemas de Liberação Controlada

O desenvolvimento bem sucedido de vacinas veiculadas em dispositivos de liberação controlada para administração em animais, incluindo peixes, depende de vários fatores. A seleção do tipo de dispositivo de liberação controlada, de sua composição e tamanho, bem como de sua permeabilidade e do método utilizado para a incorporação do agente de imunização são elementos fundamentais no projeto destes sistemas, determinando as características físico-químicas e o impacto biológico final associado à sua administração.

A versatilidade e a disponibilidade de um grande número de métodos proporciona a seleção racional de protocolos adequados a necessidades específicas. Alguns aspectos, como a disponibilidade e custo da matéria-prima, são decisivos na seleção dos protocolos, assim como considerações no campo farmacológico envolvendo a rota de administração e a dosagem necessária. Uma vez estabelecidas as metodologias, é essencial o uso de estratégias de otimização de maneira a garantir, entre outros fatores, a incorporação eficiente e econômica do composto terapêutico, bem como a estabilidade química, física e antigênica do sistema obtido.

Conforme já mencionado, uma estratégia de desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada para vacinas orais envolve a incorporação dos agentes de imunização em matrizes poliméricas projetadas para a administração por via oral. A tecnologia de microesferas poliméricas tem a grande vantagem de reduzir o número de inoculações, aumentando a resposta imune após a imunização oral e reduzindo a dose total de antígeno necessária para proteção contra determinado patógeno (Lavelle *et al.*, 1997). As micropartículas podem ser misturadas à ração umedecida com água, obtendo-se uma pasta que pode ser extrusada e seca à temperatura ambiente por 48 horas (Joosten *et al.*, 1997).

Diversos polímeros têm sido avaliados para a preparação de micropartículas destacando-se polímeros naturais como o amido, o alginato, a gelatina e a quitosana, e

polímeros sintéticos como os polilactídeos-co-glicolídeos (PLG), os polianidridos e os ftalatos. Os polímeros naturais têm vantagens como baixo custo, biocompatibilidade e solubilidade em soluções aquosas, tendo como desvantagens a presença de contaminantes, a variabilidade entre lotes e a baixa hidrofobicidade. Em contraste, os polímeros sintéticos são mais reprodutíveis, podendo ser preparados com distintas massas moleculares e composições em termos de co-polímeros, além de possibilitar a obtenção de diferentes taxas de degradação (Singh e O'Hagan, 1998). Entretanto, estes materiais podem ser tóxicos e apresentam limitada solubilidade, sendo mais frequentemente solúveis em solventes orgânicos e apresentando maior dificuldade de liberação de antígenos biologicamente ativos *in vivo*.

O uso de alginato para a finalidade em questão, parece particularmente atraente, de forma que este composto será mais detalhadamente discutido a seguir.

2.5. Características do alginato

O alginato é um polissacarídeo natural, encontrado em várias espécies de algas, inclusive a alga marrom (Mofidi *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2002). Este polissacarídeo tem sido utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia, além do seu uso na preparação de matrizes poliméricas para a encapsulação de drogas, macromoléculas e células (Chan *et al.*, 2001). As matrizes poliméricas de alginato podem proteger antígenos encapsulados de condições proteolíticas ácidas, além disso elas podem associar-se aos tecidos da mucosa induzindo respostas imunes dos antígenos encapsulados (Lemoine *et al.*, 1998).

Os alginatos são copolímeros lineares de α -L-guluronato e α -D-manuronato, podendo apresentar estrutura molecular conforme indicado na Figura 2.2. A composição e a sequência dos monômeros no alginato dependem da sua origem (Mofidi *et al.*, 2000) e estes fatores determinam as propriedades físicas do alginato (Chan *et al.*, 2001). As propriedades gelificantes deste composto resultam da ligação cooperativa de cátions divalentes localizados entre blocos homopoliméricos os resíduos do guluronato (G-blocos). Dentre os cátions divalentes utilizados, destacam-se o magnésio, o cálcio, o estrôncio e o bário, sendo mais comumente empregado o cálcio. O uso de alginato de cálcio para imobilização de

células microbianas, por exemplo, pode resultar no aumento da atividade e da estabilidade operacional de células viáveis (Phillips e Poon 1988). Também se deve ressaltar que o alginato de cálcio é seguro, relativamente barato, sendo capaz de manter a viabilidade e a atividade celular por longos períodos (Bucke, 1986).

O padrão de empacotamento das moléculas de alginato e dos íons cálcio observados na gelificação da matriz é ilustrado na Figura 2.3. Os íons Ca^{++} estão localizados nas cavidades eletronegativas e as interações iônicas entre os blocos de guluronato e os íons Ca^{++} causam a formação de um gel termoestável resistente, cujas propriedades são fortemente dependentes das características do polímero e do método de preparação (Fundueanu *et al.*, 1999).

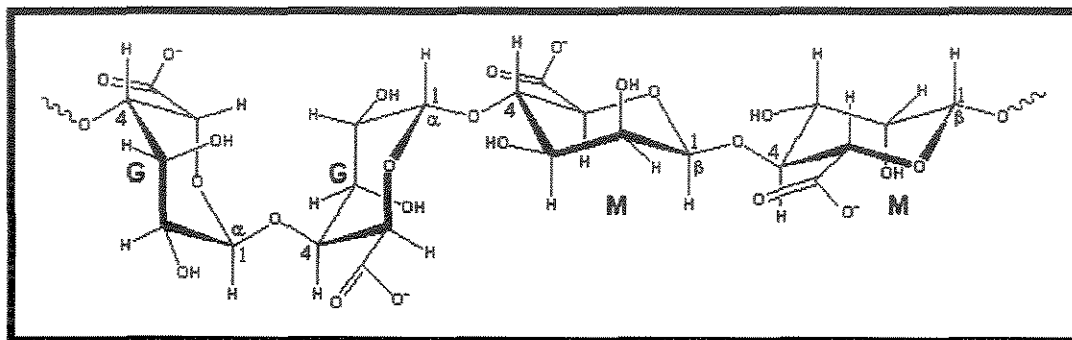


Figura 2.2: Fórmula molecular estrutural do alginato. **G** representa os copolímeros lineares de α -L-guluronato e **M**, os copolímeros de α -D-manuronato

A Figura 2.4 mostra a representação esquemática das ligações cruzadas no gel de alginato de cálcio. As fitas poliméricas formam agregados, nos quais ocorrem interstícios onde estão coordenados os íons cálcio (Moraes, 1991). A rede de ligações confere estabilidade ao gel.

De acordo com Lemoine *et al.* (1998), além das características favoráveis já explicitadas, os alginatos possuem propriedades mucoadesivas, as quais podem aumentar o tempo de contato entre as microesferas e o epitélio e entre as células do tecido linfóide associado ao intestino GALT (*gut associated lymphoid tissue*). A produção de micropartículas de alginato dispensa equipamentos sofisticados, tem ótimo perfil de

segurança associado ao processo e pode dispensar a utilização de solventes orgânicos durante a preparação, evitando a desnaturação do agente antigênico (Singh e O'Hagan, 1998).

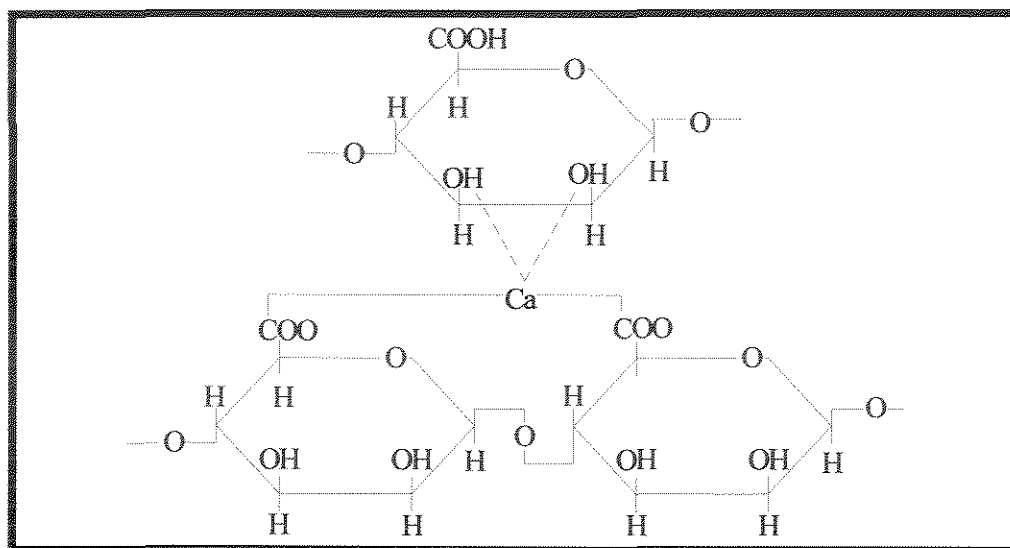


Figura 2.3: Provável mecanismo de ligação do alginato com os íons cálcio (adaptada de Moraes, 1991). Tanto ligações iônicas como de coordenação estão envolvidas.

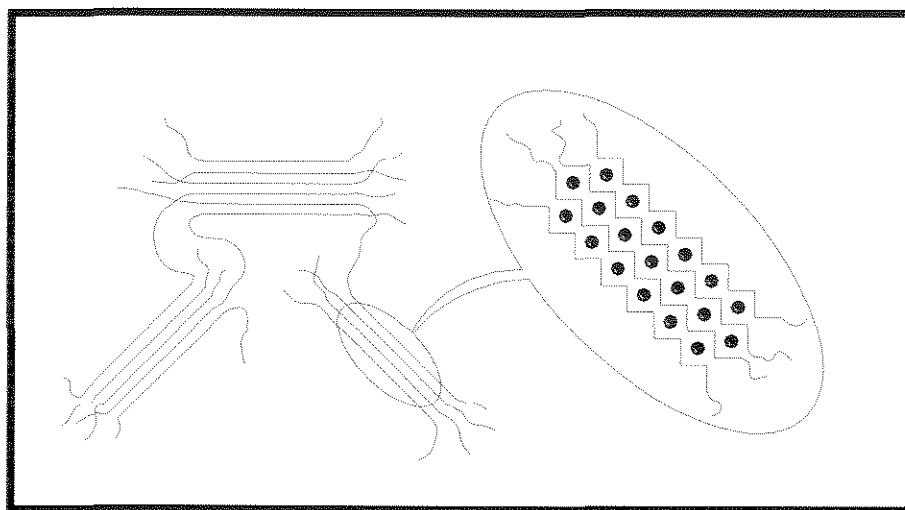


Figura 2.4: Esquema das ligações cruzadas no gel de alginato de cálcio. As esferas em preto representam os íons Ca^{++} , enquanto as linhas representam as cadeias individuais de alginato (adaptada de Moraes, 1991).

Segundo Lemoine *et al.* (1998), a massa molecular do alginato tem efeito significativo no tamanho das partículas obtidas. Estes autores verificaram experimentalmente que quando alginato de baixa viscosidade é empregado, pode ocorrer a formação de microesferas com diâmetros em torno de 5 a 20 μm e, em contra partida, quando alginato de média viscosidade é utilizado, as partículas formadas podem ser bem maiores. O aumento da massa molecular do alginato de média a alta viscosidade eleva o número total de reticulações entre as cadeias de alginato e o cálcio, aumentando o tamanho das partículas. Em adição, a utilização de alginato de sódio de baixa viscosidade permite a obtenção de soluções iniciais com elevada concentração de polímero, além de facilitar a difusão dos íons cálcio através da rede polimérica durante o processo de gelificação ou cura das partículas (Fundueanu *et al.*, 1998).

2.6. Métodos de preparação das micropartículas de alginato

As partículas de alginato podem ser preparadas por diferentes métodos, o que influencia diretamente as características das microesferas resultantes, como o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das partículas. Os principais métodos de preparação de microesferas de alginato são: emulsão, gotejamento e *spray-dryer*.

O método de emulsão consiste basicamente em misturar dois ou mais líquidos imiscíveis sob agitação, onde um dos líquidos será a fase dispersante enquanto o outro será a fase dispersa. A emulsão promoverá a formação de gotículas de alginato na fase aquosa envoltas pela fase oleosa. Com a subsequente adição de cloreto de cálcio, ocorre a gelificação dessas gotículas, havendo assim a formação das microesferas de alginato pelo processo conhecido como gelificação externa. Esse método é ilustrado na Figura 2.5 e permite obter partículas com diâmetros variando de dezenas a centenas de micrômetros.

A formação de partículas pode ser também efetuada através de uma estratégia mista que envolve a obtenção de uma emulsão seguida de gelificação interna (Poncelet *et al.*, 1999). Neste processo, a solução aquosa de alginato é misturada com um sal de cálcio insolúvel e é dispersa em uma fase oleosa para a formação de gotículas. Em seguida, induz-se a gelificação das gotículas pela adição de um ácido solúvel em óleo, que reduz o pH,

resultando em uma rápida solubilização e liberação interna dos íons cálcio. Assim como observado para o método fundamentado na formação de emulsão seguida de gelificação externa, através deste método pode-se obter partículas com diâmetros variando de dezenas a centenas de micrômetros.

No método do gotejamento, gotas de solução aquosa de alginato de sódio são adicionadas à solução de gelificante, normalmente, cloreto de cálcio. Pode-se empregar, em pequena escala, seringas e buretas para a etapa de gotejamento e, em maior escala, pode-se utilizar bombas. Nesta abordagem, as partículas são formadas imediatamente pelo processo de gelificação externa, fundamentado na difusão dos cátions divalentes através da matriz, os quais induzem as ligações cruzadas dos resíduos de guluronato do alginato (Dashevsky, 1998; Vandenberg e Noüe, 2001). Esta estratégia permite a obtenção de partículas com tamanhos da ordem de milímetros.

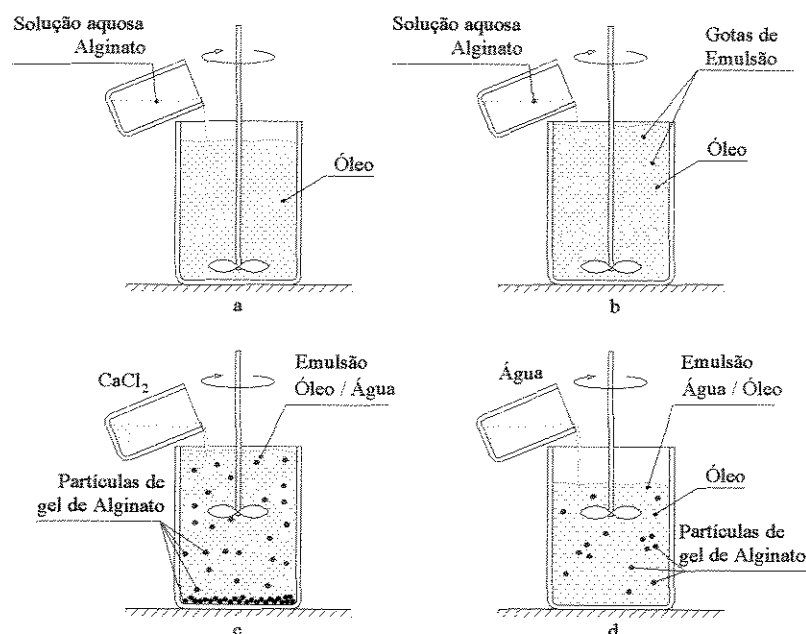


Figura 2.5: Diferentes estágios da preparação de microesferas de alginato pelo processo de emulsão. (a) adição de solução aquosa de alginato contendo o agente ativo que se deseja encapsular em uma fase oleosa; (b) formação de gotículas aquosas contendo alginato e o agente ativo na fase oleosa; (c) gelificação das gotículas pela adição de cloreto de cálcio; (d) inversão da emulsão para recuperação das partículas na fase aquosa. (figura adaptada de Poncelet *et al.*, 1999).

Aral e Akbuga (1998), Dashevsky (1998), Suckow *et al.* (2002), Fundueanu *et al.* (1999), Gaserod *et al.* (1998), Vandenberg e Notie (2001), utilizando a abordagem de gotejamento por seringas, relatam a obtenção de partículas com variadas faixas de diâmetros (de 500 a 5000 μm). Porém, observa-se claramente que as micropartículas produzidas por gotejamento possuem diâmetros maiores que as obtidas pelo processo de emulsão.

As microesferas de alginato podem ainda ser obtidas por processamento em *spray-dryer*. Neste processo, suspensões compostas de polímero e antígeno são atomizadas a altas temperaturas dentro do equipamento (Singh e O'Hagan, 1998). Ao final do processo, obtém-se as microesferas secas, na forma de pó. Apesar de ser considerado um método simples e fácil (Jiang *et al.*, 2001,) geralmente o equipamento utilizado tem um custo elevado. Associado a isso, há a necessidade de processamento de uma quantidade maior de antígenos (Singh e O'Hagan, 1998) para que se obtenha um rendimento satisfatório no processo.

Pode-se observar que a literatura propõe várias metodologias de preparação de partículas de alginato, porém a maioria das fontes pesquisadas não fornece dados suficientes para a reprodução exata dos procedimentos propostos. As diferentes preparações produzem partículas com características variadas quanto ao tamanho médio, faixa de distribuição de diâmetros e eficiência de encapsulação. Assim, faz-se necessário uma avaliação da razão custo/benefício antes que uma metodologia seja adotada. Para os fins do presente trabalho, o método de obtenção de partículas por emulsão foi adotado, pois permite a obtenção de micropartículas com tamanho reduzido (50 μm ou inferior), com custo acessível e razoável reprodutibilidade. Desta forma, este método será discutido com maior nível de detalhamento no tópico seguinte.

2.6.1. Produção de micropartículas de alginato empregando emulsões

Conforme se mencionou anteriormente, dependendo da metodologia, o controle do tamanho das partículas muitas vezes não é eficaz durante a preparação de micropartículas de alginato. Entretanto, os processos que envolvem emulsões são, geralmente, de mais fácil

escalonamento, permitindo a produção de grandes quantidades de microesferas de alginato com diâmetros que podem ser considerados como adequados para a finalidade almejada (inferiores a 50 μm).

A Tabela 2.1 mostra as faixas de diâmetros de partículas de alginato obtidas por diversos autores empregando o método da emulsão e suas derivações, com diferentes tipos de solventes orgânicos e taxas de agitação, adição ou não de tensoativos e empregando distintos procedimentos de lavagem. Pela análise da Tabela 2.1, pode-se observar que apesar de todos os autores utilizarem processos de emulsão, as partículas obtidas apresentaram diâmetros distintos. Os procedimentos apresentam particularidades tais como as taxas de agitação utilizadas, que podem variar de 200 a 8000 rpm. Ressalta-se que alguns autores sequer especificam os valores de taxa de agitação, referindo-se a este dado simplesmente como “agitação vigorosa” ou “altas taxas de agitação”.

Tabela 2.1: Tamanho médio de partículas de alginato obtidas por técnicas de emulsão empregadas por diferentes autores.

Referência	Diâmetro médio de partícula (μm)
Sultana <i>et al.</i> (2000)	500 a 1000
Mofidi <i>et al.</i> (2000)	1 a 500
Lemoine <i>et al.</i> (1998)	< 10
Poncelet <i>et al.</i> (1999)	150 a 1500
Ribeiro <i>et al.</i> (1999)	120 a 1600

Normalmente, o solvente da fase aquosa pode simplesmente ser constituído por água destilada (Murata *et al.*, 2000; Hildebrand e Tack, 2000; Chan *et al.*, 2002; Fundueanu *et al.*, 1998; Fundueanu *et al.*, 1999), como pode também conter outros componentes, como PBS (tampão fosfato salino) a pH 7,0 (Lemoine *et al.*, 1998), e ainda meios de cultura

como o Grace para células de insetos (Kim *et al.*, 2002) e o RSM a 9,5% para encapsular bactérias probióticas (Sultana *et al.*, 2000).

A fase oleosa pode ser composta por solventes orgânicos como isooctano (Chan *et al.*, 2002), 1,2 dicloroetano (Fundueanu *et al.*, 1998; Fundueanu *et al.*, 1999), alquil acetatos e acetona (Hildebrand e Tack, 2000), querosene ou n-butanol (Mofidi *et al.*, 2000) ou por óleos vegetais (Sultana *et al.*, 2000; Mofidi *et al.*, 2000), como óleo de canola (Poncelet *et al.*, 1999), óleo de soja (Ribeiro *et al.*, 1999), óleo de oliva, óleo de milho e óleo de gergelim (Murata *et al.*, 2000). A emulsão preparada com óleos vegetais resulta em partículas biocompatíveis, uma vez que vários dos solventes orgânicos mencionados são geralmente tóxicos e de difícil remoção.

A solução de gelificação pode conter apenas cloreto de cálcio em água (Fundueanu *et al.*, 1998; Fundueanu *et al.*, 1999; Singh e O'Hagan, 1998; Jiang *et al.*, 2001; Poncelet *et al.*, 1999; Sultana *et al.*, 2000) ou pode ainda incluir, além destes íons, etanol e ácido acético (Mofidi *et al.*, 2000) e cloreto de cálcio com Tween® 80 (Ribeiro *et al.*, 1999).

Conforme já mencionado, a distribuição dos tamanhos das partículas formadas por emulsão pode sofrer a influência de diversos fatores, entre eles a concentração e estrutura molecular do alginato, a taxa de agitação empregada para produção das microesferas e a presença ou não de compostos surfatantes (Poncelet *et al.*, 1999; Mofidi *et al.*, 2000; Hildebrand e Tack, 2000; Singh e O'Hagan, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999).

Em relação ao tipo de alginato, sabe-se que sua composição, sua sequência de resíduos e sua massa molecular determinam suas propriedades físicas. A variabilidade molecular é dependente do organismo do qual o alginato foi isolado (Gombotz e Wee, 1998). Sendo assim, alguns tipos de alginato podem conter mais resíduos de α -L-guluronato que outros. Uma vez que o cálcio liga-se primariamente aos resíduos de guluronato (Poncelet *et al.*, 1999), uma amostra de alginato que possua maior quantidade desses resíduos apresentará soluções aquosas mais viscosas e géis mais resistentes. Como o tamanho das partículas formadas depende diretamente da viscosidade e da concentração das soluções de alginato usadas no processo de emulsão (Hildebrand e Tack, 2000; Gombotz e Wee, 1998; Singh e O'Hagan, 1998; Poncelet *et al.*, 1999), uma redução na concentração de alginato favorece a diminuição no tamanho das microesferas, mas pode também reduzir sua resistência mecânica e estabilidade em ambientes hostis como o trato gastrintestinal.

Outro fator de grande importância no tamanho das partículas formadas por emulsão, é a taxa de agitação. Segundo Mofidi *et al.* (2000) utilizando-se uma taxa de agitação em torno de 2430 rpm obtém-se partículas com diâmetros de 1 a 50 μm , porém, quando a taxa de agitação é reduzida para 1188 rpm, as partículas obtidas passam a apresentar diâmetros de 400 a 500 μm . Altas taxas de agitação promovem a formação de pequenas gotas na emulsão, as quais, após gelificadas originam partículas de dimensões reduzidas.

Outro fator relevante no diâmetro das partículas obtidas pela técnica de emulsão é a adição de emulsificantes ao sistema. Um emulsificante pode ser definido como um estabilizador das gotículas presentes na fase interna de uma emulsão. Tais compostos possuem em sua molécula porções hidrofílicas e porções hidrofóbicas, sendo portanto denominados de compostos anfífilos. Dependendo do tipo de emulsão que se deseja formar (água em óleo ou óleo em água), diferentes emulsificantes podem ser escolhidos.

Para que a seleção seja feita de forma a favorecer a emulsão de interesse, deve-se avaliar o EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo ou HLB, *hydrophilic-lipophilic balance*) do emulsificante. Geralmente, emulsões do tipo óleo em água são formadas quando o EHL do emulsificante está na faixa de 9 a 12, enquanto as emulsões do tipo água em óleo são formadas com emulsificantes com EHL na faixa de 2 a 8 (Allen, 1999).

Os efeitos de diferentes tipos de surfatantes em microesferas de alginato produzidas por métodos envolvendo emulsificação foram detalhadamente discutidos por Wan *et al.* (1994). Segundo estes autores, para um mesmo EHL, surfatantes com maior número de cadeias de ácido graxo (como o sorbitan tri-oleato) resultam em microesferas com maiores diâmetros e com elevada incorporação de agente ativo, enquanto surfatantes com cadeias longas isoladas de polioxietileno produzem microesferas menores. Isto pode ser explicado pelo fato do empacotamento das moléculas de tensoativo constituído por uma única cadeia, como o poli-oxietileno sorbitan mono-oleato Tween® 80 e o sorbitan mono-oleato Span® 80, ser mais próximo e uniforme na interface dos glóbulos.

Os surfatantes usados na produção de micropartículas podem ser tanto iônicos quanto não iônicos. Os iônicos podem ser mais facilmente removíveis por lavagens com excesso de fase aquosa, entretanto, estes podem apresentar menor biocompatibilidade que os não iônicos. Neste sentido destacam-se os tensoativos não iônicos Tween® 80 e Span® 80, por não apresentarem efeitos tóxicos ou irritantes mesmo quando ingeridos, sendo

ambos aprovados pelo FDA/EUA (*Food and Drug Administration*) para uso em excipientes farmacêuticos destinados à administração por via oral. As fórmulas moleculares estruturais de ambos surfatantes mencionados são mostradas nas Figura 2.6 e 2.7, sendo o EHL do Span[®] 80 igual a 4,3 e o do Tween[®] 80, igual a 15).

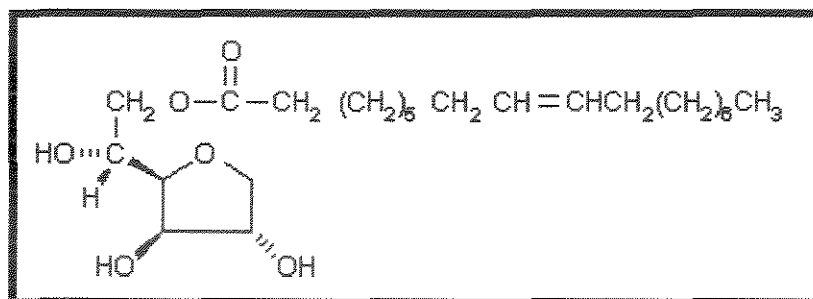


Figura 2.6: Fórmula molecular estrutural do tensoativo Span[®] 80 (disponível em www.sigmaaldrich.com, acesso em 09/06/2004).

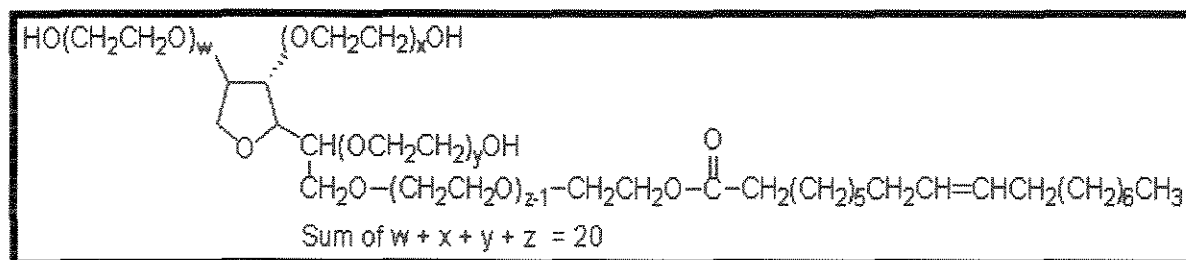


Figura 2.7: Fórmula molecular estrutural do tensoativo Tween[®] 80 (disponível em www.sigmaaldrich.com, acesso em 09/06/2004).

O tensoativo Tween[®] 80, eficiente na estabilização de emulsões de óleo em água, já foi empregado com sucesso na produção de micropartículas poliméricas por emulsão por vários autores (Hildebrand e Tack, 2000; Sultana *et al.*, 2000 e Poncelet *et al.*, 1999).

O surfatante Span[®] 80, por outro lado, favorece a formação de emulsão de água em óleo, tipo de sistema de interesse neste trabalho. Além desse fato, segundo Poncelet *et al.*

(1999), o uso de um surfatante solúvel em óleo, como o Span[®],80, permite uma notável redução no tamanho das partículas de alginato, resultante de uma diminuição da tensão interfacial e da prevenção da coalescência das gotas. Deve-se ressaltar que a obtenção de partículas com dimensões reduzidas (inferiores a 50 µm) é um dos focos centrais deste trabalho.

Embora a utilização de emulsões seja mencionada na literatura para a produção de micropartículas de alginato, algumas vezes a relação entre os volumes de fase aquosa e fase oleosa não é adequadamente descrita como em Lemoine *et al.* (1998), Sultana *et al.* (2000) e Mofidi *et al.* (2000), embora este dado seja de relevância.

Destaca-se que a maior parte das referências consultadas que abordam a preparação das partículas por emulsão não fornece dados suficientes sobre os tipos de agitadores empregados. Entretanto, o padrão de agitação tem forte impacto na forma e no diâmetro das partículas. Assim, faz-se necessário um estudo comparativo da mistura através de vários tipos de agitadores e seus efeitos sobre as emulsões.

Desta forma, observa-se várias lacunas quanto à descrição das condições operacionais envolvidas na preparação de micropartículas de alginato, lacunas estas ainda mais freqüentes no tocante à produção de veículos para a liberação controlada de agentes de imunização para peixes.

2.7. Utilização de antígenos incorporados em micropartículas de alginato e de outros polímeros para a imunização de peixes

Vários trabalhos relatando o uso de alginato e de outros polímeros biocompatíveis para a encapsulação de proteínas ou de medicamentos podem ser encontrados na literatura, porém, não foram localizados trabalhos em números expressivos que abordassem especificamente a utilização de antígenos incorporados em micropartículas para a vacinação de peixes. Dentre alguns dos trabalhos publicados nos últimos anos, destacam-se os relacionados na Tabela 2.2.

O trabalho realizado por Romalde *et al.* (2004) destaca a necessidade de se proteger o antígeno para que este possa manter-se intacto durante a passagem pelo estômago, até a

chegada ao intestino onde ocorrerá o processo de imunização. A proteção do antígeno *Lactococcus garvieae* foi realizada através da sua incorporação em micropartículas de alginato - dissolvido em 30 mL de suspensão bacteriana (contendo 10^9 células/mL) - preparadas em *spray-drier*. Através do procedimento utilizado pelos autores, foram obtidas partículas com diâmetros de cerca de 30 μm . Nos ensaios *in vivo*, microesferas de alginato intactas foram detectadas, através de microscopia de fluorescência, no estômago e na parte anterior do intestino, entre 1 e 24 horas após a administração oral das partículas, indicando assim que estas resistiram aos baixos valores de pH e à ação das proteases.

Tabela 2.2: Utilização de antígenos incorporados em micropartículas poliméricas para a imunização de peixes por via oral.

Tipo de Peixe Imunizado	Composição da micropartícula	Antígeno Incorporado	Referência
Truta	Alginato, com recobrimento ou não de polilisina	Bacterina de <i>Lactococcus garvieae</i>	Romalde <i>et al.</i> , 2004
Carpa e truta	Alginato	Bacterina de <i>Vibrio anguillarum</i>	Joosten <i>et al.</i> , 1997
Truta	Poli (DL-lactídeo-co-glicolídeo)	Gama globulina humana	Lavelle <i>et al.</i> , 1997
Salmão	Dextrose recoberta com Eudragit L-30D (copolímero ácido acrílico-metacrílico disperso em látex)	Trinitrofenil associado a lipopolissacarídeo ou a hemocianina	Piganelli <i>et al.</i> , 1994

Lavelle *et al.* (1997) utilizaram gama globulina humana (HGG) como antígeno modelo. Esta proteína foi microencapsulada em PLG (poli DL lactato co-glicolato), sendo que as partículas foram preparadas por emulsão água/óleo/água. Para a formação da emulsão óleo/água, uma solução a 6% de PLG em diclorometano foi emulsificada com 5mL de água destilada contendo 250 mg de HGG. A emulsão resultante foi novamente

emulsificada com uma solução aquosa de álcool polivinílico 20% (m/v) para a obtenção de uma emulsão do tipo água/óleo/água, e a incorporação final da HGG nas partículas foi detectada em 2,0 %. Os ensaios realizados *in vivo* mostraram que com a encapsulação houve um aumento no tempo de retenção do antígeno no estômago e um retardamento da sua entrada na região intestinal. Nos peixes que foram imunizados com antígeno solúvel (não encapsulado), fragmentos de HGG foram detectados na região estomacal 15 minutos após a administração oral, no entanto nenhum antígeno intacto ou fragmento com alta massa molecular de HGG solúvel foi detectado no interior do intestino dos animais. Por outro lado, até 2 horas após a administração, os autores não detectaram HGG administrada na forma encapsulada no intestino. Subseqüentemente, no período entre 2 a 12 horas os antígenos que foram detectados estavam praticamente intactos. Assim, o estudo sugere que a associação dos antígenos com as micropartículas de PLG pode ser útil para a produção de vacinas orais, uma vez que a encapsulação protege uma percentagem de antígenos da proteólise no trato digestivo, aumentando o nível de antígenos intactos que posteriormente participarão do processo de imunização.

Vacinas orais visando a imunização de peixes contra a bactéria *Vibrio anguillarum* foram produzidas por Joosten *et al.* (1997), utilizando alginato. Segundo os autores dois tipos de partículas de alginato foram preparadas, gerando partículas de até 20 µm. Com o intuito de se obter maiores informações em relação ao comportamento das partículas em diferentes condições de pH, estas foram submetidas aos pH 4,8; 8 e 10, no qual se verificou que o intumescimento das partículas é claramente dependente do pH em que elas se encontram. Nos ensaios realizados em pH 8, algumas partículas (do tipo I) tiveram seu tamanho original aumentado em 77%, enquanto outras (do tipo II) apresentaram um aumento da ordem de 140% após 48 h, sendo que após 8 h em tampão pH 8, aproximadamente 40% da bactéria *V. anguillarum* havia sido liberada na formulação do tipo I, contra 60 % de liberação na outra formulação. Entretanto, os ensaios realizados em pH 4,8 mostraram um aumento de cerca de 10% no tamanho original das partículas. Assim, conclui-se que as partículas de alginato em contato com o pH alcalino da parte posterior do intestino, começarão a se degradar e conseqüentemente liberarão os antígenos encapsulados, iniciando os processos de imunização do peixes. Deve-se ressaltar que os procedimentos utilizados para a preparação das partículas não foram explicitados pelos autores, dificultando a reprodução dos ensaios.

Piganelli, *et al.* (1994) conduziram um estudo comparativo para determinar a eficiência de imunização dos peixes vacinados com antígenos incorporados em microesferas com recobrimento entérico (ECAMs), vacinados por injeção intraperitoneal (i. p.) ou por imersão em antígenos livres. As microesferas foram preparadas com dextrose recoberta com Eudragit L-30D (copolímero ácido acrílico-metacrílico disperso em látex) pelo método de spray. O antígeno utilizado foi o trinitrofenil (TNP) associado a lipopolissacarídeo formando (TNP-LPS) ou a hemocianina dando origem ao (TNP-KLH). Os dados obtidos mostram que a vacinação oral aumentou significativamente o nível de anticorpos anti-TNP no período de 4 a 6 semanas após a vacinação, quando comparado com o grupo controle. A concentração de anticorpos anti-TNP após injeção intraperitoneal de TNP-LPS foi significativamente maior que para os controles a 4, 6 e 8 semanas pós-imunização, enquanto o grupo que foi vacinado por imersão não mostrou diferença significativa do controle. Não houve diferenças relevantes entre os métodos de imunização TNP-LPS (i. p.) e ECAM. O grupo imunizado com o antígeno TNP-KLH incorporado em ECAM mostrou uma significativa elevação dos níveis de anticorpos anti-TNP comparados com os grupos controle a 6 e 8 semanas, enquanto o grupo imunizado por via intra peritoneal foi significativamente maior que o controle no período de 8 semanas.

Em adição aos trabalhos listados na Tabela 2.2, destacam-se também os publicados nos últimos 10 anos por Dalmo *et al.* (1995) e Polk *et al.* (1994). Enquanto o primeiro grupo avaliou, em salmões, a absorção intestinal e a localização em tecidos de microesferas de poliestireno, o segundo grupo enfocou a proteção do antígeno modelo BSA, além de bactéria do gênero *Vibrio*, em microcápsulas de quitosana-alginato preparadas pela extrusão de uma mistura de alginato de sódio contendo o agente antigênico em uma solução de cloreto de cálcio contendo quitosana.

Deve-se ressaltar que os resultados obtidos nos trabalhos discutidos são promissores e que, provavelmente cada tipo de peixe necessite de partículas com características diferentes, uma vez que cada espécie possui particularidades em relação à morfologia e fisiologia do trato digestivo. Os esforços em pesquisa nesta área devem também se concentrar no estudo dos mecanismos de absorção dos antígenos encapsulados no intestino dos peixes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Agente antigênico: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) inativada com formaldeído a 0,5 %, gentilmente cedida pelo Professor Dr. Henrique C. P. Figueiredo, do Departamento de Medicina Veterinária (Núcleo de Aquacultura) da Universidade Federal de Lavras e albumina de soro bovino, BSA, fração V (Inlab), empregada como antígeno modelo.

Reagentes: Alginato de sódio de baixa viscosidade (Sigma Chemical Co.), óleos de milho, soja, canola e girassol (Liza) disponíveis no comércio local, ácido acético glacial, citrato de cálcio, Tween® 80 (Synth). Álcool etílico, cloreto de cálcio dihidratado e álcool isopropílico (Ecibra). Albumina de soro bovino, BSA (fração V- Inlab), Span® 80 (Fluka), EDTA (Merck), água de ionizada em sistema Milli-Q Académic Quantum EX (Millipore).

Equipamentos: Agitador de pás inclinadas modelo 251 D (Quimis), estufa (Nova Ética), balança analítica (Quimis), banho termostático modelo 214 M2 (Quimis), medidor de pH (Oakton), centrífuga modelo TDL 80-2B (Centribio), espectrofotômetro de espalhamento de laser Mastersizer S modelo S-MAM 5005 (Malvern Instruments), microscópio ótico modelo DMLM acoplado a computador Q 500 IW (Leica), espectrofotômetro UV-visível modelo DU640 (Beckman).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação das Partículas

As partículas de alginato foram preparadas por diversos métodos empregando emulsões, no sistema mostrado na Figura 3.1., conforme descrito a seguir. Foram

preparadas partículas sem a incorporação de agentes ativos, incorporando BSA e encapsulando células inativadas de *Aeromonas hydrophila*.

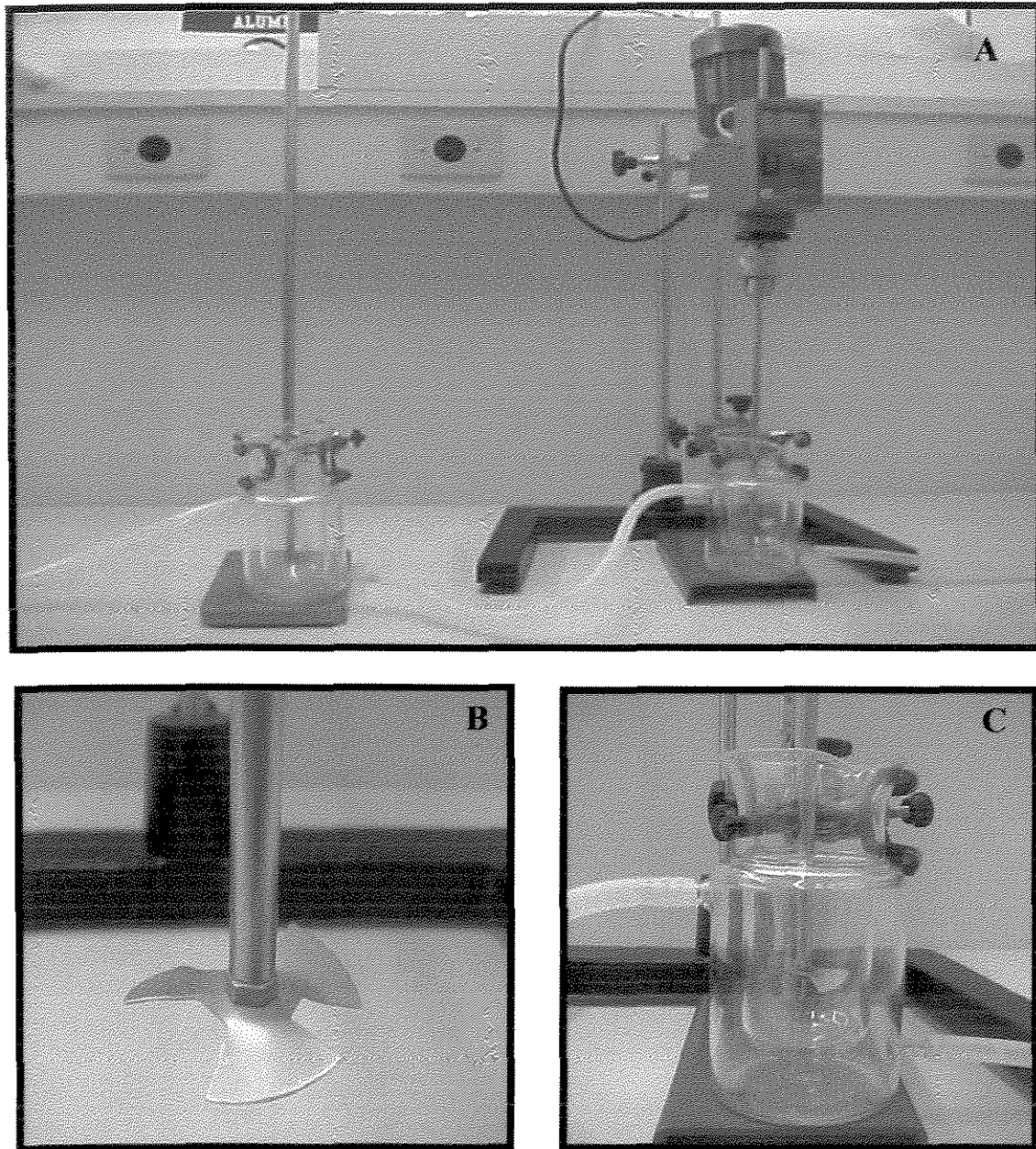


Figura 3.1: Sistema empregado para preparação das partículas de alginato por emulsão. A) sistema completo, B) detalhe da hélice utilizada e C) detalhe do béquer encamisado.

3.2.1.1. Preparação de partículas por gelificação interna

A metodologia proposta por Poncelet *et al.* (1999) foi seguida, com o intuito de obter se partículas através de emulsão acoplada à gelificação interna. Uma alíquota de 20 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) foi misturada com 1 mL de solução de citrato de cálcio a 500 mM e com 100 mL de óleo de milho, sob agitação de 400 rpm por 15 minutos. À emulsão formada, foram adicionados 20 mL de óleo de milho contendo ácido acético glacial a 80 μ M. Após cinco minutos, adicionou-se 150 mL de solução aquosa de CaCl_2 a 0,05 mM à emulsão. As partículas formadas foram recuperadas por filtração em papel de filtro, lavadas com solução aquosa de Tween® 80 a 1% (m/v), e colocadas em estufa a 37°C por 2 horas.

3.2.1.2. Preparação de partículas utilizando solução gelificante e avaliação do efeito de diferentes soluções de lavagem

As partículas foram preparadas por emulsão, porém baseando-se no procedimento proposto por Mofidi *et al.* (2000). Uma alíquota de 35 mL de solução aquosa contendo de 3 a 3,5% (m/v) de alginato de sódio foi misturada com 35 mL de óleo de milho, sob agitação de 1000rpm por 10 minutos. À emulsão formada adicionou-se 15,5 mL de solução gelificante composta por 1g de CaCl_2 , 7,5 mL de água destilada, 7,5 mL de etanol e 0,5 mL de ácido acético glacial, agitando-se novamente a amostra por 10 minutos a 1000 rpm.

Na etapa de recuperação e lavagem das partículas, testou-se cinco procedimentos alternativos com a finalidade de diminuir a quantidade de óleo residual, que afeta as metodologias de caracterização de partículas. Em uma primeira abordagem, as partículas obtidas foram recuperadas por filtração em papel de filtro e exaustivamente lavadas com água destilada.

No segundo procedimento, após a adição da solução gelificante, a amostra foi mantida em geladeira por uma noite e, em seguida, foi, por 4 vezes, centrifugada a 4000 rpm em centrífuga de tubos e ressuspensa em solução de CaCl_2 a 0,05 M com Tween® 80 a 1% (m/v), segundo o procedimento proposto por Ribeiro *et al.* (1999). Após a última

centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em água deionizada, procedimento este que dispensou a etapa de filtração das partículas. Em um terceiro procedimento, adicionou-se de 50 a 150 mL de solução de CaCl_2 a 0,05 M à amostra já contendo o gelificante para a inversão da emulsão e após essa etapa, as partículas foram, como anteriormente, filtradas e lavadas com solução de CaCl_2 0,05 M.

Em um quarto procedimento, baseado na metodologia proposta por Lemoine *et al.* (1998), as partículas formadas foram recuperadas por filtração e lavadas com três porções de 15 mL de álcool etílico e, posteriormente, com água destilada em abundância. Estas partículas foram estocadas em fase aquosa e, alternativamente, secas em estufa por 2 horas a 37°C.

Com o intuito de se obter uma remoção mais eficaz do óleo residual nas partículas, estas foram alternativamente lavadas com acetona (Fundueanu *et al.*, 1998 e 1999) e posteriormente lavadas com água deionizada. O volume de acetona utilizado para as lavagens foi de 45 mL, divididos em 3 porções de 15 mL.

Destaca-se porém que a lavagem das partículas com acetona e com etanol, pode desnaturar ou precipitar as proteínas do antígeno, sendo que estes procedimentos de lavagem só devem ser utilizados para fins de caracterização das partículas e não para a utilização *in vivo* destas.

3.2.1.3. Avaliação do efeito da concentração da solução de alginato e da taxa de agitação no diâmetro de partículas preparadas usando solução gelificante

O efeito destas variáveis foi analisado empregando-se um planejamento experimental exploratório do tipo 2^2 variando-se a concentração da solução de alginato de 2% a 5% (m/v) e a taxa de agitação de 500 rpm a 2000 rpm, conforme mostrado na Tabela 3.1.

Nestes ensaios empregou-se fundamentalmente o método de emulsão proposto por Mofidi *et al.* (2000), misturando-se 35 mL de solução aquosa de alginato (com concentrações definidas na Tabela 3.1) com 35 mL de óleo de milho, sob agitação por 10 minutos, nas taxas especificadas na Tabela 3.1. Em seguida, adicionou-se 15,5 mL da

solução gelificante anteriormente descrita sobre a emulsão formada e esta foi novamente submetida à agitação por 10 minutos no mesmo nível anteriormente empregado. Uma alíquota de 150 mL de solução aquosa de CaCl_2 a 0,05 M foi adicionada para a inversão da emulsão. Destaca-se que os ensaios A5, A6 e A7 representam repetições da condição central, na qual as variáveis independentes testadas foram avaliadas em seus níveis intermediários.

Tabela 3.1 -Níveis das variáveis testadas na avaliação do efeito da concentração de alginato e da taxa de agitação no diâmetro das partículas.

Ensaio	Concentração de alginato (%)	Taxa de agitação (rpm)
A1	2	500
A2	5	500
A3	2	2000
A4	5	2000
A5	3,5	1250
A6	3,5	1250
A7	3,5	1250

3.2.1.4. Avaliação do efeito da inversão da ordem de mistura da emulsão com a solução gelificante

A metodologia descrita no item anterior foi alterada, utilizando a concentração de alginato e a taxa de agitação do ponto central do planejamento descritos na Tabela 3.1, ou seja, 3,5% (m/v) e 1250 rpm, respectivamente. Neste ensaio, a emulsão formada foi vertida

sobre 70 mL de solução gelificante sob agitação de 350 rpm por 10 minutos. As partículas formadas foram recuperadas por filtração, lavadas com álcool isopropílico, posteriormente lavadas com água destilada e finalmente colocadas em estufa por 2 horas a 37°C.

Em uma segunda abordagem, o procedimento utilizado consistiu em misturar 35 mL de solução aquosa de alginato 3,5% com 35 mL de óleo de milho, sob agitação de 1250 rpm por 10 minutos. Essa emulsão foi vertida em 70 mL de solução gelificante sob agitação de 2000 rpm por 10 minutos. Foram adicionados 150 mL de solução de CaCl_2 0,05 M à mistura formada, que foi filtrada em papel de filtro e lavada com etanol e, posteriormente, com água destilada. Com a finalidade de secar as partículas, estas foram colocadas em estufa a 37°C por 2 horas.

3.2.1.5. Análise do efeito da proporção entre os volumes das fases aquosa e oleosa no diâmetro das partículas preparadas usando solução gelificante

Baseando-se na metodologia proposta por Mofidi *et al.* (2000) já incorporando as adaptações necessárias ao caso em estudo abordadas no item anterior, realizou-se um novo estudo variando-se a proporção entre os volumes da fase constituída de solução aquosa de alginato a 3,5% e da fase composta pelo óleo vegetal. Entretanto, fixou-se a soma dos volumes totais das fases em 70 mL. A Tabela 3.2 mostra as proporções volumétricas empregadas.

A emulsão, formada pela mistura das fases descritas na Tabela 3.2 por 10 minutos a 1250 rpm foi vertida em 70 mL de solução gelificante (cloreto de cálcio, água destilada, etanol e ácido acético glacial) e o sistema foi agitado por 10 minutos a 2000 rpm. As partículas obtidas foram lavadas com etanol, posteriormente com água destilada e foram filtradas em papel de filtro. As partículas foram armazenadas em água deionizada por uma noite, em geladeira, e no dia seguinte, foram novamente filtradas para a remoção de óleo residual. Após a filtração, as partículas foram ressuspensas em água deionizada e armazenadas em geladeira a 4°C para análises posteriores de distribuição de diâmetros.

Tabela 3.2: Proporções entre os volumes das fases da emulsão avaliadas.

Ensaio	Volume da solução de alginato (mL)	Volume de óleo de milho (mL)	Percentagem da fase aquosa (%)
B1	7	63	10
B2	14	56	20
B3	21	49	30
B4	28	42	40
B5	35	35	50

3.2.1.6. Avaliação do efeito da taxa de agitação e da adição do tensoativo Span® 80 no diâmetro de partículas preparadas usando solução gelificante

Com o intuito de avaliar a influência da taxa de agitação e da adição do tensoativo Span® 80 no diâmetro das partículas, um planejamento estatístico 2² composto de sete experimentos (quatro pontos experimentais e três pontos centrais) foi realizado segundo a Tabela 3.3.

A proporção volumétrica entre as fases utilizada neste experimento foi de 7 mL de fase aquosa e 63 mL de fase oleosa. A emulsão formada pela mistura das fases contendo, na fase oleosa, Span® 80 em diferentes concentrações, por 10 minutos a distintas taxas de agitação foi vertida em 70 mL de solução gelificante e o sistema resultante foi novamente agitado.

A temperatura, nestes e nos ensaios subseqüentes, foi controlada em 25°C. As partículas obtidas foram lavadas com etanol, posteriormente com água destilada e foram recuperadas em papel de filtro. As partículas foram armazenadas em água deionizada por uma noite, em geladeira, e no dia seguinte, foram novamente filtradas para a remoção do óleo residual. Após a filtração, as partículas foram ressuspensas em água deionizada e armazenadas em geladeira a 4°C para as análises posteriores de distribuição de diâmetros.

Tabela 3.3: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da taxa de agitação e da adição de Span® 80.

Ensaio	Agitação (rpm)	Span® 80 (%)
E 1	500	0,2
E 2	2000	0,2
E 3	500	2,0
E 4	2000	2,0
E 5	1250	1,1
E 6	1250	1,1
E 7	1250	1,1

Um estudo similar foi efetuado, seguindo-se a Tabela 3.3 mencionada anteriormente, porém, com a finalidade de obter uma massa maior de partículas a cada ensaio, a proporção entre as fases foi alterada para 21 mL de fase aquosa e 49 mL e fase oleosa.

3.2.1.7. Estudo da influência da vazão de adição da emulsão à solução gelificante nas características das partículas

Partículas de alginato foram preparadas por emulsão nas proporções de 7 mL de solução aquosa de alginato 3,5 % (m/v) e 63 mL de óleo de milho contendo 0,2 % de Span® 80. O sistema foi agitado por 10 minutos a 2000 rpm. A emulsão formada foi adicionada à solução gelificante a duas vazões diferentes, de 70 mL/h e de 280 mL/h, através de uma bomba de infusão do tipo seringa, sob agitação constante da mistura a 2000

rpm. As partículas obtidas foram lavadas com etanol e posteriormente com água e filtradas em papel de filtro. Estas foram analisadas quanto a morfologia e ao diâmetro.

3.2.1.8. Avaliação do efeito do tipo de óleo vegetal empregado na morfologia, no diâmetro médio e na distribuição de tamanho das partículas de alginato

As partículas de alginato foram preparadas pelo procedimento descrito anteriormente, nas condições do Ensaio E2. A proporção utilizada foi de 7 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e 63 mL de óleo vegetal (milho, soja, canola ou girassol). As partículas obtidas foram lavadas com acetona, posteriormente com água destilada e recuperadas em papel de filtro. Após armazenamento em água deionizada por uma noite em geladeira a 4°C, as partículas foram novamente filtradas para a remoção do óleo residual e ressuspensas em água deionizada para as análises de morfologia e de tamanho.

3.2.1.9. Secagem de partículas lavadas com diferentes solventes

O objetivo deste ensaio foi verificar a eficiência da lavagem das partículas, isoladamente, com etanol ou acetona, no processo de secagem das partículas, para que estas pudessem ser estocadas na forma de pó ao invés de em suspensão aquosa.

As partículas foram preparadas conforme o procedimento descrito para o ensaio E2 no item 3.2.1.6. Após a preparação, as partículas foram recuperadas através de filtração, lavadas por 3 vezes com 15mL de etanol ou acetona, e secas à temperatura ambiente por 4 dias ou em estufa a 40°C durante 3 horas com subsequente exposição à temperatura ambiente por mais 3 dias.

3.2.1.10. Incorporação de albumina de soro bovino nas partículas de alginato

As partículas de alginato foram preparadas nas condições do Ensaio E2, conforme descrito no item 3.2.1.6. A proporção utilizada foi de 63 mL de óleo de milho ou de soja e 7 mL de solução de alginato a 3,5% incorporando concentrações de albumina de soro bovino

(BSA) que variaram na faixa de 2 a 16 % (relação BSA/alginato), o que corresponde a uma faixa de 0,7 a 5,6 mg/mL de proteína. A mistura de alginato com BSA foi adicionada ao óleo já contendo Span® 80 e, em seguida, efetuou-se o procedimento de formação de emulsão já descrito anteriormente. Para garantir as concentrações finais desejadas, uma solução aquosa de alginato mais concentrada foi preparada (a 4,08%) e misturada com as diferentes soluções de BSA solubilizadas em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl. Quando necessário, o volume era completado com solução salina.

3.2.1.11. Obtenção das Bactérias Inativadas para Incorporação nas Micropartículas

Para o cultivo e inativação das bactérias pela equipe do Prof. Dr. Henrique C. P. Figueiredo, do Departamento de Medicina Veterinária (Núcleo de Aquacultura) da Universidade Federal de Lavras, o procedimento descrito a seguir foi utilizado.

A cultura de *A. hydrophila* foi replicada em meio de ágar soja triptose (TSA) e incubada a 30°C por 24 horas. A massa celular obtida em placa foi repicada em três erlenmeyers contendo 250 mL de caldo cérebro-coração (BHI) e novamente incubada a 30°C por 24 horas, em incubadora, sob agitação orbital a 150 rpm. O caldo obtido após a incubação foi inativado com 0,5% de formaldeído e mantido sob refrigeração a 4°C por 24 horas. Após este período foi feito um novo repique em placas de TSA para confirmar a inativação, com incubação a 30°C por 24 horas. Depois de confirmada a inativação (pela ausência de crescimento celular), o caldo foi centrifugado a 5000 x g por 15 minutos, com descarte do sobrenadante para a obtenção dos *pellets*, que foram ressuspensos em tampão fosfato salina a pH 7,2 para o transporte, à temperatura ambiente, até Campinas, SP.

Antes da incorporação nas partículas, a suspensão celular foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 6°C (procedimento repetido por três vezes) e ressuspensa em solução salina a 0,9% (m/v) e pH 7,0, procedimento este repetido por três vezes, para eliminar o formol e o tampão fosfato, que dificulta a gelificação do alginato.

3.2.1.12. Encapsulação de *Aeromonas hydrophila* inativa nas partículas de alginato

As partículas de alginato foram preparadas pelo mesmo procedimento descrito no item 3.2.1.6, nas condições do Ensaio E2. A proporção utilizada foi de 63 mL de óleo de milho e 7 mL de solução aquosa a uma concentração final de alginato a 3,5%, incorporando alíquotas de 0,5 a 3 mL da suspensão de bactérias a 33,2 mg/mL (em termos de massa seca) em solução salina a 0,9% (m/v) e pH 7,0.

3.2.2. Caracterização das Partículas

As partículas foram caracterizadas quanto à morfologia, ao diâmetro, à distribuição de diâmetros, ao grau de reidratação após secagem, à eficiência de incorporação de BSA e de bactérias inativas e à estabilidade em soluções aquosas apresentando valores de pH equivalentes às condições gastrintestinais de tilápias, conforme descrito a seguir.

3.2.2.1. Morfologia, diâmetro e distribuição de tamanhos

A forma das partículas e suas características superficiais foram avaliadas por microscopia ótica (Lemoine *et al.*, 1999), enquanto os diâmetros médios e a distribuição volumétrica de diâmetros foram determinados por espectrofotometria de espalhamento de laser (Ribeiro *et al.*, 1999 ; Poncelet *et al.*, 1999). Para as análises de diâmetros, alíquotas das amostras estocadas em água deionizada foram colocadas na cuba do equipamento, que continha aproximadamente 500 mL de água destilada.

3.2.2.2. Eficiência de incorporação da albumina de soro bovino

Uma alíquota das partículas úmida foi pesada e dissolvida para a liberação da albumina de soro bovina incorporada. Sua concentração na amostra foi determinada por

análise colorimétrica quantitativa com ácido bicinonínico (BCA, Pierce Biotechnology), com base no procedimento citado por Lemoine *et al.* (1998).

A dissolução das partículas de alginato foi efetuada ressuspensando-se 1 g de microesferas hidratadas em 9 mL de solução aquosa de citrato de sódio a 0,05 M por 12 horas, seguida de sonicação em banho a 25°C por 10 minutos para a dispersão da proteína. Este ensaio foi realizado basicamente conforme descrito pelo fabricante, empregando um espectrofotômetro UV-visível Beckman modelo DU640.

3.2.2.3. Eficiência de incorporação das bactérias inativadas

O desempenho quanto à incorporação do agente antigênico foi avaliado pela razão entre a massa de bactérias encapsuladas e a massa bacteriana empregada na preparação das partículas (Singh e O'Hagan, 1998). Uma amostra de 1 g das partículas úmidas foi dissolvida em 9 mL de citrato de sódio a 0,05M para a liberação das células incorporadas. As amostras foram centrifugadas 10.000 rpm por 10 minutos e o sedimento foi ressuspensado em solução salina a 0,9%. A concentração de bactérias em cada amostra foi determinada por análise espectrofotométrica a 500 nm, a partir de uma curva de calibração previamente obtida.

3.2.2.4. Estabilidade in vitro das partículas em água com diferentes valores de pH

A programação destes ensaios fundamentou-se nas informações básicas sobre as características de digestão na tilápia do Nilo (Logato, informação pessoal, 2002). O trato gastrointestinal da tilápia é considerado completo, formado pela cavidade bucofaringiana, esôfago, estômago, intestino médio e posterior. No estômago, as células oxinto-pépticas produzem pepsinogênio e ácido clorídrico, onde o pH após a alimentação pode chegar a 2,0 e rapidamente retornar a pH 4,5 assim permanecendo até a próxima alimentação. A velocidade de trânsito do alimento pode ser influenciada por fatores como temperatura, composição, granulometria e quantidade de alimento ingerido, dentre outros, sendo o tempo médio de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal de 12 horas. A temperatura da água influencia diretamente a digestão dos nutrientes em peixes, que são animais

heterotérmicos e, portanto, não controlam a temperatura corporal. O aumento da temperatura acelera a velocidade das reações enzimáticas, a liberação dos hormônios termogênicos e, assim, a velocidade de trânsito intestinal.

Desta forma, o comportamento em água e em meios que simulam as condições gastrintestinais foi avaliado para amostras incubadas à temperatura ambiente em soluções aquosas a pH 2,0; pH 4 e pH 4,5; na proporção de 0,2 g de partículas úmidas para 1,8 mL da solução aquosa, por 12 horas. A morfologia das partículas foi avaliada, bem como o percentual de liberação das bactérias, a partir da determinação, por medida de absorbância a 500 nm, da concentração de células remanescentes na fase líquida após a centrifugação da amostra a 500 rpm por 10 minutos, para a remoção das micropartículas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho visou-se a obtenção de partículas com distribuição de tamanho unimodal, e diâmetros médios entre 5 a 50 μm , mais especificamente em torno de 10 μm , valor este recomendável para a administração de agentes de imunização por via oral para a absorção na região intestinal de mamíferos e supostamente adequado para peixes. Com esta finalidade, vários ensaios preliminares foram realizados.

Tais ensaios basearam-se em metodologias distintas, propostas por vários autores, que foram inicialmente comparadas para se selecionar as abordagens mais relevantes na obtenção das partículas nas condições desejadas para o estudo em questão. Cada metodologia empregada mostrou vantagens e limitações, por isto em alguns testes houve uma miscelânea de procedimentos propostos. A partir da seleção de um protocolo básico, efetuou-se os estudos subseqüentes, enfocando-se o efeito de diversas variáveis operacionais na distribuição de tamanhos, no diâmetro médio e na incorporação dos agentes ativos BSA (utilizada como proteína modelo) e *Aeromonas hydrophila* inativada nas partículas.

4.1. Comparação do método de gelificação interna ao baseado no uso de solução gelificante acidificada

Durante a realização dos testes preliminares de comparação de metodologias, vários procedimentos foram testados, sendo que alguns deles foram associados para se obter partículas com características mais próximas dos objetivos propostos neste trabalho. Os itens abaixo abordarão os resultados de cada etapa dos ensaios preliminares de maior relevância, ressaltando os aspectos significativos que foram obtidos com as alterações dos procedimentos, enfocando a morfologia e tamanho das partículas obtidas e a eficiência de remoção da fase oleosa.

4.1.1. Preparação das partículas por gelificação interna

Através da metodologia proposta por Poncelet *et al.* (1999), partículas de alginato foram preparadas utilizando citrato de cálcio incluído já na solução aquosa do polímero. Neste procedimento, o citrato de cálcio presente no interior das gotículas de alginato seria solubilizado quando da adição do ácido acético, havendo a reticulação do polímero à medida em que os íons Ca^{2+} se dissociassem do citrato. Os resultados obtidos não foram adequados. Mesmo após extensiva lavagem e secagem em estufa por 2 horas a 37°C , as partículas obtidas apresentaram-se altamente agregadas e contendo muito óleo residual, conforme mostrado na Figura 4.1. Em adição, as partículas apresentaram regiões esbranquiçadas que evidenciaram a presença de citrato de cálcio não dissolvido. Por estas razões, este método foi, descartado.

4.1.2. Preparação de Partículas Utilizando Solução Gelificante e Diferentes Soluções de Lavagem

Os resultados anteriores mostraram que as partículas obtidas não eram homogêneas quanto à morfologia e ao tamanho, acumulando grande quantidade de óleo, o que dificultava sua caracterização. Assim, o procedimento proposto por Mofidi *et al.* (2000) foi testado, procedimento este que diferia do anterior em termos das composições das fases empregadas. A fase contendo o alginato basicamente era composta por água, alginato e o composto que se desejava encapsular, enquanto a fase oleosa não incorporava ácido acético. A maior diferença, porém, com relação à metodologia anterior fundamentava-se na composição da solução contendo o agente de reticulação Ca^{2+} , que incorporava também etanol, água e ácido acético e, segundo os autores, resultava, em condições apropriadas de agitação, em partículas com diâmetros de 1 a $50\ \mu\text{m}$. Destaca-se, entretanto, que as proporções entre os volumes utilizados de cada fase não foram descritos, de maneira que, com base nas dimensões do equipamento descritas no trabalho, se testou inicialmente uma emulsão contendo 35 mL de solução aquosa de alginato e 35 mL de óleo de milho, além do volume referente à solução gelificante.

óleo. Em seguida, as partículas foram, como anteriormente, filtradas e lavadas com solução de CaCl_2 a 0,05 M. Apesar da retirada mais efetiva da espessa camada de óleo, ainda foi possível visualizar grande quantidade de óleo residual nas partículas. Os resultados mais efetivos em termos da remoção de óleo residual foram obtidos para a inversão da emulsão com a adição de 150 mL de solução de CaCl_2 a 0,05 M.

Em um quarto procedimento, após a inversão da emulsão com 150 mL de CaCl_2 a 0,05 M, as partículas formadas foram recuperadas por filtração, lavadas com álcool etílico e posteriormente com água destilada. A análise destas amostras mostrou uma diminuição considerável na quantidade de óleo residual no sistema. Assim, este procedimento de preparação das partículas e de sua lavagem foi fundamentalmente adotado na realização de grande parte dos ensaios posteriores.

Ainda com o intuito de melhorar o aspecto final das partículas em relação ao óleo residual, um quinto procedimento foi avaliado, no qual as partículas foram lavadas com acetona como sugerido por Fundueanu *et al.* (1998 e 1999). Embora a toxicidade da acetona e seu efeito de desnaturação protéica sejam mais intensos que os verificados para o álcool etílico, sendo seu uso não recomendado na formulação de vacinas orais, tal procedimento foi necessário para minimizar o efeito de interferência de quantidades apreciáveis de óleo na quantificação BSA pelo método de reação com o BCA. As partículas assim tratadas apresentaram uma considerável redução de óleo residual, de forma que este procedimento foi utilizado como alternativo em alguns ensaios onde houve incorporação de BSA ou de bactéria nas partículas de alginato.

4.2. Estudo do efeito das variáveis de processo nas características das partículas preparadas empregando solução gelificante e inversão da emulsão

4.2.1. Influência da concentração da solução de alginato e da taxa de agitação na morfologia e no diâmetro de partículas

Neste grupo de ensaios foi avaliado o efeito da concentração da solução de alginato na faixa de 2% a 5% (m/v) e da taxa de agitação de 500 rpm a 2000 rpm, empregando-se

solução gelificante aquosa contendo íons cálcio, etanol e ácido acético. Tanto a concentração da solução de alginato como a taxa de agitação mostraram ter influência significativa sobre as características da emulsão formada, conforme se pode observar na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Efeitos da concentração da solução de alginato e da taxa de agitação no diâmetro final das partículas obtidas por emulsão. As partículas foram preparadas utilizando-se 35 mL de alginato e 35 mL de óleo de milho. Foram adicionados 15,5 mL de solução gelificante na emulsão formada.

Ensaio	Concentração de alginato (%)	Taxa de agitação (rpm)	Observações quanto à formação das partículas e ao óleo residual*
A1	2	500	Não houve formação de partículas
A2	5	500	+
A3	2	2000	++
A4	5	2000	++
A5	3,5	1250	+
A6	3,5	1250	+
A7	3,5	1250	+

*Dados referentes à quantidade de óleo residual ao final da preparação das partículas: (+) pequena quantidade de óleo residual; (++) grande quantidade de óleo residual (todas as análises foram realizadas pela mesma pessoa).

No ensaio onde foi utilizada solução de alginato 2% a 500 rpm (A1), não houve a formação de emulsão, ou seja, durante a preparação da emulsão, uma espessa camada de óleo permaneceu na superfície do sistema, não se incorporando à emulsão. Quando o gelificante foi adicionado à emulsão sob agitação de 500 rpm, houve a formação de uma placa de alginato gelificado, não havendo assim a formação de partículas. Pode-se afirmar que a taxa de agitação utilizada foi insuficiente para a obtenção e dispersão das gotículas da

emulsão, que posteriormente seriam gelificadas pelos íons cálcio, o mesmo se aplicando à massa de alginato.

Em todos os outros ensaios verificou-se a formação de partículas e, embora estas tenham se apresentado deformadas, pouco esféricas e agregadas, observou-se uma diminuição considerável na quantidade de óleo residual, quando comparado às partículas obtidas anteriormente. As Figuras 4.3 e 4.4 mostram o aspecto morfológico das partículas obtidas nos Ensaios A3 e A5.

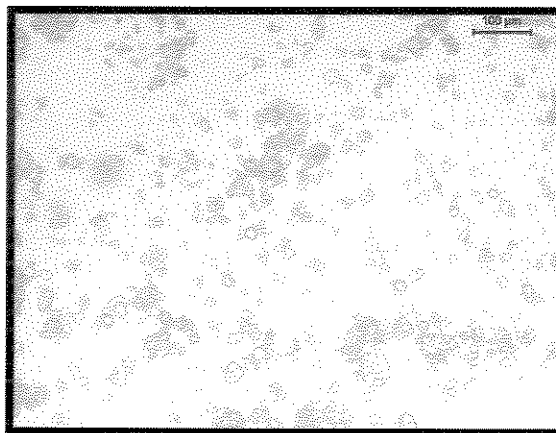


Figura 4.3: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento 100X) das partículas do ensaio A3.

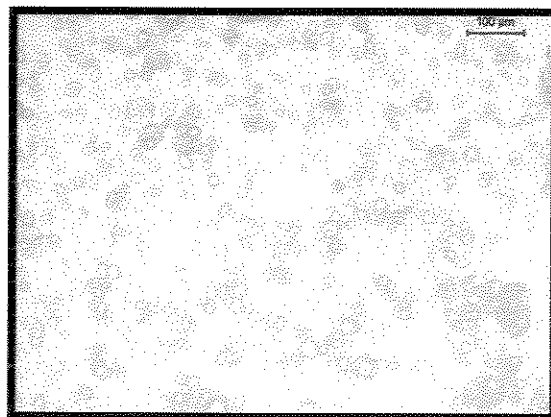


Figura 4.4: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento 100X) das partículas do ensaio A5.

Observou-se que as partículas obtidas nos ensaios em questão apresentaram diâmetros elevados (de até 500 μm) e com larga faixa de distribuição, tendo as análises de espalhamento de laser indicado distribuições polimodais. Em decorrência destas observações, não se efetuou o tratamento estatístico deste grupo de dados.

No ensaio subsequente, optou-se por trabalhar nas condições do ponto central, ou seja, solução de alginato a 3,5% e taxa de agitação a 1250 rpm, uma vez que nessas condições os resultados mostraram-se mais satisfatórios dos pontos de vista de maior esfericidade e menor retenção de óleo.

4.2.2. Efeito da inversão da ordem de mistura da emulsão com a solução gelificante

Com o intuito de melhorar ainda mais as condições do processo, e conseqüentemente obter partículas com as características desejadas, testou-se a inversão na ordem de adição das fases do sistema preparado nas condições do ponto central do ensaio discutido no item anterior.

Essa inversão mostrou-se relevante no que diz respeito ao óleo residual observado no final do processo. Pôde-se perceber que as partículas formadas apresentavam-se menos agregadas e visivelmente com menos óleo residual. A distribuição de diâmetros das partículas pode ser visualizado na Figura 4.5.

Na Figura 4.5 pode-se verificar a formação de apenas uma população de partículas, com diâmetro médio volumétrico de 233,56 μm . Apesar da distribuição dos diâmetros ainda estar larga, para os objetivos do trabalho em questão, pôde-se observar uma melhora considerável nas partículas obtidas ao final do processo. Estas foram ressuspensas facilmente em água destilada, formando uma dispersão homogênea, fato esse que não ocorria com as partículas obtidas nos ensaios anteriores. Assim, a etapa de inversão da emulsão foi adotada como parte do procedimento para a preparação das microesferas em todos os experimentos posteriores.

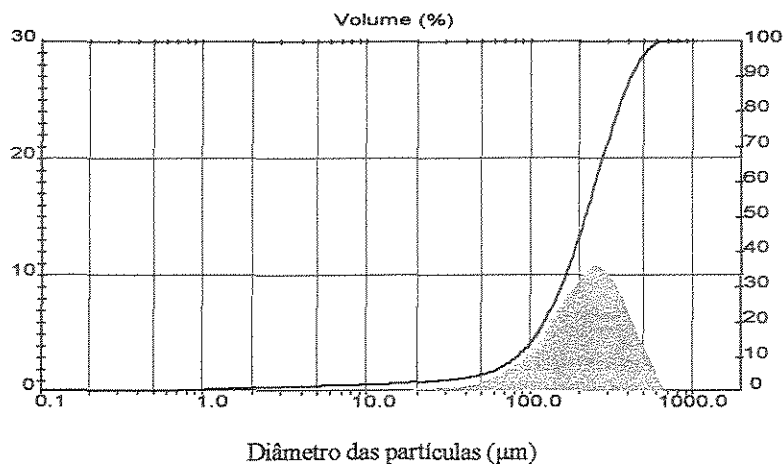


Figura 4.5: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e óleo de milho agitada a 1250 rpm por 10 minutos, seguida da adição de solução gelificante e novamente de agitação por 10 minutos a 1250 rpm. A emulsão formada foi vertida sobre 70 mL de solução gelificante.

Supõe-se que, com a adição da emulsão contendo as gotículas de alginato à solução gelificante, há uma menor competição destas pelo cálcio presente na solução gelificante, o que minimiza a limitação à transferência de massa de Ca^{++} para as partículas e reduz sua agregação.

4.2.3. Influência da alteração da proporção entre os volumes das fases aquosa e oleosa no diâmetro das partículas preparadas usando solução gelificante

Ainda com o intuito de se obter partículas com diâmetros médios abaixo de 100 μm , foram realizados novos ensaios nos quais as proporções entre os volumes das fases aquosa e oleosa foram alteradas. Para que fosse possível a comparação direta entre os resultados obtidos, o volume total da emulsão foi fixado em 70 mL. A Tabela 4.2 mostra os resultados obtidos.

Tabela 4.2: Avaliação da alteração de proporção entre os volumes das fases aquosa e oleosa nos diâmetros e na morfologia das partículas obtidas por emulsão. Para a formação da emulsão, utilizou-se solução de alginato 3,5% e óleo de milho, sob agitação de 1250 rpm por 10 minutos. A emulsão formada foi vertida sobre 70 mL de solução gelificante e novamente o sistema foi agitado por 10 minutos a 1250 rpm.

Ensaio	Percentagem da fase aquosa (%)	Diâmetro médio das partículas (μm)
B1	10	56,17
B2	20	74,11
B3	30	68,17
B4	40	106,85
B5	50	233,56

Pode-se observar que a proporção entre os volumes das fases aquosa e oleosa apresenta forte influência no diâmetro final das partículas. Quanto mais próximo o volume entre as fases, maior o tamanho da partícula formada e maior a quantidade de óleo residual ao final do processo. O Ensaio B5, que envolve volumes iguais de solução de alginato e óleo, apresentou as maiores partículas. Os menores diâmetros e a menor faixa de distribuição de diâmetros foram obtidos para o Ensaio B1, no qual foi possível a obtenção de partículas com diâmetros médios em torno de 56 μm , fato este que pode ser visualizado na Figura 4.6.

Quanto à morfologia, as partículas obtidas mostraram uma grande melhora em relação à esfericidade e uma diminuição considerável do óleo residual, o que pode ser observado nas Figuras 4.7 e 4.8 relativas aos Ensaios B3 e B1 respectivamente.

O Ensaio B1 (7 mL de alginato e 63 mL de óleo) foi considerado o que apresentou os resultados mais adequados, por ter apresentado as partículas com os diâmetros mais reduzidos, tendo sido adotado como protocolo básico para a realização dos ensaios posteriores. Entretanto, destaca-se que esta condição, do ponto de vista de aumento de

escala de processo, é a menos vantajosa, pois resulta em menor quantidade de partículas (já que envolve menor volume de solução de alginato) empregando a mesma quantidade das outras fases aquosas requeridas e uma maior proporção de fase oleosa.

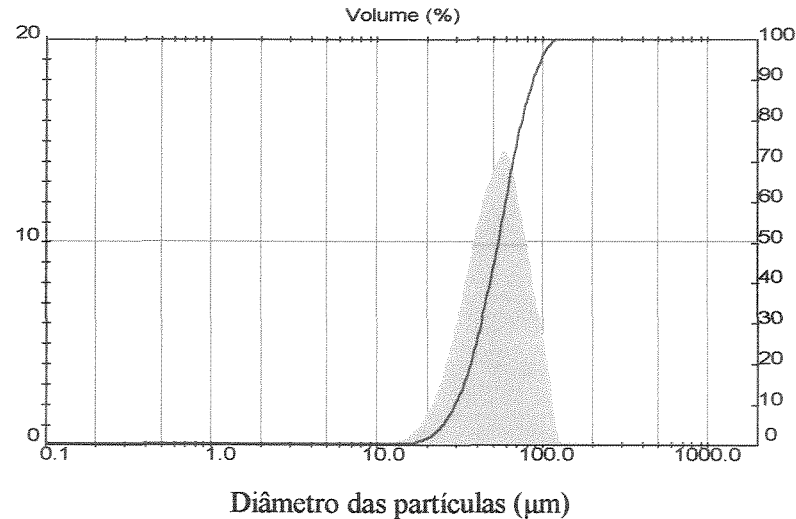


Figura 4.6: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 7 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e 63 mL de óleo de milho (Ensaio B1) agitada a 1250 rpm por 10 minutos. A emulsão formada foi vertida sobre 70 mL de solução gelificante e novamente o sistema foi agitado por 10 minutos a 1250 rpm.

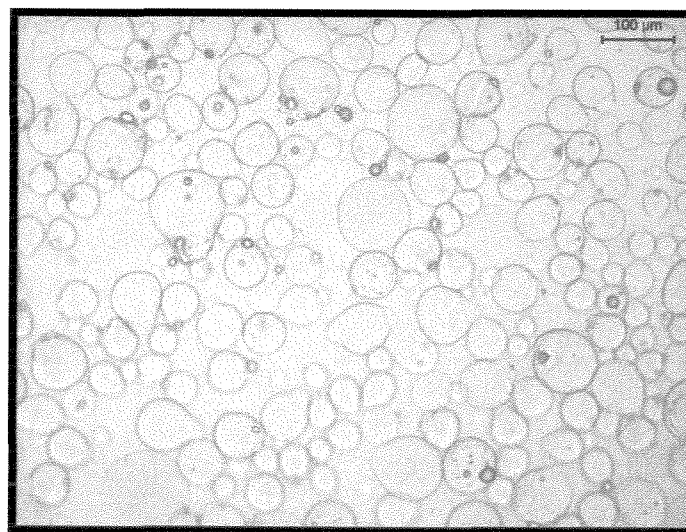


Figura 4.7: Aspecto morfológico em microscópio óptico (aumento 100X) das partículas do ensaio B3.

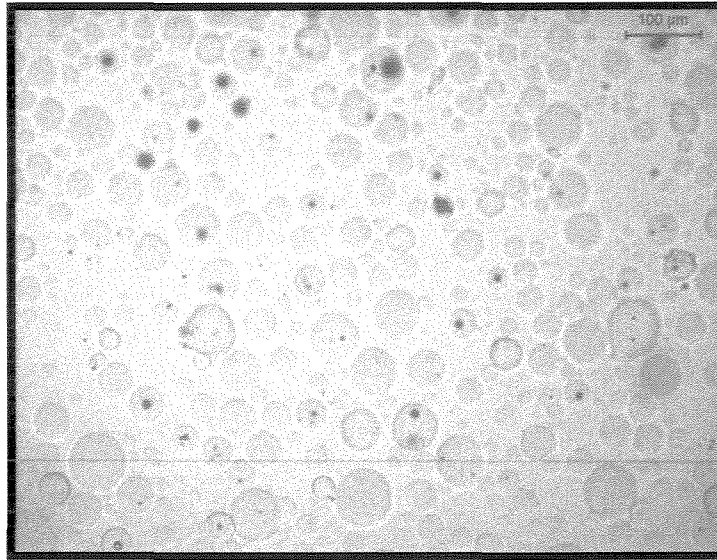


Figura 4.8: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento 100X) das partículas do ensaio B1

4.2.4. Influência da taxa de agitação e da adição do tensoativo Span[®] 80 no diâmetro de partículas preparadas usando solução gelificante

Segundo Poncelet *et al.* (1999), o uso de surfatantes solúveis em óleo como o Span[®] 80 permite uma redução significativa no tamanho das partículas, resultante de uma diminuição na tensão interfacial, que previne a coalescência das gotas da emulsão. Devido a este fato, optou-se por utilizar o tensoativo Span[®] 80 neste grupo de ensaios a fim de avaliar seus efeitos sobre o diâmetro e a morfologia das partículas obtidas por emulsão. Além da adição do surfatante Span[®] 80, efetuou-se concomitantemente um estudo complementar sobre o efeito da taxa de agitação nas partículas formadas. A Tabela 4.3 mostra os diâmetros médios das partículas obtidas.

Observou-se que tanto a taxa de agitação como a adição de Span[®] 80 influenciaram o diâmetro e a esfericidade das partículas. Todas as partículas obtidas nos ensaios apresentaram diâmetro reduzido em relação aos verificados nos outros ensaios realizados. Notou-se também apreciável redução na quantidade de óleo residual, o que facilitou as análises de diâmetro e morfologia das amostras.

Tabela 4.3: Diâmetros médios das partículas obtidas quando da adição de Span[®] 80 e variação da taxa de agitação.

Ensaio	Span [®] 80 (%)	Agitação (rpm)	Diâmetros médios (μm)
E1	0,2	500	230,00
E2	0,2	2000	45,40
E3	2,0	500	72,83
E4	2,0	2000	30,10
E5	1,1	1250	63,00
E6	1,1	1250	55,10
E7	1,1	1250	40,57

O menor diâmetro foi obtido quando se associou alta taxa de agitação (2000 rpm) a elevada quantidade de Span[®] 80 (2%) no Ensaio E4. Porém, as partículas geradas apresentaram-se menos esféricas e uma grande quantidade de partículas deformadas foi obtida, como pode ser visto na Figura 4.9. Já o Ensaio E2 resultou nas melhores características morfológicas para as partículas, ou seja, pode-se observar uma boa esfericidade das partículas (Figura 4.10). O diâmetro médio destas partículas foi de cerca de 45 μm, o que pode ser considerado aceitável para o estudo em questão.

Analisando-se a Figura 4.11, pode-se verificar que a faixa de distribuição de diâmetros não foi muito larga, e que houve a formação de apenas uma população de partículas.

A influência das variáveis adição de Span[®] 80 e taxa de agitação sobre o diâmetro final das partículas foi avaliada estatisticamente (através do programa Statistica 5.0), e os efeitos calculados estão listados na Tabela 4.4.

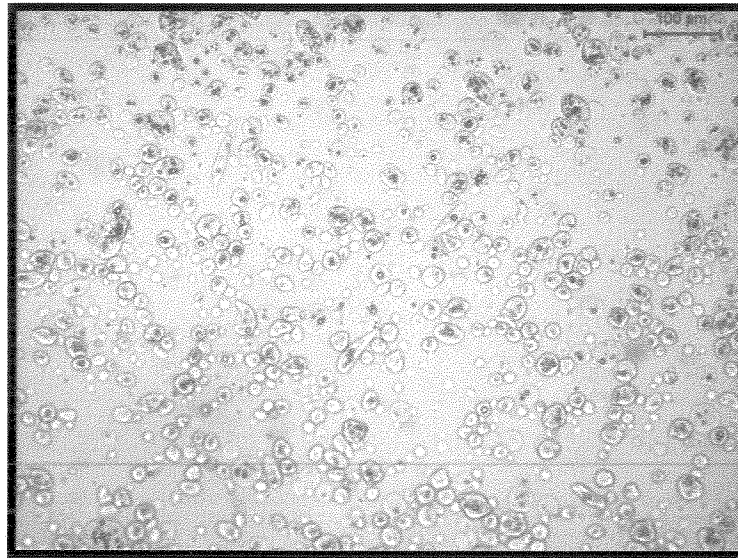


Figura 4.9: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento 100 X) das partículas do ensaio E 4.

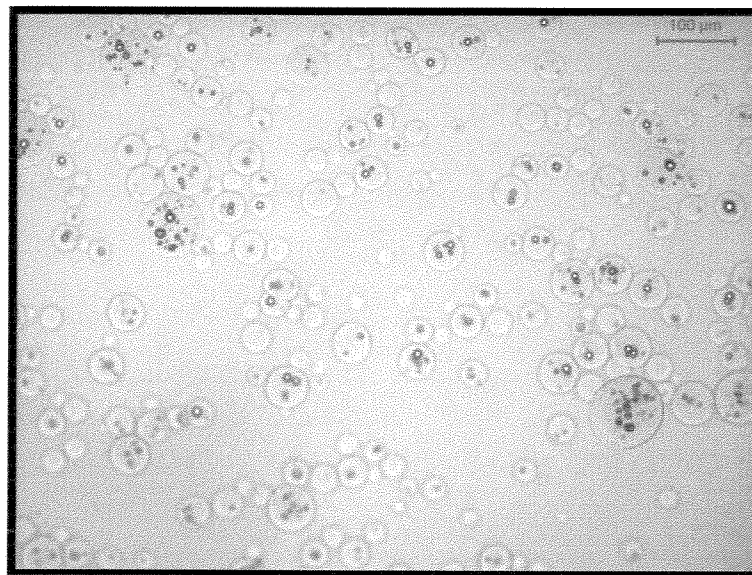


Figura 4.10: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento 100 X) das partículas do ensaio E 2.

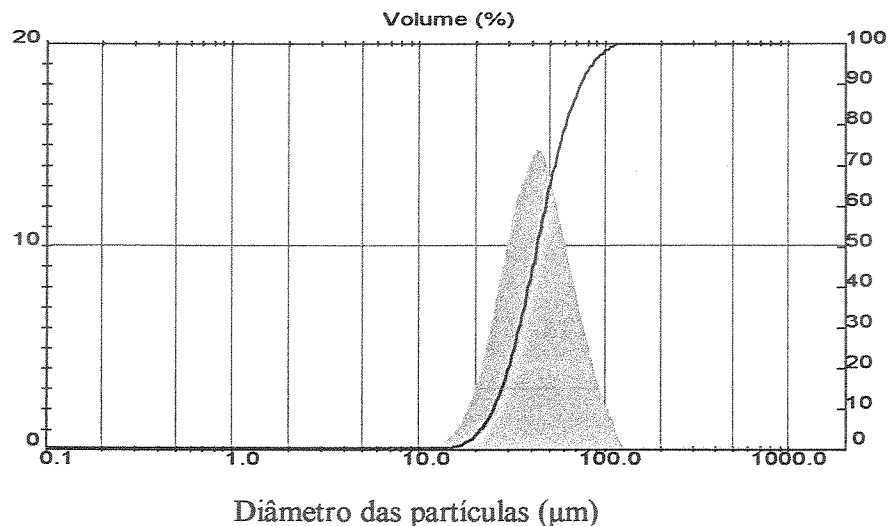


Figura 4.11: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 7 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e 63 mL de óleo de milho contendo 0,2% de Span[®] 80, agitada a 2000 rpm por 10 minutos. A emulsão formada foi vertida sobre 70 mL de solução gelificante e novamente o sistema foi agitado por 10 minutos a 2000 rpm.

Tabela 4.4: Efeitos estatísticos calculados das variáveis independentes concentração de Span[®] 80 e taxa de agitação na resposta diâmetro final das partículas.

	Efeitos	Desvio Padrão	t (2)	p
Média*	76,72	4,30	17,84	0,003127
Span [®] 80*	- 86,24	11,38	- 7,58	0,016964
Taxa de agitação*	- 113,67	11,38	- 9,99	0,009871
Span [®] 80 x taxa de agitação*	70,94	11,38	6,23	0,024772

* fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Observa-se que as variáveis Span[®] 80 e taxa de agitação, além do termo de interação entre elas, mostraram ter efeitos significativos sobre o diâmetro das partículas a 95% de confiança. Tanto o Span[®] 80 quanto a taxa de agitação apresentaram um efeito negativo sobre o diâmetro final das partículas, enquanto um efeito positivo foi observado para o termo de interação entre as variáveis independentes. A Tabela 4.5 apresenta os coeficientes de regressão para o modelo em questão.

Tabela 4.5: Coeficientes de regressão para o diâmetro das partículas obtidos no planejamento fatorial estatístico efetuado para as variáveis independentes concentração de Span[®] 80 e taxa de agitação.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão
Média*	76,72	4,30
Span [®] 80*	- 43,12	5,69
Taxa de agitação*	- 56,83	5,69
Span [®] 80 x taxa de agitação*	35,47	5,69

* fatores estatisticamente significativos a 95%

A Equação 4.1 relaciona o diâmetro das partículas em função das variáveis codificadas para um nível de confiança de 95%.

$$D = 76,72 - 43,12 \cdot X_1 - 56,83 \cdot X_2 + 35,47 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (4.1)$$

onde:

D = diâmetro

X_1 = Percentagem de Span[®] 80

X_2 = Taxa de agitação

$X_1 \cdot X_2$ = Percentagem de Span[®] 80 x Taxa de agitação

A validade desse modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Análise de variância (ANOVA) para o diâmetro das partículas para o planejamento fatorial $2^2 + 3$ envolvendo as variáveis independentes concentração de Span® 80 e taxa de agitação.

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	25387,98	3	8462,66	7,84
Resíduos	3238,76	3	1079,56	
Falta de ajuste	2979,88	2		
Erro Puro	258,88	2		
Total	28626,74	6		

$$F_{0,95; 3; 3} = 9,28$$

$$\% \text{ variação explicada } (R^2) = 88$$

Comparando-se os valores de F calculado e F tabelado, pode-se verificar se o modelo proposto é estatisticamente significativo. Para isso, o valor de F calculado deve ser no mínimo quatro vezes maior que o valor de F tabelado. Pela análise da variância verificou-se que o F calculado (7,84) é menor que o F tabelado (9,28), o que mostra que o modelo de primeira ordem obtido para o diâmetro das partículas na faixa estudada não é estatisticamente significativo para descrever o comportamento do sistema.

Assim, após a análise dos resultados obtidos, optou-se por realizar os ensaios subsequentes nas condições do ponto E2, ou seja, utilizando 7 mL de solução de alginato 3,5% e 63 mL de óleo de milho contendo 0,2% de Span® 80 sob agitação de 2000 rpm.

4.2.5. Avaliação da influência da vazão de adição da emulsão à solução gelificante nas características das partículas

Os resultados discutidos até este ponto do estudo são provenientes da adição manual da emulsão à solução gelificante, a uma vazão aproximada de 70 mL/min. A alteração na vazão de adição das fases, entretanto, poderia acarretar em mudanças nas características morfológicas e nos diâmetros das partículas obtidas. O efeito do controle e da redução da vazão de adição da emulsão à solução gelificante foi avaliado, preparando-se partículas de alginato sem a adição de agentes ativos.

As partículas obtidas para as vazões testadas (70 mL/h e 280 mL/h) apresentaram boa esfericidade, conforme mostrado nas Figuras 4.12 e 4.13, e praticamente não foram observadas quantidades significativas de óleo residual.

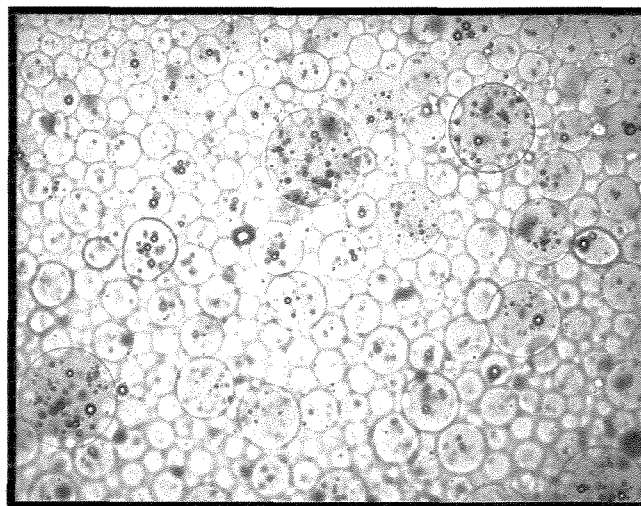


Figura 4.12: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de alginato preparadas pela adição da emulsão à solução gelificante a uma vazão controlada de 70 mL/h, sob agitação constante de 2000 rpm.

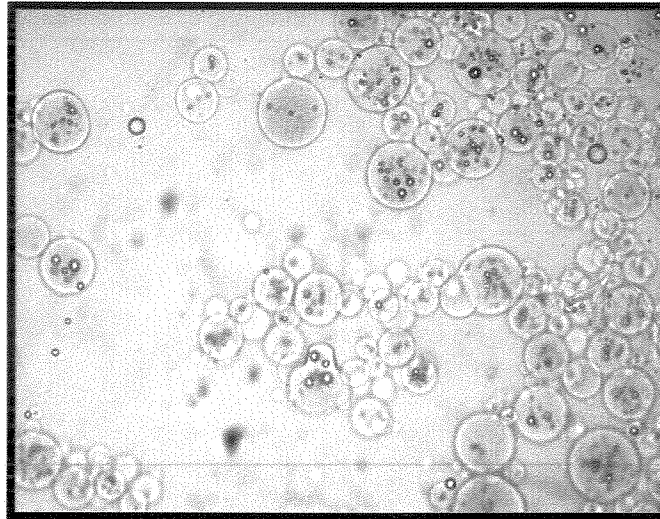


Figura 4.13: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de alginato preparadas pela adição da emulsão à solução gelificante a uma vazão controlada de 280 mL/h, sob agitação constante de 2000 rpm.

Entretanto, estas partículas apresentaram grande retenção de ar, possivelmente devido à exposição mais longa à etapa de agitação a 2000 rpm para a gelificação, possivelmente, uma redução na taxa de agitação poderia diminuir a retenção de ar nas partículas. Os perfis de distribuição de diâmetros volumétricos podem ser vistos na Figura 4.14. Observa-se que as partículas obtidas sob vazão controlada de 70 mL/h apresentaram diâmetro médio de 75,22 μm , enquanto para as obtidas a 280 mL/h, os diâmetros foram de 66,73 μm .

Pode-se concluir que as partículas de alginato preparadas por este procedimento não apresentaram melhora nas características morfológicas, uma vez que estas se mantiveram praticamente inalteradas em relação aos ensaios anteriores. Em relação aos diâmetros, estes se apresentaram maiores que os já obtidos para partículas vazias preparadas em condições similares com vazão de adição aproximada de 70 mL/min.

Uma vez que um dos objetivos deste trabalho foi a obtenção de partículas com diâmetros inferiores a 50 μm , o procedimento de redução da vazão não foi adotado nos ensaios seguintes.

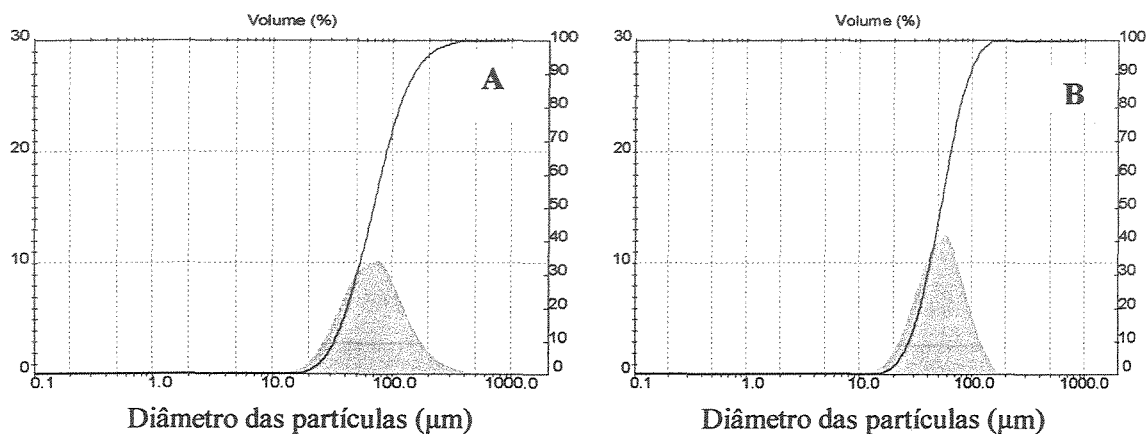


Figura 4.14: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 7 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e 63 mL de óleo de milho contendo 0,2% de Span[®] 80, agitada a 2000 rpm. A emulsão formada foi vertida sob vazões controladas de 70 mL/h (A) e 280 mL/h (B) à solução gelificante a agitada a 2000 rpm.

4.3. Influência da utilização de diferentes tipos de óleos vegetais na morfologia, no diâmetro médio e na distribuição de tamanho das partículas de alginato

O emprego de óleos vegetais diferentes do de milho, empregado até então, poderia resultar em partículas com características distintas, de forma que se avaliou, alternativamente, os óleos de soja, canola e girassol na etapa de formação da emulsão com a solução de alginato, incluindo-se, em todos os ensaios, a adição do tensoativo Span[®] 80 a 0,2 % à fase oleosa. As características das partículas obtidas estão mostradas nas Figuras 4.15 a 4.22.

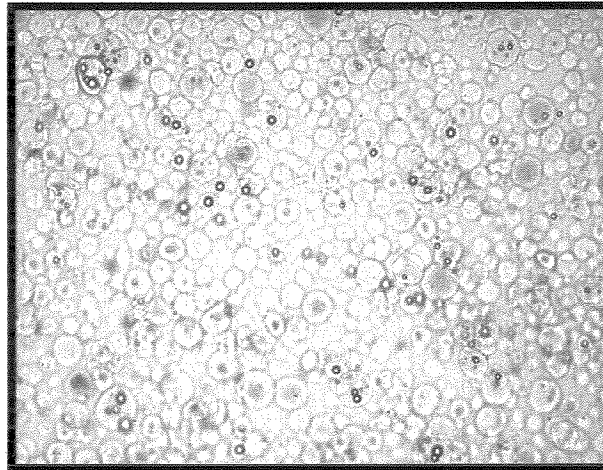


Figura 4.15: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de alginato preparadas com óleo de milho.

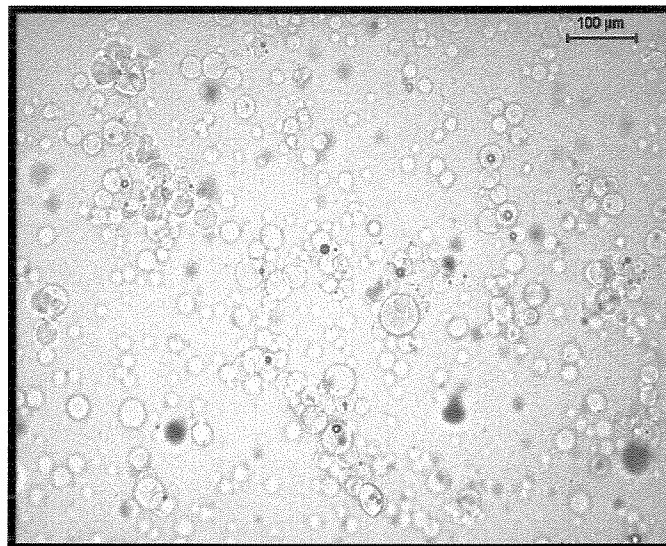


Figura 4.16: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de alginato preparadas com óleo de soja.

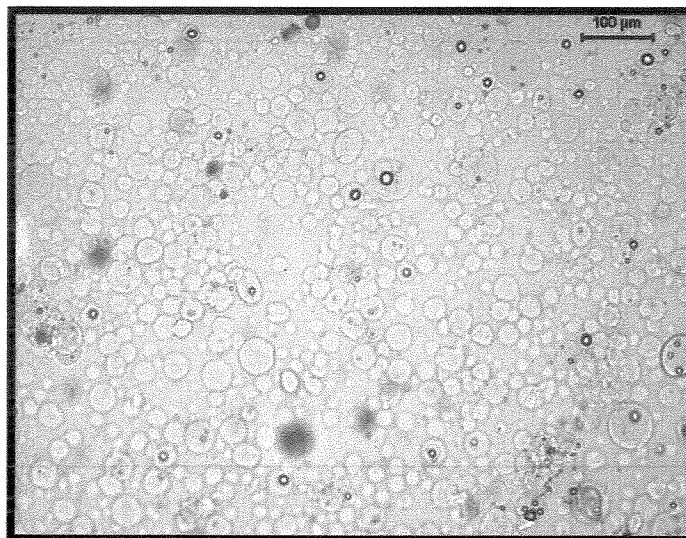


Figura 4.17: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de alginato preparadas com óleo de canola.

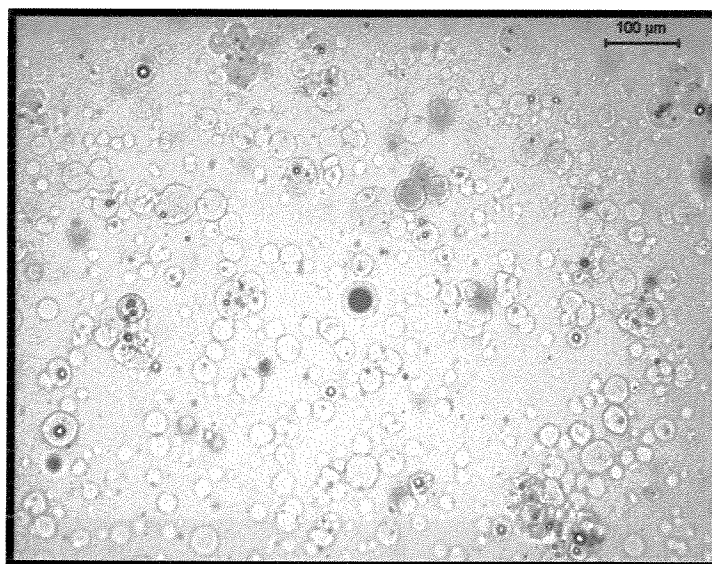


Figura 4.18: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de alginato preparadas com óleo de girassol.

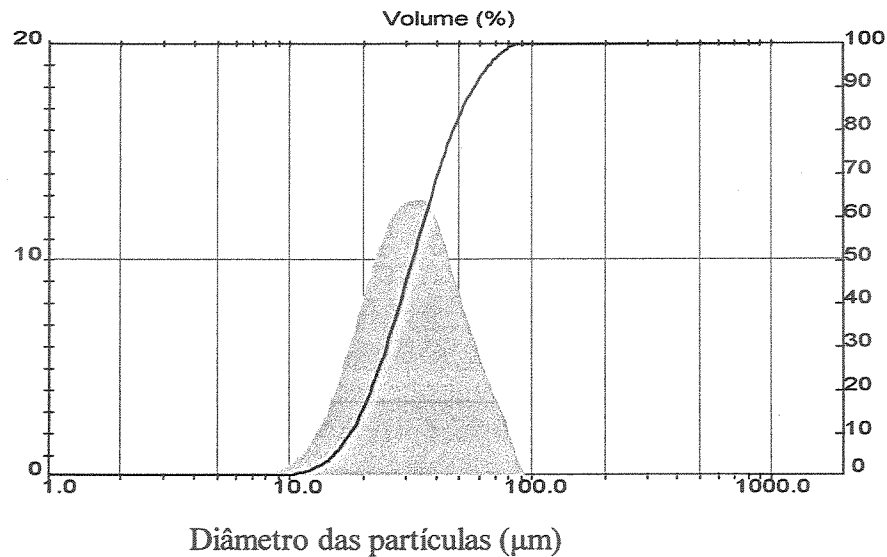


Figura 4.19: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 7 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e 63 mL de óleo de milho contendo 0,2% de Span® 80, agitada a 2000 rpm por 10 minutos. A emulsão formada foi vertida sobre 70 mL de solução gelificante e novamente o sistema foi agitado por 10 minutos a 2000 rpm.

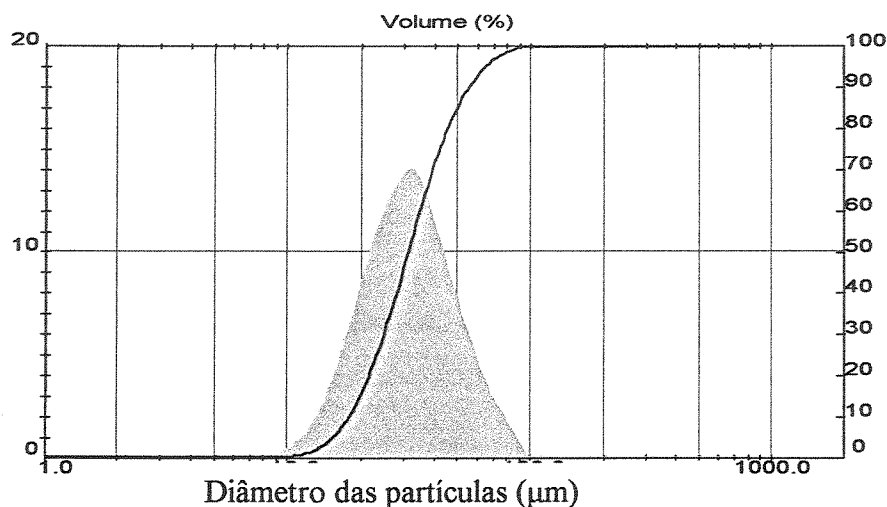


Figura 4.20: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 7 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e 63 mL de óleo de soja contendo 0,2% de Span® 80, agitada a 2000 rpm por 10 minutos. A emulsão formada foi vertida sobre 70 mL de solução gelificante e novamente o sistema foi agitado por 10 minutos a 2000 rpm.

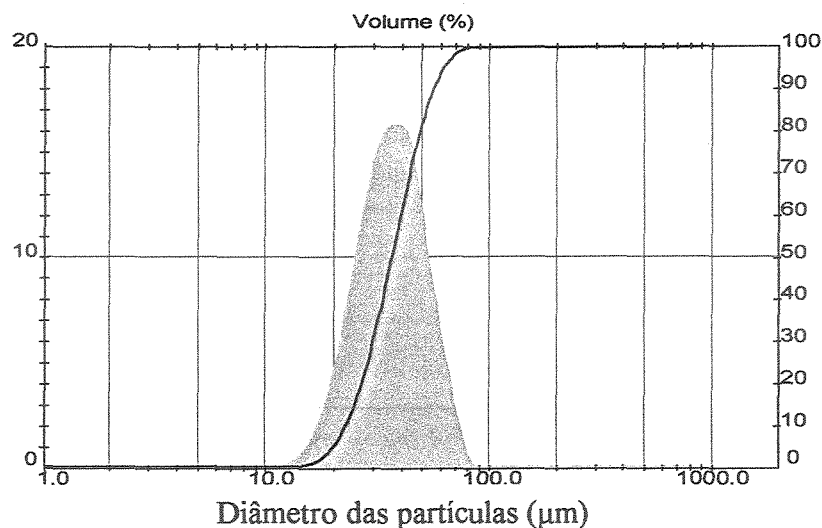


Figura 4.21: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 7 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e 63 mL de óleo de canola contendo 0,2% de Span® 80, agitada a 2000 rpm por 10 minutos. A emulsão formada foi vertida sobre 70 mL de solução gelificante e novamente o sistema foi agitado por 10 minutos a 2000 rpm.

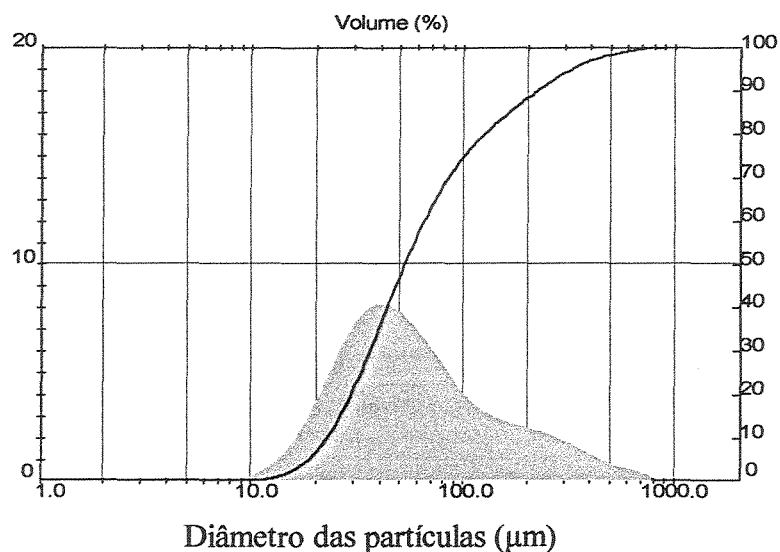


Figura 4.22: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 7 mL de solução aquosa de alginato a 3,5% (m/v) e 63 mL de óleo de girassol contendo 0,2% de Span® 80, agitada a 2000 rpm por 10 minutos. A emulsão formada foi vertida sobre 70 mL de solução gelificante e novamente o sistema foi agitado por 10 minutos a 2000 rpm.

Observou-se que as partículas produzidas mostraram-se muito semelhantes em relação à morfologia. Todas apresentaram boa esfericidade e praticamente não se verificou a presença de óleo residual. Os diâmetros médios das partículas preparadas com os óleos de milho, soja, canola e girassol foram de aproximadamente 32,29 μm , 37,66 μm , 38,05 μm e 71 μm , respectivamente. Através das Figuras 4.19, 4.20 e 4.21, pode-se observar que as preparações com os óleos de milho, soja e canola apresentaram apenas uma população, ou seja, apresentaram comportamento unimodal de diâmetros. Porém, as partículas preparadas com o óleo de girassol, apresentaram a tendência de formar populações com dois diâmetros médios distintos. Conforme indicado na Figura 4.22, a população de maior frequência apresenta diâmetro médio próximo de 40 μm (similarmente às amostras produzidas pelo uso dos outros tipos de óleos), enquanto a população de menor frequência apresenta diâmetro médio significativamente maior que 100 μm , sendo, portanto, indesejáveis no âmbito deste estudo.

Desta forma, os resultados obtidos neste grupo de ensaios sugerem que a preparação de partículas utilizando os óleos vegetais de milho, soja ou canola podem produzir partículas com características desejáveis tanto em relação à morfologia quanto em relação aos diâmetros médios. Porém, faz-se necessário ressaltar que em relação ao custo seria mais adequada a utilização de óleos vegetais menos onerosos para a preparação das formulações. Assim, o uso de óleo de canola seria desconsiderado, uma vez que este apresenta custo mais elevado em relação aos óleos de milho e de soja.

4.4. Avaliação da secagem de partículas lavadas com diferentes solventes

A estocagem de agentes de imunização na forma de suspensão aquosa, apesar de prática, pois o material já se encontra em sua forma própria para o uso imediato, implica no envolvimento de maiores áreas de estocagem e pode ainda, alterar a vida de prateleira do produto, podendo degradar de forma mais acelerada os antígenos em comparação a quando estes estão na forma seca. Estas limitações podem ser contornadas pela secagem do material.

Partículas não incorporando agentes ativos obtidas nas condições do Ensaio E2 (Tabela 3.3) e lavadas com etanol ou acetona foram, desta forma, secas em estufa a 40°C por 3 horas, processo este seguido de secagem à temperatura ambiente por 3 dias adicionais. A Figura 4.23 mostra o comportamento observado na etapa de secagem em estufa. Observa-se que a lavagem com acetona possivelmente foi mais efetiva na remoção do óleo residual, resultando em uma secagem mais rápida. Enquanto para as partículas lavadas com acetona a perda de umidade total foi de 79% em três horas, para as partículas processadas com etanol, a perda de massa na estufa resumiu-se a 18% no mesmo período. Após 3 dias, no entanto, as massas de ambas as amostras apresentaram valores similares (cerca de 5% do total inicial), praticamente não havendo diferença entre os dois solventes. Porém, as amostras lavadas com acetona agregaram-se menos após secas.

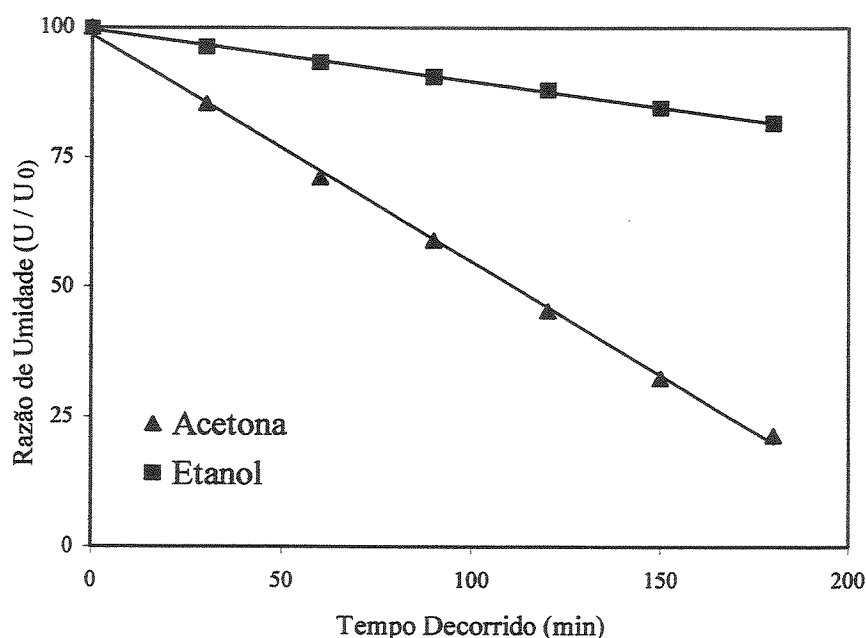


Figura 4.23: Perfis de secagem das partículas lavadas com etanol ou acetona em estufa a 40°C.

Alternativamente, as amostras foram secas somente à temperatura ambiente, por um período total de 4 dias. Observou-se que as taxas iniciais de secagem foram substancialmente menores que as observadas na estufa, e que, ao final do período, as

amostras perderam somente 93% de sua massa total inicial, apresentando cerca de 2% a mais de água ou, mais possivelmente, de óleo residual que as obtidas pelos procedimentos anteriores.

Embora a utilização de acetona na etapa de lavagem e a posterior secagem em estufa tenham se mostrado atraentes, ressalta-se que a lavagem com este solvente é problemática do ponto de vista da aplicação *in vivo* final das partículas. Recomenda-se, assim, o uso de acetona preferencialmente em procedimentos de preparação das partículas para ensaios de caracterização.

Destaca-se que as partículas podem também, eventualmente, ser veiculadas diretamente na forma de suspensão oleosa, pois freqüentemente o óleo vegetal é empregado na homogeneização de rações para peixes, prevenindo a separação de sólidos de diferentes tamanhos.

4.5. Incorporação de albumina de soro bovino nas partículas de alginato

A proteína BSA foi utilizada como antígeno modelo, uma vez que esta tem suas propriedades físico-químicas e estruturais bem caracterizadas, a fim de se comparar os resultados obtidos em seus ensaios de incorporação com os resultados obtidos com a incorporação da bactéria *Aeromonas hydrophila*, foco central deste trabalho.

A albumina de soro bovino (BSA) é uma proteína globular de aproximadamente 66,3 kDa, consistindo de 607 aminoácidos com 17 pontes dissulfeto e de um grupo cisteína livre (Kelley e McClements, 2003). Esta proteína tem diâmetro hidrodinâmico de 7,2 nm, ocorre naturalmente no sangue e apresenta ponto isoeletrico em torno de 5 (Neiser *et al.*, 1999).

Neste grupo de ensaios foram incorporadas quantidades conhecidas de BSA nas partículas preparadas utilizando-se óleo de milho e, eventualmente, óleo de soja. Após sua recuperação por filtração, as amostras foram lavadas com etanol, que se mostrou, neste caso, mais eficiente para a remoção do óleo residual. Os resultados estão mostrados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Eficiência de incorporação de BSA e diâmetros médios obtidos para as partículas de alginato preparadas pela utilização de 7 mL de solução aquosa de alginato 3,5% contendo BSA em diferentes concentrações e 63 mL de óleo de milho contendo 0,2% de Span[®] 80 sob agitação de 2000 rpm, a 25°C.

Ensaio	Concentração inicial de BSA na solução de alginato (mg/mL)	Eficiência de incorporação de BSA (%)	Diâmetros médios (µm)
1	0,70	74,57	55,28
2	1,40	84,14	133,83
3	2,80	71,53	118,52
4	4,20	121,42	143,01
5	5,60	84,28	>1000

Pode-se observar que a incorporação da proteína modificou o aspecto das partículas formadas, que passaram a apresentar novamente quantidades apreciáveis de óleo de milho residual e mostraram também maior tendência à agregação, por vezes formando agregados que não puderam ser ressuspensos em água de forma homogênea, como é o caso da amostra preparada com a maior proporção de proteína.

As alterações morfológicas observadas e o conseqüente aumento dos diâmetros devem-se provavelmente à incorporação de óleo de milho nas partículas, o que pode ser explicado com base em uma das próprias funções biológicas da BSA no sangue, de atuar como transportadora de lipídeos. Assim, a proteína possivelmente promoveu a incorporação de óleo, que fez com que os diâmetros aumentassem significativamente.

Segundo Lemoine et al., (1998), eficiências de incorporação de BSA em partículas de alginato de 61 a 92%, podem ser esperadas, porém o aumento na quantidade inicial de BSA pode diminuir a eficiência de incorporação da proteína. O aumento excessivo na

quantidade inicial da proteína faz com que a quantidade de polímero torne-se insuficiente para reter toda a BSA adicionada, diminuindo sua eficiência de incorporação.

Observou-se no presente estudo que a incorporação de BSA nas partículas não ocorreu de forma linear, ou seja, não houve um aumento proporcional da quantidade de proteína incorporada na medida em que se aumentou sua concentração inicial na solução de alginato. O Ensaio 4 apresentou uma eficiência de incorporação de proteína maior que 100 %, o que pode ser explicado considerando-se a possibilidade de se ter diferentes graus de umidade entre as amostras, fato este que poderia fazer com que uma amostra possuisse maior número de partículas por grama que a outra, apresentando um rendimento maior que o esperado, e a retenção de óleo de milho no material formulado, que interfere na quantificação da BSA por reação com BCA.

Com relação ao segundo aspecto mencionado, em ensaios controle de quantificação da proteína na forma livre em solução salina (portanto, não encapsulada em partículas de alginato) por reação com BCA realizados na presença de volumes conhecidos de óleo de milho (de 2 a 8 μ L), equivalentes ao que se estima reter nas partículas, constatou-se um aumento nas leituras de absorbância em comparação a amostras contendo apenas a proteína. Tais aumentos mostraram-se constantes na faixa de volumes de óleo de milho testada, correspondendo a cerca de 0,07 mg de BSA por mililitro de gel, podendo causar discrepâncias razoáveis nos dados, principalmente para baixas concentrações iniciais de proteína, que conduziriam a baixas concentrações finais.

Outro fator que poderia interferir, aumentando o valor da eficiência de encapsulação, seria a contração do gel de alginato quando de sua reticulação com os íons cálcio. Assim, o volume final de gel formado seria menor que o esperado e afetaria diretamente os cálculos realizados para a determinação dos valores de eficiência. Tentou-se avaliar tal aspecto determinando-se a massa de partículas recuperadas após sua lavagem com água deionizada, entretanto, estes ensaios não se mostraram conclusivos. Verificou-se que o processo é sujeito a muitas situações de possível perda do gel, como a retenção nas paredes dos frascos, na haste e na hélice do agitador, além da etapa de separação da fase aquosa e da fase oleosa que antecede a filtração. De aproximadamente 7 g de solução aquosa de alginato contendo ou não os compostos antigênicos em estudo empregadas para a

produção das partículas, pôde-se recuperar um máximo de 4,5 g (menos de 65% do material inicial), o que certamente não pode ser atribuído à contração do gel.

Com o intuito de verificar o efeito da utilização do óleo de soja em substituição ao óleo de milho nas características das partículas de alginato contendo BSA incorporada, um novo ensaio foi realizado seguindo o protocolo proposto no ensaio 1 da Tabela 4.7. As partículas obtidas neste ensaio apresentaram eficiências de incorporação de BSA comparáveis e mostraram-se morfolologicamente semelhantes àsquelas produzidas com óleo de milho nas mesmas condições. As Figuras 4.24 e 4.25 mostram respectivamente a morfologia das partículas preparadas com os óleos de milho e de soja contendo BSA, entretanto, detecta-se a presença de maior número de agregados na amostra obtida a partir de óleo de soja.

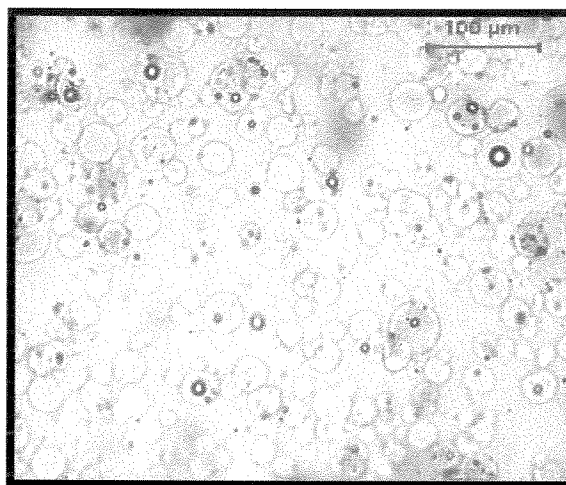


Figura 4.24: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de alginato preparadas com óleo de milho.

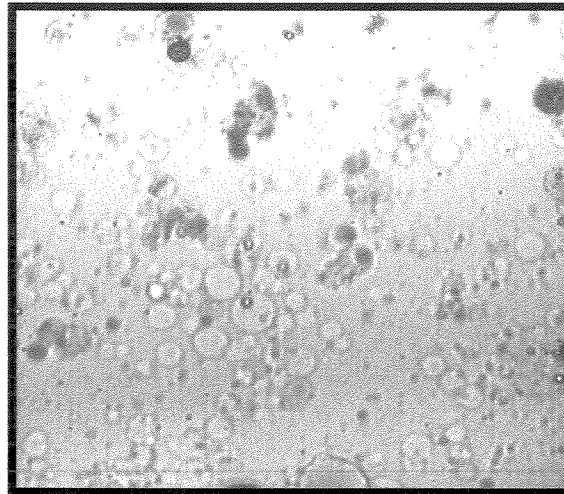


Figura 4.25: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de alginato preparadas com óleo de soja.

O perfil de distribuição de diâmetros apresentado pelas partículas preparadas com óleo de milho, foi unimodal (Figura 4.26), apresentando uma população principal de partículas com diâmetros na faixa de 55,28 μm .

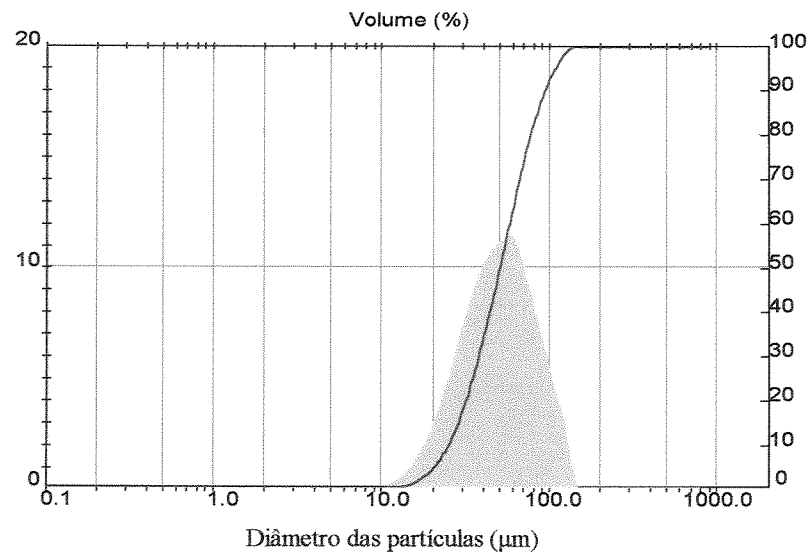


Figura 4.26: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas no Ensaio 1, com emulsão preparada a partir de óleo de milho.

As partículas preparadas com óleo de soja, por sua vez, apresentaram comportamento polimodal, notando-se um aumento tanto nos diâmetros médios quanto na frequência das populações de maior tamanho à medida em que ensaios consecutivos eram realizados com a mesma amostra, conforme indicado na Figura 4.27. Este comportamento indica a presença de agregados sedimentados na amostra, que só foram efetivamente postos em suspensão após o processamento do material em três ensaios idênticos consecutivos.

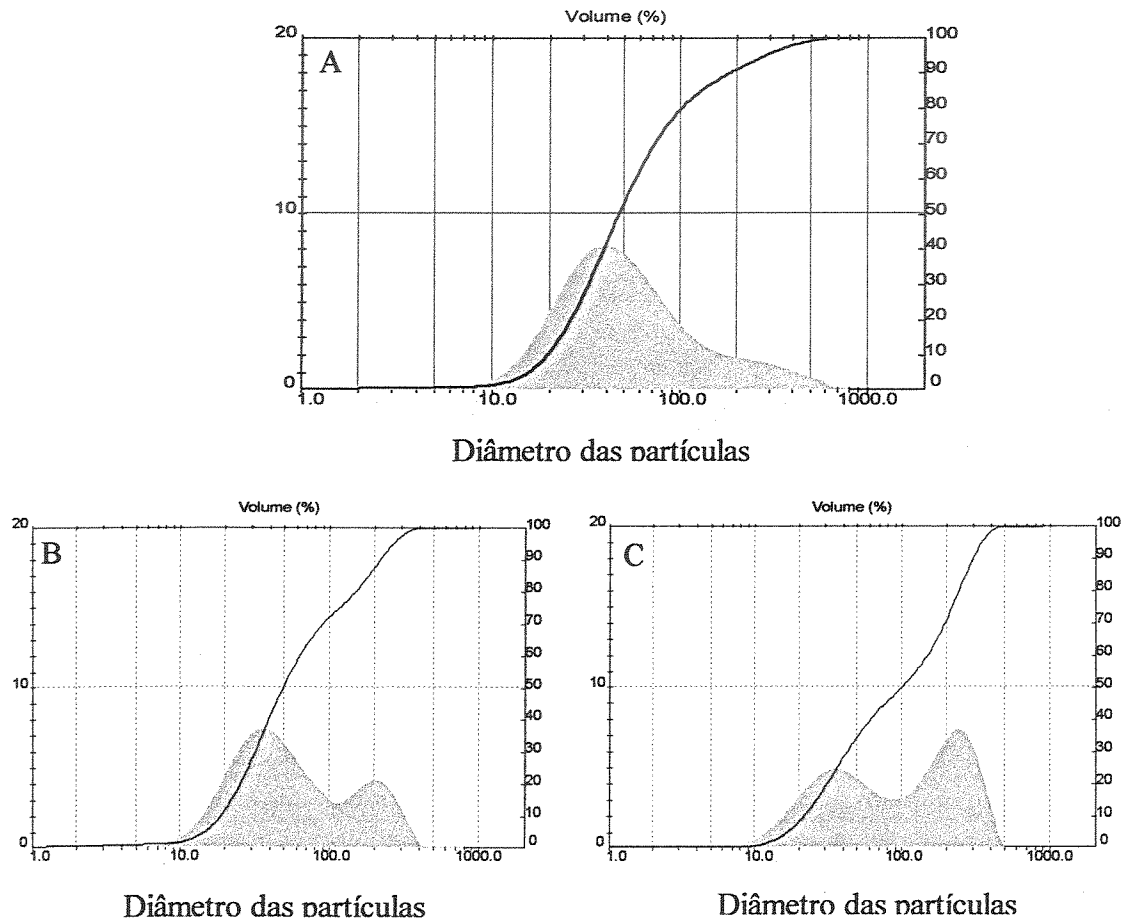


Figura 4.27: Perfis de distribuição de tamanho das partículas obtidas segundo protocolo do Ensaio U1, preparadas com óleo de soja. As letras A, B e C indicam três diferentes corridas para a mesma amostra, sendo a primeira a da letra A, B a intermediária e C a realizada por último.

Vale ressaltar que nos ensaios discutidos no item 4.3, as partículas de alginato preparadas tanto com óleo de milho quanto com óleo de soja, sem a incorporação de ativos, apresentaram comportamento unimodal em relação ao perfil de distribuição de diâmetros e diâmetros volumétricos médios de 32,29 μm e 37,66 μm , respectivamente, concluindo-se que a incorporação da proteína BSA mudou sensivelmente as características das partículas obtidas. Como esta proteína tem regiões hidrofóbicas que podem interagir tanto com a fase oleosa quanto com o tensoativo, tais interações podem ter causado o aumento da tensão superficial, uma vez que o BSA pode estar sequestrando o tensoativo Span[®] 80, o que poderia ter causado a elevação no tamanho das partículas.

Assim, os resultados mais satisfatórios para a preparação de micropartículas para incorporação da proteína BSA foram os obtidos para a emulsão preparada com óleo de milho.

4.6. Incorporação de *Aeromonas hydrophila* nas partículas de alginato

Apesar dos resultados pouco satisfatórios (do ponto de vista de caracterização das microesferas) obtidos para a incorporação de BSA nas partículas, as mesmas condições operacionais de preparação do sistema foram utilizadas nos ensaios para encapsulação da bactéria *Aeromonas hydrophila*. Esta conduta foi adotada uma vez que a bactéria não possui função transportadora de lipídeos, provavelmente não contribuindo para a incorporação de óleo nas partículas. Em alguns ensaios a lavagem das partículas foi feita com acetona substituindo o álcool etílico, mas, para este sistema, as características das partículas mostraram-se indiferentes ao solvente empregado.

Os efeitos da incorporação da bactéria nas partículas de alginato foram avaliados utilizando concentrações iniciais de bactéria na fase aquosa de 2,37 a 14,22 mg/mL (em termos de massa seca celular por mililitro de suspensão de alginato) e óleo de milho para a preparação da emulsão.

Em todas as situações, a eficiência de incorporação celular foi de aproximadamente 100%, e o mesmo se observou para uma amostra preparada alternativamente por emulsão com óleo de soja contendo inicialmente 2,37 mg/mL de bactérias. As elevadas taxas de

eficiência da bactéria comparadas às da BSA devem-se ao fato que maiores eficiências de incorporação para agentes ativos de maior massa molecular são esperadas (Lemoine *et al.*, 1998). Assim, parte da BSA encapsulada pode ser perdida durante as etapas de lavagem das partículas, devido ao pequeno tamanho desta proteína (7,2 nm) em comparação ao da bactéria que mede 0,5 μm x 1,0 a 1,5 μm (Costa, 2003).

As partículas obtidas, predominantemente esféricas, praticamente não apresentaram óleo residual e ressuspenderam-se em água de forma homogênea. Através das microscopias óticas pôde-se verificar claramente a diferença na morfologia da superfície das partículas preparadas com baixas quantidades de bactéria incorporada (Figuras 4.28 e 4.29), com altas quantidades de bactéria incorporada (Figuras 4.30 e 4.31) e das partículas sem adição de ativos (Figura 4.32). As partículas com bactérias incorporadas apresentaram superfície rugosa quando comparadas com as das partículas vazias.

Os diâmetros médios variaram de 34,50 a 83,00 μm , conforme mostrado na Tabela 4.8. Este comportamento, mais próximo do observado para a preparação de partículas quando da ausência de agentes ativos que quando da inclusão de BSA, corrobora a suposição de que a possível interação da proteína com o óleo da emulsão ocasiona o aumento do tamanho e promove a agregação das partículas

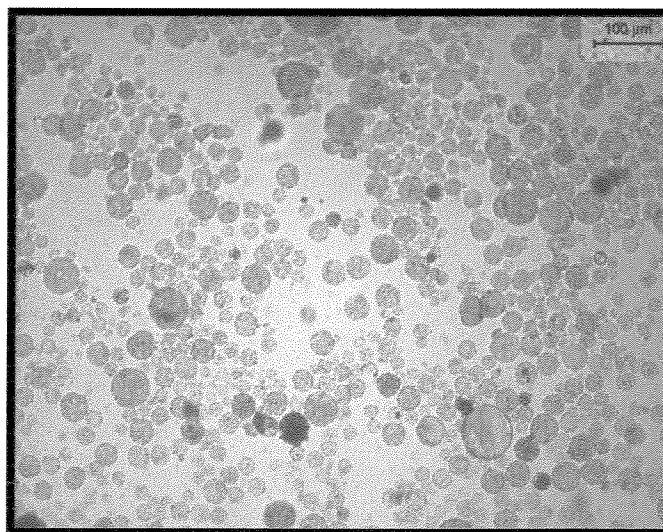


Figura 4.28: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento 100 X) das partículas de alginato preparadas com 2,37 mg/mL de bactérias com óleo de milho.

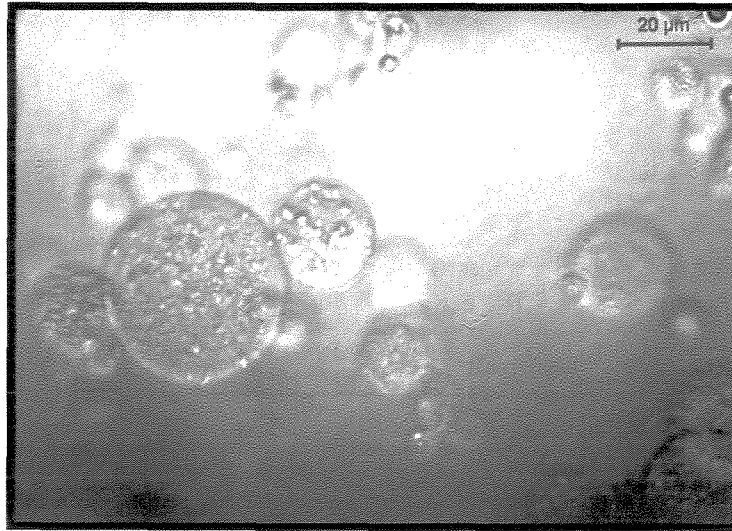


Figura 4.29: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 500x) das partículas de alginato preparadas com 2,37 mg/mL de bactérias com óleo de milho.

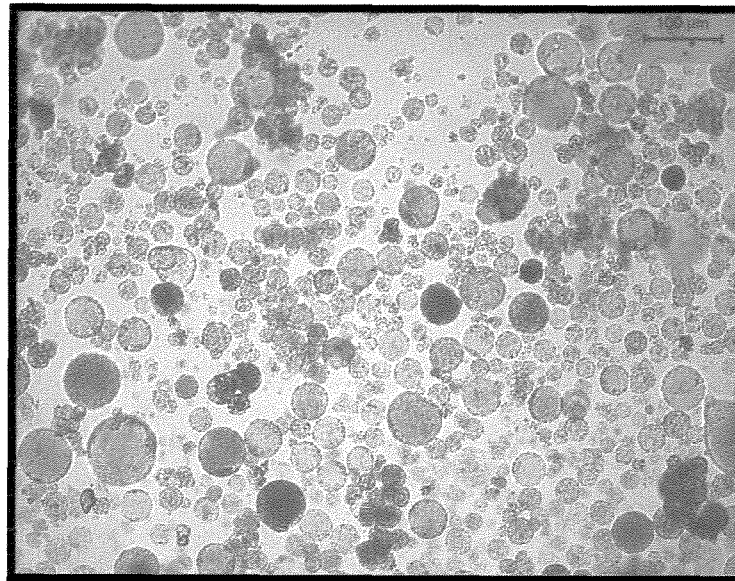


Figura 4.30: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento 100 X) das partículas de alginato preparadas com 14,22 mg/mL de bactérias com óleo de milho

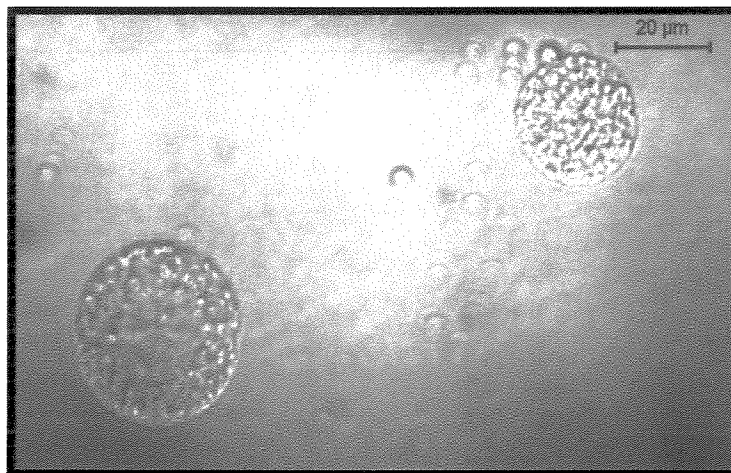


Figura 4.31: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 500x) das partículas de alginato preparadas com 14,22 mg/mL de bactérias com óleo de milho

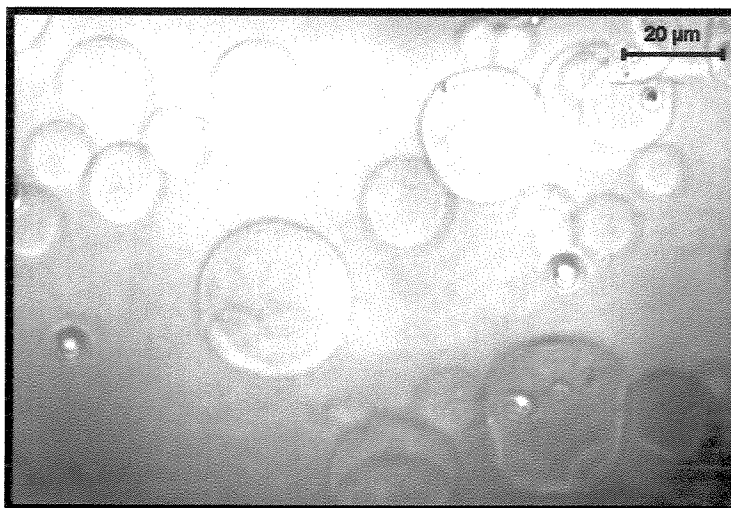


Figura 4.32: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 500x) das partículas de alginato preparadas com óleo de milho sem a adição de ativos.

De acordo com as Figuras 4.33 e 4.34, os perfis de distribuição de tamanhos das partículas obtidas utilizando-se 2,37 mg/mL de bactérias indicam diâmetros médios cerca

de 10 μm maiores para partículas preparadas com óleo de milho em comparação às preparadas com óleo de soja.

Tabela 4.8: Diâmetros médios das partículas obtidas quando da incorporação de *Aeromonas hydrophila* em partículas contendo alginato a 3,5% preparadas fundamentalmente por emulsão com óleo de milho.

Concentração inicial de bactérias (mg/mL)	Diâmetros médios (μm)
2,37	39,02 29,12*
4,74	82,04
9,48	49,70
14,22	80,20

*Amostra preparada por emulsão em óleo de soja

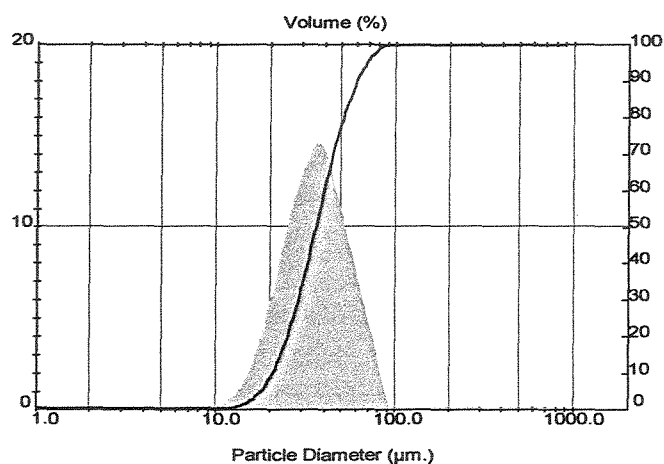


Figura 4.33: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 2,37 mg/mL de bactérias quando preparadas com óleo de milho.

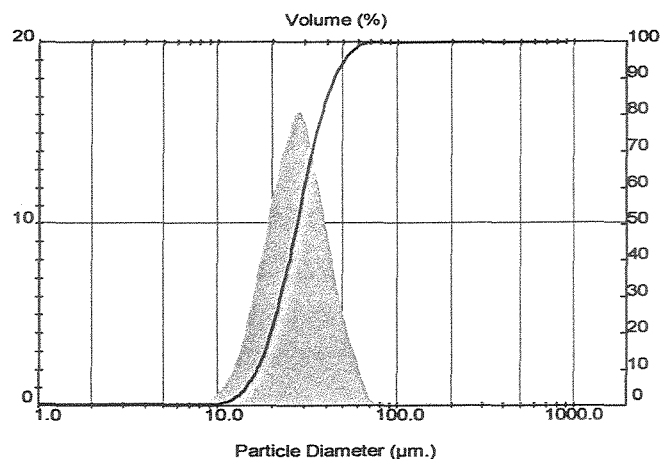


Figura 4.34: Perfil de distribuição de tamanho das partículas obtidas empregando-se 2,37 mg/mL de bactérias (em massa seca) quando preparadas com óleo de soja.

4.7. Estabilidade em água e em meios que simulam as condições gastrintestinais

Com base nas características de digestão das tilápias, os ensaios de estabilidade das partículas foram efetuados à temperatura ambiente após 12 horas de incubação em soluções aquosas com pH ajustado para 2 e 4 com ácido clorídrico, e também em água deionizada a pH 4,5.

As análises realizadas para uma amostra contendo 14,2 mg de bactérias (em termos de massa seca) por mililitro de gel a 3,5% de alginato preparadas por emulsão com óleo de milho indicam que as partículas produzidas são bastante estáveis, pois apresentaram percentuais de liberação de bactérias em água a pH 2,0 e 4,0 inferiores a 1% e de 5,5 % em água deionizada a pH 4,5 após 12 horas. Ressalta-se que este é um fato de grande importância para o trabalho em questão, uma vez que para que a imunização ocorra de forma eficaz, as partículas contendo os antígenos devem chegar praticamente intactos ao intestino dos animais. A estabilidade das amostras contendo 2,37 mg/mL foi avaliada nas mesmas condições, entretanto não conduziu a resultados conclusivos, pois a sedimentação das partículas não foi eficaz na etapa de centrifugação, e as partículas afetaram as leituras de absorvância.

A morfologia das partículas contendo 14,2 mg/mL de bactérias após 12 h de ensaio pode ser visualizada na Figura 4.35, observando-se que praticamente não ocorrem alterações em sua forma ou tamanho. O menor número de partículas nas micrografias A e B em relação à C não se deve à dissolução das amostras, e sim ao fato que a concentração inicial de partículas na amostra controle (micrografia C) era maior.

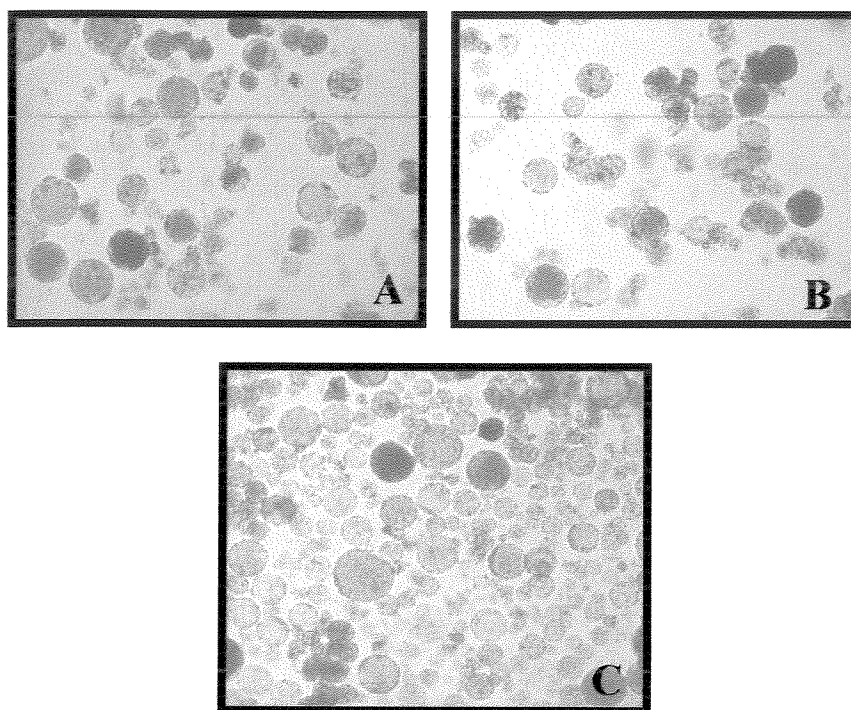


Figura 4.35: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 100X) das partículas preparadas com adição de 99,6 mg de bactérias em 7 mL de gel de alginato. A) após 12 horas em pH 2,0 B) após 12 horas em pH 4,0 C) antes da incubação em condições ácidas.

Os resultados obtidos são compatíveis com os de Romalde *et al.* (2004). Segundo estes autores, partículas intactas de alginato podem ser detectadas no estômago e na parte anterior do intestino de peixes, até mesmo 24 horas após sua administração por via oral, mostrando assim que as micropartículas de alginato são resistentes a baixos valores de pH. Entretanto, em pH básico, as partículas intumescem e podem liberar rapidamente o agente ativo encapsulado (Joosten *et al.*, 1997).

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se concluir que partículas de alginato com diâmetros em torno de 30 μm podem ser obtidas por métodos envolvendo o uso de emulsões.

A utilização de soluções concentradas de alginato, baixas taxas de agitação, proximidade entre os volumes das fases da emulsão e a não adição de tensoativos, resultou em partículas com diâmetros superiores a 50 μm .

O protocolo experimental estabelecido para a obtenção das partículas na faixa de diâmetro desejada fundamenta-se em preparar uma emulsão utilizando 7 mL de alginato a 3,5% (m/v) contendo ou não agentes ativos, 63 mL de óleo de milho contendo 0,2% (v/v) de Span[®] 80 sob agitação de 2000 rpm por 10 minutos. A emulsão obtida deve ser vertida em 70 mL de solução gelificante sob agitação de 2000 rpm por 10 minutos. Para promover a inversão da emulsão, 150 mL de solução de lavagem (composta por cloreto de cálcio 0,05M) devem ser adicionados ao sistema. As partículas obtidas devem ser filtradas em papel de filtro e lavadas (com acetona ou álcool) para que possam ser devidamente recuperadas.

As partículas obtidas por emulsão foram capazes de efetivamente encapsular tanto a proteína BSA como a bactéria *Aeromonas hydrophila*, porém quantidades apreciáveis de óleo residual foram observadas nas partículas com BSA.

Quanto à estabilidade, partículas contendo 14,3 mg/mL de bactérias apresentaram liberação inferior a 1% após 12 horas em soluções aquosas com pH entre 2,0 e 4,5. Assim, conclui-se que o antígeno incorporado pode ser efetivamente protegido da ação hostil do trato digestivo.

6.2. Sugestões para trabalhos futuros

Como continuidade ao trabalho desenvolvido sugere-se a realização de estudos complementares enfocando os seguintes tópicos:

- Utilização de novos procedimentos de lavagem das partículas com o intuito de remover mais eficientemente o óleo residual;
- Análise do efeito da temperatura na lavagem e mesmo no processamento das partículas.
- Utilização de taxas de agitação acima de 2000 rpm e de diferentes tipos de hélices ou de um homogeneizador visando a obtenção de partículas com diâmetros inferiores a 30 μm .
- Preparação de partículas de alginato por emulsão utilizando diferentes tipos de surfatantes (isolados ou em misturas) para a redução do diâmetro médio das partículas;
- Avaliação mais detalhada de procedimentos de secagem das partículas e sua reidratação, verificando se a morfologia, o tamanho e a quantidade de agente ativo incorporado são mantidas;
- Realização de ensaios *in vivo* para verificar a eficiência de imunização de tilápias do Nilo através da administração das partículas produzidas por via oral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aral, C.; Akbuğa, J. "Alternative approach to the preparation of chitosan beads". *International journal of Pharmaceutics*, vol. 168, p.9-15, 1998.
2. Allen Jr., L. V. "Manipulando Cremes e Loções". *Internacional Journal of Pharmaceutical Compounding*, Ed. Brasileira, vol. 1, 6p, novembro/dezembro 1999.
3. Azad, I. S.; Shankar, K. M.; Mohan, C. V.; Kalita, B. "Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* – standardization of dose and duration for oral vaccination of carps". *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 9, p. 519-528, 1999.
4. Bucke, C. "Methods of immobilizing cells" in: *Process Engineering Aspects of Immobilised Cell Systems*. Eds. Weeb, C.; Black, G. M.; Atkinson, B.; Rugby, Ed. The Institution of Chemical Engineers, 1986, p. 20-34.
5. Caceci, T., El-Habbak, H. A., Smith, S. A., Smith, B. J. "The stomach of *Oreochromis niloticus* has three regions". *Journal of Fish Biology*, vol.50, p. 939-952, 1997.
6. Chan, L., W.; Lee, H. Y.; Heng, P. W. S. "Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 242, p. 259-262, 2002.
7. Costa, A. B. "Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica". *Tese de Doutorado*, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

8. Dalmo, R. A., Leifson, R. M., Bogwald, J. "Microspheres as antigen carriers-studies on intestinal - absorption - and tissue localization of polystyrene microspheres in Atlantic Salmon, *Salmo-salar. L*". *Journal of Fish Diseases*, vol. 18 (1), p. 87-91, 1995.
9. Dashevsky, A. "Protein loss by the microencapsulation of an enzyme (lactase) in alginate beads". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 161, p. 1-5, 1998.
10. Fundueanu, G.; Esposito, E.; Mihai, D.; Carpov, A.; Desbrieres, J.; Rinaudo, M.; Nastruzzi, C. "Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 170, p. 11-21, 1998.
11. Fundueanu, G.; Nastruzzi, C.; Carpov, A.; Desbrieres, J.; Rinaudo, M. " Psysico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials*, vol. 20, p. 1427-1435, 1999.
12. Gåserød, O.; Smidsrød, O.; Skjåk-Braek, G. "Microcapsules of alginate-chitosan-I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan". *Biomaterials*, vol. 19, p. 1815-1825, 1998.
13. Gombotz, W. R.; Wee, S. F. " Protein release from alginate matrices". *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 31, p. 267-285, 1998.
14. Gudding, R.; Lillehaug, A.; Evensen, Ø. "Recent developments in fish vaccinology". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 72, p. 203-212, 1999.

15. Hew, C. L.; Fletcher, G. L. "The role of aquatic biotechnology in aquaculture". *Aquaculture*, vol. 197, p. 191-204, 2001.
16. Hildebrand, G. E.; Tack, J. W. "Microencapsulation of peptides and proteins". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 196, p. 173-176, 2000.
17. Jiang, G.; Jee, U. K.; Maeng, P. J.; Hwang, S. J. "Evaluation of alginate microspheres prepared by emulsion and spray method for oral vaccine delivery system". *J. Kor. Pharm. Sci.*, vol. 31, p. 241-256, 2001.
18. Joosten, P. H. M.; Tiemersma, E.; Threels, A.; Caumartin-Dhiex, C.; Rombout, J. H. W. M. "Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles". *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 7, p. 471-485, 1997.
19. Kelley, D., McClements, D. J. "Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions". *Food Hydrocolloids*, vol. 17, p. 73-85, 2003.
20. Kim, B.; Bowersock, T.; Griebel, P.; Kidane, A.; Babiuk, L. A.; Sanchez, M.; Attah-Poku, S.; Kaushik, R. S.; Mutwiri, G. K. "Mucosal immune responses following oral immunization with rotavirus antigens encapsulated in alginate microspheres". *Journal of Controlled Release*, vol. 85, p. 191-202, 2002.
21. Lavelle, E.C.; Jenkins, P.G.; Harris, J.E. "Oral immunization of rainbow trout with antigen microencapsulated in poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles". *Vaccine*, vol. 15, p. 1070-1078, 1997.

-
22. Lemoine, D.; Wauters, F.; Bouchend'homme, S.; Pr  at, V. "Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 176, p. 9-19, 1998.
23. Ministério do Desenvolvimento Agrário. www.agridata.mg.gov.br, acesso em 01/05/2002.
24. Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M., Sarbolouki, M. N. "Mass preparation and characterization of alginate microspheres". *Process Biochemistry*, vol. 35, p. 885-888, 2000.
25. Moraes, A. M. "Estudo da Oxida  o de etanol a ácido acético por células do g  nero *Acetobacter* livres e imobilizadas em géis hidrofílicos". *Disserta  o de Mestrado*, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1991.
26. Murata, Y.; Sasaki, N.; Miyamoto, E.; Kawashima, S. "Use of floating alginate gel beads for stomach-specific drug delivery". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 50, p. 221-226, 2000.
27. Neiser, S., Draget, K. I., Smidsr  d, O. "Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems". *Food Hydrocolloids*, vol. 13, p. 445-458, 1999.
28. O'Hagan, D. "Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines". *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 34, p. 305-320, 1998.
29. Phillips, C. R.; Poon, Y. C. "Immobilization of Cells". Berlin, Ed. Springer-Verlag, 1988, 167 p.

-
30. Piganelli, J. D., Zhang, J. A., Christensen, J. M., Kaattari, S. L. "Enteric coated microspheres as an oral method for antigen delivery to salmonids". *Fish & Shellfish*, vol. 4, p. 179-188, 1994.
 31. Polk, A. E.; Amsden, B.; Scarratt, D. J.; Gonzal, A.; Okhamafe, A. O.; Goosen, M. F. A. "Oral delivery in aquaculture-controlled-release of proteins from chitosan-alginate microcapsules". *Aquacultural Engineering*, vol. 13, p. 311-323, 1994.
 32. Poncelet, D.; Babak, V.; Dulieu, C.; Picot, A. "A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 155, p. 171-176, 1999.
 33. Rahman, M. H.; Kawai, K. "Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish". *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 10, p. 379-382, 2000.
 34. Ribeiro, A. J.; Neufeld, R. J.; Arnaud, P.; Chaumeil, J. C. "Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 187, p. 115-123, 1999.
 35. Romalde, J. L., Luzardo-Alvárez, A., Ravelo, C., Toranzo, A. E., Blanco-Méndez, J. "Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis". *Aquaculture*, vol. 236, p. 119-129, 2004.
 36. Scholz, T. "Parasites in cultured and feral fish". *Veterinary Parasitology*, vol. 84, p. 317-335, 1999.

-
37. Shao, Z. J. "Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities". *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 50, p. 229-243, 2001.
38. Sigma Aldrich. (www.sigmaaldrich.com acesso em 09/06/2004).
39. Singh, M.; O'Hagan, D. "The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration". *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 34, p. 285-304, 1998.
40. Suckow, M. A.; Jarvinen, L. Z.; HogenEsch, H.; Park, K.; Bowersock, T. L. "Immunization of rabbits against a bacterial pathogen with an alginate microparticle vaccine". *Journal of Controlled Release*, vol. 85, p. 227-235, 2002.
41. Sultana, K.; Godward, G.; Reynolds, N.; Arumugaswamy, R.; Peiris, P.; Kailasapathy, K. "Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt". *International Journal of Food Microbiology*, vol. 62, p. 47-55, 2000.
42. Syndel International Inc. "Vaccination as a Disease Management Tool". www.syndel.com acesso em 23/04/2002.
43. Vandenberg, G. W.; De La Noüe, J. "Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation". *Journal Microencapsulation*, vol. 18, p. 433-441, 2001.
44. Wan, L. S. C.; Heng, P. W. S.; Chan, L. W. "Surfactant effects on alginate microspheres". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 103, p. 267-275, 1994.