

Luís Carlos Araújo Freixo

Micro e Nanoencapsulação como Estratégias de Estabilização de
Entidades Bioativas: Proteínas, Enzimas e Bacteriófagos



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Micro e Nanoencapsulação como Estratégias de Estabilização de Entidades Bioativas:
Proteínas, Enzimas e Bacteriófagos

Luís Carlos Araújo Freixo

Micro e Nanoencapsulação como Estratégias de Estabilização de
Entidades Bioativas: Proteínas, Enzimas e Bacteriófagos



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Micro e Nanoencapsulação como Estratégias de Estabilização de Entidades Bioativas:
Proteínas, Enzimas e Bacteriófagos

Trabalho realizado sob a orientação da

Professora Doutora Carla M. Matos

Com coorientação do

Professor Doutor Victor M. Balcão

Micro e Nanoencapsulação como Estratégias de Estabilização de
Entidades Bioativas: Proteínas, Enzimas e Bacteriófagos

Trabalho apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

(Luís Carlos Araújo Freixo)

Sumário

A micro e nanoencapsulação são técnicas nas quais substâncias, compostos ou agentes no estado sólido, líquido e gasoso são revestidos por um agente encapsulante, obtendo-se partículas com dimensões micro/nanométricas. Existem diversas metodologias, cada uma apresentando aplicações em vários sectores industriais, nomeadamente, nas áreas farmacêutica e alimentar. Outras áreas que beneficiam das vantagens da micro e nanoencapsulação são a indústria cosmética e o sector agrícola. De entre muitas outras utilizações, esta tecnologia proporciona a libertação controlada de fármacos e compostos bioativos, e permite a sua proteção contra as agressões do meio. Durante o processo de encapsulação, a seleção do material encapsulante é uma etapa crucial. O agente encapsulante deve ser escolhido em função das características do composto bioativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para a formação das partículas.

A imobilização por via da encapsulação à micro ou nano escala, consiste na contenção em membranas préformadas ou na formação *in situ* de uma membrana que envolva as entidades bioativas. A encapsulação revela diversas vantagens em relação às outras técnicas de imobilização, como por exemplo a agregação/floculação ou o aprisionamento em matrizes porosas, nomeadamente pela maior capacidade de carga, ou seja, pela maior contenção de moléculas e ainda pela menor perda das mesmas para o meio externo.

O presente trabalho visa a revisão dos principais aspetos associados à micro e nanoencapsulação como uma estratégia de estabilização de entidades bioativas, que permita a otimização tecnológica e económica da sua utilização nos mais diversos sectores industriais, nomeadamente nas aplicações farmacêuticas.

Abstract

The micro and nanoencapsulation are techniques in which substances, compounds or agents in solid, liquid and gas state, are coated by an encapsulating agent, obtaining particles with micro/nanometric dimensions. There are several methodologies, each one presenting applications in different industrial sectors, particularly in the pharmaceutical and food industries. Other areas that benefit from the advantages of micro and nanoencapsulation are the cosmetic industry and the agricultural sector. Amongst many other uses, this technology provides the controlled release of drugs and bioactive compounds, and offers protection against attacks of the medium. During the encapsulation process, the selection of the encapsulating material is a critical step. The encapsulating agent should be chosen accordingly to the characteristics of the bioactive compound, the intended application and the method used to form the particles.

Immobilization by means of micro or nano scale encapsulation is the containment in a preformed membrane or *in situ* formation of a membrane involving the bioactive entities. Encapsulation shows several advantages over other immobilization techniques, such aggregation/flocculation or entrapment in porous matrices, in particular for greater loading capacity and also lower loss to the external medium.

This paper aims to review the main aspects related to micro and nanoencapsulation as a strategy for stabilizing bioactive entities, enabling the technological and economic optimization of its use in various industries, in particular in pharmaceutical applications.

Micro e Nanoencapsulação como Estratégias de Estabilização de Entidades Bioativas:
Proteínas, Enzimas e Bacteriófagos

Aos meus pais,

Maria e Luís

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais por me terem dado a oportunidade e todas as condições necessárias para eu tirar um curso superior. Por todo o apoio e esforços que demonstraram ao longo deste meu percurso académico.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Carla Manuela Matos pela disponibilidade que sempre demonstrou, pela forma como me orientou na realização deste trabalho e por todo o tempo que me dedicou, facultando-me todos os ensinamentos necessários.

À Adriana por todo o apoio e paciência ao longo desta fase do meu percurso académico.

Agradeço ao resto da minha família pelo apoio incondicional e a todos os meus amigos pela força que sempre me deram.

Índice

| | Página |
|--|---------------|
| I. Introdução | 1 |
| II. Micro e nanoencapsulação | 3 |
| 1. Aplicações gerais | 3 |
| 2. Microencapsulação | 4 |
| 3. Nanoencapsulação | 5 |
| III. Tipos e composição de micro e nanopartículas | 6 |
| 1. Micro e nanopartículas polissacarídicas | 6 |
| 2. Micro e nanopartículas peptídicas e proteicas | 7 |
| 3. Nanopartículas lipídicas: | 7 |
| i. Nanopartículas de lípidos sólidos | 8 |
| ii. Vetores lipídicos nanoestruturados | 10 |
| IV. Métodos de produção de micro e nanopartículas | 12 |
| 1. Métodos recorrendo a polímeros | 12 |
| 2. Métodos recorrendo a lípidos | 12 |
| V. Técnicas de produção de micro e nanocápsulas | 13 |
| 1. Métodos físicos: | 13 |
| i. Revestimento em recipiente rotativo (“pan coating”) | 13 |
| ii. Extrusão centrífuga | 13 |
| iii. Secagem por pulverizador (“spray-drying”) | 14 |
| 2. Métodos químicos: | 15 |
| i. Polimerização <i>in situ</i> | 15 |
| ii. Polimerização interfacial | 15 |
| 3. Métodos físico-químicos: | 15 |
| i. Coacervação-Separação de fases | 15 |
| ii. Evaporação do solvente | 16 |
| iii. Precipitação com fluidos supercríticos | 17 |
| VI. Avaliação da biodisponibilidade de micro e nanosistemas | 19 |

| | |
|--|-----------|
| VII. Encapsulação: estratégia para estabilização de entidades bioativas | 21 |
| VIII. Proteínas | 23 |
| 1. Definição de estabilidade proteica | 24 |
| 2. Alterações químicas | 25 |
| 3. Uso terapêutico de proteínas e péptidos | 25 |
| 4. Encapsulação e estabilização de proteínas | 28 |
| IX. Enzimas | 31 |
| 1. Desnaturação e estabilização. Significado | 32 |
| 2. Imobilização de enzimas | 32 |
| 3. Métodos para estabilização por imobilização | 33 |
| i. Estabilização contra inativação térmica | 35 |
| ii. Estabilização contra inativação não-térmica | 35 |
| 4. Estabilização de enzimas multiméricas | 36 |
| X. Bacteriófagos | 38 |
| 1. Descoberta dos bacteriófagos | 38 |
| 2. Caracterização dos bacteriófagos | 39 |
| 3. Terapia fágica | 40 |
| 4. Encapsulação de bacteriófagos | 41 |
| XI. Formulações desenvolvidas de micro e nanosistemas | 43 |
| 1. Proteínas encapsuladas | 43 |
| 2. Enzimas encapsuladas | 45 |
| 3. Bacteriófagos encapsulados | 46 |
| XII. Conclusão | 48 |
| XIII. Bibliografia | 50 |

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

A/O – Água em Óleo

A/O/A – Água em Óleo em Água

Arg – Arginina

ARN – Ácido ribonucleico

Asp – Asparagina

BSA - Bovine Serum Albumin

Cys – Cisteína

Da – Dalton

FDA – Food and Drug Administration

FSC - Fluídos Supercríticos

Glu – Glutamina

His – Histidina

HPH – High Pressure Homogenization

Lys – Lisina

Met – Metionina

NLC – Nanostructured Lipid Nanoparticle

O/LS/A – Oléo-Lípido Sólido-Água

PEG – Polietilenoglicol

PLA – Poly-lactic acid

PLGA – Poly(lactic-co-glycolic acid)

PVP – Polivinilpirrolidona

rhGH – Recombinant Human Growth Hormone

SLN – Solid Lipid Nanoparticle

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

VLP – Virus-like Particles

Índice de Figuras

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1 – Microesfera vs microcápsula (Adaptado de Pimentel <i>et al</i> , 2007) | 1 |
| Figura 2 – Nanoesfera vs nanocápsula (Adaptado de Brigger <i>et al</i> , 2002) | 2 |
| Figura 3 – Tipos de SLN (Adaptado de Souto <i>et al</i> , 2007) | 9 |
| Figura 4 – Tipos de NLC (Adaptado de Souto <i>et al</i> , 2007) | 10 |
| Figura 5 – Secagem por pulverizador (Adaptado de Lima <i>et al</i> , 2012) | 14 |
| Figura 6 – Coacervação-separação de fases (Adaptado de Lima <i>et al</i> , 2012) | 16 |
| Figura 7 – Evaporação de solvente (Adaptado de Lima <i>et al</i> , 2012) | 17 |
| Figura 8 – Imobilização enzimática (Adaptado de Gianfreda e Sacarfi, 1991) | 34 |

I. Introdução

A micro e nanotecnologia, como técnicas de encapsulação surgiram há relativamente pouco tempo, porém os seus rápidos e significativos avanços permitiram a descoberta e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e terapia para diversas doenças.

As micropartículas são partículas de tamanho variável entre um e mil micrómetros, e que podem ser biodegradáveis ou não (Vyas e Khar, 2006). Fisicamente caracterizam-se por um aspeto sólido e forma esférica. Estas estruturas têm como objetivo veicular vários compostos bioativos, tais como fármacos, vitaminas, ácidos nucleicos, péptidos e enzimas (Bansode *et al*, 2010). Relativamente à sua estrutura interna e morfologia, as micropartículas podem ser subdivididas em microcápsulas e microesferas (Figura 1).

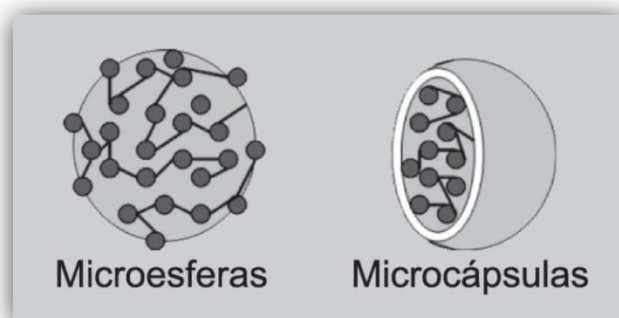


Figura 1 – Microesfera vs microcápsula (Adaptado de Pimentel *et al*, 2007)

As microcápsulas são um sistema tipo reservatório, apresentando uma estrutura muito elementar. Estas partículas são constituídas por um núcleo interno, que corresponde ao composto a encapsular, e por uma membrana de revestimento, geralmente de natureza polimérica, com espessura variável (Suave *et al*, 2006). As microcápsulas podem ser mononucleares, quando são constituídas por uma partícula simples, ou polinucleares, quando existe um aglomerado de partículas no interior da cápsula (Silva *et al*, 2003). Por outro lado, as microesferas são sistemas que apresentam uma estrutura do tipo matricial, podendo as substâncias estar adsorvidas à superfície da partícula ou aprisionadas no seu interior (Azeredo, 2005). As microesferas podem ser classificadas como homogéneas ou heterogéneas, dependendo de a substância ativa no núcleo se encontrar, respetivamente, dissolvida ou em suspensão (Silva *et al*, 2003).

As nanopartículas podem ser definidas como partículas de caracter sólido e tamanho sub-micro, com diâmetros que variam entre um nanómetro e várias centenas de nanómetros, e que podem ou não ser biodegradáveis (Reis *et al*, 2007). O termo nanopartícula é também uma designação coletiva para tanto nanoesferas como nanocápsulas (Figura 2). As nanoesferas possuem uma estrutura do tipo matricial, e tal como nas microesferas, as substâncias ou entidades ativas podem estar adsorvidas à superfície ou contidas no interior da esfera. Por outro lado as nanocápsulas caracterizam-se por serem sistemas vesiculares onde as substâncias ou entidades encontram-se confinadas a uma cavidade composta por um núcleo interior líquido que se encontra revestido por uma membrana (Brigger *et al*, 2002).

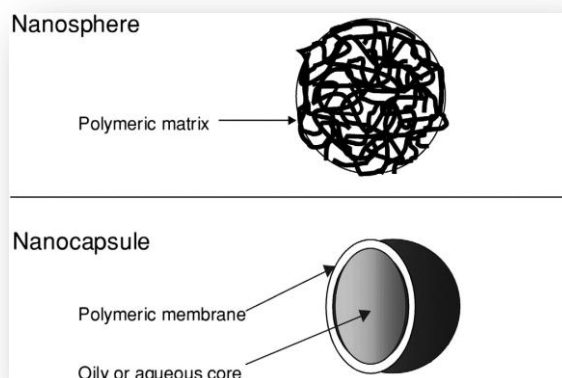


Figura 2 – Nanoesfera vs nanocápsula (Adaptado de Brigger *et al*, 2002)

As nanopartículas têm recebido cada vez mais atenção por parte da indústria farmacêutica como sendo uma opção a considerar para a administração de fármacos ou entidades ativas (Couvreur *et al*, 1995). Quando comparados com formas farmacêuticas convencionais, os sistemas de nanopartículas oferecem inúmeras vantagens, tais como: o aumento da eficácia da terapia, a libertação controlada e/ou vetorizada e a redução ou limitação de efeitos adversos associados ao fármaco ou composto encapsulado, vantagens que no seu todo se traduzem num outro grande benefício, pois aumentam a adesão do doente à terapêutica (Burgess e Hickey, 2002). O tamanho sub-micro das nanopartículas confere-lhes ainda algumas vantagens em comparação com as micropartículas, como por exemplo uma absorção intracelular significativamente superior. Além do tamanho, a carga da nanopartícula também influencia a absorção, mais especificamente a nível intestinal (McClellan *et al*, 1998).

II. Micro e nanoencapsulação

1. Aplicações gerais:

As técnicas de micro e nanoencapsulação são utilizadas nas mais diversas indústrias, nomeadamente, na indústria alimentar, agrícola e farmacêutica. Na indústria farmacêutica, as aplicações e vantagens são várias e incluem (Burgess e Hickey, 2002; Venkatesan, 2009):

- Mascaram as características organolépticas desagradáveis de fármacos ou substâncias;
- Desenvolvimento de formas de libertação prolongada;
- Redução ou eliminação da irritação gástrica e outros efeitos adversos inerentes aos fármacos ou substâncias;
- Desenvolvimento de formas com revestimento entérico (possibilitando a absorção seletiva do fármaco no intestino, em vez de no estômago);
- Desenvolvimento de formas farmacêuticas de libertação controlada e vetorizada;
- Melhoramento das características de escoamento de pós;
- Proteção contra agentes atmosféricos, como humidade, luz, calor e oxigénio;
- Administração simultânea de fármacos ou substâncias incompatíveis entre si;
- Conversão de líquidos em sólidos;
- Dispersão de compostos insolúveis em água ou meios aquosos;
- Diminuição das propriedades higroscópicas;
- Separação de substâncias incompatíveis;
- Diminuição da volatilidade (uma substância volátil encapsulada pode ser armazenada por períodos mais longos sem evaporação significativa);
- Diminuição dos riscos de manipulação de substâncias tóxicas ou nocivas.

Contudo, para além das inúmeras aplicações a micro/nanoencapsulação também possuem limitações, como por exemplo, o custo elevado das técnicas e a própria escolha

de um método, pois não existe um processo adaptável a todas as substâncias (Venkatesan, 2009).

2. Microencapsulação

A microencapsulação é um processo no qual agentes biológicos ativos, tais como enzimas, células ou substâncias, como antibióticos ou vitaminas, são aprisionados dentro de uma matriz semipermeável. A microencapsulação inclui a bioencapsulação, que é um processo específico para o aprisionamento de uma substância biologicamente ativa, como uma proteína, enzima ou bacteriófago. As cápsulas resultantes possuem um tamanho que pode variar entre os micrómetros e os milímetros. As gotículas extremamente pequenas, ou partículas de material sólido ou líquido, são empacotados dentro de um segundo material, ou revestidos com uma película contínua de material polimérico com a finalidade de proteger a entidade ativa do ambiente circundante (Thies, 2005). As aplicações da microencapsulação incluem a libertação controlada dos componentes ativos, o revestimento de partículas, a dissimulação do sabor, a estabilização física e química, o aumento do tempo de vida útil após armazenamento e a prevenção da exposição do material ativo a agentes ambientais (Thies, 2005). Substâncias em todos os estados (sólido, líquido e gasoso) podem ser encapsuladas e assim afetar o tamanho e a forma das cápsulas. Se um sólido ou um material cristalino forem utilizados como núcleo, a cápsula resultante pode possuir uma forma irregular. No entanto, se o material do núcleo for um líquido, formam-se simples cápsulas esféricas, contendo uma única gota de encapsulado (Thies, 2005).

As substâncias encapsuladas produzem o efeito desejado quando o material no núcleo é libertado, o que pode acontecer através de quatro mecanismos típicos: ruptura mecânica da parede da cápsula, dissolução da parede, fusão da parede e difusão através da parede (Trindade *et al*, 2008).

Como foi referido anteriormente, a microencapsulação acarreta diversas vantagens, pois permite a conversão de líquidos em sólidos, a alteração das propriedades coloidais e de superfície, proporciona a proteção contra o ambiente e o controlo das características de libertação. No entanto, a singularidade da microencapsulação é a dimensão micrométrica das partículas revestidas e a sua subsequente utilização e adaptação a uma vasta variedade de formas e dosagens (Shekhar *et al*, 2006).

3. Nanoencapsulação

A nanoencapsulação é uma tecnologia que tem vindo a expandir-se rapidamente e que permite aprisionar compostos com atividade biofarmacêutica sob a forma de nanopartículas. Os compostos aprisionados, encapsulados ou absorvidos dentro das nanocápsulas vão desde fármacos ativos e pró-fármacos até outras moléculas biologicamente ativas, como por exemplo, proteínas, enzimas e bacteriófagos (Moutinho *et al*, 2011). De uma forma mais sucinta, a nanoencapsulação de substâncias ou entidades ativas caracteriza-se pela formação de partículas carregadas com diâmetro entre 1 e os 1000 nm (Couvreur *et al*, 1995). A nanoencapsulação envolve a incorporação ou dispersão de combinações das entidades ou substâncias no estado sólido, líquido ou gasoso, dentro de vesículas pequenas, com diâmetro na escala nanométrica. A incorporação destas entidades bioativas protege-as contra a degradação por agentes ambientais como o pH, a temperatura, sais e solventes orgânicos, melhora a estabilidade e a solubilidade, e permite ainda a solubilização de componentes hidrofóbicos em matrizes hidrofílicas e vice-versa (Jafari *et al*, 2008). Por outras palavras as nanocápsulas são partículas coloidais de tamanho sub-micro constituídas por um invólucro polimérico, disposto em redor de um núcleo, podendo o componente ativo de interesse estar dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Labhasetwar, 1997). A retenção destes núcleos é regida pelas características químicas, de solubilidade, polaridade e volatilidade. O material de parede consiste numa barreira externa, geralmente constituída por polímeros que formam uma rede com a substância encapsulada. Em suma o principal objetivo da encapsulação é proteger uma substância sensível no interior da cápsula ou na sua parede, através do isolamento físico do meio circunvizinho e permitindo simultaneamente a transferência de gases, nutrientes e metabolitos (Reis *et al*, 2006).

III. Tipos e composição de micro e nanopartículas

Para o desenvolvimento de sistemas de micro e nanopartículas é necessário que os polímeros selecionados sejam biocompatíveis e, de preferência biodegradáveis. É ainda imprescindível que sejam capazes de proteger o fármaco ou substância durante a sua passagem na circulação sistêmica, para que o fármaco ou substância seja capaz de atingir o local alvo sem que seja captado pelo sistema fagocitário. Por fim deve ser facilmente produzido a nível industrial e estar de acordo com as diretrizes e Decretos-Lei definidos pela região ou país em questão.

Os polímeros naturais estão, entre os excipientes mais comumente utilizados em formulações farmacêuticas e alimentares (Augst *et al*, 2006), em particular, as pectinas e os alginatos, por serem baratos e não-tóxicos. As pectinas são extraídas das paredes celulares de plantas, e os alginatos das paredes celulares de algas marinhas e de determinadas bactérias. Ambas as matrizes são adequadas para a encapsulação de moléculas, providenciando grandes vantagens, como a elevada eficiência de transporte e de libertação do conteúdo encapsulado, controlo da quantidade de moléculas ou entidade libertada e elevada estabilidade (Castro *et al*, 2005). Apesar destas vantagens, existe a necessidade dos novos veículos fornecerem uma melhor proteção das moléculas/entidades contra a rápida degradação ácida e/ou proteolítica, e ao mesmo tempo permitirem a maximização da capacidade de carga. Deste modo, é essencial que haja um desenvolvimento de novas e mais eficientes alternativas para administração e libertação de moléculas ou entidades bioativas. Existem três grandes grupos de micro e nanopartículas: as polissacarídicas, as peptídicas e proteicas e as lipídicas.

1. Micro e nanopartículas polissacarídicas

Os polissacarídeos constituem um material interessante para a encapsulação de fármacos, pois apresentam na sua estrutura grupos funcionais, como hidroxilo e amina, que podem ser utilizados para reações de derivatização ou conjugação. Os polissacarídeos podem ser classificados de acordo com a sua origem: animal, vegetal ou bacteriana (Gil e Ferreira, 2006). Os principais polissacarídeos utilizados na produção de micro e nanocápsulas são (Souto e Lopes, 2011):

- Ácido hialurónico e seus derivados;
- Agarose;
- Alginato;
- Amido;
- Carragenano;
- Celulose e seus derivados;
- Dextrano;
- Dextrinas e ciclodextrinas;
- Gomas (Xantana, Gelana, Guar);
- Pectina;
- Quitosano.

2. Micro e nanopartículas peptídicas e proteicas

A maior parte dos péptidos e proteínas são biocompatíveis e biodegradáveis, sendo capazes de encapsular eficazmente fármacos e substâncias, protegendo-os contra a degradação. Uma das grandes vantagens é o facto de serem facilmente manipuláveis e a sua transposição para a escala industrial de fácil execução (Öner e Kas, 2003). A grande desvantagem reside na potencial resposta inflamatória e imunológica que podem despoletar, e na possível contaminação com agentes patogénicos, como por exemplo, vírus e príões (Öner e Kas, 2003). Os polipéptidos mais utilizados na produção de micro e nanocápsulas são (Souto e Lopes, 2011):

- Albumina;
- Caseína;
- Colagénio;
- Gelatina;
- Lectinas;
- Lipoproteínas.

3. Nanopartículas lipídicas

Existem dois tipos de nanopartículas lipídicas, as nanopartículas de lípidos sólidos (SLN) e vetores lipídicos nanoestruturados (NLC). São sistemas coloidais lipídicos que

têm sido propostos para várias vias de administração, tais como a via parentérica, oral e tópica. Este tipo de partículas surgiu no início da década de 90, com o objetivo de ultrapassar as limitações apresentadas pelos sistemas coloidais tradicionais, tais como as nanopartículas poliméricas e as micro e nanoemulsões (Müller *et al*, 1995). Ambos os sistemas utilizam como base lípidos sólidos podendo ser distinguidos pela sua estrutura interna. Os SLN consistem apenas em lípidos no estado sólido, enquanto os NLC contêm uma percentagem de lípido líquido, o que origina defeitos na rede cristalina, que por sua vez se traduz em vantagens, nomeadamente numa maior capacidade carga. No caso da administração tópica, estes sistemas também são vantajosos, pois possuem propriedades oclusivas originadas pela formação de uma película sobre a superfície da pele, que reduz a perda de água transepidérmica, e, por consequência aumenta a penetração de fármacos hidrofílicos através do estrato córneo (Souto *et al*, 2011).

i. Nanopartículas de lípidos sólidos (SLN - Solid Lipid Nanoparticles)

Durante os últimos anos os SLN têm atraído cada vez mais a atenção científica e comercial, como vetores terapêuticos para proteínas ou péptidos. Os SLN conseguem combinar várias vantagens e evitar, ou minimizar, as desvantagens dos materiais, referidos anteriormente. As vantagens incluem (Mehnert e Mader, 2001):

- Libertação controlada e direcionada do fármaco para um local-alvo;
- Redução da toxicidade quando comparados com algumas nanopartículas poliméricas, pois são utilizados lípidos fisiológicos e biocompatíveis;
- Proteção de fármacos lábeis e sensíveis contra a degradação fotoquímica, oxidativa ou por agentes químicos;
- Baixo custo dos lípidos sólidos, em comparação com os fosfolípidos e polímeros biodegradáveis;
- Não utilização de solventes orgânicos;
- Capacidade de encapsulação e administração de compostos lipofílicos e hidrofílicos;
- Capacidade de vetorizar os agentes terapêuticos por diferentes vias de administração: oral, oftálmica, dérmica e pulmonar.

Por outro lado e de acordo com os mesmos autores, existem potenciais desvantagens:

- Insuficiência da capacidade de carga de fármaco;
- Expulsão do fármaco da matriz sólida, devido a transições polimórficas dos lípidos de configurações instáveis para configurações mais estáveis durante o armazenamento.
- Elevada quantidade de água presente nas formulações, cerca de 70-90%.

A literatura descreve três modelos diferentes (Figura 3) para a localização de fármacos ou de proteínas no SLN, nomeadamente: o modelo de matriz homogênea, de invólucro enriquecido com fármaco e o de núcleo enriquecido com fármaco (Müller *et al*, 2000).

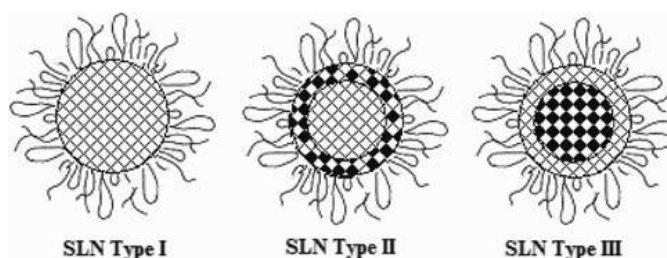


Figura 3 – Tipos de SLN. Os quadrados a negro correspondem a moléculas de fármaco (Adaptado de Souto *et al*, 2007)

As diferenças entre estes três modelos residem principalmente na composição da formulação, isto é, da natureza química da entidade bioativa, do lípido, e do tensioativo. O **modelo de matriz homogênea**, caracteriza-se por conter o fármaco molecularmente disperso no núcleo lipídico, ou seja o fármaco encontra-se sob a forma de aglomerados amorfos no interior da partícula. Este tipo de SLN é obtido recorrendo à técnica de Homogeneização de Alta Pressão (HPH), tanto a quente como a frio. Devido à sua estrutura, este tipo de nanopartícula pode ser utilizada para modificar o perfil de libertação de um fármaco (Müller *et al*, 2000). O **modelo de invólucro de fármaco**, como o próprio nome indica, consiste numa partícula com uma parede externa de fármaco que cobre um núcleo lipídico. Tal como o anterior, este modelo é obtido por HPH, mas apenas a quente. Este modelo pode ser aplicado a SLN destinadas a aplicação tópica, pois aumenta permeação cutânea e a biodisponibilidade do fármaco através da libertação imediata do fármaco e consequente efeito oclusivo resultante do núcleo lipídico. Contudo ao contrário da matriz homogênea, não permite modificar o perfil de libertação do fármaco, já que este encontra-se à superfície da partícula (Müller *et al*, 2000). Por fim o **modelo de núcleo de fármaco** caracteriza-se por ser o oposto do

modelo anterior. Neste caso, durante a produção o fármaco precipita em primeiro lugar, formando-se um núcleo enriquecido com fármaco e um involucro externo de lípido. Forma-se também por HPH a quente, e trata-se de um modelo útil quando se pretende uma libertação controlada de fármaco (Westesen *et al*, 1997).

ii. Vetores lipídicos nanoestruturados (NLC - Nanostructured lipid carrier)

No início da última década surgiram os NLC, que constituem a segunda geração de nanopartículas lipídicas, e têm como objetivo minimizar os potenciais problemas associados às SLN. Como já foi referido, a principal diferença entre as NLC e SLN, reside no facto de as NLC apresentarem uma matriz nanoestruturada, cujo objetivo é aumentar a capacidade de carga de fármaco e prevenir a sua expulsão do interior das nanopartículas durante o armazenamento, conferindo uma maior flexibilidade para modular a sua libertação (Wissing *et al*, 2002). Tal como nos SLN existem três modelos de NLC (Figura 4), o modelo de cristal imperfeito, amorfo e o múltiplo.

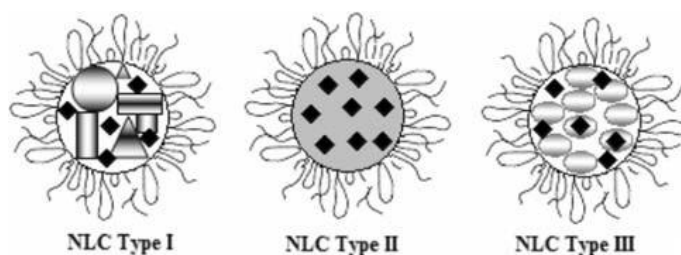


Figura 4 – Tipos de NLC. Os quadrados a negro correspondem a moléculas de fármaco (Adaptado de Souto *et al*, 2007)

O **modelo de cristal imperfeito** é assim designado pois contém inúmeras imperfeições na sua estrutura que permitem a inclusão de uma elevada quantidade de fármaco. Estas imperfeições devem-se à utilização de ácidos gordos com cadeias de tamanhos diferentes, que permitem que haja um elevado número de espaços disponíveis para alojar moléculas de fármaco (Wissing *et al*, 2002). Segundo o mesmo autor, o **modelo amorfo** é obtido a partir de uma mistura de lípidos que têm a capacidade de não recristalizar depois da homogeneização e arrefecimento da nanoemulsão. As nanopartículas de estrutura amorfa têm a vantagem de minimizar a quantidade de fármaco expulso durante o armazenamento. O **modelo do tipo múltiplo** caracteriza-se por ser uma emulsão de óleo em lípido sólido em água (O/LS/A). As nanopartículas

deste tipo são concebidas pela técnica de HPH a quente, onde se misturam os lípidos sólidos com lípidos líquidos (óleos), numa razão entre si que ultrapassa a capacidade de solubilização das moléculas de lípido líquido no lípido sólido, originando uma separação de fases e a formação de “nanocompartimentos” de lípido líquido na matriz lipídica sólida (Wissing *et al*, 2002). A maior parte dos fármacos lipófilos tem maior solubilidade em lípidos líquidos, e por essa razão a capacidade de encapsulação desse tipo de substâncias pode ser aumentada através da utilização deste tipo de NLC (Jenning *et al*, 2000).

IV. Métodos de produção de micro e nanopartículas

Existem inúmeros métodos de produção de micro e nanopartículas. Neste trabalho pretende-se apenas fazer uma referência às técnicas mais representativas de cada grupo de materiais.

1. Métodos recorrendo a polímeros

Existem três formas de produção de micro e nanopartículas: produção a partir da polimerização de monómeros, de polímeros préformados e através de macromoléculas naturais (Reis *et al*, 2006). Considerando os métodos mais representativos, a produção por polimerização de monómeros inclui: polimerização de emulsão, polimerização interfacial e a policondensação interfacial.

A produção por polimerização de polímeros préformados compreende: emulsificação e evaporação do solvente; deslocamento de solvente e deposição interfacial; emulsificação e difusão do solvente e salting-out (Reis *et al*, 2006).

2. Métodos recorrendo a lípidos

De entre todos os métodos de produção de SLN e NLC destacam-se três técnicas: a homogeneização por alta pressão (HPH), que pode ser processada acima ou abaixo da temperatura ambiente, subdividindo-se em HPH a quente e HPH a frio, respetivamente; a microemulsão e a emulsificação-evaporação do solvente (Souto e Lopes, 2011).

V. Técnicas de produção de micro e nanocápsulas

Existem várias técnicas de preparação de micro e nanocápsulas, divididas sob três categorias: as técnicas físicas, as químicas e as físico-químicas. A escolha do método vai depender de fatores, como as características e propriedades da substância, do material encapsulante, o mecanismo de libertação da substância encapsulada e os requisitos do produto final (Bansode *et al*, 2010). Idealmente, o método de encapsulação deve ser simples, reprodutível, rápido e fácil de se transpor para a escala industrial (Silva *et al*, 2003). Mais uma vez, neste trabalho pretende-se apenas fazer uma breve referência às técnicas mais representativas de cada uma das categorias.

1. Métodos físicos:

- i. Revestimento em recipiente rotativo: O processo de revestimento em recipiente rotativo (“pan coating” na língua anglo-saxónica) é um dos métodos mais antigos na elaboração industrial de micropartículas. Com a aplicação deste processo obtém-se normalmente partículas sólidas de tamanho grande, aproximadamente 600 µm, e eficazmente revestidas (Leon *et al*, 1990). Na prática, as partículas sólidas da substância a encapsular sofrem rotação e, sobre estas, é vertido ou atomizado o agente encapsulante fundido ou dissolvido. À medida que o agente encapsulante é lançado numa turbina (recipiente rotativo) uma corrente de ar quente passa através do material encapsulado a fim de remover o solvente da solução do agente encapsulante (Leon *et al*, 1990). Existem alguns fatores que interferem na encapsulação por revestimento em recipiente rotativo, tais como, a rotação, o diâmetro, a capacidade da turbina, a forma e tamanho das partículas sólidas que constituem o núcleo, a velocidade de atomização do agente encapsulante e o tempo de revestimento (Bansode *et al*, 2010).
- ii. Extrusão centrífuga: A encapsulação por extrusão centrífuga com múltiplos orifícios é uma técnica utilizada principalmente no caso de compostos termossensíveis, como por exemplo flavonoides e a vitamina C (Azeredo, 2005). Este método envolve a dispersão do material a encapsular na massa fundida do

agente encapsulante. A dispersão é forçada a passar, através de um extrusor rotativo contendo uma matriz com múltiplos orifícios, em direção a um banho frio de líquido desidratante (*e.g.* isopropanol). O movimento de ar quebra o material do núcleo em pequenas gotículas esféricas, sendo a parede de cada uma delas revestida de uma forma contínua com o agente encapsulante (Azeredo, 2005). Nesta fase, qualquer porção oleosa é removida da superfície. Os filamentos do material extrusado são fracionados em fragmentos menores, separados e secos recorrendo a um agente antiaglomerante (*e.g.* tripolifosfato de cálcio) (Shahidi e Han, 1993). No método por extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, as variáveis de processamento incluem: a velocidade rotacional da matriz; a velocidade de fluxo do núcleo e do agente encapsulante; a concentração, a viscosidade e a tensão superficial do material a encapsular (Venkatesan *et al*, 2009).

- iii. Secagem por pulverizador: “Spray-drying”, na língua anglo-saxónica, é uma técnica que permite a criação de cápsulas de matriz sólida utilizando quer polímeros hidrofóbicos quer hidrofílicos, através da pulverização de misturas líquidas como soluções, emulsões ou suspensões, para um meio de secagem a quente (Figura 5) (Re, 2006). O design do atomizador influencia diretamente o tamanho de partícula do produto final (Vehring, 2008). As vantagens deste processo traduzem-se na fácil elevação da escala de produção, no seu elevado grau de reprodutibilidade e na estreita distribuição do tamanho de partículas, ou seja origina partículas com baixo índice de polidispersão. Por outro lado, existem desvantagens como o facto de poder ocorrer a aglomeração de partículas e de haver uma perda considerável de produto, pois as partículas aderem à parede interior do aparelho (Lima *et al*, 2012).

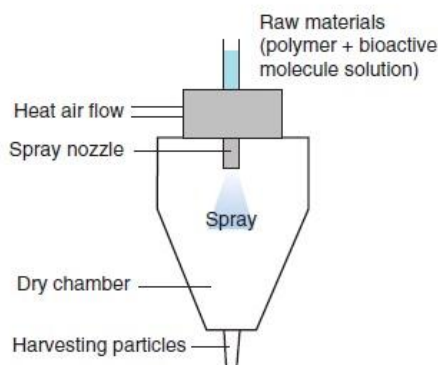


Figura 5 - Técnica de secagem por pulverizador (Adaptado de Lima *et al*, 2012)

2. Métodos químicos:

- i. Polimerização *in situ*: O mecanismo geral deste método baseia-se na formação de microcápsulas por polimerização dos monómeros que são colocados no reator de polimerização (Kasturagi *et al*, 1995). A polimerização *in situ* em sistema emulsionado é um método que ocorre normalmente num meio composto por água, monómero, tensioativo e um agente iniciador (Vieira *et al*, 2002). De uma forma resumida, o princípio do processo de polimerização em emulsão, resume-se às seguintes etapas: primeiro o tensioativo adsorve à superfície da substância a encapsular, formando micelas em volta desta. De seguida o monómero solubiliza-se nas micelas que foram adsorvidas à superfície, e por fim ocorre a polimerização dos monómeros e dos oligoradicaís que estão presentes no interior das micelas adsorvidas, obtendo-se como resultado final a substância encapsulada no polímero (Bourgeat-Lami, 2002).
- ii. Polimerização interfacial: A polimerização interfacial baseia-se na polimerização de monómeros reativos na interface de duas fases imiscíveis. Neste método, dois monómeros reativos são dissolvidos separadamente em líquidos imiscíveis, sendo que um monómero é solúvel na fase aquosa e o outro monómero é solúvel na fase orgânica. A fase orgânica é dispersa na fase aquosa, juntamente com o agente a encapsular. Após isto, os monómeros reagem entre si de forma rápida na interface das fases aquosa e orgânica, formando uma fina película de polímero. Esta técnica apresenta algumas limitações devido à toxicidade dos monómeros que não reagem, à elevada permeabilidade do revestimento e à fragilidade das membranas obtidas (Silva *et al*, 2003).

3. Métodos físico-químicos:

- i. Coacervação-Separação de fases: O método de separação de fases é baseado na diminuição da solubilidade do polímero encapsulante através da adição de um não-solvente à solução orgânica contendo o polímero e o composto bioativo. Durante este processo são geradas duas fases líquidas separadas: o núcleo da cápsula e o polímero envolvendo o núcleo (Jain, 2000). Durante a coacervação outras entidades

moleculares podem ser incluídas nas partículas, tais como componentes de ligação que podem interagir com as moléculas bioativas (Heller, 2006). O processo acontece em três passos básicos ilustrados na Figura 6. A técnica de coacervação é um método aquoso capaz de encapsular compostos bioativos solúveis e insolúveis em água, com uma eficácia razoável. O grande inconveniente desta técnica é a dificuldade de transposição para uma escala de produção superior, que advém da dificuldade de controlar vários parâmetros de processamento, tais como a taxa de adição de não-solventes, as condições de agitação e a viscosidade dos dois meios orgânicos. Outras desvantagens da técnica de coacervação incluem: a aglomeração de partículas, a necessidade de grandes quantidades de solvente orgânico e a dificuldade de remoção de solventes residuais das partículas finais (Jain, 2000).

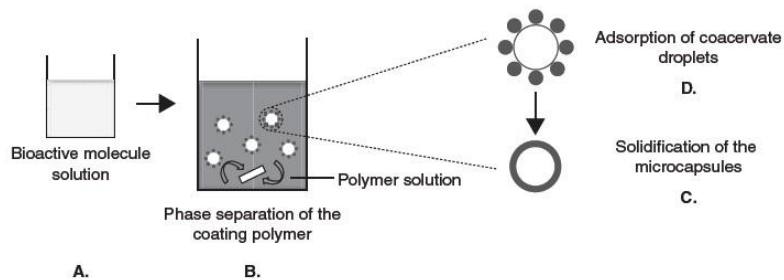


Figura 6 – Técnica de coacervação-separação de fases (Adaptado de Lima *et al*, 2012)

(Legenda: A – Solução de molécula/entidade bioativa; B – Separação de fases do polímero de revestimento; C – Solidificação das microcápsulas; D – Adsorção das gotículas coacervadas)

- ii. Evaporação de Solvente: Os processos são realizados num líquido de produção de veículo. O revestimento das cápsulas é dissolvido num solvente volátil, que é imiscível com a fase líquida de fabrico do veículo. O material de núcleo a ser encapsulado é dissolvido ou disperso na solução do polímero que o vai revestir. Posteriormente e com agitação, a mistura dos materiais de núcleo e de revestimento é dispersa na fase líquida de veículo para se obter um tamanho de microcápsula apropriado (Suave *et al*, 2006). Se necessário, a mistura é aquecida para evaporar o solvente do polímero. Se o material do núcleo for disperso na solução o polímero vai contrair em torno do núcleo, se por outro lado este for dissolvido na solução de revestimento forma-se uma microcápsula do tipo matricial. Uma vez que todo o solvente do polímero é evaporado, a temperatura do veículo líquido é reduzida até à temperatura ambiente com agitação contínua. Nesta fase, as cápsulas podem ser utilizadas na forma de suspensão coberta com substratos ou isoladas na forma de

pós. A técnica de evaporação de solvente para produzir microcápsulas é aplicável a uma ampla variedade de materiais de núcleo líquidos e sólidos. Existe ainda uma grande variedade de polímeros formadores de filme que podem ser utilizados como material de revestimento (Zanneti *et al*, 2002).

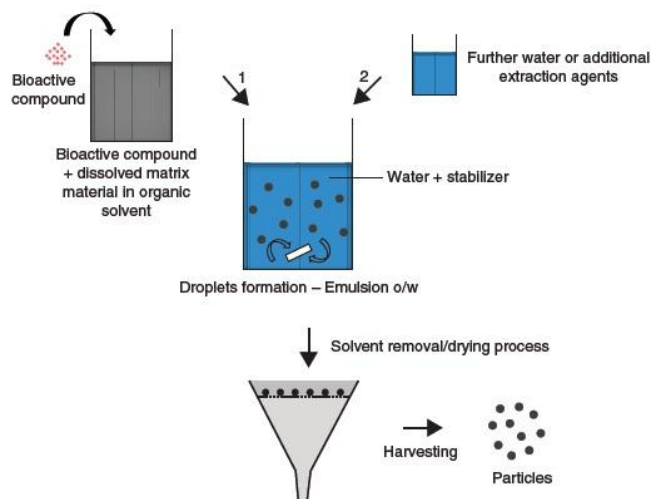


Figura 7 – Técnica de evaporação de solvente (Adaptado de Lima *et al*, 2012)

iii. Precipitação com fluídos supercríticos: Os fluídos supercríticos (FSC) são utilizados em várias tecnologias biomédicas, incluindo o desenvolvimento de partículas para a encapsulação de moléculas bioativas. O princípio baseia-se no facto da expansão rápida dos FSC provocar a precipitação dos solutos dissolvidos neles próprios (Smith, 1986). Dependendo do tipo de material, das moléculas a serem encapsuladas e das características do produto final, o FSC pode ser utilizado como um solvente, um soluto, um antissolvente ou um adjuvante da dispersão num aerossol (Tandya *et al*, 2007). As técnicas de encapsulamento mais comuns que utilizam FSC são: a expansão rápida de soluções supercríticas e o gás antissolvente. Na expansão rápida de soluções supercríticas, a molécula bioativa e o polímero são dissolvidos num FSC a uma pressão elevada e após uma descompressão rápida (expansão) a precipitação ocorre. Após a expansão e precipitação, o FSC torna-se num gás, o que significa que o produto final se encontra puro e no estado sólido, permitindo a sua recuperação sem qualquer vestígio de solvente. No processo de gás antissolvente, os solutos (polímero e molécula bioativa) são dissolvidos numa fase orgânica adequada. De seguida a solução é pressurizada e o FSC, que atua como o gás antissolvente entra na solução, fazendo precipitar os solutos. A pressão

é então reduzida e o produto sólido recolhido. Esta técnica é adequada nas situações em que é difícil dissolver os polímeros ou moléculas bioativas no FSC, tais como péptidos ou proteínas (Reverchon *et al*, 2008; Yeo *et al*, 2001). A utilização de FSC em vez de solventes orgânicos apresenta diversas vantagens. Por exemplo, o FSC mais comum é o CO₂ que se caracteriza por ser não-tóxico, aceitável para o ambiente, não inflamável e de baixo custo. Além disso, este tipo de processo não requer temperaturas elevadas, tem potencial de expansão para uma escala superior de produção e pode ser aplicado em condições de assepsia. Todavia, também tem as suas desvantagens, como a difícil dissolução de alguns polímeros e fármacos no FSC e o facto do mecanismo de controlo da morfologia das partículas obtidas não ser fácil (Shine e Gelb, 1998).

VI. Avaliação da biodisponibilidade de micro e nanosistemas

Pouco se sabe sobre a absorção de micro e nanopartículas através das membranas gastrointestinais e sua posterior acumulação em órgãos alvo secundários. De uma forma geral pensa-se que a sua absorção em células isoladas é dependente do tamanho e da carga superficial das partículas (He *et al*, 2010; Geiser *et al*, 2005). Já no que concerne à membrana intestinal, acredita-se que a absorção para a circulação é de algum modo dependente do tamanho (Florence *et al*, 1995). Apesar de existirem vários estudos que descrevem a absorção de nanopartículas em sistemas *in vitro*, apenas um pequeno número de artigos é que se concentra na orientação de micro e nanosistemas para alvos biológicos, tratando-se de uma necessidade urgente na investigação farmacêutica (Florence, 2007).

Schleh e colaboradores (2012) elaboraram um estudo em que o principal objetivo passou por considerar as características físico-químicas que determinam a absorção através das membranas intestinais, bem como a acumulação em órgãos-alvo secundários. Schleh *et al* (2012) utilizaram nanopartículas de ouro para administração de um fármaco, com cinco tamanhos diferentes (1.4, 5, 15, 80 e 200 nm), bem como nanopartículas com cargas de superfície opostas (positiva e negativa) e tamanho igual (2.8 nm). As nanopartículas foram aplicadas por administração intraesofágica em ratos fêmeas, adultos e saudáveis. Após 24 horas fizeram a determinação da biodistribuição de 100% das nanopartículas administradas. Este é um dos primeiros estudos que descreve a absorção e a acumulação de nanopartículas em órgãos-alvo secundários, após a sua ingestão. Os investigadores conseguiram demonstrar com este estudo que a absorção das nanopartículas através das membranas intestinais e a sua consequente acumulação em órgãos secundários é em grande parte dependente do tamanho e carga de superfície das partículas. Assim, concluíram que um menor tamanho e uma carga negativa conduzem a uma maior absorção e acumulação. Esta premissa é corroborada por uma outra investigação (Desai *et al*, 1997), onde nanopartículas com 100 nm revelaram ter uma absorção 2,5 vezes superior a micropartículas com 1 µm, e 6 vezes superior a micropartículas com 10 µm. Resultados semelhantes foram obtidos noutro estudo dos mesmos autores (Desai *et al*, 1996), quando foi testada a absorção num modelo de intestino de rato, revelando uma eficácia de absorção das nanopartículas com 100 nm comparativamente às micropartículas de 1 µm e 10 µm, de 15 e 250 vezes

superior, respetivamente. No mesmo estudo concluíram que as nanopartículas têm a capacidade de penetrar através de camadas submucosas, enquanto as micropartículas ficam localizadas predominantemente no epitélio.

Em outros estudos idênticos, outros investigadores (Chen e Langer, 1998; Panyam e Labhasetwar, 2003) chegaram à mesma conclusão, ou seja que o tamanho das partículas é determinante na absorção através do epitélio e mucosa gastrointestinal. Revelando assim um elevado potencial das nanopartículas na administração oral de compostos bioativos, comparativamente com partículas transportadoras de tamanho superior.

Num estudo diferente (Kroll *et al*, 1998) foi comprovado ainda que as nanopartículas conseguem atravessar a barreira hematoencefálica através da abertura de junções estreitas recorrendo a manitol hiperosmótico. Este tipo de estratégia revela-se vantajosa, na medida em que permite a libertação prolongada de agentes terapêuticos em doenças com difícil acesso, como por exemplo tumores cerebrais.

VII. Encapsulação: estratégia para estabilização de entidades bioativas: proteínas, enzimas e bacteriófagos

Pelo termo “encapsulado/a” entende-se que as entidades bioativas imobilizadas encontram-se revestidas com determinada substância (agente encapsulante) que aumenta a sua proteção e resistência contra stresses físico-químicos sejam eles bióticos ou abióticos. A imobilização de entidades bioativas pode ser definida como a restrição ou circunscrição do seu movimento numa fração ou fase de um sistema, por consequência do alojamento no interior ou na superfície de uma matriz ou agente imobilizador. A imobilização tem como objetivo a estabilização estrutural e/ou funcional das entidades bioativas, protegendo-as de tensões e fatores ambientais como a temperatura, pH, sais, solventes orgânicos, e outros agentes que possam interferir com a atividade das mesmas. Logo, o aprisionamento das biomoléculas leva ao aumento da sua estabilidade termodinâmica, que por si pode ser correlacionada com a alteração das condições termodinâmicas no seu microambiente circundante, alterações essas que resultam da diminuição dos movimentos das moléculas de solvente circunvizinhas a cada molécula encapsulada. Consequentemente, este efeito traduz-se num aumento da viscosidade vibracional, translacional e rotacional da biomolécula, permitindo que esta tenha uma arquitetura tridimensional mais rígida e que concomitantemente ocorra a diminuição da entropia, originando uma biomolécula estável (Balcão *et al*, 2013). O aumento da viscosidade e confinamento entrópico (aprisionamento físico) representam uma grande vantagem biotecnológica porque retardam as taxas de reação e degradação, permitindo que os materiais biológicos como proteínas, enzimas ou bacteriófagos sejam estabilizados para armazenamento.

Atualmente existe uma panóplia de técnicas de imobilização, assim como de suportes ou materiais naturais e sintéticos, e tal como já foi referido, não é possível definir um método universal que se adapte a todos os materiais e bioprocessos. A escolha da metodologia e do tipo de suporte vai estar dependente da conjugação de três fatores: as características da entidade biológica, as condições de utilização do suporte, e da técnica que garanta uma maior retenção da bioatividade (Balcão e Malcata, 1998). A imobilização por via da encapsulação à micro ou nano escala, consiste na contenção em membranas préformadas ou na formação *in situ* de uma membrana que envolva as entidades bioativas (Balcão *et al*, 1996). A encapsulação revela diversas vantagens em

relação às outras técnicas de imobilização, como por exemplo a agregação/floculação ou o aprisionamento em matrizes porosas, nomeadamente pela maior capacidade de carga, ou seja, pela maior contenção de moléculas e ainda pela menor perda das mesmas para o meio externo (Puapermpoonsiri *et al*, 2009).

VIII. Proteínas

As proteínas são biomoléculas com diversas funções biológicas, como estrutural, nutricional, hormonal e catalítica. Executam processos e reações biológicas, são por exemplo, enzimas, ligandos para sinalização, recetores, anticorpos e fatores de transcrição, tendo por isso desenvolvido elevada especificidade e potência. Por tudo isto, as proteínas são consideradas candidatas óbvias a fármacos. O aparecimento e desenvolvimento da engenharia genética permitiram a produção em grande escala de praticamente qualquer proteína para fins terapêuticos. Além disso, a informação genómica, cada vez mais disponível, promete manter a uma taxa crescente o desenvolvimento de fármacos proteicos (Putney, 1998). O desenvolvimento de proteínas como fármacos enfrenta muitos desafios porque os processos de produção requerem condições substancialmente diferentes daqueles em que as proteínas existem naturalmente. Na natureza, as proteínas são sintetizadas em pequenas quantidades, atuando geralmente de um modo transiente e estabilizadas pelo meio celular e extracelular. Em contrapartida, para ser bem sucedida como agente terapêutico uma proteína deve ser altamente purificada e concentrada, e ter um tempo de vida útil de pelo menos dois anos. Em comparação com os fármacos de baixo peso molecular, as proteínas são moléculas grandes, com arquitetura complexa e portanto inerentemente menos estáveis (Putney, 1998).

As proteínas possuem estrutura secundária, terciária e em alguns casos, estrutura quaternária com ligações lábeis e cadeias laterais com grupos quimicamente reativos. A perturbação destas estruturas (por desnaturação ou agregação) ou a modificação das cadeias laterais pode muitas vezes resultar na perda da bioatividade ou no aumento da imunogenicidade. Apesar destes desafios, os avanços na estabilização e formulação de proteínas permitiu a chegada ao mercado de centenas de fármacos proteicos (Putney, 1998). Os fármacos proteicos possuem geralmente uma atividade fraca ou nula quando são administrados por via oral, pois são compostos altamente suscetíveis à proteólise no trato gastrointestinal (Moutinho *et al*, 2011). Mesmo quando administrados pela via intravenosa, este tipo de fármacos têm um tempo de vida curto. Logo os fármacos proteicos são considerados mais instáveis em comparação com os fármacos convencionais sintéticos, pois desnaturam facilmente, o que resulta na perda da sua bioatividade. A desnaturação pode ocorrer por diferentes mecanismos, nomeadamente

por agregação e desagregação ou desenrolamento das cadeias peptídicas ou subunidades proteicas. Outros fatores desnaturantes incluem o contacto com solventes orgânicos ou a agitação mecânica durante o processo de produção (Duncan *et al*, 1995). A administração péptidos e fármacos proteicos na sua forma encapsulada acarreta então algumas dificuldades, especialmente porque a maior parte possui uma importante componente hidrofóbica, e assim apresentam uma tendência para adsorver a superfícies, como o plástico ou o vidro. Este tipo de comportamento pode conduzir a perdas significativas da quantidade de macromolécula disponível que chega ao local alvo (Duncan *et al*, 1995).

1. Definição de estabilidade proteica

O termo estabilidade proteica refere-se à capacidade de uma proteína resistir a fatores ou condições adversas, como agentes desnaturantes ou temperatura, ou seja, é a aptidão das proteínas manterem a sua integridade molecular e função biológica face a altas temperaturas ou outros fatores destabilizantes. Uma proteína estruturalmente inalterada e perfeitamente funcional pode perder a sua bioatividade através do desdobramento da sua estrutura terciária num polipéptido desorganizado em que os seus locais-chave deixam de interagir e estar alinhados na forma estrutural estável que permite a sua bioatividade (Fágáin, 1995). Este tipo de desdobramento caracteriza o fenómeno de desnaturação. Desde que as cadeias polipeptídicas não sofram nenhuma alteração química, se removermos o agente desnaturante, o fenómeno de desnaturação é reversível. Se por outro lado a proteína sofrer alterações químicas nas suas cadeias, pode ocorrer uma perda irreversível da bioatividade, ou seja, inativação da proteína (Fágáin, 1995). Um polipéptido desdobrado encontra-se muito mais suscetível à proteólise do que na sua forma globular e bem empacotada (Parsell e Sauer, 1989). O desdobramento pode resultar na perda de um cofator essencial para a função de uma proteína de tal modo que a sua bioatividade não seja recuperada, mesmo que o desdobramento seja revertido. As cadeias polipeptídicas desdobradas podem agregar-se, formando uma massa inativa e insolúvel, enquanto as cadeias individuais podem “tentar” retomar a conformação original, mas redobrando-se sob uma forma cineticamente incorreta. As ligações peptídicas e as cadeias laterais dos aminoácidos são quimicamente reativas e podem participar em reações prejudiciais à conformação da

proteína, em especial a temperaturas elevadas ou em condições de armazenamento inadequadas (Fágáin, 1995). Segundo o mesmo autor, existem dois tipos definidos e distintos de estabilidade proteica, a estabilidade termodinâmica ou conformacional, e a estabilidade cinética. A estabilidade termodinâmica diz respeito à resistência da conformação dobrada da proteína contra a desnaturação, enquanto a estabilidade cinética mede a resistência à inativação irreversível, por exemplo, a persistência da bioatividade da proteína (Mozhaev, 1993).

2. Alterações químicas

De acordo com Means e Feeney (1990), cada um dos aminoácidos que podem estar presentes nas proteínas tem um grupo-R livre ou cadeias laterais. Muitos destes têm grupos funcionais reativos, tais como o grupo tiol da cisteína, ou o grupo amina da lisina. Pelo menos nove aminoácidos (Cys, Lys, Asp, Glu, Arg, His, Trp, Tyr e Met) possuem cadeias laterais capazes de reagir com reagentes específicos e gerar derivados proteicos quimicamente modificados, com as suas propriedades conseqüentemente alteradas (Means e Feeney, 1990). A escolha cuidadosa dos agentes químicos e das condições de produção/trabalho com as proteínas pode muitas vezes minimizar as perdas da bioatividade. O leque disponível de reagentes adequados à estabilização proteica está em constante expansão, devido à necessidade de eficientes procedimentos de imobilização (Means e Feeney, 1990). Por outro lado existem alterações químicas nas proteínas que podem ser induzidas para melhorarem a sua estabilidade. Existem três estratégias de modificação química que podem beneficiar a estabilidade proteica: o *crosslinking* (inter e intramolecular), a modificação dos grupos de superfície e o acoplamento covalente de polímeros, tais como, o polietilenoglicol ou polissacarídeos (Lundblad e Noyes, 1984).

3. Uso terapêutico de proteínas e péptidos

Os péptidos/proteínas terapêuticos têm um elevado potencial para o diagnóstico e cura de doenças, originando efeitos secundários mínimos. Vários péptidos de potencial terapêutico são bem conhecidos e caracterizados, contudo a sua utilização encontra-se

restrita devido a uma menor estabilidade estrutural e funcional e à suscetibilidade à proteólise.

A insulina foi o primeiro peptídeo a ser utilizado como agente terapêutico (Leader *et al*, 2008). No entanto, atualmente a terapia com proteínas inclui mais de 130 proteínas terapêuticas aprovadas para uso clínico pela Food and Drug Administration (FDA). Encontrando-se ainda mais de 1000 proteínas/peptídeos em fases de ensaio clínico ou de aprovação pela FDA (Leader *et al*, 2008). Este tipo de terapêutica é atualmente distinguido e preferido devido à sua elevada especificidade e complexo conjunto de funções, tais como: menos interferência nos processos biológicos e menor probabilidade de causarem respostas imunitárias. Outras premissas que a distinguem são o facto de permitirem um tratamento de substituição eficaz nos casos de proteínas biológicas mutadas ou em défice, e ainda o facto do desenvolvimento clínico e período de aprovação por parte das autoridades competentes serem rápidos (Reichert, 2003).

A desnaturação e o efeito de primeira passagem sobre a proteína/péptido antes destes atingirem o alvo são outros grandes entraves à sua utilização como agentes terapêuticos. Contudo, com o desenvolvimento da nanotecnologia, o campo da terapia com proteínas atingiu um crescimento exponencial. A insulina, pela sua importância, é um exemplo de um elemento que capta muito interesse no desenvolvimento futuro de formulações de peptídeos na medicina (Yadav *et al*, 2011). A encapsulação de péptidos terapêuticos sobre a forma de nanotransportadores biodegradáveis e biocompatíveis surge então como uma solução, eliminando a possibilidade de degradação, de deformações estruturais e funcionais e da metabolização precoce. A encapsulação destes peptídeos é um dos primeiros passos no desenvolvimento da micro e nanomedicina, como por exemplo na compreensão, controlo e aplicação das interações entre biomoléculas-micro/nanomateriais para o diagnóstico médico, no aumento da atividade terapêutica destes agentes e no desenvolvimento de micro e nanocompósitos médicos (*e.g.* nanoparticulas, nanofibras, nanoplaquetas) (Yadav *et al*, 2011).

Devido à sua natureza não invasiva, a administração oral de fármacos é a via preferível de entre todas as vias de administração existentes. A via oral apresenta a vantagem de evitar a dor e desconforto associados à via intravenosa, bem como reduzir ou eliminar a problemática das contaminações (Rieux *et al*, 2006). No entanto, para poderem ser administrados fármacos bioativos como peptídeos e proteínas por esta via, estes devem conseguir resistir aos ambientes hostis gástrico e intestinal, e persistir no lúmen

intestinal por tempo suficiente para que haja adesão à superfície apical das células e sejam absorvidos. Ou seja, quando administrados na sua forma livre os péptidos e proteínas possuem uma baixa biodisponibilidade, devido principalmente à sua baixa permeabilidade nas mucosas e à falta de estabilidade no ambiente gastrointestinal, o que resulta na degradação do composto bioativo antes da sua absorção (Rieux *et al*, 2006).

Durante as últimas duas décadas, muitos estudos têm-se centrado no aperfeiçoamento da administração oral de péptidos e proteínas, sendo a sua associação com transportadores coloidais, tais como micro e nanopartículas, uma das mais importantes e promissoras abordagens propostas para melhorar a sua biodisponibilidade oral (Steffansen *et al*, 2004). As micro e nanopartículas possuem especial interesse da indústria farmacêutica pela seguinte ordem de razões: são mais estáveis no trato gastrointestinal do que outros transportadores coloidais, tais como lipossomas, e podem proteger os fármacos encapsulados do ambiente gastrointestinal. O uso de vários materiais poliméricos permite a modulação das características físico-químicas (tais como, hidrofobicidade e potencial zeta), as propriedades de libertação do composto bioativo (retardada, prolongada, desencadeada) e o comportamento biológico (segmentação, bioadesão e absorção celular) das micro e nanopartículas (Galindo-Rodriguez *et al*, 2005). Além disso, as dimensões e a grande área de superfície deste tipo de partículas favorecem a sua absorção em comparação com transportadores de maiores proporções. Consequentemente já foi demonstrado que a micro e nanoencapsulação de péptidos e proteínas protege-as contra o ambiente adverso do trato gastrointestinal (Lowe e Temple, 1994) e aumentam o seu transporte através da mucosa gastrointestinal (Mathiowitz *et al*, 1997). Existem diversas estratégias desenvolvidas para melhorar a biodisponibilidade oral de péptidos e proteínas encapsuladas. Contudo, há duas abordagens principais para melhorar significativamente transporte através da mucosa gastrointestinal:

- i. Modificação das propriedades físico-químicas da superfície das micro e nanocápsulas;
- ii. Acoplação de uma molécula orientadora (com afinidade para o local ou célula alvo) à superfície das micro e nanocápsulas.

4. Encapsulação e estabilização de proteínas

A encapsulação de compostos bioativos como as proteínas surge então como uma solução ideal para promover a estabilização e proteger as mesmas de todas as alterações e agentes que possam comprometer a sua utilização. A entrega de moléculas bioativas, tais como genes e proteínas às células-alvo é muito importante para aplicações médicas e biológicas (Nagai, 2005; Tabata, 2006).

As características mais importantes das micro e nanopartículas transportadoras de fármacos são o tamanho, a eficiência de encapsulação e a cinética de libertação. Do ponto de vista económico, a eficiência de encapsulação é de extrema importância, especialmente quando o agente ativo é muito caro, como é comum em medicamentos de origem proteica. Até agora, foram realizados extensos estudos em todo o mundo, no sentido de investigar a eficiência de encapsulação em micropartículas em função dos parâmetros de produção (Feczkoa *et al*, 2011).

Segundo Putney (1998), a dificuldade no desenvolvimento de formulações de proteínas micro e nanoencapsuladas deve-se principalmente à instabilidade das proteínas. Até há poucos anos, a maioria dos procedimentos de encapsulação de proteínas empregavam o tipo de métodos utilizados para produzir as formas de libertação prolongada de fármacos de baixo peso molecular (Pitt, 1990). Porém, a maioria dos métodos que produzem formas de libertação controlada de compostos pequenos e estáveis são demasiado agressivos para a maioria das proteínas. A integridade das proteínas deve ser mantida durante a encapsulação, o armazenamento e após a administração. A estratégia geral passa por evitar o desdobraimento das cadeias polipeptídicas, que expõe os grupos reativos “enterrados” na estrutura da proteína e levam à sua inativação química ou agregação. Além disso, deve ser mantido um microambiente que permita à proteína recuperar sua conformação nativa se ocorrer um desdobraimento parcial. (Putney, 1998).
Todavia, os processos de encapsulação expõem as proteínas a solventes orgânicos, como o cloreto de metileno ou o acetato de etilo. Além disso, as proteínas são geralmente anfipáticas, ou seja contêm uma região hidrofóbica e outra hidrofílica, tendendo a migrar para a interface orgânico-aquosa das micro e nanocápsulas, e as proteínas que se encontram nesta zona estão, geralmente, parcialmente ou completamente desnaturadas. A extensão da desnaturação depende principalmente da estabilidade intrínseca da proteína, por exemplo, as proteínas globulares constituídas principalmente por α -hélices conseguem conservar a sua estrutura na interface (Morlock

et al, 1997). Porém, mesmo com estes inconvenientes, a encapsulação de proteínas tem ganho importância como uma das formas preferidas para a sua administração (Johansen *et al*, 2000).

Diwan e Park (2001) desenvolveram um estudo onde abordam esta problemática. Através da conjugação das proteínas com polietilenoglicol (PEG) ou peguilação, conseguiram aumentar a estabilidade estrutural e funcional das proteínas. Demonstraram *in vivo*, que as proteínas peguiladas têm um maior tempo de semivida em circulação em comparação com as proteínas nativas. Assim, a peguilação revela ser um processo vantajoso para várias proteínas terapêuticas e, portanto importante para a sua comercialização (Kodera *et al*, 1998). Em suma, Diwan e Park (2001) concluíram que a peguilação da proteína protege-a contra as condições adversas e prejudiciais presentes no processo de encapsulação, minimizando também a libertação inicial de grande quantidade de proteína das micro ou nanocápsulas, facilitando o processo de libertação prolongado. A conjugação com PEG resultou ainda numa menor agregação entre proteínas e reduziu adsorção das mesmas, fatores que contribuem para a libertação praticamente total da proteína das micro ou nanocápsulas.

Os métodos mais utilizados para a encapsulação de proteínas são a emulsão múltipla, a secagem por pulverização e a coacervação-separação de fases (Sinha e Trehan, 2003). Porém de entre todas as técnicas possíveis para a encapsulação de proteína, a mais utilizada é sem dúvida o método de emulsão dupla A/O/A (Bilati *et al*, 2005). Este é um método adequado para a incorporação de um fármaco hidrofílico, na medida em que o fármaco é primeiro dissolvido na fase aquosa interior, e em seguida aprisionado dentro de um polímero, resultando num sistema de matriz (esfera) ou reservatório (cápsula). Resumidamente, uma solução aquosa do fármaco hidrofílico é emulsionada numa solução orgânica do polímero. A emulsão primária ou fase interna (A/O) é vertida para uma segunda fase aquosa ou fase externa, contendo um tensioativo para se formar a emulsão dupla A/O/A (Bilati *et al*, 2005). O solvente orgânico é então removido por evaporação ou extração originando as micro ou nanocápsulas endurecidas em meio aquoso. A técnica de emulsão dupla é adequada para muitas proteínas, embora estas possam ser submetidas a vários fatores de stress durante este processo. A interface entre a água e um solvente é um fator destabilizador bem conhecido (Van de Weert *et al*, 2000; Kwon *et al*, 2001). Tipicamente, as proteínas tornam-se especialmente propensas à agregação a partir do momento que estas migram e adsorvem à interface. A solução

contra este tipo de interações e outras que provocam a destabilização proteica passa pela utilização de agentes adicionais de estabilização, como BSA (Bovine Serum Albumin) e outras proteínas de baixo custo para a estabilização com base em proteínas, e manitol, PVP (Polivinilpirrolidona) e PEG para regular a pressão osmótica do meio (Myrberg *et al.*, 2007).

Concluindo, apesar de existir uma panóplia de estudos sobre a administração e libertação de proteínas micro e nanoencapsuladas ao longo dos últimos 30 anos, foi somente em 1996 que a primeira formulação encapsulada de libertação prolongada de proteínas entrou em ensaios clínicos (Putney, 1998). À medida que as técnicas de estabilização e encapsulação de proteínas são aplicadas a uma cada vez maior diversidade de proteínas, a terapêutica com formulações proteicas irá tornar-se cada vez mais e melhor estabelecida na prática biomédica. Estas formulações permitem ainda o desenvolvimento de terapêuticas recorrendo a proteínas que, por razões como tempo de semivida curto, toxicidade sistêmica ou a incapacidade de atingir o local de ação, não podem ser desenvolvidas como formulações em solução (Putney, 1998). A conveniência e as vantagens proporcionadas por este tipo de formulações vai muito provavelmente permitir que as terapêuticas proteicas venham, eventualmente, a constituir uma parte significativa das farmacopeias mundiais.

IX. Enzimas

As enzimas são compostas por cadeias de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas, e podem ser consideradas como macromoléculas polifuncionais e carregadas com uma estrutura tridimensional rígida mais ou menos definida. A molécula de enzima típica tem um peso molecular de 30.000 Da (Dalton) e assemelha-se a uma partícula esférica compacta. Muitas enzimas, especialmente aquelas que são reguladas por vários efetores (pequenas moléculas que se ligam seletivamente a uma proteína e regulam a sua bioatividade), são constituídas por mais que uma cadeia de aminoácidos (subunidade), que estão covalentemente ou não covalentemente ligadas. Funcionalmente, as enzimas são biomoléculas sintetizadas pelas células, com a finalidade de obterem determinadas reações bioquímicas. Sendo classificadas também como biocatalisadores, atuam em substratos específicos e originam a transformação/conversão dos substratos em produtos. São biomoléculas medicinalmente, industrialmente e comercialmente muito importantes (Norouzian, 2003). Nos últimos 60 anos tem surgido um interesse cada vez maior na utilização de enzimas como catalisadores industriais. Estas oferecem inúmeras vantagens relativamente aos catalisadores químicos convencionais como por exemplo, exibem elevada atividade catalítica e elevada especificidade para os substratos, minimizam a formação de produtos secundários e podem ser produzidas em grandes quantidades com baixo custo (Gianfreda e Scarfi, 1991). Contudo, a aplicação geral de enzimas nos processos industriais é ainda bastante limitada, pois considerando que um bom catalisador industrial deve ser estável sob as condições de funcionamento durante um longo período de tempo, e a maioria das enzimas são facilmente inativadas pelo calor, agentes químicos, proteases, alterações no meio ou radiações. Com efeito, a utilização prática de enzimas requer, frequentemente, condições de trabalho desnaturantes tais como: temperaturas elevadas para aumentar a produtividade e prevenir a contaminação microbiana, meios orgânico-aquosos com objetivo de deslocar o equilíbrio da reação para obtenção dos produtos desejados e valores de pH reacionais diferentes daqueles em que as enzimas demonstram ter o máximo de estabilidade. Para superar estas limitações, os investigadores dedicam muita atenção à estabilização enzimática (Gianfreda e Scarfi, 1991). Nos últimos anos, têm sido investigadas estratégias a seguir para obter enzimas mais estáveis, sendo que a imobilização tem sido considerada muitas vezes um

excelente método para estabilizar enzimas, tendo sido desenvolvidas várias técnicas (Gianfreda e Scarfi, 1991). O encapsulamento de enzimas em estruturas de tamanho sub-micro acarreta diversas vantagens, como: a proteção da enzima; a possibilidade de recuperação da enzima; o controlo sobre o acesso ao centro catalítico e portanto, aumento da seletividade da mesma; a capacidade de tornar o centro catalítico facilmente acessível aos substratos, devido à elevada relação superfície-volume e permitir que haja um coeficiente de difusão elevado, que resulta das dimensões e da pouca tendência para a sedimentação das micro e nanopartículas (Cellesi e Tirelli, 2006). A redução das interações prejudiciais resulta também num aumento da estabilidade ao pH e à temperatura. Uma encapsulação adequada consegue proteger uma enzima antibacteriana da degradação, mantendo-a na forma ativa enquanto esta circula no organismo. Além disso, a estrutura de suporte (micro ou nanocápsulas) pode adicionar interações biológicas específicas, como por exemplo, favorecer uma localização específica da ação da enzima (Cellesi e Tirelli, 2006). A encapsulação minimiza assim as condições adversas que podem eventualmente causar a desnaturação das enzimas.

1. Desnaturação e estabilização. Significado

A estrutura nativa de uma enzima é geralmente considerada como a conformação exibida pelas enzimas dentro do ambiente celular ou por enzimas isoladas com a sua atividade biológica máxima (Tandord, 1968). A desnaturação das enzimas é um processo que envolve uma alteração da estrutura tridimensional nativa, sem que qualquer sequência de aminoácidos seja alterada (Tandord, 1968). Uma alteração ou desdobramento da estrutura da enzima compromete o arranjo correto do local ativo, e resulta portanto na inativação da enzima (Klibanov, 1983). A estabilização das moléculas enzimáticas significa impedir alterações na estrutura nativa da enzima, preservando assim a sua bioatividade.

2. Imobilização de enzimas

Tradicionalmente, as enzimas eram utilizadas em solução, na sua forma solúvel ou livre, para reagirem com determinado substrato e originarem um produto. Esta forma de utilização das enzimas resultava num imenso desperdício, particularmente quando isto ocorria a nível industrial, pois as enzimas na sua forma livre não são muito estáveis e

não podem ser recuperadas para reutilização. A imobilização de enzimas refere-se à restrição ou ancoragem das mesmas no interior ou na superfície de um suporte inerte que permite a aumentar a sua estabilidade e reutilização funcional. As técnicas de imobilização tornaram as enzimas mais eficientes e mais económicas para o uso industrial. Como foi referido anteriormente, existem diversas vantagens na imobilização de enzimas, tais como:

- Função mais estável e eficiente;
- Possibilidade de reutilização;
- O produto final encontra-se livre de enzima, ou seja menos contaminado, do ponto de vista biotecnológico;
- Permite sistemas de reações multienzimáticas;
- Controlo da função enzimática mais fácil;
- Minimiza os problemas a jusante do processo biotecnológico.

Contudo também existem algumas desvantagens associadas ao processo de imobilização de enzimas:

- Possibilidade de perda de atividade biológica durante a sua imobilização ou utilização;
- A imobilização requer técnicas caras e em alguns casos equipamentos muito sofisticados.

3. Métodos para estabilização por imobilização

A imobilização de enzimas é uma técnica amplamente investigada desde o início da década de 60, e hoje em dia é bastante utilizada, tanto em estudos fundamentais bioquímicos, como em aplicações práticas no campo da indústria biotecnológica (Silman e Katchalski, 1966). Por definição, uma enzima imobilizada é uma proteína fisicamente localizada numa determinada região do espaço ou convertida a partir de um estado móvel solúvel em água para um imóvel e insolúvel em água (Martinek e Mozahev, 1985). As aplicações biotecnológicas das enzimas imobilizadas incluem várias áreas de interesse geral e em particular na química analítica e clínica, na

engenharia alimentar, na síntese orgânica e industrial de compostos químicos e na medicina e tecnologia farmacêutica.

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos vários métodos para imobilização enzimática. De acordo com Gianfreda e Scarfi, é muito difícil identificar uma técnica universal adequada para todas as enzimas. A escolha apropriada do método de imobilização depende muito do tipo de enzima, e da capacidade do mesmo em assegurar um equilíbrio positivo entre as vantagens e desvantagens do processo de imobilização. As técnicas de imobilização mais utilizadas podem ser divididas de acordo com a forma como a enzima fica imobilizada, por ligação química ou por retenção física. Os principais métodos de imobilização são (Gianfreda e Scarfi, 1991):

- Ligação de enzimas a moléculas transportadoras por ligações covalentes;
- Adsorção;
- Aprisionamento em gel ou fibras;
- Crosslinking com reagentes bifuncionais;
- Encapsulamento em micro ou nanocápsulas.

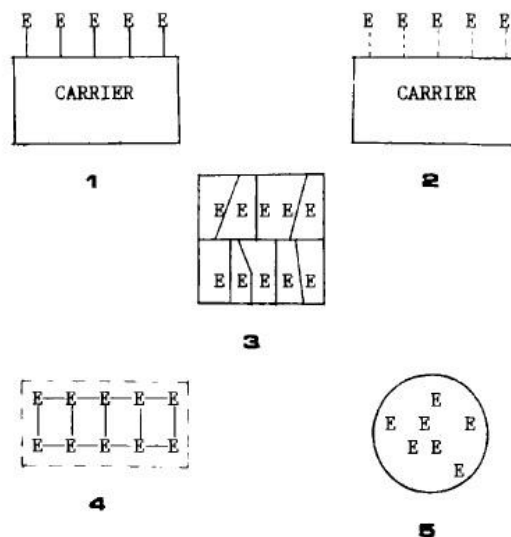


Figura 8 – Tipos de imobilização enzimática. A letra “E” corresponde a uma molécula de enzima
(Adaptado de Gianfreda e Sacarfi, 1991)

(Legenda: 1 - Ligação de enzimas a moléculas transportadoras por ligações covalentes; 2 - Adsorção; 3 - Aprisionamento em geles ou fibras; 4 - *Crosslinking* com reagentes bifuncionais; 5 - Encapsulamento em micro ou nanocápsulas)

i. Estabilização contra a inativação térmica

O calor é de longe um dos mais importantes fatores causadores da perda da bioatividade enzimática. A inativação térmica das enzimas envolve, geralmente, consideráveis alterações na conformação das moléculas proteicas (Tanford, 1968). Estas alterações resultam de uma forma geral num desdobramento parcial da estrutura proteica ao passo que os acontecimentos finais sofridos pelas moléculas enzimáticas parcialmente desdobradas, dependem da natureza específica da enzima envolvida. De acordo com Klibanov, enzimas termicamente desnaturadas podem sofrer três tipos de transformações: alterações covalentes que resultam numa proteína quimicamente alterada, alterações não-covalentes com subsequente agregação polimolecular ou formação incorreta de estruturas enzimáticas inativas. A fim de minimizar significativamente este processo, a abordagem mais frequente utilizada passa por endurecer a conformação nativa do glóbulo da proteína. Alternativamente, a termoestabilidade das enzimas pode ser aumentada por recurso à alteração do microambiente da enzima, com a suposição de que o microambiente de uma molécula proteica pode afetar as forças intramoleculares que estabilizam a sua estrutura nativa.

ii. Estabilização contra inativação não-térmica

Existem vários outros fatores, que podem provocar a desnaturação enzimática. De seguida serão abordadas os fatores mais frequentes que afetam significativamente o desempenho das enzimas na sua aplicação biotecnológica:

- pH e compostos químicos: Valores de pH desfavoráveis presentes no meio podem muitas vezes provocar a inativação das enzimas envolvidas. Uma simples mudança da ionização no local ativo pode originar uma enzima estruturalmente inalterada mas cataliticamente inativa, mas pode também gerar graves alterações na sua conformação devido à labilidade das ligações iónicas que estabilizam a estrutura. Além disso, compostos químicos como a ureia são potentes desnaturantes, competindo com a água na formação de pontes de hidrogénio inter ou intracadeias, pontes estas que contribuem para manter inalterada a estrutura da proteína nativa (Tanford, 1968).

- Oxigénio e peróxidos: Várias enzimas são frequentemente desativadas pela presença de peróxido de hidrogénio ou oxigénio. A inativação por oxigénio ou peróxido envolve a oxidação dos grupos funcionais das enzimas gerando uma desativação que pode ser irreversível ou reversível. Embora, geralmente, estes agentes não provoquem um rigoroso processo de desnaturação, os seus efeitos correspondem sempre a uma diminuição drástica da atividade da enzima. A imobilização traduz-se muitas vezes numa melhoria da estabilidade contra estes agentes pelo impedimento do acesso destes aos grupos funcionais enzimáticos (Cho e Bailey, 1976; Duvnjak e Lilly, 1976).

4. Estabilização de enzimas multiméricas

O problema da estabilização enzimática adquire uma importância especial quando são utilizadas enzimas complexas como as proteínas multiméricas. Estas proteínas são compostas por várias subunidades, que devem estar devidamente interligadas para exibirem atividade catalítica. Tais enzimas são principalmente inativadas por fenómenos de dissociação das subunidades, que podem ser acelerados por algumas condições experimentais, como determinados valores de pH, de força iónica e de temperatura (Balcão *et al*, 2001). A estabilização da estrutura quaternária de enzimas imobilizadas multiméricas atrai então um grande interesse para a indústria, pois permite a prevenção da inativação das mesmas, resultante da dissociação das subunidades. Isto trata-se de um requisito fundamental para a utilização de enzimas em aplicações biomédicas, onde a libertação de subunidades da enzima pode promover não só a inativação da enzima, mas também originar reações alérgicas indesejáveis. Segundo os mesmos autores, para se conseguir a estabilização de enzimas multiméricas, é necessário a utilização de um sistema de imobilização especificamente concebido para resolver este objetivo, ou seja são necessários suportes que possuam grandes superfícies internas com um elevado nível de ativação, para permitir a interação entre as subunidades da enzima e os grupos no suporte. Simultaneamente são fundamentais longos períodos de imobilização porque o alinhamento correto entre os grupos reativos do suporte e da enzima pode ser complicado. Contudo mesmo quando é utilizado um bom sistema de imobilização, pode ser geometricamente impossível conseguir a estabilização completa de algumas enzimas multiméricas (Balcão *et al*, 2001). Neste caso, o posterior *crosslinking* químico com

polímeros multifuncionais pode permitir obter a estabilização completa da estrutura multimérica, independentemente da sua complexidade química. O uso de macromoléculas polifuncionais para alcançar o *crosslinking* entre as subunidades traz consigo várias vantagens, tais como, prevenção da alteração unipontual ou do *crosslinking* devido ao grande tamanho dos polímeros; aumento da suscetibilidade de ocorrer um envolvimento na reação, de resíduos das diferentes subunidades; e transformação da distância entre os diferentes resíduos na proteína num fator não crítico para a estabilidade (Balcão *et al*, 2001).

A utilização de enzimas como catalisadores na síntese de compostos químicos, reuniu ao longo das últimas décadas, um grande consentimento na indústria química. De acordo com Tischer e Wedekind (1999), a imobilização por encapsulação de enzimas é uma ferramenta útil para atingir objetivos de custos e vantagens tecnológicas. A encapsulação permite o uso repetitivo de enzimas virtualmente *ad eternum*, significando portanto, uma redução considerável de custos. Do ponto de vista tecnológico, as enzimas encapsuladas podem ser facilmente separadas do líquido de reação, evitando assim processos de separação trabalhosos e dispendiosos a jusante do processo biotecnológico. Os benefícios adicionais surgem da estabilização contra condições reacionais e ambientais adversas, que são prejudiciais para as preparações de enzimas solúveis, preservando assim a sua bioatividade (Norouzian, 2003). Devido à ampla variação nas propriedades individuais das espécies enzimáticas e aos vários requisitos de tecnologia de reação para os compostos alvo, torna-se aconselhável a exploração plena da riqueza de métodos e técnicas de encapsulação. A escolha de entre os métodos disponíveis vai variar de caso para caso, e será decidido em última instância pelos requisitos técnicos específicos e pelo quadro económico (Tischer e Wedekind, 1999).

X. Bacteriófagos

Os bacteriófagos constituem as entidades bioativas mais abundantes na superfície terrestre, com um valor estimado de 10^{30} a 10^{32} partículas, apresentando uma distribuição ubiqüitária nos oceanos, solo, alimentos e inclusive águas de consumo. Este tipo de entidades contribui para a manutenção do equilíbrio microbiano nos ecossistemas. Caracterizam-se por elevada especificidade, tendo como alvo grupos específicos de bactérias, que são constituídos por estirpes de uma mesma espécie ou espécies diferentes mas relacionadas entre si. Distinguem-se ainda pela rápida capacidade de replicação nas bactérias hospedeiras e pela capacidade de resistência a longo prazo no meio ambiente.

1. Descoberta dos bacteriófagos

A história da descoberta dos bacteriófagos é controversa, tendo a primeira descrição sido feita no ano de 1896, por Ernest Hankin, um bacteriologista britânico. Este relatou uma elevada atividade antibacteriana contra *Vibrio cholerae* nos rios Ganges e Jumna, na Índia. Hankin descreveu este fenômeno como uma substância não identificada presente na água, que seria responsável pela ação antibacteriana, que limitava a proliferação das epidemias de cólera. Em 1898, o bacteriologista soviético Nikolay Gamaleya observou uma ocorrência similar enquanto trabalhava com *Bacillus subtilis*. No entanto, nenhum destes investigadores tentou explorar esta descoberta. A hipótese de este evento se dever a um vírus só foi proposta 20 anos após os relatos de Hankin, por Frederick Twort, outro bacteriologista britânico, que observou um fenômeno idêntico ao de Hankin. A oficialização da descoberta dos bacteriófagos foi feita em 1917 por Felix d'Herelle, um microbiologista canadiano (Sulakvelidze *et al*, 2001). A descoberta destes vírus estritamente bacterianos, que destroem os seus hospedeiros e ao mesmo tempo são inócuos para os seres humanos, criou uma nova, e muito atrativa área de investigação que tinha como objetivo a utilização dos mesmos para a terapia de infecções bacterianas. Félix d'Herelle demonstrou a segurança da utilização de bacteriófagos através de uma técnica experimental que seria impensável nos tempos de hoje, mas muito comum na sua época: Félix ingeriu ele próprio uma preparação fágica contra *Shigella dysintariae*. Esta preparação foi posteriormente

administrada a doentes com disenteria e obteve excelentes resultados, curando os pacientes com sucesso. Rapidamente, outros investigadores começaram a utilizar bacteriófagos para outros tratamentos. A comercialização de preparações fágicas para tratamento de infeções bacterianas em seres humanos iniciou-se nos anos 40 pela mão de Felix d'Herelle na Europa e por intermédio da empresa farmacêutica Eli Lilly® nos Estados Unidos da América. Todavia, o aparecimento dos muito promissores antibióticos químicos e de alguns estudos com fagos com resultados controversos provocou um desinteresse substancial na terapia fágica (Sulakvelidze *et al*, 2001).

Recentemente, o interesse pela terapia fágica como forma de controlar infeções bacterianas foi renovada. Este facto deve-se essencialmente às cada vez mais emergentes resistências bacterianas aos antibióticos químicos. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, 60% de toda a mortalidade causada por infeções bacterianas deveu-se a bactérias multirresistentes aos antibióticos. Deste modo, os bacteriófagos são hoje considerados potenciais adjuvantes à antibioterapia convencional, pois apresentam baixa toxicidade para o doente, que advêm da elevada especificidade para determinada bactéria (consequentemente apresentam menos efeitos adversos, nomeadamente pela interferência mínima que causam na flora comensal intestinal; pela probabilidade muito mais reduzida de causar resistências bacterianas), pelo baixo custo de isolamento e subsequente propagação e pela administração facilitada com dose baixa e única, já que estas entidades bioativas têm a capacidade de se reproduzir exponencialmente enquanto houver hospedeiro bacteriano. Ao mesmo tempo há uma eliminação automática, assim que ocorra a erradicação do agente patogénico alvo (Westwater *et al*, 2003).

2. Caraterização dos bacteriófagos

Como já foi referido, os bacteriófagos são vírus que infetam única e exclusivamente células bacterianas. Cada partícula fágica contém o seu próprio material genético, que pode ser ADN ou ARN, encapsulado num involucro proteico ou lipoproteico, que se denomina cápside. A cápside além de conferir proteção ao material genético está ainda envolvida na adsorção de epítomos específicos que se encontram à superfície da célula hospedeira alvo (Guttman, *et al*, 2005). Tal como todos os vírus, os bacteriófagos são considerados parasitas obrigatórios, necessitando de um hospedeiro para que se

consigam multiplicar, proliferar e disseminar, pois não possuem a maquinaria metabólica necessária para efetuar funções básicas como a produção de energia e a síntese proteica (Guttman *et al*, 2005).

Os bacteriófagos são classificados, com base na sua morfologia e natureza do ácido nucleico. Quanto à natureza do ácido nucleico este pode ser ADN ou ARN, tanto de cadeia simples como de cadeia dupla. No entanto a maior parte dos bacteriófagos descritos, cerca de 95%, possuem ADN de cadeia dupla. Atualmente existem 13 famílias de bacteriófagos aceites, das quais se destacam 3 principais, que se diferenciam pela morfologia da cauda, nomeadamente a *Siphoviridae* com caudas longas e flexíveis, a *Myoviridae* com caudas contracteis de cadeia dupla e a *Podoviridae* de caudas curtas. As restantes 10 famílias, não apresentam cauda e são diferenciados pela morfologia da cápside, pela presença ou ausência de invólucro, tipo de material genético e pela forma de libertação da progenia (Ackermann, 2011). Os bacteriófagos podem ainda ser subdivididos em duas subclasses, baseadas na interação com a célula hospedeira, os bacteriófagos líticos e os lisogénicos. Os líticos, como o próprio nome indica multiplicam-se por um ciclo lítico que termina quando ocorre a lise celular, libertando-se a progenia. Por outro lado, os lisogénicos podem apresentar vias replicativas alternativas, podendo resultar num ciclo lisogénico, no qual o genoma fágico assume um estado quiescente, denominado pró-fago, e integra-se no genoma hospedeiro ou mantêm-se no interior da célula sob a forma de plasmídeos, o que origina a formação de clones bacterianos contendo pró-fagos, dependendo assim a reprodução fágica da reprodução da célula hospedeira. Eventualmente, em alguma das células um pró-fago abandona o estado quiescente, e desencadeia um ciclo lítico (Carlson, 2005).

3. Terapia fágica

A emergência de estirpes bacterianas multirresistentes em associação com a fraca penetração de alguns antibióticos cria cada vez mais uma necessidade de assegurar opções seguras e eficazes no tratamento antimicrobiano. A utilização de bacteriófagos estritamente líticos tem sido proposta como alternativa ou complemento à antibioterapia com antibióticos químicos convencionais, permitindo a atuação sobre as bactérias por parte dos seus predadores naturais.

Uma das grandes vantagens da antibioterapia com fagos relativamente aos antibióticos químicos convencionais reside no facto dos primeiros se replicarem diretamente no local da infeção, ficando disponíveis em abundância onde são mais necessários. Quando comparados com os antibióticos, os fagos apresentam outras vantagens relevantes (Sulakvelidze *et al*, 2001):

- Forte permeabilidade tecidual;
- Concentração permanentemente elevada no local da infeção;
- Eliminação apenas após a erradicação da bactéria hospedeira;
- Compatibilidade com antibióticos;
- Extremamente específicos contra a bactéria alvo;
- Capacidade superior de penetração nos biofilmes bacterianos;
- Isolamento e produção em larga escala de novos fagos é muito mais simples e económica do que desenvolver um novo antibiótico.

A utilização de fagos não se restringe apenas à antibioterapia em humanos. Os fagos podem ser aplicados no controlo de infeções bacterianas em culturas agrícolas, prevenindo a infeção de plantas e sementes. Dois exemplos do sucesso da terapia fágica noutras áreas, são a utilização de bacteriófagos no controlo de contaminações bacterianas em fruta e em peixes de aquicultura (Leverentz *et al*, 2001). No mesmo sentido, os fagos poderiam ser utilizados para limpar o ambiente na indústria de produção animal e unidades de processamento de plantas, reduzindo assim a probabilidade de infeção nesses produtos alimentares.

4. Encapsulação de bacteriófagos

A terapia fágica por administração oral requer uma maior resistência dos bacteriófagos às condições adversas do meio, como por exemplo o ambiente gástrico. Como já foi referido, esse é o objetivo da encapsulação dos bacteriófagos em matrizes poliméricas, ou seja, formar uma barreira protetora contra o meio e/ou agentes desfavoráveis à sua atividade (Dini *et al*, 2012). Atualmente, as tecnologias de libertação controlada estão a desempenhar um papel crucial no aumento da resiliência dos bacteriófagos contra ambientes adversos que naturalmente inibem a sua bioatividade. Por conseguinte, nos

últimos anos, o encapsulamento, nomeadamente em matrizes poliméricas tem vindo a ganhar cada vez mais atenção (Mettters e Hubbell, 2005). As propriedades mais relevantes destes polímeros incluem: a estrutura molecular estereoespecífica, a boa tolerabilidade, e o facto de serem materiais amigos do ambiente (Chiellini *et al*, 2004). Além disso, alguns polímeros podem ser considerados "inteligentes" porque por exemplo, as suas moléculas podem ser “insensíveis” às condições ácidas agressivas do estômago, mas serem responsivas a um meio alcalino, como o ambiente intestinal. Esta propriedade além de permitir que as moléculas ou entidades encapsuladas, como os bacteriófagos fiquem protegidas contra estas condições extremas, vai possibilitar a sua libertação apenas no trato intestinal (Bosio *et al*, 2011).

XI. Formulações desenvolvidas de micro e nanosistemas

Nesta secção, e em jeito de conclusão, seguem alguns exemplos práticos de formulações desenvolvidas na literatura para proteínas, enzimas e bacteriófagos, à base de micro ou nano sistemas.

1. Proteínas encapsuladas

Péptidos como a hormona libertadora da tiotropina, e proteínas como a somatotropina e a interleucina-2 podem ser encapsuladas dentro de polímeros biodegradáveis, para prolongar a sua duração de ação e a sua eficácia terapêutica. Por terem um histórico comprovado de boa biocompatibilidade, os polímeros biodegradáveis geralmente utilizados são o ácido poli-láctico-glicólico (PLGA) e os seus co-polímeros como o ácido poli-láctico (PLA).

No ano de 1994, os investigadores alemães Herrmann e Bodmeier desenvolveram e publicaram uma formulação para a encapsulação de somatostatina em microesferas de PLA. Os resultados revelaram elevada eficiência de encapsulação, no entanto, a libertação do fármaco mostrou-se muito lenta. Os resultados revelaram ainda diferenças significativas na eficácia de encapsulação e libertação causadas por meios externos com diferentes valores de pH. Posto isto, os investigadores adicionaram vários sais às fases aquosas (interna e externa), com o intuito de influenciar a libertação do fármaco através de alterações na microestrutura das microesferas. Seguidamente foram efetuados novos testes que demonstraram que a presença de sais na matriz do polímero resultou numa difusão mais rápida para o meio de dissolução e portanto uma libertação mais rápida do fármaco.

Dois anos depois, em 1996, Jameela *et al* elaboraram um estudo comparativo onde prepararam microesferas contendo BSA, que forneceram resultados interessantes e revelaram ser vantajosas na administração e libertação sustentada de proteínas e péptidos.

No ano seguinte, Johnson e colaboradores (1997) publicaram uma formulação para estabilização por microencapsulação da hormona de crescimento (rhGH). Os resultados revelaram que a proteína encapsulada se mantinha inalterada relativamente ao seu estado anterior à encapsulação. A administração *in vivo* demonstrou induzir elevados

níveis de rhGH no sangue durante o período máximo de um mês, o que se traduz numa período vinte vezes mais longo do que quando comparado com a injeção subcutânea da mesma quantidade de proteína sob a forma de solução. Após três meses de doses sequenciais, o perfil de libertação mostrou ser reprodutível e sem induzir acumulação das doses (Johnson *et al*, 1997).

No ano de 2007, Al haushey *et al* apresentaram um estudo que tinha como objetivo a preparação de microesferas poliméricas com capacidade melhorada para a encapsulação de proteínas terapêuticas (Al haushey *et al*, 2007).

Em 2010, Chergn-Ju Kim patenteou uma técnica para a produção de micropartículas biodegradáveis para administração de fármacos, como por exemplo péptidos ou polipéptidos.

No presente ano, Minimol *et al* (2013) desenvolveram uma formulação de nanopartículas de acetato de amido que permite a administração oral de insulina.

Também recentemente Balcão *et al* (2013) publicaram uma formulação de nanovesículas lipídicas para a encapsulação de lactoferrina bovina para aplicações na indústria alimentar e farmacêutica. A ação mais conhecida da lactoferrina é a sua capacidade de se ligar aos íons de ferro, por possuir uma elevada afinidade para com estes. O ferro é um elemento essencial para muitas bactérias patogénicas que necessitam deste para se multiplicarem e proliferarem, logo, são fortemente inibidas ou mesmo mortas quando sujeitas à ação da lactoferrina. Resultados de outros estudos (Ellison *et al*, 1988) demonstraram que a lactoferrina interage principalmente com as bactérias Gram-negativo, provocando a libertação de quantidades elevadas de lipopolissacarídeos da membrana externa destas, comprometendo a sua permeabilidade e aumentando a suscetibilidade das bactérias a outras moléculas antimicrobianas como as lisozimas. Os resultados observados por Balcão e colaboradores (2013) revelaram-se idênticos aos anteriormente referidos. Posteriormente, e após armazenamento prolongado (cerca de 3 meses) a temperatura ambiente, foram efetuadas observações macroscópicas do nanossistema que mostraram não existir separação de fases nem ausência de adesão do mesmo às paredes dos recipientes, mantendo-se assim a sua estabilidade. Na indústria farmacêutica, esta formulação encontra a sua aplicação em, por exemplo, elixires para higiene oral (Balcão *et al*, 2013).

2. Enzimas encapsuladas

Como já foi mencionado, existem diversos métodos e tipos de partículas que encontram a sua aplicação na biotecnologia enzimática, mais especificamente na biocatálise de produtos ou substâncias.

Em 2004, Wang e Caruso desenvolveram e publicaram um método de imobilização de enzimas em nanoesferas porosas de sílica, seguido do revestimento (encapsulação) com uma nanocápsula orgânica na superfície da partícula. Os resultados obtidos permitiram concluir que a utilização de nanoesferas para imobilização de enzimas seguida da sua nanoencapsulação proporciona uma via fácil e eficaz para preparar compósitos com elevadas quantidades de enzimas, aumentando a bioatividade enzimática, a proteção contra a proteólise e melhorando a estabilidade da enzima contra valores de pH desfavoráveis (Wang e Caruso, 2004).

Yan *et al*, apresentaram no ano de 2006 um método para a encapsulação de uma única enzima numa partícula de nanogel, por polimerização aquosa *in situ*. Os resultados obtidos por estes investigadores demonstraram que o procedimento escolhido é um método simples e eficiente para preparar partículas de nanogéis contendo uma única enzima (Yan *et al*, 2006).

Ainda em 2006, Cellesi e Tirelli publicaram um método para a produção de nanopartículas de sílica, para encapsular enzimas, que permite combinar vantagens como o acesso ao centro catalítico facilitado (e conseqüentemente melhoria da seletividade), e um elevado coeficiente de difusão e baixa tendência para a sedimentação (devido às pequenas dimensões das nanopartículas).

Em 2008, Lambert *et al* descreveram uma formulação para a microencapsulação da hidrolase de sais biliares, para fins alimentícios e ainda para a veiculação da enzima na região proximal do intestino delgado. Após análise de resultados as ilações retiradas foram que esta formulação é uma excelente ferramenta para proteger as enzimas das condições gástricas, durante o trânsito gastrointestinal, permitindo a libertação e atividade da enzima no intestino delgado proximal.

Já em 2010, Sawada e Akiyoshi publicaram um estudo sobre uma formulação para a nanoencapsulação de lipase, com objetivo de aumentar a sua bioatividade e induzir uma estabilidade térmica superior, num nanogéis de colesterol e pululano (Sawada e Akiyoshi, 2010).

No último ano, Gassara-Chatti *et al* (2012), divulgaram a sua formulação para a encapsulação de enzimas ligninolíticas com aplicação na indústria alimentar, mais especificamente, na clarificação de sumos de frutas.

No mesmo ano, Patterson *et al* (2012) publicaram o desenvolvimento de um nanosistema baseado na encapsulação de enzimas em partículas virais (VLP), que se caracterizam por serem partículas multiproteicas e não infecciosas (por não conterem material genético). A característica única distingue esta VLP é o facto de permitir manipular o seu volume global e porosidade, possibilitando o controlo do acesso do substrato à enzima encapsulada (Patterson *et al*, 2012).

3. Bacteriófagos encapsulados

Como já foi referido, a terapia fágica tem o potencial de se traduzir num método muito eficaz no controlo da proliferação de diversas espécies e estirpes bacterianas patogénicas. Contudo, para que sejam comercialmente viáveis, os bacteriófagos devem possuir um certo grau de estabilidade que permita o seu transporte e armazenamento. Existem vários métodos utilizados para proteger, conservar e armazenar os bacteriófagos, tais como o congelamento a temperaturas muito baixas, a liofilização ou o armazenamento em meio líquido (Murphy e Engelhardt, 2012).

Waddell *et al* patentearam em 2004 métodos para encapsulação e libertação controlada de bacteriófagos num polímero metacrilado (Waddell *et al*, 2004).

Em 2008, Ma e colaboradores publicaram uma formulação para microencapsulação do bacteriófago “Felix O1” para o tratamento por administração oral contra infeções pelo género *Salmonella* em animais. Os resultados mostraram que o processo de encapsulação não teve efeitos prejudiciais sobre a viabilidade do bacteriófago, tendo ainda sido alcançada uma elevada eficiência de carga. A microencapsulação demonstrou ainda melhorar significativamente a sobrevivência deste fago num ambiente gastrointestinal simulado em laboratório. Esta abordagem apresenta-se assim como uma tecnologia viável para aplicação em terapêuticas orais (Ma *et al*, 2008).

Dois anos depois, Stanford *et al* (2010) desenvolveram um método para a administração de fagos encapsulados, mais especificamente para a um fago específico contra a *Escherichia coli* O157:H7, com objetivo de tornar a terapia fágica uma estratégia viável para o tratamento de infeções deste microrganismo em bovinos na indústria

agropecuária. Após avaliação de vários parâmetros, os investigadores concluíram que a encapsulação dos bacteriófagos em combinação com ambos os tipos de administração, bólus e na alimentação, foi extremamente eficaz na libertação de fagos ativos a pH 7 e, em teoria, seria capaz de eliminar a bactéria na maioria dos bovinos. Todavia, na prática, nem o sistema de administração por bólus nem através da alimentação foram capazes de controlar efetivamente a proliferação da bactéria, logo são necessários mais estudos para caracterizar as relações entre fagos endêmicos e fagos experimentais, nomeadamente as doses eficazes e qual a importância da colonização, por parte das bactérias, de múltiplas regiões do trato gastrointestinal dos animais (Stanford *et al*, 2010).

No mesmo ano, Balcão *et al* (2010) conceberam uma formulação para a administração por inalação de bacteriófagos, utilizando nanovesículas lipídicas.

Mais recentemente, em 2012, os investigadores canadianos Murphy e Engelhardt, patentearam uma formulação para encapsulação de bacteriófagos. A formulação desenvolvida por Murphy e Engelhardt (2012) demonstrou ser resistente à exposição a meios com valores de pH muito baixos durante longos períodos de tempo, que de outra forma tornariam o bacteriófago inviável. O resultado traduz-se numa proteção aumentada contra a acidez do estômago. Os bacteriófagos encapsulados podem assim ser utilizados e aplicados de diversas formas no controlo da proliferação bacteriana, como por exemplo, no tratamento oral antibacteriano em humanos, ou em outras espécies de mamíferos ou aves (Murphy e Engelhardt, 2012).

XII. Conclusão

A micro e nanotecnologia, como técnicas de encapsulação, surgiram há relativamente pouco tempo, porém os seus rápidos e significativos avanços permitiram a descoberta e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e terapia para diversas doenças. Nas últimas décadas, por consequência dos avanços da biotecnologia e da engenharia genética têm sido desenvolvidas várias e novas proteínas e peptídeos ativos com ações terapêuticas. Estas novas biomoléculas farmacêuticas são normalmente caracterizadas por um tamanho grande, tempo de semi-vida curto, alta velocidade de eliminação (pois são facilmente degradados por enzimas e fluidos corporais), capacidade limitada para atravessar as membranas celulares, e fraca biodisponibilidade por administração oral. Assim, torna-se necessária a injeção frequente deste tipo de medicamentos e geralmente por um longo período tempo. A sobrevivência destas moléculas no organismo é, portanto, difícil, a menos que seja utilizado um transportador (protetor) apropriado. O transportador selecionado deve garantir uma proteção adequada da molécula, ser capaz de escapar a captação por macrófagos e a sua dimensão deve poder ser modificada de acordo com as necessidades específicas. Estas características podem ser alcançadas recorrendo à imobilização por encapsulação. A imobilização por contenção das moléculas bioativas permite protegê-las de agentes e tensões ambientais, como o pH, temperatura, sais, solventes orgânicos ou outros agentes inibidores que interfiram com a sua bioatividade. Simultaneamente impedem a difusão das entidades bioativas para o meio circunvizinho, devendo para tal os poros da matriz encapsulante apresentarem um diâmetro inferior ao da molécula a imobilizar, mas ao mesmo tempo possuírem um tamanho suficientemente grande que permita a transferência de metabolitos, nutrientes e gases.

Em suma, garantir a estabilidade da entidade bioativa ou molécula é um ponto-chave na conceção de métodos eficazes de encapsulação. Estes não só devem empregar condições físicas adequadas, mas também recorrer a materiais biocompatíveis com a entidade ou molécula, não comprometendo a sua bioatividade. Além disso, quando o objetivo é fornecer uma entidade viável a um local específico, como por exemplo o intestino, os materiais de encapsulação devem conseguir proteger a mesma contra eventuais agentes ou ambientes desfavoráveis e prejudiciais, como ácidos, enzimas e radicais. Os atuais métodos de encapsulação permitem uma melhoria na eficácia da terapêutica oral com

entidades bioativas como bacteriófagos, proteínas e enzimas. Contudo, são necessários mais estudos para explorar os materiais de revestimento com características que permitam o armazenamento dos mesmos durante longos períodos de tempo e a vectorização dos mesmos para um local específico (Chan e Zhang, 2002).

XIII. Bibliografia

- Ackermann, H. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, pp. 90-94.
- Al haushey, L., Bolzinger, M. A., Bordes, C., Gauvrit, J. Y. e Briançon, S. (2007). Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. *International Journal of Pharmaceutics*, 344, pp. 16-25.
- Augst, A. D., Kong, H. J. e Mooney, D. J. (2006). Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6, p. 623.
- Azeredo, H. M. C. (2005). Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimento e Nutrição*, 16(1), pp. 89-95.
- Balcão, V. M., Azevedo, A. F., Castro, L. M., Costa, C. I., Santos, S., Matos, C. M., Moutinho, C. G., Teixeira, J. A. e Azeredo, J. C. (2010). Design of a lipid nanovesicle system encapsulating bacteriophages integrated in a multiple emulsion formulation: a proof-of-concept. *Nanotechnology*, 3, pp. 459-462.
- Balcão, V. M., Costa, C. I., Matos, C. M., Moutinho, C. G., Amorim, M., Pintado, E., Gomes, A. P., Vila, M. M., e Teixeira, J. A. (2013). Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications. *Food Hydrocolloids*, 32, pp. 425-431.
- Balcão, V. M. e Malcata, F. X. (1998). On the performance of a hollow-fiber bioreactor for acidolysis catalyzed by immobilized lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(1), pp. 114-123.
- Balcão, V. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcata, F. X. e Guisán J. M. (2001). Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. *Biotechnology Progress*, 17, pp. 537-542.

Balcão, V. M., Vieira, M. C. e Malcata, F. X. (1996). Adsorption of protein from several commercial lipase preparations onto a hollow-fiber membrane module. *Biotechnology Progress*, 12(2), pp. 164-172.

Bansode, S. S., Banarjee, S. K., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L. e Thorat, R. M. (2010). Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1(2), pp. 38-43.

Bilati, U., Allémann, E. e Doelker, E. (2005). Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59, pp. 375-388.

Bosio, V., Islan, G., Martínez, Y. e Castro, G. (2011). *Advances in Bioprocesses in Food Industries*, New Delhi, Asiatech Press, p. 10.

Bourgeat-Lami, E. (2002). Organic–Inorganic Nanostructured Colloids. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2(1), pp. 1-24.

Brigger, I., Dubernet, C. e Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, p. 632.

Burgess, D. J., e Hickey, A. J. (2002). Microsphere technology and applications in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York, Marcel Dekker Inc, pp. 1783-1794.

Carlson, K. (2005). Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches in *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida, CRC Press, pp. 439-484.

Castro, G. R., Kamdar, R. R., Panilaitis, B. e Kaplan, D. L. (2005). Triggered release of proteins from emulsan-alginate beads. *Journal of Controlled Release*, 109, p. 149.

Cellesi, F. e Tirelli, N. (2006). Sol–gel synthesis at neutral pH in W/O microemulsion: A method for enzyme nanoencapsulation in silica gel nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 288, pp. 52-61.

Chan, E. S. e Zhang, Z. (2002). Encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* by direct compression. *Food and Bioprocess Processing*, 80, pp. 78-82.

Chen, H. e Langer, R. (1998). Oral particulate delivery: Status and future trends. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34(2-3), pp. 339-350.

Chiellini, E., Cinelli, P., Chiellini, F. e Imam, S. H. (2004). Environmentally degradable bio-based polymeric blends and composites. *Macromolecular Bioscience*, 4, p. 218.

Cho, Y. K. e Bailey, J. E. (1976). Enzyme immobilization on activate carbon: alleviation of enzyme deactivation by hydrogen peroxide. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, pp. 769-775.

Couvreur, P., Dubernet, C. e Puisieux, F. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41, pp. 2-13.

Desai, M. P., Labhasetwar, V., Amidon, G. L. e Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharmaceutical Research*, 13, pp. 1838-1845.

Desai, M. P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R. J., e Amidon, G. L. (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research*, 14, pp. 1568-1573.

Dini, C., Islan, G., Urraza, P. e Castro, G. (2012). Novel Biopolymer Matrices for Microencapsulation of Phages: Enhanced Protection Against Acidity and Protease Activity. *Macromolecular Bioscience*, 12, pp. 1200-1208

Diwan, M. e Park, T. G. (2001). Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, 73, pp. 233-244.

Duncan, M. R., Lee, J. M. e Warchol, M. P. (1995). Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 170-179.

Duvnjak, Z., e Lilly, I. V. (1976). The immobilization of glucoseoxidase to manganese oxide. *Biotechnology and Bioengineering*, 18, pp. 737-739.

Ellison, R. T., Giehl, T. J. e LaForce, F. M. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity*, 56, pp. 2774-2781.

Fágáin, C. O. (1995). Understanding and increasing protein stability. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1252, pp. 1-14.

Feczkoa, T., Tótha, J., Dósac, G. e Gyenisa, J. (2011). Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing*, 50, pp. 757-765

Florence, A. T. (2007). Pharmaceutical nanotechnology: More than size. Ten topics for research. *International Journal of Pharmaceutics*, 339(1-2), pp. 1-2.

Florence, A. T., Hillery, A. M., Hussain, N. e Jani, P. U. (1995). Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: Histological and analytical evidence. *Journal of Drug Targeting*, 3(1), pp. 65-70.

Galindo-Rodriguez, S. A., Allemann, E., Fessi, H. e Doelker, E. (2005). Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22, pp. 419-464.

Gassara-Chatti, F., Brar, S. K., Ajila, C. M., Verma, M., Tyagi, R. D. e Valero, J. R. (2013). Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice. *Food Chemistry*, 137, pp. 18-24.

Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im, H. V., Heyder, J. e Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental Health Perspectives*, 113(11), pp. 1555-1560.

Gianfreda, L. e Scarfi, M. R. (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 100, pp. 97-128.

Gil, M. H. e Ferreira, P. (2006). *Polissacarídeos como biomateriais*. Química, 100, pp. 72-74.

Guttman, B., Raya, R., e Kutter, E. (2005). *Basic phage biology*. Boca Raton, CRC Press pp. 29-66.

He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C. e Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), pp. 3657-3666.

Heller, P. F. (2006). Coacervate of anionic and cationic polymer forming microparticles for the sustained release of therapeutic agents. *US Patent WO2006023207*

Herrmann, J. e Bodmeier, R. (1995). The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method. *Journal of Controlled Release*, 36, pp. 63-71.

Jafari, S. M., Assadpoor, E., Bhandari, B. e He, Y. (2008). Nanoparticle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41, pp. 172-183.

Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21, pp. 2475-2490

Jameela, S. R., Suma, N. e Jayakrishnan, A. (1996). Protein release from poly(ϵ -caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: A comparative study. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 8(6), pp. 457-466.

Jenning, V., Schafer-Korting, M. e Gohla, S. (2000). Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for tropical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*. 66(2), pp. 115-126.

Johansen, P., Men, Y., Merkle, H. P. e Gander, B. (2000). Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, pp. 129-146.

Johnson, O. L., Jaworowicz, W., Cleland, J., Bailey, L., Charnis, M., Duenas, E., Wu, C., Shepard, D., Magil, S., Last, T., Jones, A. J. S. e Putney, S. D. (1997). The Stabilization and Encapsulation of Human Growth Hormone into Biodegradable Microspheres. *Pharmaceutical Research*, 14, pp. 730-735.

Kasturagi, Y., Sugiura, Y. C., Lee, K., Otsugi, K. e Kurihara, K. (1995). Selective inhibition of bitter taste of various drugs by lipoprotein. *Pharmaceutical Research*, 12(5), pp. 658-662.

Klibanov, A. M. (1983). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology*, 29, pp. 1-28.

Kodera, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H., Ishii, A., Ueno, T. e Inada, Y. (1998). Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications. *Progress in Polymer Science*, 23, pp. 1233-1241.

Kroll, R. A., Pagel, M. A., Muldoon, L. L., Roman-Goldstein, S., Fiamengo, S. A. e Neuwelt, E. A. (1998). Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery*, 43, pp. 879-886.

Kwon, Y. M., Baudys, M., Knutson, K. e Kim, S. W. (2001). *In situ* study of insulin aggregation induced by water-organic solvent interface. *Pharmaceutical Research*, 18, pp. 1754-1759.

Labhasetwar, V. (1997). Nanoparticles for drug delivery, *Pharmaceutical News*, 4, pp. 28-31.

Lambert, J. M., Weinbreck F., e Kleerebezem, M. (2008). In Vitro Analysis of Protection of the Enzyme Bile Salt Hydrolase against Enteric Conditions by Whey

Protein-Gum Arabic Microencapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 8360-8364.

Leader, B., Baca, Q. J. e Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, pp. 21-39.

Leon, L., Herbert, A. L. e Joseph, L. K. (1990). *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. 3rd edition, Varghese Publishing House, pp. 412-428.

Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E. e Sulakvelidze, A. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: a model study. *Journal of Food Protection*, 64(8), pp. 1116-1121

Lima, A. C., Sher, P. e Mano, J. F. (2012). Production methodologies of polymeric and hydrogel particles for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(2), pp. 236-239

Lowe, P. J. e Temple, C. S. (1994). Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, pp. 547-552.

Lundblad, R. L. e Noyes, C. M. (1984). *Chemical Reagents for Protein Modification*. Boca Raton, CRC Press, pp. 179-188.

Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A. e Sabour, P. M. (2008). Microencapsulation of Bacteriophage Felix O1 into Chitosan-Alginate Microspheres for Oral Delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), pp. 4799-4805.

Martinek, K. e Mozahev, V. V. (1985). Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. *Advances in Enzymology*, 57, pp. 179-245.

Mathiowitz, E., Jacob, J. S., Jong, Y. S., Carino, G. P., Chickering, D. E., Chaturvedi, P., Santos, C. A., Vijayaraghavan, K., Montgomery, S., Bassett, M. e Morrell, C.

(1997). Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. *Nature*, 386, pp. 410-414.

McClellan, S., Prosser, E., Meehan, E., O'Malley, D., Clarke, N. e Ramtoola, Z. (1998). Binding and uptake of biodegradable poly-lactide microand nanoparticles in intestinal epithelia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, pp. 53-63.

Means, G. E. e Feeney, R. E. (1990). Chemical modifications of proteins: history and applications. *Bioconjugate Chemistry*, 1, pp. 2-12.

Mehnert, W. e Mader, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), pp. 165-196.

Metters, A. e Hubbell, J. (2005). Network formation and degradation behavior of hydrogels formed by Michael-type addition reactions. *Biomacromolecules*, 6, p. 290.

Minimol, P. F., Paul, W. e Sharma, C. P. (2013). PEGylated starch acetate nanoparticles and its potential use for oral insulin delivery. *Carbohydrate Polymers*, 95, pp. 1-8.

Morlock, M., Kroll, H., Winter, G. e Kissel, T. (1997). Microencapsulation of rh-erythropoietin using biodegradable poly(d,l-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43, pp. 29-36.

Moutinho, C. G., Matos, C. M., Teixeira, J. A. e Balcão, V. M. (2011). Nanocarrier possibilities for functional targeting of bioactive peptides and proteins: state-of-the-art. *Journal of Drug Targeting*, pp. 1-28.

Mozhaev, V. V. (1993). Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnology*, 11, pp. 88-95.

Müller, R. H., Mader, K. e Gohla, S. (2000). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), pp. 161-177.

Müller, R. H., Mehnert, W., Lucks, J. S., Schwarz, C., Mulhen, A. e Weyhers, H. (1995). Solid lipid nanoparticles (SLN) – An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41, pp. 62-69.

Murphy, K. e Engelhardt, R. (2012). Encapsulated bacteriophage formulation. *US Patent US0258175A1*.

Myrberg, H., Lindgren M. e Langel U. (2007). Protein delivery by the cell-penetrating peptide YTA2. *Bioconjugate Chemistry*, 18, pp. 170-174.

Nagai, T. (2005). Drug discovery and innovative drug delivery research in new drug development. *Pharmaceutical Technology in Japan*, 21, pp. 1949-1951.

Norouzian, D. (2003). Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. *Iranian Journal of Biotechnology*, 1(4), pp. 197-204.

Öner, F. e Kas, H. S. (2003). *Bioactive molecules and biodelivery systems*. Routledge, pp. 369-392.

Panyam, J. e Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, pp. 329-347.

Parsell, D. A. e Sauer, R. T. (1989). The Structural Stability of a Protein Is an Important Determinant of Its Proteolytic Susceptibility in *E. coli*. *Journal of Biotechnology and Chemistry*. 264, pp. 7590-7595.

Patterson, D. P., Prevelige, P., E. e Douglas, T. (2012). Nanoreactors by Programmed Enzyme Encapsulation Inside the Capsid of the Bacteriophage P22. *ACS Nano*, 6 (6), pp. 5000-5009.

Pimentel, L. F., Júnior, A. T. J., Mosqueira, V. C. F. e Santos-Magalhães, N. S. (2007). Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43, p. 509.

Pitt, C. G. (1990). The controlled parenteral delivery of polypeptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 59, pp. 173-196.

Putney, S. D. (1998). Encapsulation of proteins for improved delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, pp. 548-552.

Puapermpoonsiri, U., Ford, S. J. e Walle, C. F. (2009). Stabilization of bacteriophage during freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 168-175.

Re, M. I. (2006). Formulating drug delivery systems by spray drying. *Drying Technology*, 24, pp. 433-446.

Reichert, J. M. (2003). Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, pp. 695-702.

Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. e Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, pp. 8-21.

Reis, C. P., Ribeiro A. J., Veiga F. e Neufeld, R. J. (2007). Nanoparticle delivery system for insulin. Design, characterization and *in vitro/in vivo* bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, p. 392.

Reverchon, E., Adami, R. e Caputo, G. (2008). Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: interpretation of results. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47, pp. 70-84.

Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y. e Pr at, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, 116, pp. 1-27.

Sawada, S. e Akiyoshi, K. (2010). Nano-Encapsulation of Lipase by Self-Assembled Nanogels: Induction of High Enzyme Activity and Thermal Stabilization. *Macromolecular Bioscience*, 10, pp. 353-358.

Schleh, C., Semmler-Behnke, M., Lipka, J., Wenk, A., Hirin, S., Schäffler, M., Schmid, G., Ulrich, S. e Kreyling, W. G. (2012). Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology*, 6(1), pp. 36-46

Shahidi, F. e Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), p. 47.

Shekhar, K., Madhu, M. N., Pradeep, B. e Banji, D. (2006). *A review on microencapsulation*. Nalgonda, Pharmaceutics Department of Pharmacy Nalanda College, pp. 253-265.

Shine, A. D. e Gelb, J. J. (1998). Microencapsulation process using supercritical fluids. *US Patent WO1998015348*.

Silman, I. H. e Katchalski, E. (1966). Water-insoluble derivatives of enzymes, antigens, and antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 35, pp. 873-908.

Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D. e Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(1), pp. 1-9.

Sinha, V. R. e Trehan, A. (2003). Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, 90, pp. 261-280.

Smith, R. D. (1986). Supercritical fluid molecular spray film deposition and powder formation. *US Patent US4582731*.

Souto, E. B., Almeida, A. J. e Müller, R. H. (2007). Lipid Nanoparticles (SLN®, NLC®) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, p. 3.

Souto, E. B. e Lopes, C. M. (2011). *Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 215-218.

Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M. e Muller, R. H. (2011). Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(1), pp. 83-90.

Stanford, K., McAllister, T. A., Niu, D., Stephenson P., Mazzocco, A., Waddell, T. E. e Johnson, R. P. (2010). Oral Delivery Systems for Encapsulated Bacteriophages Targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in Feedlot Cattle. *Journal of Food Protection*, 73(7), pp. 1304-1312.

Steffansen, B., Nielsen, C. U., Brodin, B., Eriksson, A. H., Andersen, R. e Frokjaer, S. (2004). Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, pp. 3-16.

Suave, J., Dall'agnol, E. C., Pezzin, A. P. T., Silva, D. A. K., Meier, M. M. e Soldi, V. (2006). Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, 7(2), pp. 12-20.

Sulakvelidze, A., Zemphira, A. e Glenn-Morris Jr, J. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp. 649-659.

Tabata, T. (2006). Drug delivery system: basic technology for biomedical research, medical treatment and health care. *Biotechnology Journal*, 6, pp. 553-555.

Tandya, A., Mammucari, R. e Dehghani, F. (2007). Dense gas processing of polymeric controlled release formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, pp. 1-11.

Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, 23, pp. 121-282.

Thies, C. (2005). *Microencapsulation - Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4ª edição. New York, John Wiley, pp. 628-651.

Tischer, W. e Wedekind, F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Topics in Current Chemistry*, 200, pp. 96-123.

Trindade, C. S. F., Pinho, S. C. e Rocha, G. A. (2008). Review – Microencapsulation of food ingredients. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11(2), pp. 103-109.

Van de Weert, M., Hoehstetter, J., Hennink, W. E. e Crommelin, D. J. (2000). The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme. *Journal of Controlled Release*, 68, pp. 351-359.

Vehring, R. (2008). Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research*, 25, pp. 999-1022.

Venkatesan, P., Manavalan, R. e Valliappan, K. (2009). Microencapsulation: A vital technique in novel drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(4), pp. 26-35.

Vieira, R. A. M., Sayer, C., Lima, E. L. e Pinto, J. C. (2002). In-line and *in-situ* monitoring of semi-batch emulsion copolymerizations using near-infrared spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 84(14), p. 2670.

Vyas, S. P. e Khar, R. K. (2006). *Targeted and controlled drug delivery*. Delhi, CBS Publishers & Distributors, pp. 424-449.

Waddell, T. E., Johnson, R., e Mazzocco, A. (2004). Methods and compositions for controlled release of bioactive compounds. *Canadian patent CA2463827*.

Wang, Y. e Caruso, F. (2004). Enzyme encapsulation in nanoporous silica spheres. *Chemical Communications*, pp. 1528-1529.

Westesen, K., Bunjes, H. e Kock, M. H. J. (1997). Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug load capacity and sustained release potential. *Journal of Controlled Release*. 48, pp. 223-236.

Westwater, C., Kasman, L. M., Schofield., D. A., Werner, P. A., Dolan, J. W., Schmidt, M. G. e Norris, J. S. (2003). Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), pp. 1301-1307.

Wissing, S. A. e Muller, R. H. (2002). Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release an in vivo skin penetration. *Journal of Controlled release*. 81 (3), pp. 225-233.

Yadav, S. C., Kumari, A., e Yadav, R. (2011). Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and Nanobioconjugation. *Peptides*, 32, pp. 173-187.

Yan, M., Ge, J., Liu, Z. e Ouyang, P. (2006). Encapsulation of Single Enzyme in Nanogel with Enhanced Biocatalytic Activity and Stability. *Journal of the American Chemical Society*, 128, pp. 11008-11009.

Yeo, Y., Baek, N. e Park, K. (2001). Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6, pp. 213-230.

Zanetti, B. G., Soldi, V. e Lemos-Senna, E. (2002). Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas deacetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(2), pp. 229-236.