

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

*Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em
lipossomas*

André Gonçalo Antunes dos Santos

Mestrado em Biotecnologia

2011

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

*Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em
lipossomas*

André Gonçalo Antunes dos Santos

Mestrado em Biotecnologia

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Ana Margarida Grenha

Professor Doutor Jorge Martins

2011

O conteúdo desta dissertação é da única e exclusiva responsabilidade do autor.

Este documento foi escrito segundo o novo acordo ortográfico.

**Este trabalho é parte do projeto 13380-MICALA, co-financiado pelo FEDER
através do PO Algarve 21 no âmbito do QREN 2007-2013.**

***Devemos acreditar que temos um dom para alguma coisa e que, custe o
que custar, havemos de consegui-la”***

Marie Curie

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus pais pelo esforço que fizeram ao longo destes anos para me ajudarem no meu percurso académico. Estou-lhes muito grato por tudo o que têm feito por mim. Espero não os ter desiludido...

Índice

Dedicatória	IV
Índice	V
Lista de figuras	VII
Lista de quadros e tabelas.....	XI
Agradecimentos.....	XII
Resumo	XIII
Abstract	XIV
Lista de abreviaturas	XV
1 – Introdução	1
1.1 - Lipossomas.....	2
1.1.1– Preparação de lipossomas	5
1.1.2 – Aplicações dos lipossomas	9
1.2 – Quitosano	14
1.2.1 – Biodegradação, biodistribuição e toxicidade do quitosano	16
1.2.2 – Preparação de micropartículas de quitosano.....	19
1.2.3 – Controlo da libertação utilizando micropartículas de quitosano.....	23
1.2.4 – Aplicações do quitosano	25
1.3 – Objetivo.....	26
2 – Material e métodos.....	27
2.1 – Material.....	27
2.2 – Métodos	27
2.2.1 – Preparação dos lipossomas	27
2.2.1.1 – Determinação do tamanho e do potencial de superfície dos lipossomas	29
2.2.2.2 – Determinação da eficiência de encapsulação	29
2.2.2 – Preparação de micropartículas de quitosano.....	30
2.2.2.1 – Determinação do tamanho, análise da morfologia e microanálise das micropartículas de quitosano	33

2.2.2.2 – Determinação do índice de compressibilidade e da densidade aparente das micropartículas de quitosano	34
2.2.2.3 – Determinação da eficiência de encapsulação	36
2.2.2.4 – Avaliação do perfil de libertação	36
2.2.2.4.1 – Quantificação do CPSP e PM libertado	37
2.2.3 – Tratamento estatístico dos dados	37
3 – Resultados e Discussão	39
3.1 – Lipossomas	39
3.1.1 – Caracterização dos lipossomas	39
3.1.2 – Determinação da eficiência de encapsulação	42
3.2 – Micropartículas de quitosano	44
3.2.1 – Caracterização das micropartículas de quitosano	44
3.2.2 – Determinação da eficiência de encapsulação	48
3.2.3 – Quantificação de CPSP e PM libertados	50
4 – Conclusões	57
5 – Perspetivas futuras	58
Referências bibliográficas	59

Lista de figuras

Figura 1: “Tube-fed” com soluções indicadoras de pH em solha japonesa (*Paralichthys olivaceus*). **A)** Antes; **B)** após aquisição da digestão gástrica. Adaptado de [2]. _____ **1**

Figura 2: Esquema das diferentes formas de organização dos fosfolípidos: **A)** lipossoma; **B)** bicamada fosfolípídica. Adaptado de [18] . _____ **3**

Figura 3: Representação esquemática dos diferentes tipos de estruturas formadas por lipossomas e da estrutura típica de um fosfolípido. **A)** vesícula multilamelar ou MLV; **B)** vesícula unilamelar grande ou LUV; **C)** vesícula unilamelar pequena ou SUV; **D)** estrutura de um fosfolípido; **E)** vesícula multivesicular ou MVV. Adaptado de [15]. _ **4**

Figura 4: Estrutura química de: **A)** fosfatidilcolina (PC); **B)** colesterol, **C)** palmitoil-oleoil-glicero-fosfatidilcolina (POPC), **D)** fosfatidiletanolamina (PE); **E)** fosfatidilserina (PS); **F)** fosfatidilglicerol (PG), **G)** fosfatidilinositol (PI). Adaptado de [15]. __ **5**

Figura 5: Esquema básico dos procedimentos que podem ser utilizados para a formação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico. Adaptado de [15]. _____ **7**

Figura 6: Esquema formação de lipossomas com base na emulsão como passo inicial. Adaptado de [15]. _____ **8**

Figura 7: Esquema de formação de lipossomas com base na utilização de detergentes. Adaptado de [15]. _____ **8**

Figura 8: Representação esquemática de vesículas sensíveis ao pH, contendo glucose-oxidase, para potencial uso no tratamento da diabetes. A glucose-oxidase e a insulina são coencapsuladas na vesícula (POPE-ácido oleico,7:3). **(1)** A oxidação da glucose no interi interior das vesículas leva a uma diminuição do pH, **(2)** resultando numa desestabilização das vesículas e **(3)** consequente libertação de insulina para o meio externo. Adaptado de [32]. _____ **12**

Figura 9: Estrutura química: A) Quitina e B) Quitosano Adaptado de [45]. _____	14
Figura 10: Esquema da reação de desacetilação da quitina a quitosano: A) Quitina; B) Quitosano. Adaptado de [43]. _____	15
Figura 11: Esquema geral da preparação de partículas de quitosano pelo método de emulsificação em presença de um agente reticulante. Adaptado de [44]. _____	20
Figura 12: Esquema da preparação de partículas de quitosano através do método de emulsão-coalescência. Adaptado de [73]. _____	22
Figura 13: Representação esquemática da produção de partículas de CS através do método de complexação polielectrolítica. Adaptado de [44]. _____	23
Figura 14: Esquema dos três mecanismos de libertação de compostos encapsulados em partículas de CS. A) Libertação do composto presente na superfície das partículas; B) Libertação por difusão a partir da matriz da partícula e C) Libertação por erosão da partícula. Adaptado de [44]. _____	24
Figura 15: Imagens de: A) Esquema do injetor do atomizador; B) Spray criado pelo nozzle. Adaptado de [83-84]. _____	31
Figura 16: Esquema ilustrativo de um sistema de atomização. Adaptado de [44]. ____	31
Figura 17: Equipamento de compactação mecânica (volúmetro de Jolting). Adaptado de [88]. _____	34

Figura 18: Efeito da aplicação de dez ciclos de congelamento/aquecimento (-196 °C/60 °C) sobre o tamanho de MLV preparados pelo método de hidratação do filme lipídico com (●) e sem (◇) CPSP (n ≥ 3; média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas no tamanho dos lipossomas relativamente ao tamanho inicial (p<0.05). **40**

Figura 19: **A)** Molécula de fosfatidilcolina (as setas indicam a orientação do vetor P→N presente na cabeça do fosfolípido), evidenciado a vermelho os grupos carbonilo. Direção do vetor criado **B)** Em água; **C)** Em solução aquosa com catiões. Adaptado de [96]. **D)** Representação esquemática das interações entre os grupos carbonilo e a molécula de água. _____ **41**

Figura 20: Variação da eficiência de encapsulação (◇) e do tamanho dos MLV com CPSP (●) após ciclos de congelamento/aquecimento (-196 °C/60 °C) (n = 3; média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na eficiência de encapsulação (p<0.05). _____ **42**

Figura 21: Microfotografias obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM, ampliação 5000x) das partículas de quitosano: **A)** Formulação CS:CPSP:PM = 2:0:0; **B)** Formulação CS:CPSP:PM = 2:12:1. _____ **46**

Figura 22: espectros das micropartículas obtidos por microanálise por espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (EDX). Verde – formulação 2:0:0 (controlo); Preto – formulação 2:12:1. Nota: Au (ouro) atribuído à cobertura das amostras, realizada para visualização por SEM, estando presente em todas as amostras. _____ **49**

Figura 23: Perfil de libertação das micropartículas (▲) CS: 1:6:0.5 e (□) CS: 1:12:1, obtido em água do mar (n = 3, média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na quantidade de CPSP:PM libertado entre as diferentes formulações (p<0.05). _____ **50**

Figura 24: Perfil de libertação das micropartículas (▲) CS: 1.5:6:0.5 e (□) CS: 1.5:12:1, obtido em água do mar (n = 3, média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na quantidade de CPSP:PM libertado entre as diferentes formulações (p<0.05). _____ **51**

Figura 25: Perfil de libertação das micropartículas (▲) CS: 2:6:0.5 e (□) CS: 2:12:1, obtido em água do mar (n = 3, média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na quantidade de CPSP:PM libertado entre as diferentes formulações (p<0.05). _____ **52**

Figura 26: Perfil de libertação das micropartículas (A) (●) CS: 1:6:0.5 (□) CS: 1.5:6:0.5 e (▲) CS: 2:6:0.5; (A); (B) (●) CS: 1:12:1 (□) CS: 1.5:12:1 e (▲) CS: 2: 12:1, obtido em água do mar (n = 3, média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na quantidade de CPSP:PM libertado entre as diferentes formulações (p<0.05). _____ **53**

Figura 27: Perfil de libertação das micropartículas. (—) CS 1% (●●●) CS 1.5%; (- - -) CS 2% (▲) Razão CPSP:PM 6:0.5; (□) Razão CPSP:PM 12:1; obtido em água do mar (n = 3, média ± DP). _____ **55**

Lista de quadros e tabelas

Quadro 1: Exemplos de potenciais medicamentos ou aplicações biomédicas de enzimas encapsuladas em lipossomas. Adaptado de [15] 11

Quadro 2: Toxicidade do quitosano e dos seus derivados. Caracterização do CS efetuada através do grau de desacetilação (GD) e pela massa molecular (MM). Adaptado de [50]. 18

Tabela 1: Efeito do aumento dos parâmetros associado à utilização do atomizador, nas características finais do produto. Adaptado de [81-82]. 32

Tabela 2: Percentagens de CS, CPSP e PM utilizadas para preparar as soluções para atomização. 32

Tabela 3: Caracterização do diâmetro médio das micropartículas de quitosano em função da variação das quantidades de polímero ($n \geq 100$; média \pm DP). Diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0.05$) no tamanho das micropartículas. 44

Tabela 4: Índice de compressibilidade (IC) e densidade aparente de compactação (Dac) das formulações de micropartículas de quitosano ($n = 3$, média \pm DP). Diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0.05$) no valor de IC ou Dac. 47

Tabela 5: Eficiência de encapsulação obtida para as diferentes formulações de micropartículas ($n = 3$, média \pm DP). 49

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Margarida Grenha e ao Professor Doutor Jorge Martins, pela preciosa orientação, disponibilidade e conselhos transmitidos ao longo do estágio.

A todos os membros do Aquagroup, em especial à Professora Doutora Maria Teresa Dinis, ao Doutor Luís Conceição e à Doutora Cláudia Aragão, por facilitarem o tempo necessário para frequentar o mestrado.

A todos os colegas de laboratório, Marita, Susana, Sara, Margarida e Ana Catarina pela companhia boa disposição, nos bons e nos maus momentos. Em especial ao Wilson pela ajuda fundamental na preparação das experiências.

Um agradecimento muito especial aos meus pais por mais uma vez me apoiarem na continuação do percurso académico. Aos meus irmãos, familiares e amigos de infância por todo o apoio transmitido.

Ao Marco, Jorge, Cátia, “Marquito”, Eduardo, Ana Catarina, Ana Margarida, “Palmira”, “Fraquinha”, Inês e a todos os membros da “BRIGADA” por todos os bons momentos que passámos juntos.

À Susana, Célia, Filipa, “Ticha” pela companhia nas aulas e pelos bons momentos passados no mestrado.

Por fim, ao projeto HYDRA e MICALA pelas bolsas auferidas e que me permitiram frequentar o mestrado.

Resumo

A aquicultura é uma área em expansão devido ao aumento do consumo de peixe nos últimos anos sendo que para os estágios iniciais do desenvolvimento larvar é utilizado alimento vivo, como *Artémia*. Nos últimos anos tem-se tentado obter dietas inertes devido às limitações inerentes à utilização de alimento vivo. Estas dietas apresentam na sua constituição uma componente muito hidrossolúvel que facilmente se perde por lixiviação, constituída por compostos de baixa massa molecular, mas que são determinantes para o crescimento das larvas. O objetivo deste trabalho foi utilizar inicialmente os lipossomas e posteriormente as micropartículas de quitosano (CS) como veículos para tentar formular microdietas para a alimentação de larvas de peixe. Para tal, foram encapsulados o hidrolisado de proteína de peixe (CPSP 90[®]) e um mistura de vitaminas, oligo-elementos e minerais (Pré-Mix PVO-40[®]). Os resultados obtidos indicam que os lipossomas apresentam tamanhos entre os 150-600 nm, dependendo do número de ciclos de congelação/aquecimento. Embora se tenham obtido eficiências de encapsulação de CPSP na ordem dos 90-95%, concluiu-se que esta tecnologia não é rentável para a produção de microdietas para larvas de peixe devido à reduzida capacidade de produção diária. Desta forma, desenvolveu-se um segundo sistema, as micropartículas de CS, que evidenciaram tamanhos de 2.7 - 8.7 µm, dependendo da percentagem de CS e CPSP:PM e uma eficiência de encapsulação de 95%. A formulação CS:CPSP:PM 2:6:0.5 apresentou a libertação mais baixa (40% em 30-60 min), permitindo que os restantes 60% estejam disponíveis para ingestão. Foi observado também que o perfil de libertação depende da quantidade de polímero presente nas micropartículas. A caracterização dos dois tipos de sistema estudados indica que não podem ser utilizadas como formulação final para a alimentação de larvas de peixe devido ao seu tamanho, mas que têm o perfil ideal para fazer parte de uma sistema complexo, em que exista uma segunda micropartícula externa.

Palavras-chave: Lipossomas, lixiviação, micropartículas, microdietas, quitosano

Abstract

In recent years, the increase on fish consumption led to an increase of aquaculture industry. During the early stages of larval development, larvae feeding is based on live food such as *Artemia*. Due to inherent limitations in the use of this live food, many attempts have been directed to the production of inert diets. However, the low molecular weight compounds composing these diets are easily lost by leaching because they are water-soluble, although they are crucial for larvae growth. This study aimed to use initially liposomes and subsequently chitosan (CS) microparticles, as vehicles to formulate microdiets for fish larvae feeding. To this end, hydrolyzed fish protein (CPSP 90[®]) and a mixture of vitamins, trace elements and minerals were encapsulated (Pre-Mix[®] PVO-40). The results show that the liposomes size varies between 150 - 600 nm depending on the number of cycles of freezing/thawing. Although the encapsulation efficiency was found to be around 90 - 95%, it is considered that the formulations is not adequate as fish larvae microdiet, due to the reduced daily production capacity. In this manner, a second approach was developed, consisting in CS microparticles, which evidenced sizes of 2.7 - 8.7 μm depending on the percentage of CS and CPSP:PM and encapsulation efficiency of 95%. The formulation CS:CPSP:PM: 2:6:0.5 showed the slowest release (40% in 30 - 60 min) allowing the remaining 60% to be available for ingestion by the larvae. The release profile was also observed to depend on the amount of polymer present in the formulation. The characterization of both liposomes and CS microparticles indicates that they cannot be used as final formulations for fish larvae feeding due to their size, but also suggests that they have adequate characteristics to be a part of a complex system, comprising an external microparticle.

Keywords: Chitosan, leaching, liposomes, microdiets, microparticles

Lista de abreviaturas

CS – Quitosano

D₀ – Densidade bruta inicial

D_{ac} – Densidade aparente de compactação

DHA – Ácido docosa-hexaenóico

EDX – Microanálise por espectroscopia de dispersão de energia de raios X

IC – Índice de compressibilidade

g – Gramas

IP – Intra peritoneal

IPD – Índice de polidispersidade

IV – Intra venoso

LC₅₀ – Concentração que mata 50% do material em estudo

LUV – Vesícula unilamelar grande

MLS – Vesículas multilamelares esféricas

MLV – Vesícula multilamelar

MVV – Vesícula multivesicular

PC – Fosfatidilcolina

PE - Fosfatidiletanolamina

PI - Fosfatidilinositol

PG - Fosfatidilglicerol

PM – Pré-Mix

POPC - Palmitoil-oleoil-glecero-fosfatidilcolina

POPE - 1-palmitoil2-oleoil sn-glicero3-fosfoetanolamina

RPM – Rotações por minuto

SNK – Teste Student-Newman-Keuls

SUV – Vesícula unilamelar pequena

T_f – Temperatura transição fase

TPP – Tripolifosfato de sódio

V – Volts

V₀ – Volume inicial

V_f – Volume final

1 – Introdução

A aquacultura é uma área em franca expansão devido ao aumento do consumo de peixe nos últimos anos. Adjacente a esta expansão tem sido necessário estudar alguns dos parâmetros fundamentais no desenvolvimento larvar, sendo a alimentação das larvas uma das áreas com maior interesse.

As larvas de peixe, em geral, eclodem com um sistema digestivo imaturo e indiferenciado constituído por um tubo gástrico. Na Figura 1A está representado o tubo gástrico da solha japonesa e no qual é visível o tubo indiferenciado e um pH no seu interior igual ao da água do mar. Nesta etapa do desenvolvimento larvar apenas ocorre digestão enzimática e em meio alcalino [1-3]

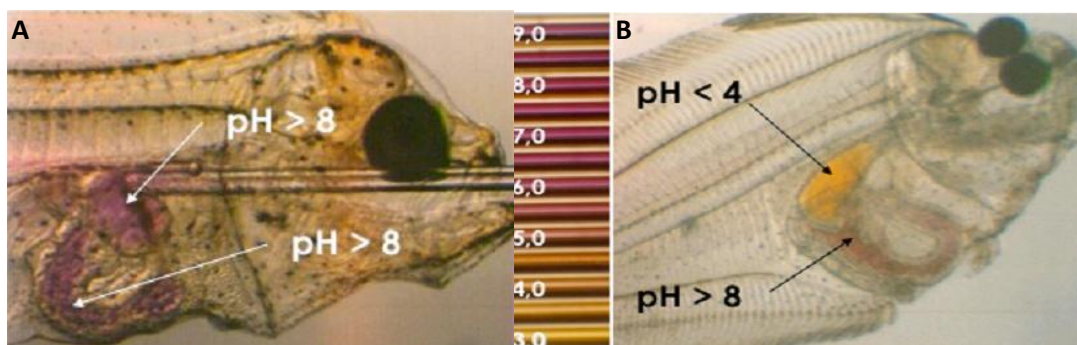


Figura 1: “Tube-feed” com soluções indicadoras de pH em solha japonesa (*Paralichthys olivaceus*). **A)** Antes; **B)** após aquisição da digestão gástrica. Adaptado de [2].

Juntamente com a metamorfose ocorre a diferenciação do trato digestivo, sendo possível observar o aparecimento do estômago (amarelo na Figura 1B) e da diferenciação do intestino [2]. Nesta etapa do desenvolvimento larvar, não só ocorre digestão enzimática mas também por catálise ácida no estômago [2, 4].

Com base neste conhecimento, as larvas de peixe nos estágios iniciais do seu desenvolvimento são alimentadas com alimento vivo fácil de metabolizar, caso da *Artémia* e/ou *Rotíferos*. Contudo estes pequenos crustáceos apresentam limitações inerentes a este tipo de alimento, como a necessidade de produzir o alimento vivo semanas antes da eclosão das larvas e a sua manutenção durante o cultivo larvar, assim

como a preparação diária do alimento horas antes da alimentação das larvas, tornou-se fundamental encontrar alternativas à sua utilização [5]. Desta forma, nos últimos anos tem-se tentado obter dietas inertes para evitar a dependência do cultivo prévio de alimento vivo e da perda de tempo, diária, antes de cada alimentação [6-9] .

Já foram descritos diversos estudos que reportam a utilização de lipossomas ou de partículas poliméricas compostas por amido, gelatina, alginato e carragenina, para produzir partículas que possam atuar como transportadores dos nutrientes [6]. Há inclusivamente algumas empresas que produziram microdietas, mas a sua relação produtividade/preço indica ausência de rentabilidade. Estas dietas apresentam na sua constituição uma componente muito hidrossolúvel, constituída por compostos de baixa massa molecular, que facilmente se perdem por lixiviação [7]. Fazem parte desta componente hidrolisados de proteína de peixe e uma mistura de vitaminas com sais minerais [10-11]. As perdas destes nutrientes podem ser determinantes para o crescimento das larvas, porque são nutrientes fundamentais no estágio inicial do desenvolvimento larvar, enquanto o trato gastrointestinal não está completo [12].

Neste trabalho serão desenvolvidos lipossomas e micropartículas de quitosano para encapsular um hidrolisado de proteína de peixe, CPSP 90[®] e uma mistura de vitaminas hidrossolúveis e sais minerais denominada de Pré-Mix PVO-40[®] de forma a evitar as perdas por lixiviação.

1.1 - Lipossomas

Os lipossomas, Figura 2A, são vesículas lipídicas de estrutura anfifílica, normalmente esféricas com uma cavidade interna de natureza hidrofílica, formadas por agregados lipídicos que se dispõem sob a forma de bicamada (Figura 2B). Em determinadas condições osmóticas, as vesículas formam-se espontaneamente podendo conter uma ou mais lamelas concêntricas [13-14] . A zona hidrofóbica encontra-se no interior da bicamada e a zona hidrofílica no exterior, sendo a zona hidrofóbica formada pelas cadeias alifáticas dos fosfolipídios e a zona hidrofílica pela cabeça iónica do fosfolipídeo (Figura 3D) [15-17].

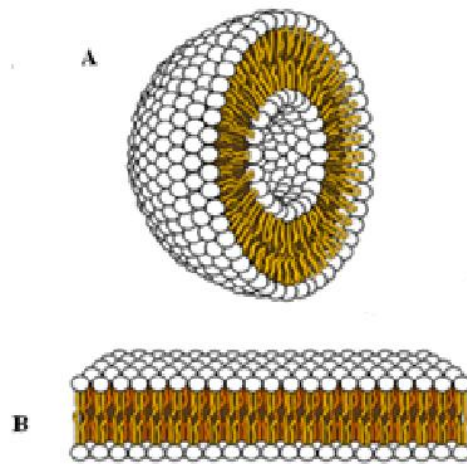


Figura 2: Esquema das diferentes formas de organização dos fosfolípidos: **A)** lipossoma; **B)** bicamada fosfolípídica. Adaptado de [18] .

Dependendo do método de preparação, podem-se obter vesículas oligounilamelares, variando o seu diâmetro de 20 nm a algumas centenas de μm . Na Figura 3 estão representadas várias estruturas lipídicas que se podem formar.

A Figura 3A ilustra uma vesícula multilamelar ou MLV, apresentando um diâmetro de aproximadamente 100 nm. Representada por B, está uma vesícula unilamelar grande ou LUV (diâmetro 1 μm); por C, uma vesícula unilamelar pequena ou SUV, que normalmente apresenta um diâmetro de 30 nm; e por E, uma vesícula multivesicular ou MVV [15].

Apesar de serem cineticamente estáveis, as vesículas lipídicas não apresentam estabilidade termodinâmica devido às propriedades dos fosfolípidos que as constituem [13-14, 17] . Os primeiros trabalhos significativos que reportam a utilização/formação de lipossomas realizaram-se nos anos 70 [19], tendo-se utilizado fosfatidilcolina (PC) (Figura 4A) e colesterol (Figura 4B).

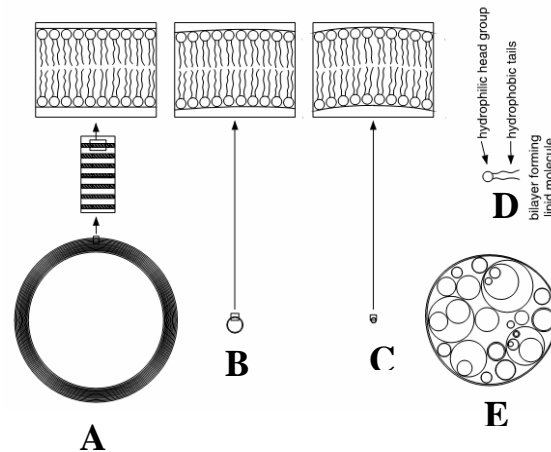


Figura 3: Representação esquemática dos diferentes tipos de estruturas formadas por lipossomas e da estrutura típica de um fosfolípido. **A)** vesícula multilamelar ou MLV; **B)** vesícula unilamelar grande ou LUV; **C)** vesícula unilamelar pequena ou SUV; **D)** estrutura de um fosfolípido; **E)** vesícula multivesicular ou MVV. Adaptado de [15].

Ao longo dos anos foram desenvolvidos mais trabalhos utilizando outros fosfolípidos [15-16, 20-23]. Os fosfolípidos mais utilizados para a formação de lipossomas são o palmitoil-oleoil-glicero-fosfatidilcolina (POPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) e o fosfatidilinositol (PI). Na figura 4 está representada a estrutura de cada um deles [15].

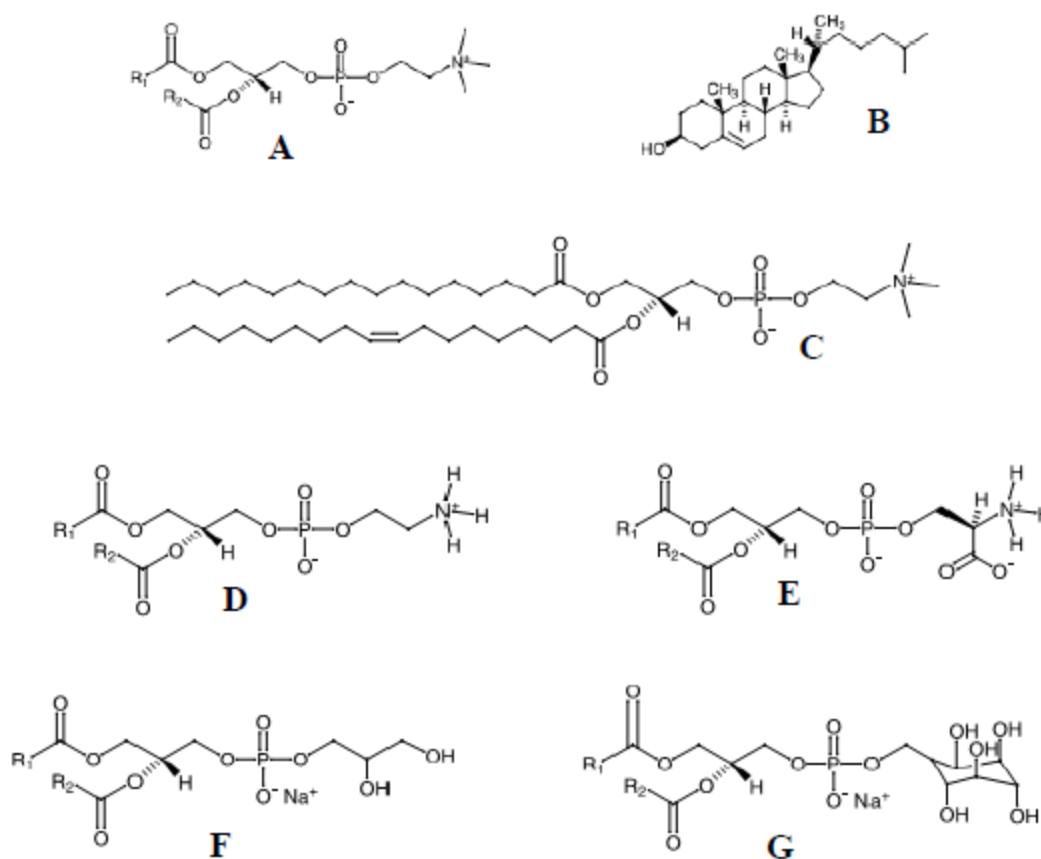


Figura 4: Estrutura química de: **A)** fosfatidilcolina (PC); **B)** colesterol, **C)** palmitoil-oleoil-glicero-fosfatidilcolina (POPC), **D)** fosfatidiletanolamina (PE); **E)** fosfatidil serina (PS); **F)** fosfatidilglicerol (PG), **G)** fosfatidilinositol (PI). Adaptado de [15].

1.1.1– Preparação de lipossomas

As propriedades físico-químicas e biológicas dos fosfolípidos são de extrema importância na formação dos lipossomas. A carga iônica, a área/volume, o tipo de cabeça/cauda e o tipo de interações que podem promover, bem como as temperaturas de transição de fase são alguns dos aspetos focados pela bibliografia e considerados os mais importantes para a caracterização de um fosfolípido [13-15, 17].

Existem diferentes métodos para a produção de lipossomas, bem como diferentes formas de promover e encapsulamento de moléculas no seu interior. No processo de formação de lipossomas podem-se adicionar ao meio de preparação moléculas hidrossolúveis que, aquando da autoagregação dos fosfolípidos, ficam aprisionadas no interior dos lipossomas, ou moléculas lipossolúveis, que ficam

intercaladas na zona hidrófoba da bicamada. Este processo tem de ser obrigatoriamente efetuado a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase da bicamada lipídica (T_f), pois abaixo desta temperatura as cadeias hidrofóbicas saturadas assumem uma conformação semelhante à da sua estrutura cristalina, o que impediria a formação da estrutura lipossomal [15, 17].

O método de preparação de lipossomas que acolhe maior popularidade é aquele que foi desenvolvido por Alec Bangham na década de 60, que envolve a formação de um filme lipídico e a sua posterior hidratação, razão pela qual se chama método de *hidratação do filme lipídico* [24-25]. Na figura 5 estão representados, esquematicamente, os diferentes passos para produção de lipossomas utilizando este método. Como se observa, dependendo do tipo de hidratação podem obter-se diferentes tipos de lipossomas.

No caso de a hidratação ocorrer na presença de um campo magnético, formam-se vesículas de grandes dimensões que podem ser injetadas para introduzir biomoléculas no seu interior. Se o objetivo é obter vesículas esféricas e multilamelares (MLS) após a hidratação, recorre-se a um processo de “shearing” para estruturar a vesícula. O procedimento mais comum, neste tipo de formulação, é fazer apenas a hidratação do filme para formar vesículas multilamelares (MLV). Estas podem receber tratamentos posteriores, como extrusão (passagem forçada das vesículas por um filtro de dimensão característica na ordem dos nm- μ m), ciclos de congelação e aquecimento para formar vesículas de grandes dimensões, sonicação ou microfluidização (passagem forçada das vesículas por canais cerâmicos) [15].

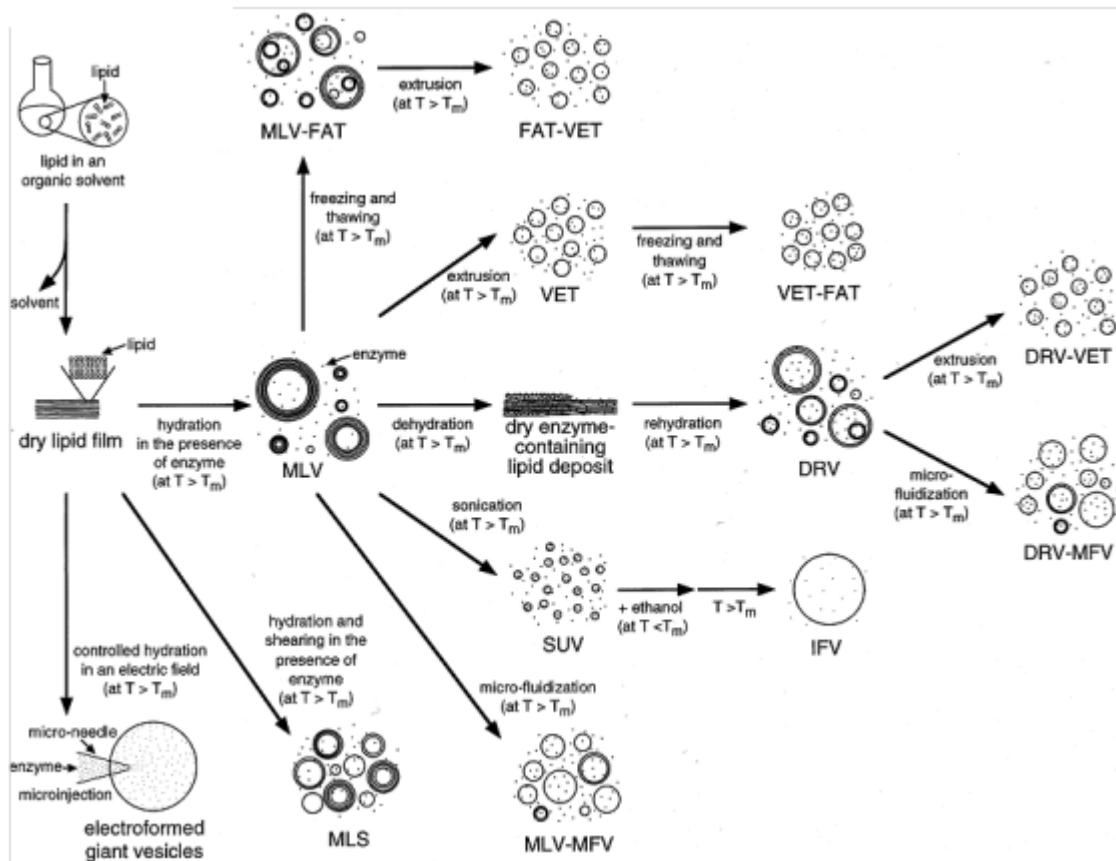


Figura 5: Esquema básico dos procedimentos que podem ser utilizados para a formação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico. Adaptado de [15].

Na figura 6 está representada outra abordagem utilizada para formação dos lipossomas, cuja base é a formação de uma emulsão. Neste caso, adiciona-se um solvente orgânico aos fosfolípidos de modo a obter uma solução homogênea, juntando-se de seguida as biomoléculas em solução aquosa ou apenas água ao meio para promover a organização dos fosfolípidos. A parte hidrófoba dos fosfolípidos fica em contacto com o solvente orgânico e a hidrofílica com a fase aquosa. Ao retirar o solvente orgânico e adicionar água, promove-se reorientação dos fosfolípidos, originando vesículas unilamelares [15].

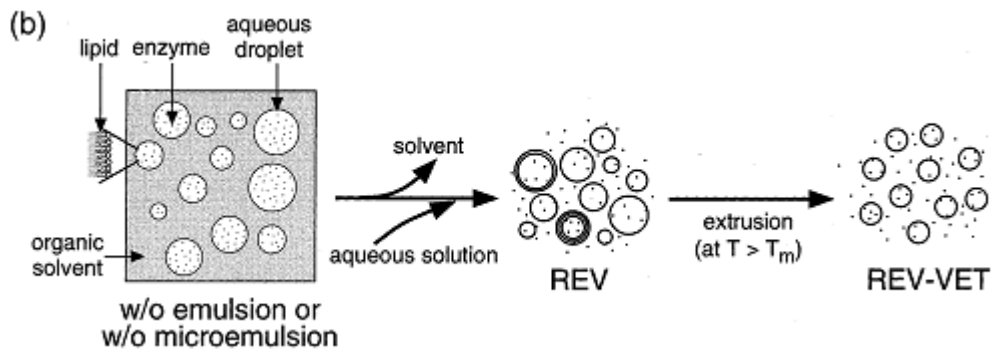


Figura 6: Esquema formação de lipossomas com base na emulsão como passo inicial. Adaptado de [15].

Um terceiro método utilizado (Figura 7) consiste na formação de lipossomas utilizando detergentes. Este processo consiste em adicionar grandes quantidades de detergente (agentes que desestabilizam biomembranas) formando uma suspensão micelar.

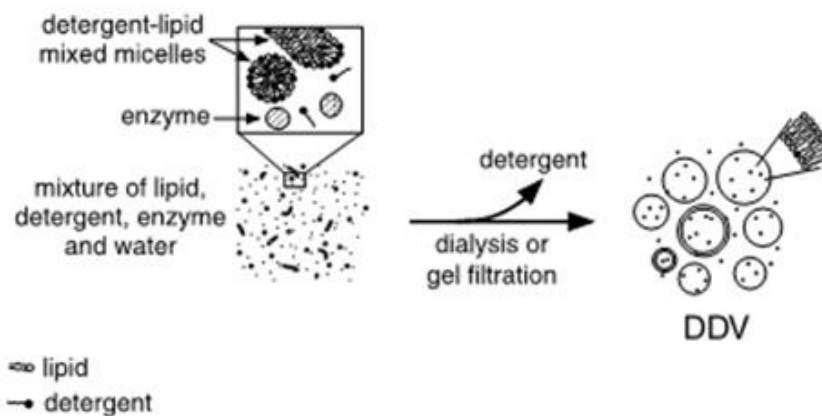


Figura 7: Esquema de formação de lipossomas com base na utilização de detergentes. Adaptado de [15].

Em determinadas condições físico-químicas obtém-se um equilíbrio entre complexos vesículas-detergente e moléculas de detergente livre. Este equilíbrio impede

a estabilização da membrana, tornando-a permeável. Deste modo, no caso destes complexos serem formados numa solução aquosa com biomoléculas, ocorre a entrada das mesmas para o interior. Ao ser retirado o detergente, através de diálise ou filtração em gel, promove-se a estabilização das membranas e a formação de lipossomas com biomoléculas encapsuladas. Quando este processo é efetuado apenas em solução aquosa sem biomoléculas, obtêm-se apenas lipossomas [15].

Existem outros métodos de encapsulação de biomoléculas em lipossomas descritos na literatura, contudo, todos são baseados nos princípios descritos anteriormente, tendo sido apenas introduzidas pequenas alterações a nível experimental, por exemplo no que se refere à temperatura ou aos próprios passos necessários à formação dos lipossomas [21-22, 26].

1.1.2 – Aplicações dos lipossomas

Ao longo dos anos os lipossomas foram utilizados principalmente para estudos de estrutura e dinâmica de bicamadas lipídicas, tidas como modelos de biomembranas. No entanto, nos últimos tempos muitos estudos têm sido efetuados que permitiram encontrar novas aplicações [15, 27]. O principal impulsionador destas novas aplicações foi a indústria farmacêutica, que viu nos lipossomas uma fonte interminável de potencialidades, principalmente como transportadores de fármacos. Hoje em dia existem muitos medicamentos e produtos de cosmética que utilizam os lipossomas como transportadores. São exemplos de medicamentos o Daunoxome[®], o Caelyx[®] e o AmBisome[®] [28-30].

O Daunoxome[®] é uma formulação de daunorubicina, um agente anticancerígeno que tem aplicação no tratamento de Sarcoma de Kaposi associado a doentes com HIV. A solução de daunorubicina é encapsulada em SUV de diesteroílfosfatidilcolina e colesterol (2:1). O principal efeito secundário da daunorubicina é a sua alta cardiotoxicidade, que pode persistir após o tratamento. O Daunoxome[®] não apresentou manifestações deste efeito secundário, mesmo em doses muito elevadas, mostrando que o lipossoma age eficientemente como redutor dos efeitos secundários [28].

O Caelyx[®] é um outro agente anticancerígeno com a mesma aplicação que o anterior, mas é ainda utilizado no tratamento do cancro do ovário. Neste caso, o fármaco é a doxorubicina, que está encapsulada em lipossomas de cerca de 100 nm, compostos por fosfatidilcolina, colesterol e polietilenoglicol. A utilização deste polímero na composição dos lipossomas permite um aumento do tempo de semivida do lipossoma dentro do organismo, porque impede o mecanismo de opsonização, essencial para a identificação de compostos exógenos por parte dos macrófagos e consequente eliminação [31]. Neste caso, verifica-se um aumento na eficiência do tratamento e uma redução dos efeitos secundários, como náuseas e vômitos [29].

No caso do AmBisome[®], o fármaco veiculado é a anfotericina B, um potente antifúngico, que está encapsulado em lipossomas de fosfatidilcolina:colesterol:difosfatidilglicerol (10:5:4). A formulação lipossómica deste fármaco permitiu observar o desaparecimento dos efeitos secundários associados à anfotericina B, bem como aumentar o seu tempo de semivida [30].

Muitos estudos foram necessários para se chegar a um ponto de comercialização frequente de formulações de base lipossomal. Na revisão efetuada por *Walde* et al estão descritos alguns dos estudos realizados ao longo dos anos que permitiram ou permitirão o desenvolvimento de fármacos com base enzimática. No Quadro 1 estão expostos alguns desses estudos [15].

Quadro 1: Exemplos de potenciais medicamentos ou aplicações biomédicas de enzimas encapsuladas em lipossomas. Adaptado de [15]

Enzima	Investigação/potencial aplicação
Fosfatase alcalina	Imuno-lipossomas direcionados utilizados no combate ao Herpes simplex
Amiloglucosidases	Tratamento de pacientes com doença de Pompe (Terapia enzimática de substituição) Atividade antitumoral, no tratamento da leucemia linfoblástica.
Asparaginase	Atividade antitumoral no tratamento da leucemia linfoblástica
β -Galactosidase	Utilização como marcador molecular no estudo do efeito do sistema complemento nos lipossomas
Glucocerebrósido : β -glucosidase	Tratamento da doença Gaucher (terapia de reposição enzimática)
Glucose oxidase	Estudos efetuados com ratos mostram que uma administração intragástrica de vesículas com esta enzima, diminui o nível de glicose no sangue
Fosfotriesterase	Remoção de orgânofosfatos tóxicos
Peroxidase + glucose oxidases	Agente antibacteriano oral contra <i>streptococcus gordonii</i>
Estreptoquinase	Atividade trombolítica, tratamento de infeções
Superóxido dismutase	Previne a necrose epática em ratos,
Tirosinase	Possível utilização no tratamento da doença de Parkinson, a enzima cataliza a oxidação da L-Tirosina a L-Dopa

Na Figura 8 está representado o mecanismo de atuação da glucose-oxidase referida no quadro anterior. A glucose-oxidase é encapsulada juntamente com a insulina no lipossoma. A D-glucose passa para o interior da vesícula e sofre uma oxidação, que induz uma diminuição do pH. Esta diminuição leva à desestabilização da membrana e à consequente libertação da insulina [32].

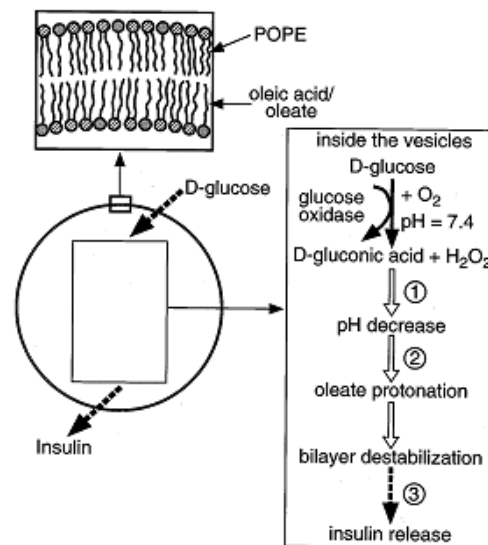


Figura 8: Representação esquemática de vesículas sensíveis ao pH, contendo glucose-oxidase, para potencial uso no tratamento da diabetes. A glucose-oxidase e a insulina são coencapsuladas na vesícula (POPE-ácido oleico,7:3). (1) A oxidação da glucose no interi interior das vesículas leva a uma diminuição do pH, (2) resultando numa desestabilização das vesículas e (3) consequente libertação de insulina para o meio externo. Adaptado de [32].

Outros estudos mostram outras aplicações, não biomédicas, tais como encapsulamento de nutrientes para suplementar alimentos, como óleos ricos em ómega 3 e 6 [33], incorporação de compostos bioativos como vitaminas, antioxidantes, péptidos em alimentos [34], ou impedir processos de lixiviação das dietas de animais aquáticos nos diferentes estados de desenvolvimento [8, 35].

Um dos primeiros estudos nesta última área reporta a 1997, em que é aconselhada a utilização de estruturas lipídicas, entre as quais os lipossomas, como forma de prevenir a perda de nutrientes por lixiviação [36]. Contudo, já em 1986 *Parker et al.* [35], através de MLV marcados com ^{14}C -colesterol, ^{14}C -DPPC e ^{14}C -glucose verificou uma incorporação bem sucedida dos MLV em ostras do pacífico. Mais tarde, em 1991, verificou-se que o mesmo tipo de lipossomas demonstrou eficiência na entrega de ácido glutâmico a mexilhões [37]. No mesmo ano, e após lavagem extensa, *Novaczek et al.* verificou em lipossomas (1:2:7 colesterol, estearilamina e DPPC) que, após 72 horas em suspensão na água do mar, não foi possível quantificar o ácido

domóico que tinha sido previamente encapsulado [6]. *Hontoria* et al. [38] descobriu que 95% da carboxifluoresceína fica retida em LUV's de DPPC após 47 dias em suspensão em água do mar. No entanto, em LUV's preparados com PC de gema de ovo, 90% do corante fica retido após três dias e posteriormente ocorre uma libertação mais intensa.

Ainda não existe um consenso quanto ao facto dos lipossomas serem um bom veículo na alimentação de larvas de peixe, visto parecerem demasiado pequenos para ser captados. Contudo, podem ser utilizados como precursores ou ativadores da alimentação, isto se transportarem substâncias que possam ser libertadas para a água de modo a alertar as larvas de que estão na presença de alimento [6].

Nos últimos 10 anos, foi desenvolvida uma nova abordagem na utilização dos lipossomas. Esta consiste em fazer ensaios enzimáticos *in vitro* nos quais as enzimas estão inseridas nos lipossomas. Este método permite otimizar os tempos de reação devido ao aumento da eficiência promovida pelo processo de compartimentalização. Esta alteração induz um aumento na concentração de substrato na vizinhança da enzima, aumentando a probabilidade da reação enzima:substrato. Prevê-se que muito em breve se possa aplicar esta técnica a mais fármacos, mas para tal é necessário otimizar as membranas seletivas ou adicionar canais ou bombas [15]. Esta técnica já é utilizada na biotecnologia, na produção de alguns compostos ativos. No fundo, trata-se de um nano reator enzimático, que ao invés de utilizar uma bactéria ou um fungo para produzir determinada proteína para metabolizar um substrato, apenas encapsula a enzima específica num lipossoma [39].

No entanto, para tal é necessário seguir os seguintes requisitos: (i) estabilidade da enzima, (ii) estabilidade da vesícula, (iii) baixa permeabilidade da membrana em relação à enzima e (iv) membrana permeável ao substrato e/ou produto [39].

Estudos mais recentes, visam incorporar membranas fosfolipídicas com polímeros, quer orgânicos (quitosano) [20, 23], quer sintéticos (polietilenoglicol) [40]. Na revisão efetuada por *Nair* et al (2007) é possível encontrar alguns polímeros sintéticos biodegradáveis que podem ou já são utilizados na formação das bicamadas. Entre eles estão os poliglicólidos, os polilactídeos, os poliésteres e poliuretanos [41]

Em suma, os lipossomas parecem ter um potencial ilimitado, desde que se tenha em linha de conta a finalidade da sua utilização e se sigam os princípios básicos para a sua construção. No fundo, trata-se de uma matriz estrutural à qual podemos adicionar diferentes peças, como por exemplo bombas, canais, anticorpos, partículas magnéticas, de forma a direcionar a vesícula para determinado tipo de célula/órgão, ou organelo.

1.2 – Quitosano

O quitosano (Figura 9B) é um polissacarídeo derivado da quitina (Figura 9A). Este polímero policationico é obtido através da desacetilação alcalina (Figura 10) da quitina. A quitina está presente no meio ambiente essencialmente nos crustáceos, mas ao contrário do quitosano (CS), é um polímero quimicamente inerte [42-44].

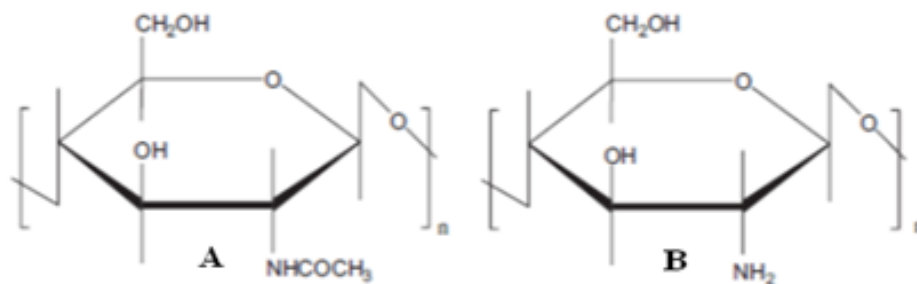


Figura 9: Estrutura química: **A)** Quitina e **B)** Quitosano Adaptado de [45].

A ligação $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetoamino-2-desoxi-D-glucopiranosose com 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose repete-se entre cada molécula de quitosano (CS) ao longo da cadeia. A amina primária, presente no monómero, é muito importante, pois torna o CS num dos poucos polímeros biológicos com carga positiva [42, 44].

O grau de desacetilação e a massa molecular são os principais parâmetros utilizados na caracterização do CS [42-44], os quais são determinados essencialmente pelas condições do processo de obtenção, podendo contudo ser modificados *a posteriori*. Por exemplo, o grau de desacetilação pode ser diminuído através de uma reacetilação [46] e a massa molecular através de despolimerização ácida [47].

O CS é relativamente reativo e pode ser obtido sob a forma de pó, pasta, filme ou fibra [42, 44]. Encontra-se disponível comercialmente, com uma grande variedade de massas moleculares e graus de desacetilação [44].

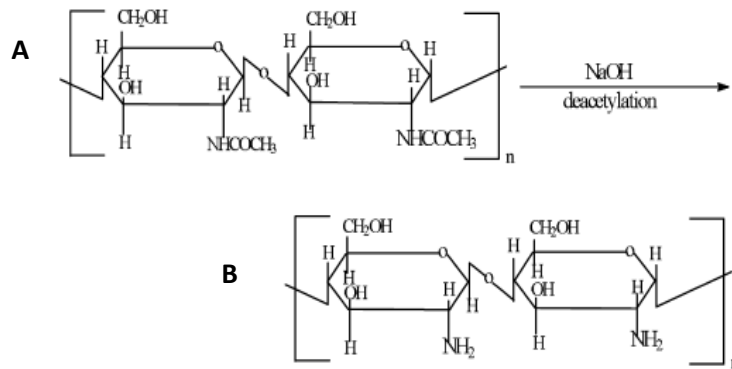


Figura 10: Esquema da reação de desacetilação da quitina a quitosano: **A)** Quitina; **B)** Quitosano. Adaptado de [43].

As propriedades físico-químicas e biológicas do CS tornam-no um excelente polímero para utilização em diversas áreas. As principais características físico-químicas são o elevado teor em azoto, com um pK_a de 6.3, estrutura D-glucosamina rígida, alta cristalinidade e insolubilidade em água, mas solubilidade em soluções aquosas ácidas, devido à protonação dos grupos amina. As soluções ácidas mais comumente utilizadas para solubilizar o quitosano são o ácido acético e o ácido clorídrico, que permitem uma solubilização na concentração 1-4% (m/v), dando origem a soluções com viscosidade considerável. O CS apresenta ainda capacidade de formação de ligações intermoleculares através de pontes hidrogénio. A pH ácido é um polímero com alta densidade de carga positiva, estabelecendo ligações eletrostáticas com moléculas aniónicas, pelo que se usa como agente floculante [42-45].

No que diz respeito às propriedades biológicas, destaca-se o facto de ser um polímero biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade, semelhante à do açúcar ou do sal (LD_{50} em ratos, 16g/kg peso corporal) [48]. O quitosano exhibe ainda propriedades mucoadesivas [49-50] e quando incluído em sistemas de administração de fármacos, tem demonstrado capacidade de modular a libertação dos mesmos, bem como de aumentar a sua absorção, como já demonstrado nos epitélios intestinal [36, 38], pulmonar [51], nasal [52] e na mucosa ocular [53-54]. O interesse deste polímero

abrange ainda o facto de ter ação antimicrobiana, antiulcerosa, antitumoral e anticoagulante [42-45].

1.2.1 – Biodegradação, biodistribuição e toxicidade do quitosano

O quitosano e outros polímeros hidrossolúveis devem ter cadeias de tamanho relativamente pequeno para que após a sua administração possam ser eliminados pelos rins sem necessitarem de sofrer uma degradação. Contudo, na maioria dos casos isso não ocorre, pelo que é ativada a sua degradação (química e/ou enzimática). A via química normalmente está associada à catálise ácida no estômago, mas também há registos de degradação polimérica através de reações de oxidação-redução [55-56], formando radicais que podem ser prejudiciais ao bom funcionamento do organismo [50]. No que diz respeito à via enzimática, são várias as enzimas associadas ao metabolismo do CS, sendo as mais predominantes em vertebrados, a lisozima e algumas enzimas presentes em bactérias do cólon [42, 44, 50]. São também reportadas outras enzimas que fazem hidrólise das uniões glucosamina-glucosamina, glucosamina-*N*-acetil-glucosamina e *N*-acetil-Glucosamina-*N*-acetil-glucosamina. Recentemente, oito quitinases humanas foram identificadas, tendo sido observada atividade em três delas [50]. Existem outras quitinases que não são reportadas em vertebrados, mas em plantas, fazendo parte do mecanismo de defesa contra insetos e outros microrganismos providos de exoesqueleto de quitina [50].

Não estão reportados muitos estudos realizados com CS em seres humanos [50], mas num estudo em porcos em que se administraram por via oral quatro formulações de pastilhas de CS modificado (quitosano-4-tiobutilamina) e quatro de CS nativo (MW 400 kDa), ambos com polipéptido utilizado num possível tratamento para substituir a insulina, após 6 horas na cavidade bucal não foi observada qualquer degradação do disco e a forma modificada do CS apresentava maior atividade mucoadesiva [57].

Após administração oral, o quitosano é predominantemente degradado no trato gastrointestinal, principalmente no intestino. Estudos em galinhas e em frangos evidenciam uma degradação de 67-98%, enquanto em coelhos a degradação foi de 39-83%. De salientar neste estudo, que a degradação de *N*-esteroilquitosano foi insignificante, indicando que a degradação enzimática depende dos grupos amina livres

[50]. Este estudo e outros indicam que a degradação do quitosano depende da massa molecular, do grau de desacetilação e das modificações químicas nos grupos amina. Contudo, apesar de não se conhecer o verdadeiro mecanismo de degradação do quitosano, é evidente a existência de diferentes vias alternativas.

Outra propriedade que ainda não se encontra totalmente estudada é a biodistribuição do CS. No caso de ser injetado sob a forma de nano/micropartícula a velocidade de eliminação e a biodistribuição dependem do tamanho da partícula e da carga. Contudo, após a libertação do encapsulado no interior das células ou tecidos, o CS livre vai distribuir-se pelo organismo para ser eliminado [50]. Estudos realizados em ratos, em que se administraram nanopartículas de CS/heparina por via oral, indicam que após 3 horas não se encontraram vestígios das partículas nos órgãos internos. Verificou-se um aumento de 20.5% na quantidade de heparina no sangue e apenas vestígios das partículas nos vasos sanguíneos [58]. Outro estudo, desta vez em ratos mas com administração intravenosa de partículas contendo um agente radioativo, indica que uma hora após a administração, a radioatividade diminui nos órgãos mas mantém-se no sangue [59].

Ensaio em ratos induzidos com cancro, aos quais se administraram por via intravenosa nanopartículas de CS com um agente antitumoral, permitiram observar a presença das partículas especialmente nos rins, fígado e na zona tumoral [60]. Este estudo e os elaborados por *Kean* et al. [50] indicam que o principal órgão de acumulação de CS é o fígado, o que seria esperável pois trata-se do órgão responsável pelo metabolismo dos compostos xenobióticos. Outra observação importante é de que a biodistribuição do CS após a administração intravenosa ou intraperitoneal é semelhante, mas com uma cinética diferente [61]. Em suma, a biodistribuição do CS depende do tamanho, carga das partículas e da forma como é administrado.

O CS é considerado um polímero não tóxico, biologicamente compatível e aprovado pela FDA para aplicações dietéticas [42, 44, 62-64]. No entanto, a síntese de derivados do quitosano pode alterar o seu perfil toxicológico [50]. Como foi referido anteriormente, a interação com outras moléculas, como proteínas, ou as substituições no grupo amina, promovem alterações da biodistribuição do CS, bem como na velocidade de eliminação. Por exemplo, quando se forma uma partícula de CS/DNA promove-se uma diminuição das cargas positivas do CS, alterando a cinética de entrada da partícula

na célula e consequentemente a toxicidade associada ao CS [65]. No Quadro 2 estão compilados alguns dos estudos efetuados por diferentes autores, nos quais foi determinada a concentração letal (LC₅₀) do CS (concentração de CS que mata 50% das células ou organismos em estudo). Estes estudos foram efetuados com CS modificado e/ou não modificado e/ou com partículas vazias ou carregadas.

Quadro 2: Toxicidade do quitosano e dos seus derivados. Caracterização do CS efetuada através do grau de desacetilação (GD) e pela massa molecular (MM). Adaptado de [50].

Características CS (GD, MM)	Modificação	Testes	LC₅₀
95% GD, 18.7 kDa	Micelas de Ácido esteárico conjugado com CS	<i>In vitro</i> , Células A549	369±27 µg/ml
95% GD, 18.7 kDa	Micelas de Ácido esteárico conjugadas com CS encapsuladas em CS	<i>In vitro</i> , Células A549	234±9 µg/ml
97% GD, 65 kDa	N-octil-O-sulfato	<i>In vitro</i> , hepatocitos de rato	>200 mg/ml
87% GD, 20, 45, 200, 460 kDa	Nenhuma, ácido aspártico	<i>In vitro</i> , Caco-2 cells, pH 6.2	0.67±0.24, 0.61±0.10, 0.65±0.20, 0.72±0.16 mg/ml
87% GD, 20, 45, 200, 460 kDa	Nenhuma, ácido glutâmico		0.56±0.10, 0.48±0.07, 0.35±0.06, 0.46±0.06 mg/ml
87% GD, 20, 45, 200, 460 kDa	Nenhuma, ácido láctico		0.38±0.13, 0.31±0.06, 0.34±0.04, 0.37±0.08 mg/ml
87% GD, 20, 45, 200, 460 kDa	Nenhuma, hidróxido de sódio		0.23±0.13, 0.22±0.06, 0.27±0.08, 0.23±0.08 mg/ml
78% GD, <50 kDa	Nenhuma, ácido láctico	<i>In vitro</i> Células B16F10	2.50 mg/ml
82% GD, 150–170 kDa	Nenhuma, ácido láctico	<i>In vitro</i> Células B16F10	2.00±0.18 mg/ml
>80% GD, 60–90 kDa	Nenhuma, ácido glutâmico	<i>In vitro</i> Células B16F10	2.47±0.14 mg/ml
77% GD, 180–230 kDa	Nenhuma, ácido láctico	<i>In vitro</i> Células B16F10	1.73±1.39 mg/ml
85% GD, 60–90 kDa	Nenhuma, hidróxido de sódio	<i>In vitro</i> Células B16F10	2.24±0.16 mg/ml
81% GD, 100–130 kDa	Nenhuma, hidróxido de sódio	<i>In vitro</i> Células B16F10	0.21±0.04 mg/ml
100% GD, 152 kDa	Glicol-quitosano	<i>In vitro</i> Células B16F10	2.47±0.15 mg/ml

100% GD, 3–6 kDa	20, 44, 55% Trimetil quitosano, Cloreto Sódio	<i>In vitro</i> , Células MCF7 e COS7, 6 h e 24 h	>10 mg/ml
100% GD, 3–6 kDa	94% Trimetil quitosano, Cloreto Sódio	<i>In vitro</i> , MCF7, 6 h	1.402±0.210 mg/ml
100% GD, 3–6 kDa	94% Trimetil quitosano, Cloreto Sódio	<i>In vitro</i> , COS7, 6 h	2.207±0.381 mg/ml
100% GD, 100 kDa	36% Trimetil quitosano, Cloreto Sódio	<i>In vitro</i> , MCF7, 6 h	0.823±0.324 mg/ml
100% GD, 100 kDa	36% Trimetil quitosano, Cloreto Sódio	<i>In vitro</i> , COS7, 6 h	>10 mg/ml
84.7% GD, 400, 100, 50, 25, 5 kDa	40% Trimetil quitosano	<i>In vitro</i> , L929 cells, 3 h	30, 70, 90, 270, >1000 µg/ml
84.7% GD, 1.89 MDa	12% PEG, 40% Trimetil quitosano	<i>In vitro</i> , Células L929, 3 h	220 µg/ml
84.7% GD, 3.6 MDa	25.7% PEG, 40% Trimetil quitosano	<i>In vitro</i> , Células L929, 3 h	370 µg/ml
84.7% GD, 300 kDa	6.44% PEG, 40% Trimetil quitosano (e todo o PEG modificado com TMC de baixa massa molecular)	<i>In vitro</i> , Células L929, 3 h	>500 µg/ml
97% GD, 65 kDa	N-octil-O-sulfato	<i>In vivo</i> , IV, Ratos	102.59 mg/kg
97% GD, 65 kDa	N-octil-O-sulfato	<i>In vivo</i> , IP, Ratos	130.53 mg/kg

No geral, a maioria dos estudos indicam que o CS apresenta índices muito baixos de toxicidade, pelo que é um candidato preferencial para utilização na indústria farmacêutica e alimentar. É de salientar, no entanto, que é necessário efetuar mais estudos de toxicidade dos derivados de CS [50, 65-67].

1.2.2 – Preparação de micropartículas de quitosano

São vários os métodos reportados para preparação de partículas de quitosano. Fatores como o tamanho final da partícula, estabilidade físico-química do material encapsulado, reprodutibilidade da cinética de libertação, estabilidade do produto final e a toxicidade que lhe está associada, são fundamentais na escolha do método [42, 44].

O método de emulsificação (Figura 11) em presença de um agente reticulante é um dos mais utilizados. Esta técnica tem como base a utilização de um agente reticulante que faz a ligação covalente entre dois grupos amina das cadeias poliméricas

de CS. Inicialmente prepara-se uma emulsão água/óleo, emulsificando a solução aquosa de CS na fase oleosa, em presença de um agente emulsificante. De seguida é adicionado o agente reticulante para endurecer e estabilizar as partículas. A utilização de aldeídos como o glutaraldeído tem sido reportada frequentemente como extremamente eficaz, permitindo a reticulação dos grupos amina do quitosano através de uma ligação covalente com os grupos aldeído [44, 59]. No entanto, para qualquer aplicação do foro biomédico ou nutricional, como é o caso deste trabalho, a utilização destes compostos tem sido progressivamente substituída por outros menos agressivos, dada a sua reportada toxicidade, muitas vezes comprometendo a estabilidade dos materiais encapsulados [68]. O tamanho das partículas pode ser modulado controlando fatores como a velocidade de agitação [69] e a concentração dos materiais [44]. A figura seguinte esquematiza os processos envolvidos nesta técnica.

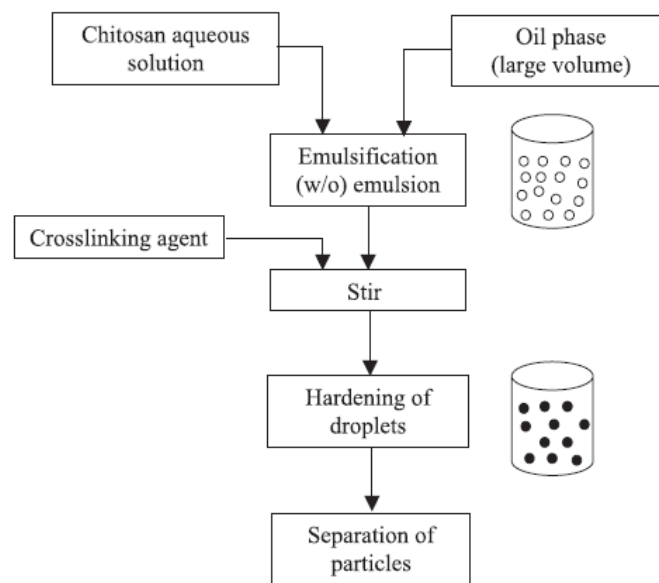


Figura 11: Esquema geral da preparação de partículas de quitosano pelo método de emulsificação em presença de um agente reticulante. Adaptado de [44].

Esta técnica apresenta alguns inconvenientes, como a morosidade do procedimento, a toxicidade geralmente associada aos reticulantes, bem como o facto de ser uma técnica que apresenta um rendimento relativamente baixo [44, 70].

De forma a evitar a utilização dos referidos agentes reticulantes, muitas vezes associados a toxicidade, foi desenvolvido um método, em tudo semelhante ao anterior, mas no qual a formação das partículas tem por base alterações térmicas. Uma parte da fase oleosa é aquecida a 120 °C enquanto uma mistura da fase aquosa (CS com ácido cítrico) juntamente com a outra parte oleosa é arrefecida até 0 °C. Posteriormente, ambas as fases são misturadas e agitadas durante 40 minutos. Neste caso, o princípio básico não é a utilização de um agente reticulante mas uma reorganização estrutural do CS mediada por uma alteração drástica da temperatura [71].

A coacervação/precipitação é outra técnica aplicada na preparação de partículas de CS, utilizando a característica insolubilidade do CS em soluções alcalinas. Ao projetar as gotas da solução de CS, sobre uma solução alcalina como hidróxido sódio, formam-se partículas coacervadas (aglomeração de partículas rodeadas por um meio). Neste caso, o tamanho das partículas dependerá essencialmente do tipo de *nozzle* utilizado para derramar as gotas de CS, sendo tanto maior quanto maior o diâmetro da gota formada [44]. Outra abordagem consiste em adicionar sulfato de sódio à solução de CS, o que induz uma diminuição de moléculas de água livres em solução promovendo uma precipitação/coacervação das moléculas de CS [72]. Com esta técnica é possível produzir partículas com tamanho no intervalo nanométrico [70, 72].

Uma mistura dos métodos referidos anteriormente foi desenvolvida por *Tokumitsu et al* [73]. Assim, utiliza-se uma emulsão, mas em vez de se adicionar um agente reticulante, promove-se a coalescência das partículas ao adicionar uma emulsão de hidróxido de sódio, conforme esquematizado na figura 12.

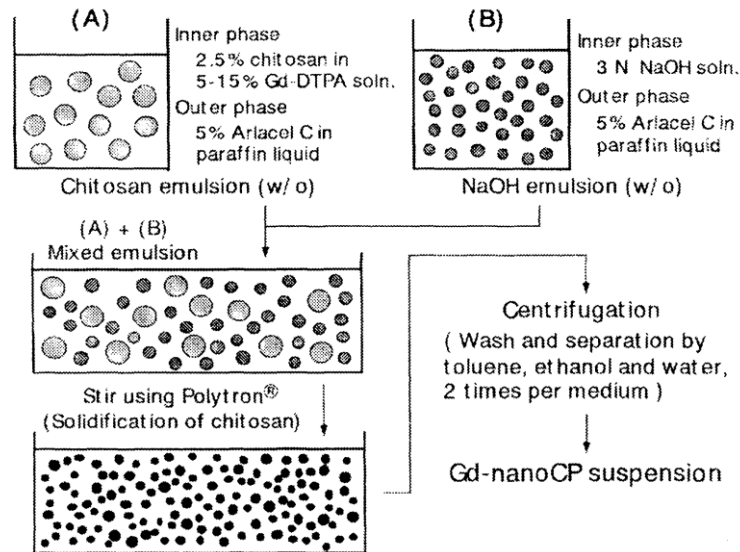


Figura 12: Esquema da preparação de partículas de quitosano através do método de emulsão-coalescência. Adaptado de [73].

As técnicas de gelificação iônica ou complexação polielectrolítica, que decorrem em ambiente completamente hidrofílico, são talvez a forma mais simples de preparar partículas de CS tendo o método sido reportado por primeira vez em 1989, utilizando a interação do CS com o tripolifosfato de sódio (TPP) [44]. A técnica consiste numa complexação de moléculas com cargas opostas, adicionando-se a solução de CS a uma solução de polianiões sob agitação vigorosa, tal como se representa na Figura 13.

A técnica de atomização tem também sido muito utilizada, a qual será desenvolvida com mais pormenor na secção da metodologia, visto ter sido utilizada para preparação de partículas de CS neste trabalho. Outros métodos utilizados mas em menor escala são o método da micelização inversa [44] e o de “sieving”[74].

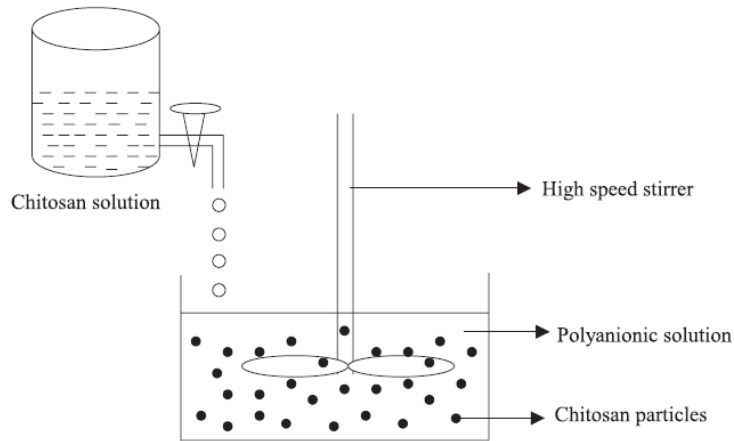


Figura 13: Representação esquemática da produção de partículas de CS através do método de complexação polielectrolítica. Adaptado de [44].

Em suma, existem diferentes técnicas para a produção de partículas de CS, pelo que dependendo do objetivo para o qual a partícula é desenvolvida, existem métodos mais ou menos adequados, sendo por vezes necessário recorrer-se a uma combinação de tecnologias.

1.2.3 – Controlo da libertação utilizando micropartículas de quitosano

Utilizando CS é possível preparar partículas de diferentes características que permitem encapsular tanto compostos hidrofílicos como hidrofóbicos. Os compostos hidrossolúveis, são misturados para formar uma solução homogénea, que posteriormente pode ser utilizada em qualquer um dos métodos referidos anteriormente. Os compostos insolúveis em água e/ou solúveis em soluções básicas, podem ser encapsulados através da imersão das partículas previamente formadas em soluções saturadas do composto a encapsular [44, 70].

O perfil de libertação das moléculas encapsuladas depende de um conjunto de fatores como a extensão da reticulação, a morfologia, o tamanho e densidade das partículas, as propriedades físico-químicas, bem como a presença de adjuvantes [43-44,

75]. A libertação das moléculas a partir da matriz das partículas pode ocorrer de três formas, i) libertação do composto presente na superfície das partículas (Figura 14 A); ii) libertação por difusão a partir da matriz da partícula (Figura 14 B), e iii) libertação por erosão da partícula (Figura 14 C).

Na maioria dos casos, a libertação segue mais do que um dos mecanismos. Geralmente, a libertação da fração de molécula que se encontra à superfície da partícula, dá origem a uma libertação instantânea, ocorrendo no momento em que as partículas entram em contacto com o meio. A libertação por difusão é composta por três etapas, havendo uma fase inicial em que o meio penetra na matriz da partícula, provocando o seu inchamento. A matriz fica cada vez mais maleável e o contacto progressivo com meio renovado leva à difusão da molécula por um simples gradiente de concentração. Este tipo de libertação é lenta na sua fase inicial e mais rápida na fase final. No caso da libertação por erosão, a velocidade de libertação depende do ritmo em que ocorre a erosão/degradação da matriz de CS [44].

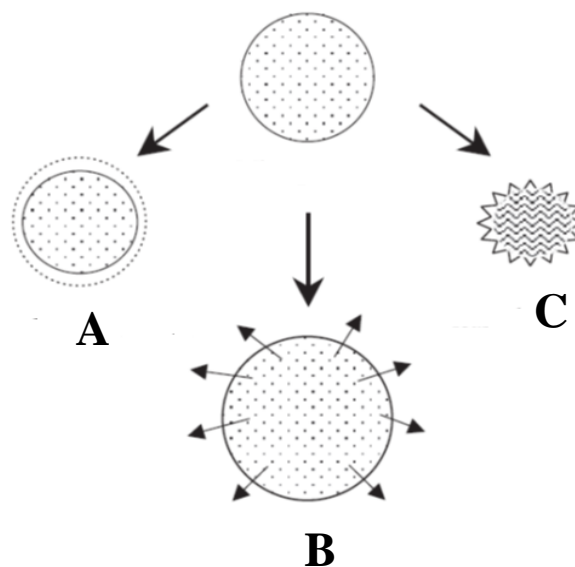


Figura 14: Esquema dos três mecanismos de libertação de compostos encapsulados em partículas de CS. **A)** Libertação do composto presente na superfície das partículas; **B)** Libertação por difusão a partir da matriz da partícula e **C)** Libertação por erosão da partícula. Adaptado de [44].

1.2.4 – Aplicações do quitosano

O CS apresenta uma ampla aplicação em diferentes áreas. Na agricultura é utilizado como protetor de plantas, inibidor do crescimento de fungos fitopatogénicos, revestimento de sementes e fertilizantes, e no tratamento de solos [45, 76]. Está presente nas estações de tratamento de águas como agente quelante de metais, agente floculante, presente nas membranas de filtração, na separação de gás. É utilizado também na produção de embalagens biodegradáveis, no processo de transformação do papel reciclado e na preparação do papel de fotografia, no tratamento de tecidos na indústria têxtil, na produção de sprays para cabelo, loções, cremes hidratantes para as mãos e corpo e champôs [45, 76].

As suas aplicações biomédicas derivam do facto de ter sido reportada atividade biológica como antifúngico, antimicrobiano e agente antitumoral, bem como agente hemostático. É ainda utilizado na produção de lentes de contacto. Na área biotecnológica serve como imobilizador de células e enzimas, estimulador celular e é utilizado como matriz para cromatografia por afinidade ou como membrana [43, 45, 76].

É utilizado na indústria farmacêutica e alimentar como material formador de sistemas transportadores de fármacos/proteínas/genes, com capacidade de libertação controlada. Tem ainda aplicação como constituinte de suplementos alimentares devido à sua capacidade de reduzir os níveis de colesterol e ácidos gordos. É utilizado na conservação de alimentos, na desacidificação de sumos e outras bebidas, na estabilização da cor e como agente emulsificante. É usado como recuperador de resíduos do tratamento dos alimentos e aditivo na alimentação animal [43, 45, 76].

1.3 – Objetivo

Com base nas características específicas dos lipossomas e do CS e nas suas amplas aplicações, este trabalho teve como objetivo inicial desenvolver lipossomas e posteriormente micropartículas de CS, para utilização como veículos em microdietas para alimentação de larvas de peixe. Para tal, foram encapsulados o hidrolisado de proteína de peixe CPSP 90[®] e Pré-Mix PVO-40[®].

2 – Material e métodos

2.1 – Material

Para a realização deste trabalho utilizou-se L- α -fosfatidilcolina de gema de ovo, clorofórmio; metanol e quitosano (Sigma, Alemanha); CPSP 90[®] (Sopropêche, França); Pré-Mix PVO-40[®] (Premixportugal; Portugal); kit de quantificação de proteínas (MicroBCA, Pierce, USA). Foi utilizada água MilliQ (Millipore, Interface, Portugal) para a produção dos sistemas e água do mar quando aplicável.

Informação comercial sobre a composição do CPSP 90[®]: Hidrolisado de proteínas solúveis de peixe obtido por moagem, hidrólise enzimática, filtração, concentração e desidratação de peixe fresco (peixe inteiro ou subprodutos). Principais propriedades: constituído por péptidos até 20 aminoácidos (cerca de 82-87% da sua massa total), solubilidade quase total, elevada digestibilidade do azoto (dN 95%), alto valor nutricional (alta concentração de proteínas), baixo peso molecular, alta palatabilidade do produto, imuno-estimulantes e baixa nível de resíduos minerais [77].

Informação comercial sobre a composição do Pré-Mix PVO-40[®]: Mistura de vitaminas, oligo-elementos e minerais para alimentação de Robalo e Dourada [78].

2.2 – Métodos

2.2.1 – Preparação dos lipossomas

A preparação dos lipossomas foi efetuada utilizando o método de *hidratação do filme lipídico*. Este método é um dos mais utilizados para preparações de lipossomas, embora apresente algumas desvantagens, como o facto de levar à produção de lipossomas com volume interno baixo e uma distribuição do tamanho das vesículas finais muito heterogénea.

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

O método envolve a secagem de uma solução lipídica num evaporador rotativo, e a consequente formação de uma película de lípido na parede do balão utilizado, a qual é posteriormente hidratada. As moléculas a encapsular são adicionadas à solução aquosa ou ao solvente orgânico contendo os lípidos, dependendo da sua afinidade [24-25].

Mais especificamente, a preparação dos lipossomas utilizados neste trabalho envolve a solubilização da fosfatidilcolina numa mistura de clorofórmio:metanol (2:1) de forma a obter uma solução stock de 20 mM. Desta solução retira-se e dilui-se, em 15 mL de clorofórmio:metanol, uma quantidade de lípido que, após a hidratação com 5 mL de solução aquosa, resulte numa concentração de 1 mM de fosfatidilcolina. Após a diluição na mistura de clorofórmio:metanol, procede-se à evaporação num evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-210, Postfach, Suíça), a 337 mbar e 60 °C, até se verificar a existência de um filme lipídico completamente seco (aproximadamente duas horas e meia). Os lipossomas formam-se adicionando sobre o filme lipídico 5 mL de água MilliQ, após o que se agita num vortex e se volta a colocar no evaporador para agitação durante cerca de 30 minutos a 60 °C.

Quando os lipossomas estão formados verifica-se uma alteração no aspeto da formulação, que passa do aspeto translúcido da água para um branco opaco característico das formulações lipossomais.

Para proceder à encapsulação do CPSP nos lipossomas, utiliza-se o mesmo procedimento, fazendo-se a hidratação com 5 mL de solução de CPSP à concentração de 152 µg/mL (razão lípido:proteína de 1:5). A seleção desta concentração teve por base estudos que indicaram uma maior eficiência de encapsulação de proteínas em lipossomas quando se utiliza uma razão lípido:proteína da ordem de 1:4-1:10 [15].

De forma a testar o efeito de repetidos ciclos de congelação e aquecimento no tamanho das vesículas e na eficiência de encapsulação, efetuaram-se 10 ciclos de congelação em azoto líquido (-196 °C) e aquecimento (até descongelar) a 60 °C. Entre cada um destes ciclos retirou-se uma amostra de 500 µL para posterior utilização.

2.2.1.1 – Determinação do tamanho e do potencial de superfície dos lipossomas

O potencial de superfície, também denominado potencial zeta, e o tamanho dos lipossomas são dois dos parâmetros mais importantes da caracterização destas vesículas. O potencial zeta é a carga superficial que uma partícula adquire num determinado meio. A magnitude do potencial zeta medido é uma indicação da força repulsiva que está presente e pode dar indicações sobre a estabilidade do produto em suspensão. Se as partículas apresentarem um valor muito alto para um potencial positivo ou negativo, há uma tendência de repulsão entre si. O pH, a força iónica e a concentração têm influência direta no potencial zeta das partículas e podem ser utilizados para otimizar a sua estabilidade [79].

Para a determinação do tamanho dos lipossomas, retiraram-se 20 uL de cada uma das amostras recolhidas no passo anterior e adicionou-se 1 mL de água MilliQ. Posteriormente, transferiu-se para uma numa cuvette de plástico de 10×10×45 mm e mediu-se o tamanho das partículas por dispersão de correlação fotónica (Zetasizer[®] Nano ZS, Malvern, UK). O mesmo equipamento e diluição foram utilizados para determinar o potencial zeta dos lipossomas, utilizando uma célula capilar específica para o efeito, mediante a técnica de anemometria de laser Doppler (n = 3).

2.2.2.2 – Determinação da eficiência de encapsulação

Para a determinação deste parâmetro produziram-se lipossomas com e sem CPSP. De seguida, retiraram-se aliquotas de 400 µL, que se centrifugaram a 12500×g durante 30 minutos a 4 °C (Sigma 4K15, Alemanha). Retirou-se o sobrenadante, que se diluiu 2× em água MilliQ, e ressuspendeu-se o depósito em 800 µL de água MilliQ. Quantificou-se o CPSP no sobrenadante e no depósito por espectrofotometria a 562 nm (Infinite[®] M200, Tecan, Suíça) após aplicação, segundo o fornecedor, do método colorimétrico MicroBCA (MicroBCA protein kit product, Thermo Scientific, E.U.A). Elaborou-se uma reta de calibração de CPSP com concentrações entre 10 e 120 µg/mL.

O método BCA permite determinar a quantidade total de proteína ou de péptidos em solução até a uma concentração mínima de 0.5 µg/mL. A metodologia é bastante

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

simples e precisa, compatível com reagentes iônicos e não iônicos; apresenta pouca variação e alta sensibilidade na detecção. Apresenta limitações, como variação da absorvência com o tempo, dependência da temperatura de incubação das amostras e variação da absorvência específica para diferentes proteínas.

O método BCA baseia-se na redução do Cobre (Cu^{2+} a Cu^{1+}) pela proteína, num meio alcalino. O Cu^{1+} é posteriormente detetado após a reação com o ácido bicinconínico. Este ensaio é composto por duas etapas, em primeiro lugar, as ligações peptídicas vão reduzir os iões Cu^{2+} a Cu^{1+} (reação depende da temperatura), sendo a quantidade de Cu^{2+} reduzida, proporcional à quantidade de proteína e/ou péptidos presente na solução. Na segunda reação, o ácido bicinconínico reage com o catião Cu^{1+} , formando um complexo de cor roxa que absorve a luz a um comprimento de onda de 562 nm. A estrutura molecular da proteína, o número de ligações peptídicas e a presença de aminoácidos com potencial redutor (cisteína ou cistina, triptofano e tirosina) são responsáveis pela formação de cor com BCA [80] .

2.2.2 – Preparação de micropartículas de quitosano

A técnica de atomização é utilizada para produzir pós, grânulos ou aglomerados a partir de uma solução que contenha um material polimérico. O processo de atomização compõe-se de três etapas, que incluem a formação do spray a partir de uma solução ou suspensão, a secagem e a recolha do pó. Inicialmente, através de uma bomba peristáltica, a solução contendo o polímero é conduzida para o injetor (Figura 15A) [44, 81-82]. No injetor ocorre a mistura da solução com um fluxo de ar, levando à formação de pequenas gotículas. Estas gotículas são pulverizadas, figura 15B, para o interior de uma câmara de secagem, onde existe um fluxo de ar quente, de temperatura regulável mas sempre superior à temperatura de evaporação do solvente utilizado. Devido à grande área de superfície de contacto das gotículas que formam o spray, a remoção do solvente ocorre rapidamente, em cerca de 10-20 segundos. As partículas secas passam depois para um separador ciclónico, onde ocorre a sua separação e posterior sedimentação num recipiente de recolha. Na figura 16 estão representados os principais componentes de um sistema de atomização[44, 81-82].

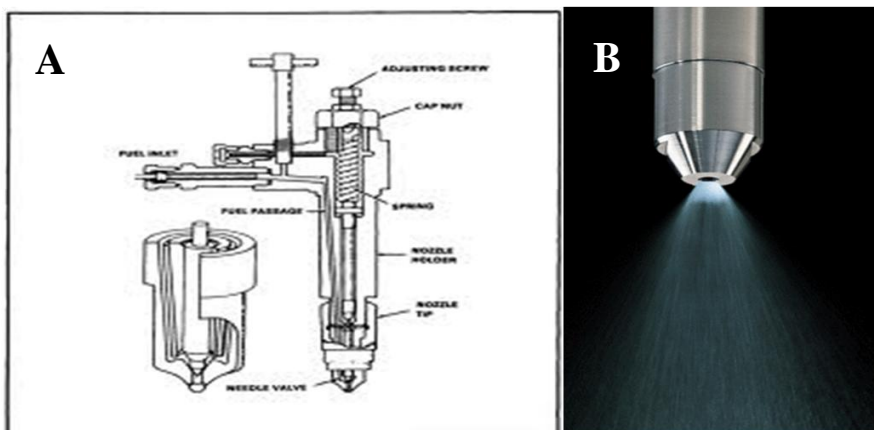


Figura 15: Imagens de: **A)** Esquema do injetor do atomizador; **B)** Spray criado pelo nozzle. Adaptado de [83-84].

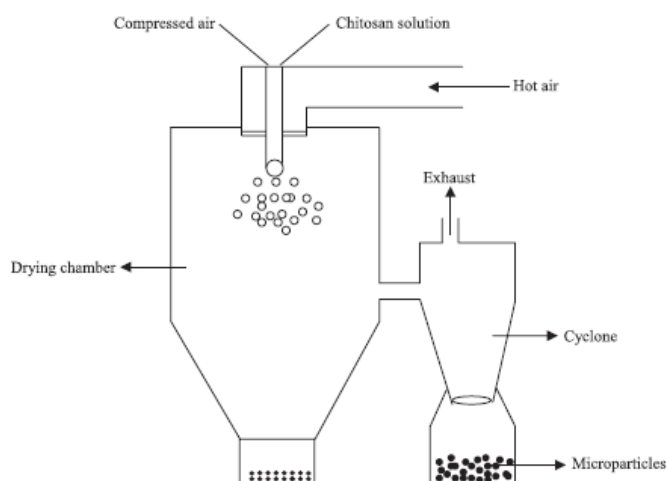


Figura 16: Esquema ilustrativo de um sistema de atomização. Adaptado de [44].

O tamanho das partículas produzidas por esta técnica depende de vários parâmetros, como a velocidade do fluxo da amostra e do ar, o tipo de extremidade do *nozzle*, a temperatura e o fluxo de ar quente da câmara de secagem. Na Tabela 1 está representada a influência do aumento dos parâmetros anteriores nas características do produto final.

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

Tabela 1: Efeito do aumento dos parâmetros associado à utilização do atomizador, nas características finais do produto. Adaptado de [81-82].

Características do produto	Fluxo ar no injetor	Fluxo solução atomizador	Temperatura de entrada	Fluxo ar na câmara de secagem
Tamanho	↓	↑	↑	↓
Humidade residual	↓	↑	↓	↑
Rendimento	↑	↓	↑	↓

Para a formação das partículas de CS com CPSP e PM, prepararam-se, em triplicado, três soluções de CS a 1, 1.5 e 2% (m/v), em ácido acético 1%. Deixou-se em agitação durante a noite, para uma completa homogeneização. Após completa dissolução do quitosano, pesou-se e adicionou-se CPSP e PM de forma a obter as distintas formulações indicadas na Tabela 2.

Tabela 2: Percentagens de CS, CPSP e PM utilizadas para preparar as soluções para atomização.

CS (%)	CPSP (%)	PM (%)
1	--	--
1	6	0,5
1	12	1
1.5	--	--
1.5	6	0,5
1.5	12	1
2	--	--
2	6	0,5
2	12	1

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

Preparações finais com um total de 200 mL foram atomizadas (Lab-Plant Spray Drier SD-04, North Yorkshire, Inglaterra) utilizando as seguintes condições: temperatura de entrada de 160 ± 1 °C, temperatura de saída 120 ± 4 °C, fluxo da solução 5 ± 0.5 mL/min e fluxo de ar de 5/9 (foi impossível determinar a pressão ou fluxo do ar, visto que o indicador para o fluxo de ar é manual e apenas se sabe que a abertura máxima corresponde a nove voltas do manípulo). Após a atomização, recolheu-se o pó, que foi conservado num exsicador com sílica até posterior utilização. Foi determinado o rendimento de produção das micropartículas, de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa partículas}}{\text{Massa total de sólidos na solução}} \times 100$$

2.2.2.1 – Determinação do tamanho, análise da morfologia e microanálise das micropartículas de quitosano

O tamanho das micropartículas produzidas foi determinado por microscopia ótica (Olympus IX51, Hamburgo, Alemanha). Para tal, tiraram-se fotografias (ampliação de 20x) das micropartículas, as quais foram posteriormente processadas utilizando um programa de processamento de imagem (AxioVision Release 4.8[®], Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), tendo-se determinado o tamanho de 100 partículas para cada uma das formulações.

A análise morfológica foi levada a cabo utilizando a técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM, Zeiss Evo[®] LS15, Cambridge, Inglaterra). Esta é a técnica mais utilizada na análise de sistemas microparticulados, pois apresenta vantagens como a versatilidade dos vários tipos de imagem, a excelente resolução espacial, não requerer uma preparação de amostra muito complicada, interpretação simples das imagens obtidas e permitir aplicações que ascendem a $1.000.000 \times$, equivalente a cerca de 0.5 nm [85]. Utilizando o mesmo equipamento e usando o programa INCA[®], fez-se uma microanálise por espectroscopia de dispersão de energia de raios X (EDX) das micropartículas. A EDX é uma técnica de microanálise que utiliza o espectro de emissão do raio-X após excitação com eletrões de alta energia, para obter informação básica sobre os elementos que compõem a superfície do material. Esta

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

técnica permite identificar e quantificar os elementos químicos presentes nas diferentes amostras desde que apresentem um número atômico superior a 11. Importante referir que se trata de um método qualitativo (embora em alguns casos possa ser semiquantitativo) [86].

2.2.2.2 – Determinação do índice de compressibilidade e da densidade aparente das micropartículas de quitosano

A par do diâmetro e da morfologia, a densidade aparente de um pó é um dos parâmetros utilizados na sua caracterização, relacionando-se com as propriedades reológicas dos pós. Este parâmetro de densidade depende do empacotamento das partículas e altera-se com a compactação do pó, pelo que surgem dois conceitos intimamente relacionados: a densidade aparente e a densidade aparente de compactação, em que o primeiro consiste na determinação simples da razão entre a massa de partículas e o volume ocupado por essa mesma massa após derramamento num recipiente volumétrico. Para a determinação da densidade aparente de compactação é utilizado um mecanismo de compactação mecânico, denominado de volúmetro de Jolting (Figura 17), que acompanha as alterações do empacotamento do pó, à medida que os espaços vazios diminuem e o leito do pó é compactado [87].



Figura 17: Equipamento de compactação mecânica (volúmetro de Jolting). Adaptado de [88].

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

Este equipamento tem uma roda que gira de forma constante após acionamento, mas que num dos lados tem um sulco. Este, ao passar por baixo da proveta promove uma pequena queda da mesma, induzindo uma alteração na posição das partículas de pó, provocando o seu empacotamento/compactação. Deste modo, o volume ocupado inicialmente (V_0) pelas partículas (utilizado para calcular a densidade aparente), dá lugar a um volume final pós-compactação (V_f), que permite calcular a densidade aparente de compactação, a qual reflete um estado de maior equilíbrio para as partículas em questão, ou seja, um empacotamento invariável. Com base na determinação destes parâmetros de volume é possível determinar o índice de compressibilidade (IC) de um pó através da seguinte fórmula:

$$IC = \frac{V_0 - V_f}{V_f} \times 100$$

sendo V_0 o volume inicial e V_f o volume final.

Como referido anteriormente, os parâmetros relacionados com compressibilidade e densidade dizem respeito à caracterização das propriedades reológicas das partículas, que aludem especificamente às suas propriedades de fluxo. Neste contexto, valores de IC ente 5-15 indicam um pó com uma fluxibilidade excelente, enquanto valores superiores a 40 indicam fracas propriedades de fluxo [87].

Utilizando os mesmos dados de variação de volume fornecidos pela utilização do volúmetro de Jolting, pode determinar-se a densidade aparente de compactação (D_{ac}), dada pela seguinte fórmula:

$$D_{ac} = \frac{\text{Massa partículas}}{\text{Volume final}}$$

Para determinação destes parâmetros nas micropartículas de quitosano produzidas, colocou-se na proveta do equipamento uma massa pré-determinada de cada uma das formulações de micropartículas (CS/CPSP:PM = 1:6:0.5; 1:12:1; 2:6:0.5 e 2:12:1) e procedeu-se à compactação das partículas até o volume permanecer inalterado.

2.2.2.3 – Determinação da eficiência de encapsulação

As eficiências de encapsulação de micropartículas obtidas por atomização são geralmente elevadas, na ordem dos 90-100% [44]. Todavia, procedeu-se à determinação da eficiência de encapsulação para verificar similaridade com os dados bibliográficos.

Deste modo, pesou-se em triplicado, para cada formulação obtida por atomização, cerca de 5 mg de partículas. De seguida adicionou-se 1 mL de água MilliQ e homogeneizou-se num ultraturrax com uma aste S8N-5G (Ultra Turrax T8, IKA, Staufen, Alemanha) na posição 5 durante 4 ciclos de 20 segundos. Posteriormente, diluiu-se a amostra 10× em água MilliQ e procedeu-se à quantificação de CPSP e PM encapsulado através do método de quantificação proteica MicroBCA (kit MicroBCA, Pierce, Estados Unidos da América).

Preparou-se uma solução stock de CPSP:PM (1 mg/mL CPSP:80 µg/mL PM ⇔ 12:1 ⇔ 6:0.5). Fez-se uma reta de calibração com concentrações entre 10 e 120 µg/mL. Com o objetivo de determinar a influência do PM e do CPSP na absorvência prepararam-se quatro soluções (40 e 80 µg/mL CPSP; 3,2 e 6,4 µg/mL de PM) e determinou-se a sua absorvência. Através das absorvências obtidas para as concentrações de 40 e 80 µg/mL da reta de calibração, pode-se determinar a contribuição de cada um dos compostos.

2.2.2.4 – Avaliação do perfil de libertação

Em tubos RIA (Radio Immuno Assay) de 5 mL, pesou-se cerca de 15 mg dos 6 tipos de microcápsulas produzidas por atomização. Adicionou-se 5 mL de água do mar e colocou-se os tubos num agitador orbital (Orbital Shaker OS-10, Biosan, Riga, Letónia) a 200 rpm. Esta velocidade de agitação foi determinada previamente de forma a simular a agitação da coluna de água de um tanque de 100 L, utilizado nas maternidades de peixes. Retirou-se 500 µL de amostra após 1, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 440 minutos e filtrou-se com filtros de seringa de 0.22 µm (Millex®-GV, Millipore Iberica, Espanha). De forma a não saturar a água salgada do tubo, sempre que se retirou amostra, adicionou-se mais 500 µL de água salgada.

2.2.2.4.1 – Quantificação do CPSP e PM libertado

Para a quantificação do CPSP e PM libertado, diluíram-se 10× em água MilliQ todas as amostras recolhidas no passo anterior. A diluição de 10× foi determinada em experiências prévias (dados não mostrados), pois os iões com capacidade redutora presentes na água do mar interferem com o método de quantificação MicroBCA[®]. Deste modo, utilizou-se a menor diluição possível para a qual não houve interferência no método, daí a necessidade de se ter pesado 15 mg de partículas. A quantificação do CPSP e do PM foi efetuada através do método MicroBCA[®] e para a formação da reta de calibração, procedeu-se como descrito para a determinação da eficiência de encapsulação (2.2.3).

2.2.3 – Tratamento estatístico dos dados

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa SigmaStat versão 3.5[®] (Systat Software, E.U.A) para um nível de significância de 0.05 ($P \leq 0.05$).

Utilizou-se o teste t-student para verificar a existência de diferenças no tamanho dos MLV vazios e com CPSP.

Teste ANOVA uma variável seguido de teste multicomparação Student-Newman-Keuls (SNK) para o tratamento dos resultados o tamanho e eficiência de encapsulação dos lipossomas. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para verificar a correlação entre o número de ciclos de congelação, a eficiência de encapsulação e o tamanho dos lipossomas.

Teste ANOVA duas variáveis seguido do teste de multicomparação SNK foi utilizado para o tratamento dos dados do tamanho das micropartículas de CS, para índice de compressibilidade e densidade aparente de compactação.

Teste ANOVA três variáveis seguido do teste de multicomparação SNK para o tratamento os resultados dos ensaios de libertação.

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

Os testes de normalidade e de variância foram efetuados para verificar a possibilidade de utilização dos testes de ANOVA.

Os resultados de eficiência de encapsulação e dos ensaios de libertação, expressos em percentagens, sofreram uma transformação arcsen [89].

3 – Resultados e Discussão

3.1 – Lipossomas

3.1.1 – Caracterização dos lipossomas

Para a realização deste trabalho foram produzidos lipossomas, mais especificamente MLV. Uma das características associada a este tipo de estruturas é o alto índice de polidispersão (IPD) [15]. Neste caso, os MLV vazios que foram produzidos apresentaram 152 ± 2 nm de tamanho e um IPD de $0,19 \pm 0,03$ ($n = 5$), mantendo-se estes parâmetros praticamente inalterados após a encapsulação de CPSP (tamanho de 147 ± 19 nm e um IPD de $0,29 \pm 0,16$ ($n = 3$)). Estes resultados estão de acordo com o descrito na bibliografia para MLV de PC obtidos pelo método de *hidratação do filme lipídico* [90-93]. Foram aplicados a estes lipossomas ciclos subsequentes de congelamento/aquecimento, cujo efeito se observa na Figura 17, com o objetivo de observar um aumento do tamanho dos MLV e da eficiência de encapsulação. Verificou-se um aumento significativo do tamanho ($p < 0.05$) dos MLV vazios para aproximadamente 600 nm, o que representa cerca de $4\times$ o tamanho inicial. Também é possível observar na Figura 18 que este tamanho é obtido após a realização de seis a sete ciclos, mantendo-se o tamanho praticamente inalterado com o aumento do número de ciclos. Outros autores observaram um efeito semelhante, reportando-se na bibliografia resultados que indicam uma média de cinco a seis ciclos para promover o aumento do tamanho do MLV, associado a um aumento na eficiência de encapsulação [94-95]. É de realçar, no entanto, que muitos dos estudos descritos na bibliografia foram efetuados com misturas de PC com outros fosfolípidos ou com colesterol, pelo que existe pouca informação atualizada sobre estudos apenas com PC [15].

No caso dos MLV com CPSP verificou-se que após seis ciclos de congelamento/aquecimento aumentaram significativamente de tamanho ($p < 0.05$) para 552 ± 23 nm (Figura 17), cerca de $3.7\times$ superior ao tamanho inicial. Pela análise da Figura 17 e pelo tratamento estatístico dos dados, não se verifica diferenças significativas no tamanho dos MLV vazios em relação aos MLV com CPSP ao longo dos ciclos e existe uma correlação entre o aumento do número de ciclos e o tamanho dos MLV ($r = 0.962$

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

para lipossomas vazios e $r = 0.941$ para lipossomas com CPSP, $p < 0.05$). No que diz respeito ao IP verificou-se um aumento para os 0.48 ± 0.20 nos lipossomas vazios e para os 0.46 ± 0.07 nos lipossomas com CPSP.

O potencial zeta determinado para MLV vazios foi de -37.7 ± 5.3 mV enquanto para MLV com CPSP é de -36.4 ± 3.0 mV. Apesar da PC ser um fosfolípido zwitteriónico (com cargas, mas globalmente neutro) obteve-se um potencial negativo. Teoricamente o potencial de membrana interno, constituído pelo carbono do grupo carboxilo e pelas cadeias alquílicas é de $+240$ mV, pelo que a explicação para este resultado provém das interações dos grupos carbonilo com as moléculas da água de hidratação [17, 96].

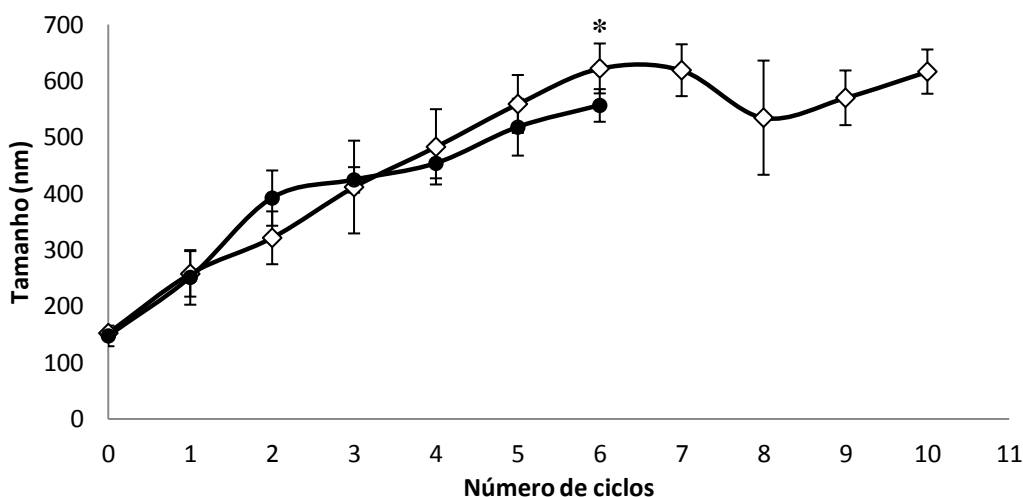


Figura 18: Efeito da aplicação de dez ciclos de congelamento/aquecimento (-196 °C/ 60 °C) sobre o tamanho de MLV preparados pelo método de hidratação do filme lipídico com (●) e sem (◇) CPSP ($n \geq 3$; média \pm DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas no tamanho dos lipossomas relativamente ao tamanho inicial ($p < 0.05$).

A orientação do vetor criado pelo dipolo P (grupo fosfato) \rightarrow N (grupo amina) (Figura 19 A) pode ser alterada. Em água ultrapura, a orientação do vetor é paralela à das moléculas de água de hidratação (Figura 19 B), mas em solução com catiões, como cálcio, sódio, potássio, entre outros, os catiões podem adsorver ao grupo amina e induzir uma alteração da orientação do vetor. Neste caso, o vetor é perpendicular à fase aquosa (Figura 19 C) [96].

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

O facto de em água a orientação do dipolo ser paralela indica que o grupo amina está deslocado e que facilita a interação das zonas mais interiores com a água de hidratação. Desta forma, o potencial negativo associado ao átomo de oxigénio do grupo carbonilo é estabilizado pelo potencial positivo do hidrogénio da molécula de água. Assim, o potencial medido não é referente à carga da superfície da membrana, mas sim ao oxigénio da água (Figura 19 D) [96].

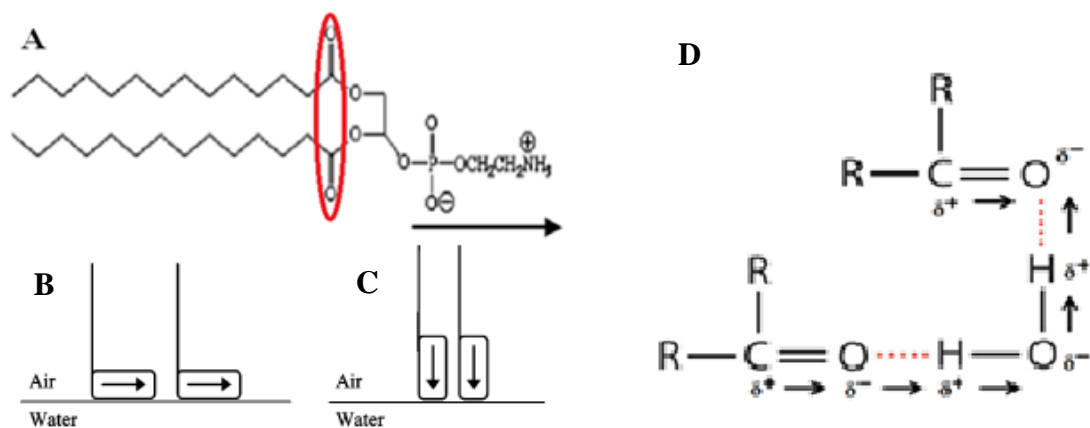


Figura 19: A) Molécula de fosfatidilcolina (as setas indicam a orientação do vetor P→N presente na cabeça do fosfolípido), evidenciado a vermelho os grupos carbonilo. Direção do vetor criado B) Em água; C) Em solução aquosa com cátions. Adaptado de [96]. D) Representação esquemática das interações entre os grupos carbonilo e a molécula de água.

Experiências efetuadas por Hwang et al. com MLV de PC:colesterol (4:1) em água ultrapura, resultaram em valores de potencia zeta de -7,1 mV, [93]. Outro estudo com MLV de PC demonstrou a alteração do potencial de negativo para positivo na presença de iões de cálcio e lantano [96-97]. A ligação ou interação de substâncias com a interface altera a estrutura da membrana, a área da superfície e as interações intermoleculares [98]. Desta forma pode-se dizer que o potencial de superfície, em lipossomas, está diretamente relacionado com a composição da partícula e com o meio envolvente.

3.1.2 – Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação é um dos parâmetros mais importantes no que diz respeito à utilização de lipossomas como transportadores de biomoléculas [15]. Os resultados obtidos neste estudo estão representados na Figura 20 e, como se pode observar, obtiveram-se inicialmente eficiências de encapsulação na ordem dos 77%, que aumentaram significativamente ($p < 0.05$) para valores próximos dos 90% após a aplicação dos ciclos de congelação/aquecimento. Na mesma figura também é possível constatar que o aumento da eficiência de encapsulação é acompanhado pelo aumento do tamanho dos MLV.

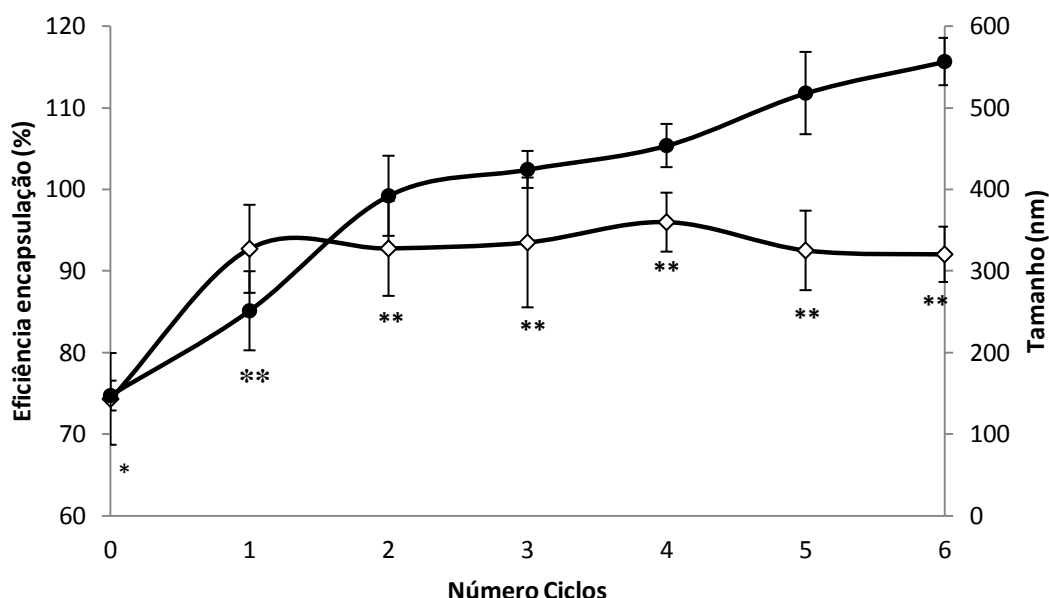


Figura 20: Variação da eficiência de encapsulação (◇) e do tamanho dos MLV com CPSP (●) após ciclos de congelação/aquecimento (-196 °C/60 °C) (n = 3: média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na eficiência de encapsulação ($p < 0.05$).

Pela análise estatística dos resultados é possível identificar uma correlação direta do aumento da eficiência de encapsulação, com o aumento do tamanho dos MLV ($r = 0.596$, $p < 0.05$) e com o número de ciclos de congelação/aquecimento ($r = 0.434$,

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

$p < 0.05$). Resultados semelhantes a estes foram obtidos por outros autores e sugerem a utilização destes ciclos de congelação/aquecimento para aumentar o tamanho e a eficiência de encapsulação dos MLV. Estes mesmos estudos indicam que, utilizando esta abordagem, é possível aumentar a eficiência de encapsulação em cerca de 20% e que existe uma relação entre o tamanho dos lipossomas e a eficiência de encapsulação e o número de ciclos de congelação/aquecimento [15, 94-95, 99].

A elevada eficiência de encapsulação observada estará diretamente relacionada não só com os ciclos de congelação/arrefecimento, mas também com a quantidade de MLV formados aquando da hidratação, com a força iónica e sobretudo com o rácio lípido:proteína, como demonstrado noutros estudos [15, 99-100].

Apesar de alguns estudos anteriores indicarem que os lipossomas poderão ser pequenos para permitir diretamente a alimentação de larvas de peixe, este veículo tem sido estudado para verificar a sua aplicação como transportador de moléculas hidrossolúveis de baixa massa molecular [6].

Os valores de eficiência de encapsulação elevados, por si só, não justificam que a produção de MLV com CPSP pelo método *hidratação do filme lipídico* seja a melhor escolha para produzir MLV a larga escala de forma a permitir uma utilização posterior como dietas para larvas. Isto deve-se ao facto de, à escala laboratorial, apenas ser possível obter cerca de 10-50 mg de MLV por dia devido ao tempo de processamento para formação do filme lipídico, entre outras limitações, que incluem a necessidade de vácuo e temperaturas relativamente elevadas, o que aumenta o custo de produção.

Por outro lado, há ainda a acrescentar que a razão lípido:péptido é muito elevada, podendo provocar desequilíbrios nutricionais que resultariam na morte da larva [6, 101]. Contudo, os lipossomas têm sido utilizados para enriquecer *Artemia* com nutrientes como glicínia [102], ácido docosa-hexaenóico (DHA) [103] e metionina (aminoácido essencial) [104] e com agentes terapêuticos como a oxitetracilina [105]. Outros estudos indicam que MLV em água salgada formam agregados com cerca de 20-30 μm que são capturados pelas larvas de dourada com cinco dias. Os mesmos autores dizem que estas larvas ingerem grandes quantidades de lipossomas ricos em extratos de bacalhau (proteínas e aminoácidos), indicando a presença de algum estimulante da ingestão no extrato [6, 106]. É neste sentido que a encapsulação do CPSP em lipossomas pode ser aplicada, não como a dieta propriamente dita, mas como parte de

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

uma dieta, isto é, os lipossomas podem produzir-se como transportadores de CPSP, sendo posteriormente incorporados numa outra matriz que contém os restantes componentes da dieta. Desta forma, não só se impede a perda do CPSP por lixiviação devido à elevada capacidade de retenção associada às estruturas lipídicas [6-9, 107-110] como também uma eventual degradação da matriz não leva a perda por lixiviação da componente hidrofílica da dieta.

3.2 – Micropartículas de quitosano

3.2.1 – Caracterização das micropartículas de quitosano

No decurso deste trabalho prepararam-se nove formulações de micropartículas de quitosano, tendo-se obtido um rendimento na ordem dos 28%. As partículas de quitosano apresentam tamanhos diferentes para as formulações estudadas variando entre 2.74 μm para a formulação 1:6:0.5 (CS:) e 8.65 μm para a formulação 2:0:0 (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização do diâmetro médio das micropartículas de quitosano em função da variação das quantidades de polímero ($n \geq 100$; média \pm DP). Diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0.05$) no tamanho das micropartículas.

CS (%)	CPSP:PM (%)	Diâmetro médio (μm)
1	0:0	4.46 \pm 0.09 ^a
1	6:0.5	2.74 \pm 0.10 ^b
1	12:1	3.18 \pm 0.09 ^c
1.5	0:0	5.54 \pm 0.10 ^d
1.5	6:0.5	3.90 \pm 0.10 ^e
1.5	12:1	3.97 \pm 0.10 ^{e,g}
2	0:0	8.65 \pm 0,09 ^f
2	6:0.5	4.03 \pm 0,10 ^g
2	12:1	4.39 \pm 0.09 ^h

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

A análise dos resultados permite constatar que as partículas vazias, 1:0:0, 1.5:0:0, 2:0:0, apresentam tamanhos sempre superiores às partículas com CPSP:PM ($p < 0.05$). Trabalhos anteriores de outros autores indicam que a presença de uma agente reticulante na formulação de partículas de CS obtidas por atomização conduz a uma redução de tamanho [111-112]. O mesmo efeito é observado após encapsulação de proteínas em sistemas particulados de CS no intervalo nanométrico [113]. Neste caso, a mistura conduz à obtenção de um efeito similar à reticulação, porque estão presentes componentes com carga oposta à do CS que levam à formação de interações eletrostáticas que permitem obter partículas mais pequenas.

Também se verifica que o aumento da percentagem do CS induz um aumento no tamanho das partículas, quando a relação se mantém ($p < 0.05$). Resultado semelhante foi obtido por *Chidavaenzi* e colaboradores, mas neste caso com partículas de lactose vazias [114]. É também observável que as partículas com a razão 6:0.5 são menores que as de razão 12:1 ($p < 0.05$), à exceção da formulação com 1.5% de CS onde esta diferença não é significativa. Observa-se assim que existe um efeito da quantidade de CS e das diferentes razões de no tamanho das partículas, havendo uma tendência generalizada de aumento de tamanho nas condições descritas, a qual é facilmente explicada pelo aumento da quantidade de materiais presentes na formulação em cada caso.

Em termos de morfologia é possível verificar, pela análise das imagens obtidas por SEM, que as partículas de formulações sem CPSP e PM (Figura 21A) apresentam uma morfologia mais homogénea e mais esféricas e com uma superfície lisa (resultados não apresentado). Pelo contrário, as partículas com CPSP e PM (Figura 21B), apresentam uma estrutura mais heterogénea, menos esférica e com maior irregularidade da superfície. Na bibliografia estão reportados diferentes estudos que indicam que as micropartículas produzidas por atomização apresentam diferentes morfologias dependendo de vários fatores, como o tipo e quantidade de compostos encapsulados, fluxo de ar na câmara de secagem e fluxo de solução no atomizador. O diâmetro das partículas e a sua morfologia têm sido reportados como bastante dependentes dos materiais a encapsular, não existindo no entanto uma relação linear entre estes parâmetros [81-82, 115-120].

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

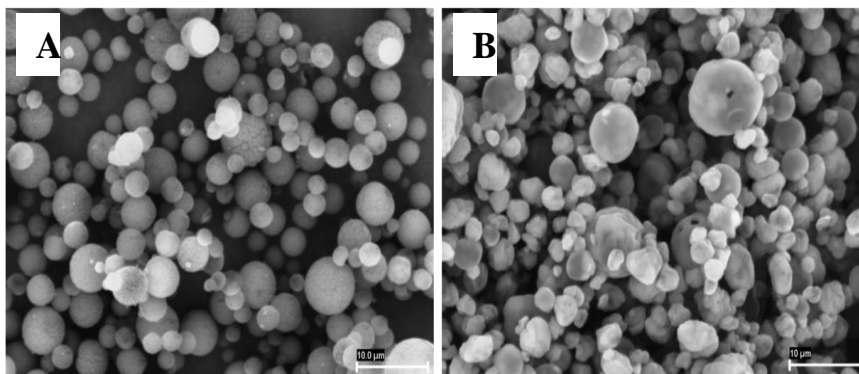


Figura 21: Microfotografias obtidas por microscopia eletrônica de varrimento (SEM, ampliação 5000x) das partículas de quitosano: **A)** Formulação CS:CPSP:PM = 2:0:0; **B)** Formulação CS:CPSP:PM = 2:12:1.

A caracterização das propriedades de fluxo dos materiais pulverulentos também se reveste de importância, pois delas depende o sucesso de algumas operações como a mistura com outros componentes e a própria manipulação dos pós. O índice de compressibilidade (IC) e a densidade aparente de compactação (D_{ac}) são dois parâmetros indicativos da fluxibilidade das micropartículas [87]. Uma vez que os tamanhos das micropartículas das várias formulações com material encapsulado não diferem substancialmente entre si, embora haja diferenças estatisticamente significativas, selecionaram-se para o ensaio de fluxibilidade as formulações com material encapsulado que têm a maior e a menor quantidade de quitosano (1% e 2%) e as que apresentam maior e menor percentagem de libertação de CPSP:PM (secção 3.2.3). Os resultados obtidos para as formulações selecionadas estão representados na Tabela 4. Os valores de IC variam entre os 30% e os 42% para as formulações 1:6:0.5 e 1:12:1, respectivamente, o que indica que as micropartículas apresentam propriedades de fluxo deficientes enquanto material pulverulento, o que poderá ser modificado por mistura com outros componentes típicos das dietas para peixe.

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

Tabela 4: Índice de compressibilidade (IC) e densidade aparente de compactação (Dac) das formulações de micropartículas de quitosano (n = 3, média ± DP). Diferentes letras representam diferenças significativas (p<0.05) no valor de IC ou Dac.

CS (%)	CPSP:PM (%)	Índice de compressibilidade (%)	Densidade aparente de compactação (g/cm ³)
1	6:0.5	30.4 ± 0.5 ^a	0.37 ± 0.01 ^a
1	12:1	41.9 ± 3.4 ^b	0.42 ± 0.00 ^b
2	6:0.5	34.8 ± 1.2 ^c	0.34 ± 0.00 ^c
2	12:1	38.2 ± 4.4 ^b	0.36 ± 0.01 ^d

Verifica-se ainda que o IC apresenta diferenças significativas (p<0.05) quando se varia a quantidade de CPSP:PM, não se observando o mesmo efeito com a alteração da quantidade de CS.

No que diz respeito à D_{ac} os valores variam entre os 0.34 e os 0.42 g/cm³, verificando-se alterações significativas (p<0.05) com a variação da percentagem de CS e da razão CPSP:PM. Os valores de densidade são considerados relativamente baixos em todos os casos, o que pode sugerir um comportamento favorável em termos de permanência das micropartículas na coluna de água. No entanto, à falta de resultados bibliográficos que possibilitem uma comparação, torna-se evidente a necessidade de um ensaio real para demonstrar esta hipótese.

Desta forma, o que se conclui destes dados é que os valores de IC e D_{ac} têm tendência a aumentar com a utilização de elevadas percentagens de CPSP:PM.

No geral, a caracterização das micropartículas indica-nos que as suas propriedades poderão ser adequadas para a produção de um alimento particulado complexo, composto por uma partícula interna, que seria a desenvolvida neste trabalho, a qual seria posteriormente encapsulada numa segunda micropartícula, externa e logicamente de maior dimensão, que encapsularia os restantes nutrientes, de afinidade lipofílica.

3.2.2 – Determinação da eficiência de encapsulação

O CPSP e o PM foram as moléculas encapsuladas nas microsferas de quitosano, por serem os constituintes que apresentam maior taxa de perda por lixiviação e por serem essenciais da alimentação de larvas de peixe. A utilização da técnica de microscopia eletrónica de varrimento permitiu realizar concomitantemente uma microanálise das várias amostras por espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (EDX). A Figura 21 representa a comparação entre uma formulação controlo (2:0:0) e a uma formulação com material encapsulado (2:12:1), considerando-se representativa de todas as outras observações, uma vez que os resultados obtidos foram similares na comparação formulação/respetivo controlo. Assim, em todas as amostras foram observados picos que indicaram a presença ou o aumento da quantidade de alguns compostos nas partículas carregadas relativamente às partículas vazias.

Como se observa pela análise da Figura 22, na amostra 2:0:0 apenas estão presentes elementos que fazem parte da constituição do CS, como o carbono (C), azoto (N), oxigénio (O). Elementos como sódio (Na), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl) aparecem apenas na formulação 2:12:1, acompanhados de um aumento no C, N e O, o que indica uma alteração na constituição da superfície das micropartículas. Os elementos que aparecem de novo estão associados a aminoácidos, vitaminas e sais minerais indicando a presença destas moléculas na constituição da partícula [121]. No entanto, a sua deteção por esta técnica, que faz uma análise da superfície, sugere que não ocorre uma verdadeira encapsulação do CPSP:PM no interior das micropartículas, o que levaria à deteção superficial de elementos apenas característicos do CS. Esta observação não é surpreendente, dada a maior quantidade de CPSP:PM presente nas formulações, em comparação com o CS. Como já foi referido, esta técnica é apenas qualitativa, não sendo possível retirar mais informações acerca das proporções de cada um dos compostos.

No que diz respeito às eficiências de encapsulação, representadas na Tabela 5, verifica-se que variam entre os 93 e os 97%. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, que reportam eficiências de encapsulação para micropartículas de CS obtidas por atomização na ordem dos 90-100% [111-112, 122-123]. Não foi observada

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

estatisticamente qualquer relação entre a eficiência de encapsulação e a quantidade de CS e CPSP:PM ($p < 0.05$).

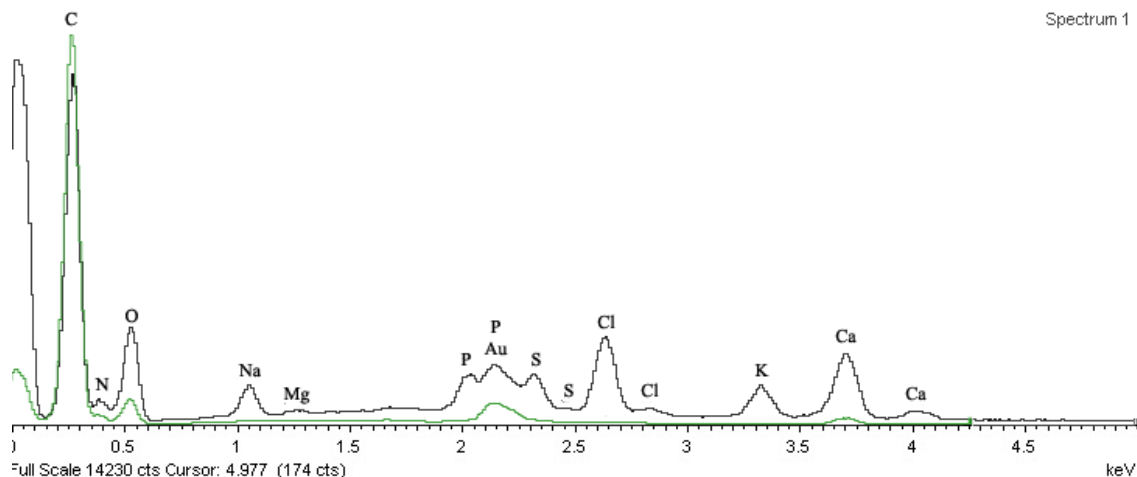


Figura 22: espectros das micropartículas obtidos por microanálise por espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (EDX). Verde – formulação 2:0:0 (controlo); Preto – formulação 2:12:1. Nota: Au (ouro) atribuído à cobertura das amostras, realizada para visualização por SEM, estando presente em todas as amostras.

Tabela 5: Eficiência de encapsulação obtida para as diferentes formulações de micropartículas ($n = 3$, média \pm DP).

CS (%)	CPSP:PM (%)	Eficiência encapsulação (%)
1	6:0.5	95.2 \pm 5.3
1	12:1	97.0 \pm 2.4
1.5	6:0.5	94.3 \pm 4.4
1.5	12:1	96.4 \pm 3.3
2	6:0.5	93.6 \pm 4.5
2	12:1	92.6 \pm 1.7

3.2.3 – Quantificação de CPSP e PM libertados

Pela análise da Figura 23 verifica-se que nos primeiros 30 minutos e para ambas as razões de CPSP:PM cerca de 45-50% da quantidade de CPSP:PM é libertado, não se verificando diferenças significativas no perfil de libertação de ambas as formulações. As micropartículas 1:6:0.5 atingem o máximo da libertação aos 30 minutos (50%), enquanto nas micropartículas 1:12:1 ocorre um aumento na libertação para cerca de 65% que se atinge aos 60 minutos. Esta diferença de 15% é significativa ($p < 0.05$) a partir dos 120 minutos.

Para as micropartículas de CS 1.5% verifica-se uma libertação na ordem dos 55% após uma hora para ambas as razões de CPSP:PM (Figura 24). Esta percentagem de libertação mantém-se ao longo do tempo para as duas formulações, não se verificando diferenças significativas entre elas. Apenas se verificam diferenças na libertação até aos 15 minutos, tempo ao qual as partículas com maior quantidade de encapsulado libertam cerca de 55%, enquanto as de menor quantidade de encapsulado libertam aproximadamente 42% ($p < 0.05$).

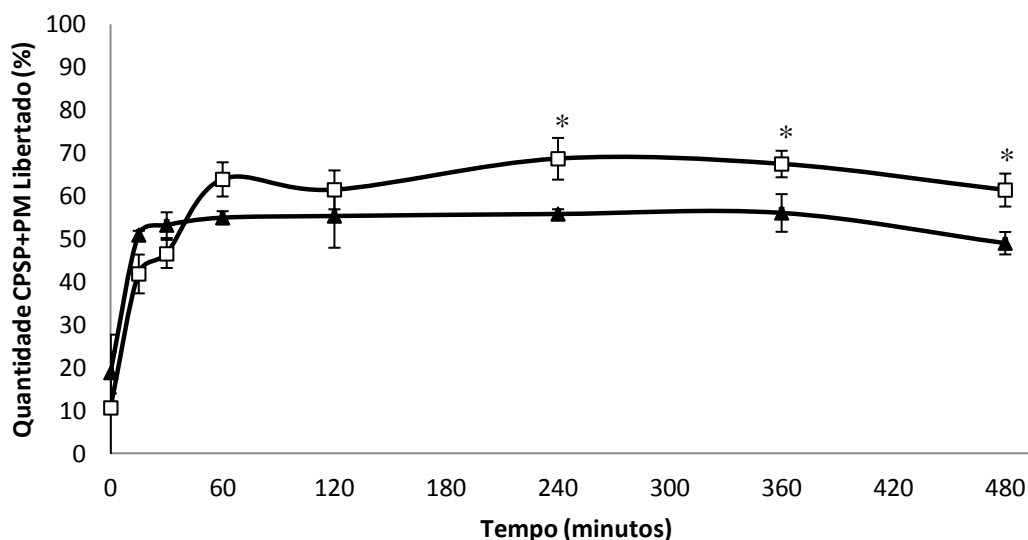


Figura 23: Perfil de libertação das micropartículas (▲) CS: 1:6:0.5 e (□) CS: 1:12:1, obtido em água do mar ($n = 3$, média \pm DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na quantidade de CPSP:PM libertado entre as diferentes formulações ($p < 0.05$).

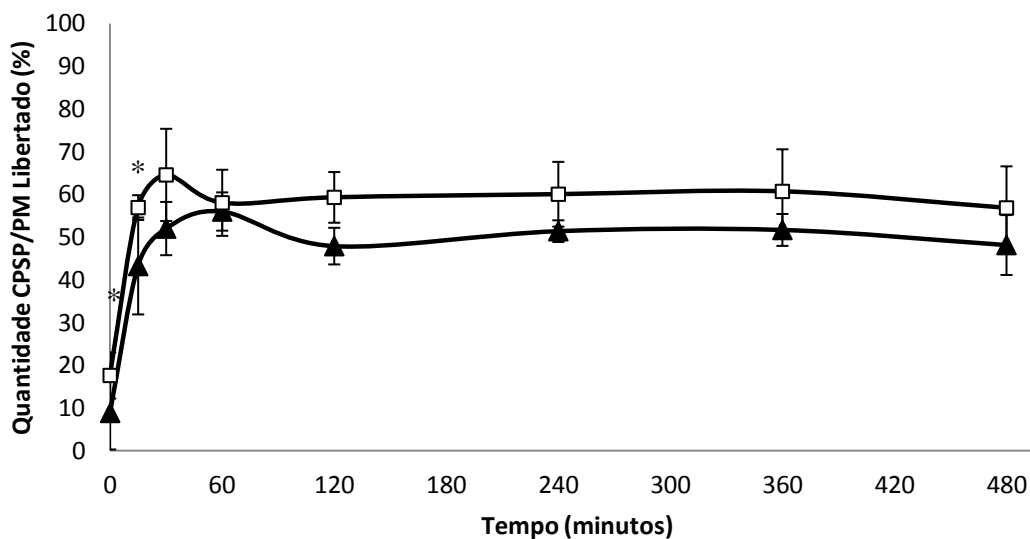


Figura 24: Perfil de libertação das micropartículas (▲) CS: 1.5:6:0.5 e (□) CS: 1.5:12:1, obtido em água do mar (n = 3, média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na quantidade de CPSP:PM libertado entre as diferentes formulações (p<0.05).

No que diz respeito às partículas de CS 2% o perfil de libertação, representado na Figura 25, é semelhante para as duas razões de CPSP:PM, não se verificando diferenças significativas entre os perfis. A libertação máxima obtida está na ordem dos 40-45% e ocorre aproximadamente após 30-60 minutos.

Desta forma, apesar da libertação ser tendencialmente superior quando existe mais material encapsulado (razão 12:1), verifica-se que apenas para as partículas de CS 1% existem diferenças significativas na quantidade final de CPSP:PM libertado. Assim, não se pode estabelecer uma relação entre o perfil de libertação e a quantidade de material encapsulado. Uma observação importante reside no facto de a libertação máxima ocorrer no intervalo 30-60 minutos, alcançando valores na ordem dos 45-60%.

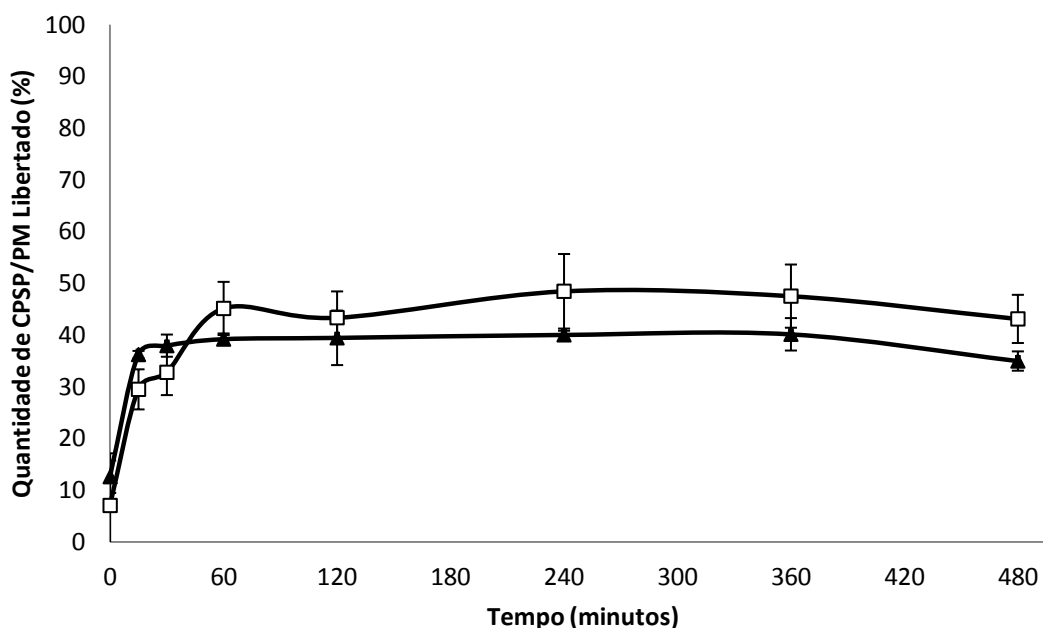


Figura 25: Perfil de liberação das micropartículas (▲) CS: 2:6:0.5 e (□) CS: 2:12:1, obtido em água do mar (n = 3, média ± DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na quantidade de CPSP:PM libertado entre as diferentes formulações (p<0.05).

Na Figura 26A estão representados os perfis de liberação para as formulações com razão CPSP:PM 6:0.5. Verifica-se que, para as três formulações e até aos 30 minutos, ocorre liberação de 40-50% do CPSP:PM, não se verificando diferenças no perfil de liberação entre as formulações. Após esse período, nas formulações 1:6:0.5 e 1.5:6:0.5 há um incremento de liberação para cerca de 60%. Por outro lado, a liberação nas partículas da formulação 2:6:0.5 mantém-se nos 40%. Esta diferença é significativa (p<0.05) e indica diferenças no perfil de liberação entre as formulações 1:6:0.5 e 1.5:6:0.5 e a 2:6:0.5

Para as formulações com razão CSPS:PM 12:1 (Figura 26B), a formulação 1.5:12:1 apresenta uma liberação mais rápida nos primeiros 30 minutos, libertando cerca de 60% enquanto as formulações 1:12:1 e 2:12:1 libertam 45% e 30%, respetivamente. Neste período a diferença na velocidade de liberação é significativa (p<0.05) entre a formulação 1.5:12:1 e as restantes formulações. Após 30 minutos, a liberação das micropartículas 1:12:1 aumenta dos 45 para os 65%, mantendo-se o valor constante ao longo do tempo. Valor de liberação semelhante foi obtido para a

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

formulação 1.5:12:1, não se verificando diferenças entre os dois perfis após os 60 minutos. A quantidade libertada após 60 minutos para estas duas formulações é sempre superior ($p < 0.05$) à observada para a formulação 2:12:1, que regista cerca de 40%.

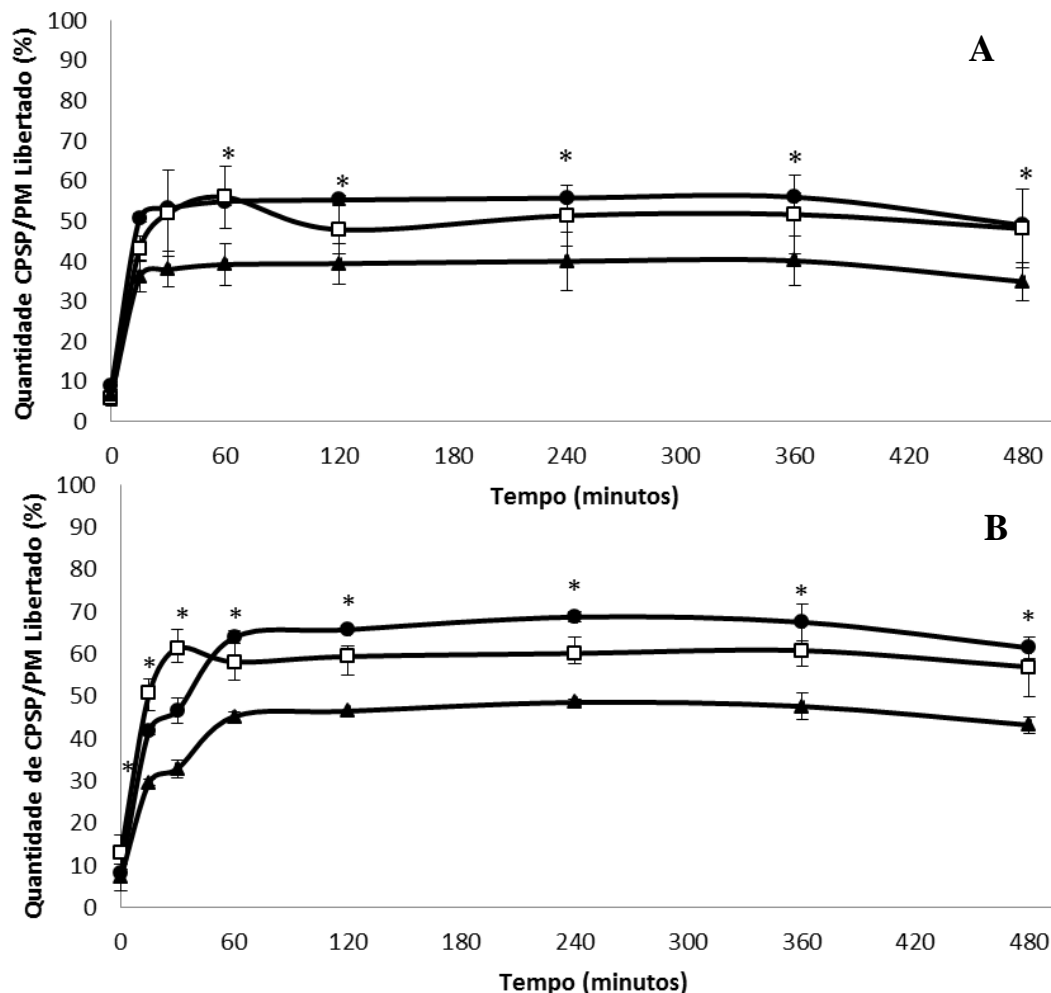


Figura 26: Perfil de libertação das micropartículas (A) (●) CS: 1:6:0.5 (□) CS: 1.5:6:0.5 e (▲) CS: 2:6:0.5; (A); (B) (●) CS: 1:12:1 (□) CS: 1.5:12:1 e (▲) CS: 2:12:1, obtido em água do mar ($n = 3$, média \pm DP). Asteriscos (*) representam diferenças significativas na quantidade de CPSP:PM libertado entre as diferentes formulações ($p < 0.05$).

Desta forma, constata-se que as percentagens de libertação variam entre os 40 e os 60%, observando-se que a percentagem de CS tem influência significativa ($p < 0.05$) no perfil de libertação do material encapsulado.

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

A Figura 27 é um resumo dos perfis de libertação para as seis formulações estudadas. As principais conclusões deste ensaio são: 1) a quantidade de CS presente nas micropartículas afeta significativamente o perfil de libertação, observando-se menor libertação do material em presença de maiores quantidades de quitosano; 2) a percentagem de CPSP:PM não afeta significativamente o perfil de libertação.

Assim, a formulação CS:CPSP:PM 2:12:1 parece ser a formulação mais indicada para fazer parte do alimento para larvas de peixe. Estes resultados vão, de certa forma, ao encontro do objetivo do trabalho, que consistiu em preparar uma formulação que permitisse perder a menor quantidade possível de compostos hidrossolúveis de baixa massa molecular. Na formulação referida, observa-se uma libertação de 40% até aos 30 minutos, pelo que, ficam 60% disponíveis para a ingestão.

O aumento da retenção de moléculas de baixa massa molecular com o aumento da percentagem de CS também foi observado por outros autores. *Corrigan* verificou que para concentrações crescentes de CS a retenção de salbutamol aumenta [124], nos estudos de *Giunchedi* o perfil de libertação da ampicilina é diferente com o aumento da razão CS/ampicilina [125]. *Liu* e colaboradores obtiveram percentagens de libertação de paracetamol na ordem dos 40-70%, ocorrendo a menor libertação para partículas com maior percentagem de CS e com reticulante [123]. Resultados semelhantes foram obtidos para a libertação de diclofenac de sódio [112]. Já no trabalho desenvolvido por *Learoid* e colaboradores, verifica-se que substâncias com maior massa molecular apresentam percentagens de libertação muito inferiores para as mesmas % de CS e um perfil de libertação diferente comparando com substâncias com massa molecular inferior [126]. Esta pode ser uma explicação para a libertação do CPSP:PM neste trabalho não passar dos 60%. Uma das características da composição do CPSP e do PM é a grande heterogeneidade da massa molecular dos compostos [77-78], assim os compostos com maior massa podem ter ficado retidos no interior da matriz criada pelo CS.

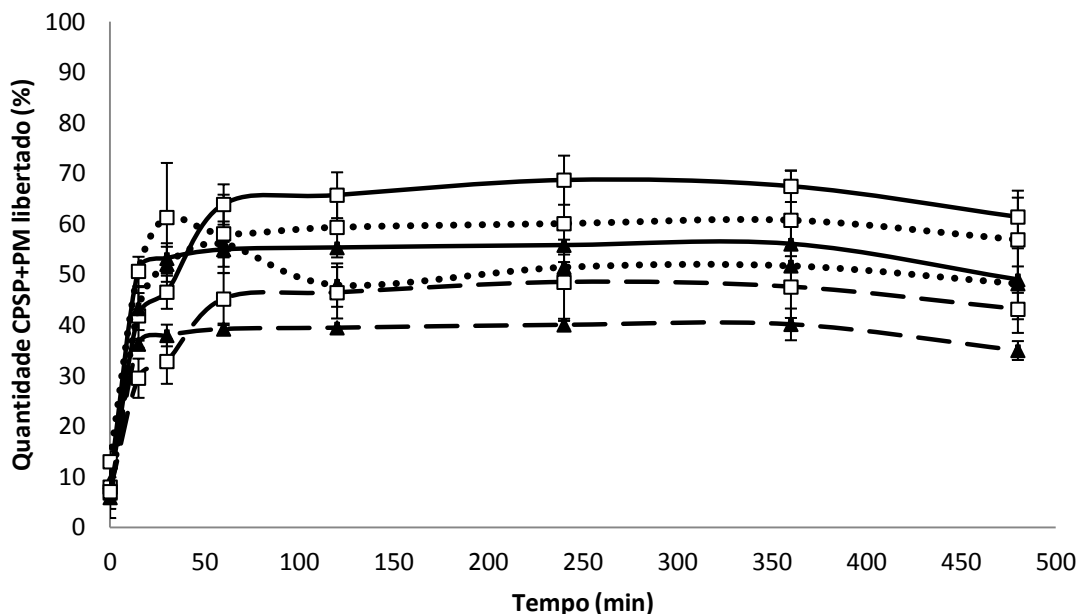


Figura 27: Perfil de libertação das micropartículas. (—) CS 1% (●●●) CS 1.5%; (- - -) CS 2% (▲) Razão CPSP:PM 6:0.5; (□) Razão CPSP:PM 12:1; obtido em água do mar (n = 3, média ± DP).

Estudos sobre o efeito da temperatura na estrutura de proteínas e de hidrolisados proteicos após encapsulação por atomização demonstraram que a albumina encapsulada em CS não apresenta alterações estruturais [127], enquanto a tripsina encapsulada em sacarose regista uma ligeira diminuição na sua atividade, embora não se tenham identificado alterações estruturais [128]. Para o hidrolisado de tilápia encapsulado em maltodextrina, demonstrou-se que uma temperatura de 180 °C conduz a uma diminuição nos aminoácidos quantificados, mas a qualidade da proteína parece manter-se inalterada, observando-se digestibilidade proteica *in vitro* de 92% [129]. Desta forma, de uma maneira geral pode-se dizer que a temperatura de atomização parece não influenciar as características estruturais e nutricionais dos materiais encapsulados de base proteica, como o CPSP e o PM.

Um dos problemas associados às partículas de CS preparadas neste trabalho reside no facto de as larvas de peixe nos seus primeiros dias de vida apresentarem um sistema digestivo simples, não diferenciado [12], ocorrendo um desenvolvimento completo apenas próximo da metamorfose, o qual permite iniciar a digestão gástrica [3]. Para as larvas sem estômago a digestão ocorre em meio alcalino [2] e a clivagem de

Encapsulação de aminoácidos hidrolisados em lipossomas

proteínas ocorre apenas no intestino, sendo mediada pela tripsina, amilase, aminopetidases, fosfatase alcalina e ácida e estreases [130-131]. Devido a estas limitações, um dos principais requisitos nutricionais para as larvas são moléculas simples e fáceis de metabolizar, como péptidos. Se por um lado o CPSP é uma excelente fonte de péptidos, a presença de CS nas micropartículas propostas pode representar um problema, porque nenhuma destas enzimas indicadas anteriormente tem atividade sobre o quitosano. Apenas quando se forma o estômago há registos da presença da lisozima nas larvas de halibute do Atlântico [132], permitindo a degradação do polissacárido. Por outro lado, só 30-40 dias após a eclosão é que está reportado o aparecimento de quitinases, fundamentais para a digestão do exoesqueleto do zooplâncton, bem como da pepsina em espécies como o linguado Japonês, o halibute e a garoupa [133]. A administração de quitosano em peixes adultos parece ter efeitos contraditórios. Se por um lado em tilápia alimentada com uma dieta à base de CS durante oito semanas, promove uma diminuição do crescimento e menos quantidade de lípido por grama de peso seco [134], por outro lado em salmão preto, aumenta a taxa de crescimento e melhora a resposta imunitária a algumas doenças [135].

No geral e apesar das desvantagens associadas às estruturas estudadas neste trabalho os lipossomas e as micropartículas de quitosano podem ser utilizados como mecanismos para evitar a perda dos componentes hidrofílicos na alimentação de animais aquáticos. Não como micropartículas final, mas como componente de uma partícula complexa.

4 – Conclusões

As principais conclusões que se podem retirar deste trabalho são:

No que se refere aos lipossomas,

- O seu tamanho e a eficiência de encapsulação aumentam com o número de ciclos de congelação/aquecimento (-196/60 °C);
- A utilização do método de *hidratação de um filme lipídico*, embora resulte em eficiências de encapsulação de CPSP na ordem dos 90-95%, não é rentável para a produção de microdietas para larvas de peixe devido à reduzida capacidade de produção diária;

No que se refere às micropartículas de quitosano,

- A técnica de atomização é adequada para produzir micropartículas de CS encapsulando uma mistura de CPSP:PM com eficiência de aproximadamente 95%;
- O tamanho das micropartículas depende da quantidade de CS e de CPSP:PM, sendo superior na ausência de CPSP:PM e nas formulações com maior percentagem de CS;
- A presença de CPSP:PM induz alterações na morfologia das micropartículas, tornando-as mais irregulares;
- As micropartículas apresentam índice de compressibilidade na ordem dos 35-45% indicando propriedades de fluxo deficientes;
- O perfil de libertação depende da quantidade de polímero e não da quantidade de material encapsulado;
- A formulação 2:6:0.5 é a que apresenta uma libertação mais baixa (40% em 30-60 min) permitindo que os restantes 60% estejam disponíveis para ingestão.
- A caracterização das micropartículas indica que as partículas têm o perfil ideal para fazerem parte de uma micropartícula complexa;

5 – Perspetivas futuras

Como perspetivas futuras é importante mencionar a importância de determinar o perfil de libertação de CPSP:PM proporcionado pelos lipossomas, bem como verificar o seu potencial de aplicação como veículo de compostos bioativos hidrossolúveis para administração em pequenas quantidades inseridos numa matriz com os restantes nutrientes. No que respeita às micropartículas de CS, seria desejável aumentar a quantidade de polímero até aos 2.5-3%, determinando posteriormente o perfil de libertação, verificando a digestibilidade das micropartículas e o seu efeito no crescimento das larvas. Também seria interessante testar a utilização de outro tipo de matriz com valor nutricional, como a gelatina, ou uma matriz complexa que permitisse não só a sua degradação pelas larvas, mas também uma libertação controlada. Importa mencionar também a possibilidade de integrar as micropartículas produzidas num sistema complexo, fazendo uma posterior encapsulação destas partículas, para produção de um sistema partícula interna/partícula externa.

Referências bibliográficas

1. Rønnestad, I., A. Thorsen, and R.N. Finn, *Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids*. Aquaculture, 1999. **177**(1-4): p. 201-216.
2. Rønnestad, I., R.P. Dominguez, and M. Tanaka, *Ontogeny of digestive tract functionality in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* studied by in vivo microinjection: pH and assimilation of free amino acids*. Fish Physiology and Biochemistry, 2000. **22**(3): p. 225-235.
3. Rønnestad, I., et al., *The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings*. Aquaculture, 2003. **227**(1-4): p. 147-164.
4. Cahu, C.L., et al., *Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae*. Aquaculture, 1999. **171**(1-2): p. 109-119.
5. Dinis, M.T., et al., *A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal*. Aquaculture, 1999. **176**(1-2): p. 27-38.
6. Langdon, C., *Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae*. Aquaculture, 2003. **227**(1-4): p. 259-275.
7. Langdon, C., B. Clack, and U. Önal, *Complex microparticles for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and pharmaceuticals to marine fish larvae*. Aquaculture, 2007. **268**(1-4): p. 143-148.
8. Önal, U. and C. Langdon, *Characterization of lipid spray beads for delivery of glycine and tyrosine to early marine fish larvae*. Aquaculture, 2004. **233**(1-4): p. 495-511.

9. Önal, U. and C. Langdon, *Potential delivery of water-soluble protein hydrolysates to marine suspension feeders by three different microbound particle types*. *Aquaculture*, 2009. **296**(1-2): p. 174-178.
10. http://www.praxmayer.at/fileadmin/Praxmayer_pdfs_etc/Gemma_Micro.pdf.
11. <http://www.lidovski.com/docs/Caviar.pdf>.
12. Cahu, C. and J. Zambonino Infante, *Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae*. *Aquaculture*, 2001. **200**(1-2): p. 161-180.
13. Kunieda, H., et al., *Spontaneous formation of reverse vesicles*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1993. **97**(37): p. 9525-9531.
14. Segota, S. and D.u.i. Tezak, *Spontaneous formation of vesicles*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006. **121**(1-3): p. 51-75.
15. Walde, P. and S. Ichikawa, *Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications*. *Biomolecular Engineering*, 2001. **18**(4): p. 143-177.
16. Silva, R., et al., *Incorporation of peptides in phospholipid aggregates using ultrasound*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2008. **15**(6): p. 1026-1032.
17. Yeagle, P.L., *The membranes of cells*. 2 ed, ed. A. Press. Vol. 1. 1993. 349.
18. <http://www.jornallivre.com.br/161559/o-sao-lipossomas.html>.
19. Sessa, G. and G. Weissmann, *Incorporation of Lysozyme into Liposomes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1970. **245**(13): p. 3295-3301.
20. Grenha, A., et al., *Microspheres containing lipid/chitosan nanoparticles complexes for pulmonary delivery of therapeutic proteins*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008. **69**(1): p. 83-93.

21. Ciobanu, M., et al., *Layersome: Development and optimization of stable liposomes as drug delivery system*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **344**(1-2): p. 154-157.
22. Desai, T.R., R.E.W. Hancock, and W.H. Finlay, *Delivery of liposomes in dry powder form: aerodynamic dispersion properties*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **20**(4-5): p. 459-467.
23. Grenha, A., et al., *Surface Characterization of Lipid/Chitosan Nanoparticles Assemblies, Using X-Ray Photoelectron Spectroscopy and Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2008. **8**(1): p. 358-365.
24. Ebrahim, S., G.A. Peyman, and P.J. Lee, *Applications of Liposomes in Ophthalmology*. Survey of Ophthalmology. **50**(2): p. 167-182.
25. Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, *Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)*. Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 1980. **9**(1): p. 467-508.
26. Leekumjorn, S., et al., *The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(7): p. 1508-1516.
27. Cohn, E.C.J.S.C.M.R.M.O.D., *Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics*, ed. K.A. Publishers. 2002 New York: Kluwer Academic Publishers.
28. <http://www.drugs.com/pro/daunoxome.html>.
29. <http://www.drugs.com/mtm/budeprion-xl.html>.
30. <http://www.drugs.com/pro/amphotericin-b.html>.

31. Yu, R.Z., et al., *Pharmacokinetics and Tissue Disposition in Monkeys of an Antisense Oligonucleotide Inhibitor of Ha-Ras Encapsulated in Stealth Liposomes*. *Pharmaceutical Research*, 1999. **16**(8): p. 1309-1315.
32. Chong-Kook, K., et al., *Development of glucose-triggered pH-sensitive liposomes for a potential insulin delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1994. **101**(3): p. 191-197.
33. McClements, D.J., *Design of Nano-Laminated Coatings to Control Bioavailability of Lipophilic Food Components*. *Journal of Food Science*, 2010. **75**(1): p. R30-R42.
34. de Vos, P., et al., *Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components*. *International Dairy Journal*, 2010. **20**(4): p. 292-302.
35. Parker, R.S. and D.P. Selivonchick, *Uptake and metabolism of lipid vesicles from seawater by juvenile Pacific oysters (Crassostrea gigas)*. *Aquaculture*, 1986. **53**(3-4): p. 215-228.
36. Coutteau, P. and P. Sorgeloos, *Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures*. *Freshwater Biology*, 1997. **38**(3): p. 501-512.
37. Madhyastha, M.S., et al., *A comparative study of uptake and release of glutamic acid and kainic acid by blue mussel (Mytilus edulis L.)*. *Aquatic Toxicology*, 1991. **21**(1-2): p. 15-27.
38. Hontoria, F., et al., *Potential use of liposomes in larviculture as a delivery system through Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 1994. **127**(2-3): p. 255-264.
39. Shingles, R. and J.V. Moroney, *Measurement of Carbonic Anhydrase Activity Using a Sensitive Fluorometric Assay*. *Analytical Biochemistry*, 1997. **252**(1): p. 190-197.

40. Blanco, D. and M.J. Alonso, *Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **45**(3): p. 285-294.
41. Nair, L.S. and C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8-9): p. 762-798.
42. Berger, J., et al., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**(1): p. 19-34.
43. Ravi Kumar, M.N.V., *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and Functional Polymers, 2000. **46**(1): p. 1-27.
44. Agnihotri, S.A., N.N. Mallikarjuna, and T.M. Aminabhavi, *Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2004. **100**(1): p. 5-28.
45. Crini, G. and P.-M. Badot, *Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature*. Progress in Polymer Science, 2008. **33**(4): p. 399-447.
46. Sorlier, P., et al., *Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan*. Biomacromolecules, 2001. **2**(3): p. 765-772.
47. Gong, *Influence of molecular weight on critical concentration of chitosan/formic acid liquid crystalline solution*. Polymer Journal, 2001. **33**(5): p. 387-389.
48. Junginger, H.E. and J.C. Verhoef, *Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs--a fiction?* Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998. **1**(9): p. 370-376.

49. He, P., S.S. Davis, and L. Illum, *In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **166**(1): p. 75-88.
50. Kean, T. and M. Thanou, *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(1): p. 3-11.
51. Grenha, A., et al., *Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **31**(2): p. 73-84.
52. Fernández-Urrusuno, R., et al., *Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles*. Pharmaceutical Research, 1999. **16**(10): p. 1576-1581.
53. de Campos, A., et al., *Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: in Vitro Stability, in Vivo Fate, and Cellular Toxicity*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(5): p. 803-810.
54. De Campos, A.M., A. Sánchez, and M.a.J. Alonso, *Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **224**(1-2): p. 159-168.
55. Hsu, et al., *Free radical degradation of chitosan with potassium persulfate*. Vol. 75. 2002, Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier.
56. Zoldners, J., T. Kiseleva, and I. Kaiminsh, *Influence of ascorbic acid on the stability of chitosan solutions*. Carbohydrate Polymers, 2005. **60**(2): p. 215-218.
57. Langoth, N., et al., *Thiolated Chitosans: Design and <i>In Vivo</i> Evaluation of a Mucoadhesive Buccal Peptide Drug Delivery System*. Pharmaceutical Research, 2006. **23**(3): p. 573-579.

58. Chen, M.-C., et al., *The characteristics, biodistribution and bioavailability of a chitosan-based nanoparticulate system for the oral delivery of heparin*. *Biomaterials*, 2009. **30**(34): p. 6629-6637.
59. Banerjee, T., et al., *Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002. **243**(1-2): p. 93-105.
60. Son, Y.J., et al., *Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect*. *Journal of Controlled Release*, 2003. **91**(1-2): p. 135-145.
61. Kato, Y., H. Onishi, and Y. Machida, *N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates*. *Biomaterials*, 2004. **25**(5): p. 907-915.
62. Ilium, L., *Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient*. *Pharmaceutical Research*, 1998. **15**(9): p. 1326-1331.
63. Thanou, M., J.C. Verhoef, and H.E. Junginger, *Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. **52**(2): p. 117-126.
64. Millner, R.W.J., et al., *A New Hemostatic Agent: Initial Life-Saving Experience With Celox (Chitosan) in Cardiothoracic Surgery*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2009. **87**(2): p. e13-e14.
65. Kean, T., S. Roth, and M. Thanou, *Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency*. *Journal of Controlled Release*, 2005. **103**(3): p. 643-653.
66. Carreño-Gómez, B. and R. Duncan, *Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997. **148**(2): p. 231-240.

67. Zhang, C., et al., *Biological evaluation of N-octyl-O-sulfate chitosan as a new nano-carrier of intravenous drugs*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **33**(4-5): p. 415-423.
68. Janes, K.A., P. Calvo, and M.J. Alonso, *Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(1): p. 83-97.
69. Poncelet, D., et al., *Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992. **38**(1): p. 39-45.
70. Wang, *Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers*. International Journal of Nanomedicine 2011. **6**(1): p. 765-774.
71. Varshosaz, J., *Effect of Citric Acid as Cross-linking Agent on Insulin Loaded Chitosan Microspheres*. Iranian Polymer Journal, 2005. **14**(7): p. 647-656.
72. Berthold, A., K. Cremer, and J. Kreuter, *Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs*. Journal of Controlled Release, 1996. **39**(1): p. 17-25.
73. Tokumitsu, H., H. Ichikawa, and Y. Fukumori, *Chitosan-Gadopentetic Acid Complex Nanoparticles for Gadolinium Neutron-Capture Therapy of Cancer: Preparation by Novel Emulsion-Droplet Coalescence Technique and Characterization*. Pharmaceutical Research, 1999. **16**(12): p. 1830-1835.
74. Agnihotri, S.A. and T.M. Aminabhavi, *Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method*. Journal of Controlled Release, 2004. **96**(2): p. 245-259.

75. Gan, Q. and T. Wang, *Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-- Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007. **59**(1): p. 24-34.
76. Dutta, *chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications*. Journal of Scientific & Industrial Research, 2004. **63**: p. 20-31.
77. <http://www.biovontade.com/#/cpsp/3474915>.
78. <http://www.premixportugal.com/pt/produtos.php?tipo=peixes>.
79. Boisseau, P.H., P; Lahmani, M., *Nanoscience - Nanobiotechnology and Nanobiology*. 1ª ed. 2009: Springer Verlag. 1202.
80. Wilson, K. and J. Walker, *Principles and techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 6ª ed, ed. C.U. Press. 2005, New York: Cambridge University Press. 800.
81. Prinn, K.B., H.R. Costantino, and M. Tracy, *Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale*. Vol. 3. 2002. E4.
82. Nandiyanto, A.B.D. and K. Okuyama, *Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges*. Advanced Powder Technology, 2011. **22**(1): p. 1-19.
83. http://www.google.pt/imgres?q=spray+nozzle&um=1&hl=pt-PT&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:en-US:official&biw=1280&bih=659&tbm=isch&tbnid=xbipGUVd_L3UQM:&imgrefurl=
84. http://www.google.pt/imgres?q=spray+dryer+nozzle&um=1&hl=pt-PT&client=firefox-a&hs=Y2l&sa=N&rls=org.mozilla:en-US:official&biw=1280&bih=659&tbm=isch&tbnid=_aSqQf2eBr-txM:&imgrefurl=http://www.geaprocess.co.uk/gpuk/cmsdoc.nsf/webdoc/webb7

- q4gmn&docid=YPWwM4XLJwBzDM&w=205&h=364&ei=Hoh8To7hCsag0Q
WC68DYDw&zoom=1&iact=rc&dur=455&page=2&tbnh=143&tbnw=96&star
t=19&ndsp=21&ved=1t:429,r:1,s:19&tx=68&ty=38.
85. Yao, N.W., Z.L.; , *Handbook of microscopy for nanotechnology*. 6^a ed. 2005, New York: Springer Science+Business Media. 742.
86. http://www.eu-softcomp.net/FILES/edx_technique.pdf.
87. Aulton, M.E., *Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines*. 2007: Churchill Livingstone.
88. <http://www.mksinter.com/showproduct.php?pid=835>.
89. Chang, M., *Modern Issues and Methods in Biostatistics*. 1^a ed. Statistics for Biology and Health, ed. M. Gail, et al. 2011, New York: Springer. 321.
90. Mozafari, M.R., et al., *Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology*. International Journal of Food Properties, 2008. **11**(4): p. 833 - 844.
91. Mayer, L.D., et al., *Influence of Vesicle Size, Lipid Composition, and Drug-to-Lipid Ratio on the Biological Activity of Liposomal Doxorubicin in Mice*. Cancer Research, 1989. **49**(21): p. 5922-5930.
92. Mozafari, M., et al., *Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology*. Journal of Liposome Research, 2008. **18**(4): p. 309-327.
93. Hwang, T.-L., et al., *Cisplatin encapsulated in phosphatidylethanolamine liposomes enhances the in vitro cytotoxicity and in vivo intratumor drug accumulation against melanomas*. Journal of Dermatological Science, 2007. **46**(1): p. 11-20.
94. Uri, P., *Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1981. **212**(1): p. 186-194.

95. Perkins, W.R., et al., *The determination of liposome captured volume*. Chemistry and Physics of Lipids, 1993. **64**(1-3): p. 197-217.
96. Sabín, J., et al., *On the Effect of Ca²⁺ and La³⁺ on the Colloidal Stability of Liposomes*. Langmuir, 2005. **21**(24): p. 10968-10975.
97. Mosharraf, M., K.M.G. Taylor, and D.Q.M. Craig, *Effect of Calcium Ions on the Surface Charge and Aggregation of Phosphatidylcholine Liposomes*. Journal of Drug Targeting, 1995. **2**(6): p. 541-545.
98. Kinoshita, K., S.J. Li, and M. Yamazaki, *The mechanism of the stabilization of the hexagonal II (H₂O₂) phase in phosphatidylethanolamine membranes in the presence of low concentrations of dimethyl sulfoxide*. European Biophysics Journal, 2001. **30**(3): p. 207-220.
99. Mayer, L.D., et al., *Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1985. **817**(1): p. 193-196.
100. Dufour, P., et al., *Characterization of enzyme immobilization in liposomes prepared from proliposomes*. Journal of Microencapsulation, 1996. **13**(2): p. 185-194.
101. Izquierdo, M.S., et al., *Recent advances in lipid nutrition in fish larvae*. Fish Physiology and Biochemistry, 2000. **22**(2): p. 97-107.
102. Ozkizilcik, S. and F.-L.E. Chu, *Uptake and metabolism of liposomes by Artemia nauplii*. Aquaculture, 1994. **128**(1-2): p. 131-141.
103. McEvoy, L.A., et al., *Two novel Anemia enrichment diets containing polar lipid*. Aquaculture, 1996. **144**(4): p. 339-352.
104. Tonheim, S.K., W. Koven, and I. Ronnestad, *Enrichment of Artemia with free methionine*. Aquaculture, 2000. **190**(3): p. 223-235.

105. Touraki, M., P. Rigas, and C. Kastritsis, *Liposome mediated delivery of water soluble antibiotics to the larvae of aquatic animals*. *Aquaculture*, 1995. **136**(1-2): p. 1-10.
106. Koven, et al., *The potential of liposomes as a nutrient supplement in first-feeding marine fish larvae*. *Aquaculture Nutrition*, 1999. **5**(4): p. 251-256.
107. Naoi, M., et al., *Permeability of amino acids into liposomes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1977. **471**(2): p. 305-310.
108. Ozkizilcik, S. and F.-L.E. Chu, *Preparation and characterization of a complex microencapsulated diet for striped bass *Morone saxatilis* larvae*. *Journal of Microencapsulation*, 1996. **13**(3): p. 331-343.
109. Buchal and Langdon, *Evaluation of lipid spray beads for the delivery of water-soluble materials to a marine suspension-feeder, the Manila clam *Tapes philippinarum* (Deshayes 1853)*. *Aquaculture Nutrition*, 1998. **4**(4): p. 263-274.
110. Klein, R.A., M.J. Moore, and M.W. Smith, *Selective diffusion of neutral amino acids across lipid bilayers*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1971. **233**(2): p. 420-433.
111. He, P., S.S. Davis, and L. Illum, *Chitosan microspheres prepared by spray drying*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999. **187**(1): p. 53-65.
112. Wang, Q., et al., *Preparation, Characterization and Drug-Release Behaviors of Crosslinked Chitosan/Attapulgate Hybrid Microspheres by a Facile Spray-Drying Technique*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2011. **2**, (2): p. 250-257.
113. Grenha, A., et al., *Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010. **92A**(4): p. 1265-1272.

114. Chidavaenzi, O.C., et al., *The use of thermal techniques to assess the impact of feed concentration on the amorphous content and polymorphic forms present in spray dried lactose*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. **159**(1): p. 67-74.
115. Kosaraju, S.L., L. D'Ath, and A. Lawrence, *Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery*. Carbohydrate Polymers, 2006. **64**(2): p. 163-167.
116. Yan, H. and G.U. Zhengbiao, *Morphology of modified starches prepared by different methods*. Food Research International, 2010. **43**(3): p. 767-772.
117. Maa, Y.-F., et al., *The Effect of Operating and Formulation Variables on the Morphology of Spray-Dried Protein Particles*. Pharmaceutical Development and Technology, 1997. **2**(3): p. 213-223.
118. Liu, W., et al., *Uniform Chitosan Microparticles Prepared by a Novel Spray-Drying Technique*. International Journal of Chemical Engineering, 2011. **2011**.
119. Alamilla-Beltrán, L., et al., *Description of morphological changes of particles along spray drying*. Journal of Food Engineering, 2005. **67**(1-2): p. 179-184.
120. Iskandar, F., L. Gradon, and K. Okuyama, *Control of the morphology of nanostructured particles prepared by the spray drying of a nanoparticle sol*. Journal of Colloid and Interface Science, 2003. **265**(2): p. 296-303.
121. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry*. 2004, New York: J. Wiley & Sons.
122. Gelfuso, G.M., et al., *Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate*. Journal of Microencapsulation, 2011. **28**(7): p. 650-658.
123. Liu, C., et al., *Drug Release Kinetics of Spray-Dried Chitosan Microspheres*. Drying Technology, 2006. **24**(6): p. 769-776.

124. Corrigan, D.O., A.M. Healy, and O.I. Corrigan, *Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2006. **62**(3): p. 295-305.
125. Giunchedi, P., et al., *Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres*. Biomaterials, 1998. **19**(1-3): p. 157-161.
126. Learoyd, T.P., et al., *Chitosan-based spray-dried respirable powders for sustained delivery of terbutaline sulfate*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **68**(2): p. 224-234.
127. Kusonwiriawong, C., et al., *Retained integrity of protein encapsulated in spray-dried chitosan microparticles*. Journal of Microencapsulation, 2009. **26**(2): p. 111-121.
128. Tzannis, S.T. and S.J. Prestrelski, *Activity–stability considerations of trypsinogen during spray drying: Effects of sucrose*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **88**(3): p. 351-358.
129. Abdul-Hamid, A., J. Bakar, and G.H. Bee, *Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*)*. Food Chemistry, 2002. **78**(1): p. 69-74.
130. Yúfera, M. and M.J. Darias, *The onset of exogenous feeding in marine fish larvae*. Aquaculture, 2007. **268**(1-4): p. 53-63.
131. Kolkovski, S., *Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets*. Aquaculture, 2001. **200**(1-2): p. 181-201.
132. Hermannsdottir, R., et al., *Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae*. Fish & Shellfish Immunology, 2009. **27**(5): p. 595-602.

133. Wu, X., et al., *Staging of initial pepsinogen and chitinase expression and complete gastric gland development within the larval stomach of Japanese flounder, spotted halibut, seven-band grouper and greater amberjack*. Aquaculture, 2011. **314**(1-4): p. 165-172.
134. Shiau, S.-Y. and Y.-P. Yu, *Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, Oreochromis niloticus×O. aureus*. Aquaculture, 1999. **179**(1-4): p. 439-446.
135. Geng, X., et al., *Effects of dietary chitosan and Bacillus subtilis on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, Rachycentron canadum*. Fish & Shellfish Immunology, 2011. **31**(3): p. 400-406.