

W/10/11

Carla Isabel Dias da Costa

Leitura Interna

Biblioteca UFP

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA À
BASE DE LACTOFERRINA ENCAPSULADA EM
NANOEMULSÕES MÚLTIPLAS COM PROPRIEDADES
ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÕES EM HIGIENE ORAL**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto

Junho de 2010

Carla Isabel Dias da Costa

Leitura Interna

Biblioteca UFP

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA À
BASE DE LACTOFERRINA ENCAPSULADA EM
NANOEMULSÕES MÚLTIPLAS COM PROPRIEDADES
ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÕES EM HIGIENE ORAL**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto

Junho de 2010

Título: Desenvolvimento de uma formulação líquida à base de lactoferrina encapsulada em nanoemulsões múltiplas com propriedades antimicrobianas para aplicações em higiene oral.

Leitura Interna

Autor: Carla Isabel Dias da Costa

Biblioteca UFP

Orientador: Professor Doutor Victor M. Balcão

Co-orientadora: Professora Doutora Carla Manuela Matos

A aluna,

Carla Isabel Dias da Costa

(Carla Isabel Dias da Costa)

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

Resumo

A lactoferrina, proteína originalmente isolada a partir do leite, desde cedo captou o interesse de muitos investigadores, dada a grande variedade de potenciais (e reais) aplicações que apresenta. Trata-se de uma glicoproteína monomérica com peso molecular aproximado de 80 kDa, constituída por 703 resíduos de aminoácidos, com capacidade para se ligar ao ferro. Aparentemente, é a subfracção do soro de leite mais documentada relativamente aos seus efeitos anti-virais, anti-microbianos, anti-cancerígenos e imuno-moduladores/estimuladores. Pertence à família das proteínas transferrinas e permite controlar os níveis de ferro nos fluidos biológicos corporais, uma vez que sequestra e solubiliza iões férricos. No presente trabalho de investigação científica, pretendeu-se encapsular a lactoferrina (a partir de um extracto comercial purificado) em nanovesículas lipídicas, assegurando-se a estabilização estrutural e funcional da sua estrutura tridimensional. Para tal, recorreu-se ao método das emulsões múltiplas, formulando-se e optimizando-se uma emulsão água-em-óleo-em-água. Durante todo o período de armazenamento da nanoemulsão optimizada, a lactoferrina encapsulada não se deteriorou, o que comprova a eficácia do processo de encapsulação. As nanovesículas lipídicas preparadas nas condições ideais foram empregues com sucesso em ensaios antimicrobianos laboratoriais.

Palavras-chave: Lactoferrina, nanovesículas lipídicas, emulsões múltiplas água-em-óleo-em-água, estabilização estrutural e funcional, actividade anti-microbiana.

Abstract

Lactoferrin is a protein initially isolated from milk, and has for long captured the interest of many researchers as a natural compound with a wide array of potential (and real) uses. Lactoferrin is a monomeric, iron-binding glycoprotein with a molecular weight of ca. 80 kDa encompassing 703 aminoacids, and appears to be the subfraction of whey with the best documented antiviral, antimicrobial, anticancer and immune modulating/enhancing effects. It belongs to the family of transferrin proteins, and serves to control iron levels in body fluids by sequestering and solubilizing ferric iron. In the present research effort, production of lactoferrin derivatives (starting from a purified commercial extract), encompassing full (structural and functional) stabilization of its three-dimensional structure, has been attempted via nanoencapsulation within lipid nanovesicles, integrating a multiple *water-in-oil-in-water* emulsion. Long-term storage of the multiple (optimized) nanoemulsions produced did not lead to leaching of protein, thus proving the effectiveness of the encapsulation procedure. Furthermore, lactoferrin nanovesicle derivatives prepared under optimal conditions were successfully employed at lab-scale antimicrobial trials.

Keywords: Lactoferrin, lipid nanovesicles, multiple water-in-oil-in-water emulsions, structural and functional stabilization, antimicrobial activity.

Aos meus pais,

Fátima e José.

Agradecimentos

Com este trabalho monográfico termino uma das mais importantes etapas do meu percurso académico. Quero aproveitar para demonstrar a minha gratidão a todos os que para tal contribuíram, directa ou indirectamente.

Um especial agradecimento ao Professor Doutor Victor M. Balcão pelo apoio, incentivo e orientação ao longo da elaboração deste trabalho. Estou-lhe grata por todo o conhecimento e oportunidades que tão prontamente me proporcionou. Às Professoras Doutoras Carla Matos e Carla Moutinho pela ajuda e aconselhamento constantes.

Quero agradecer à Eng^a Madalena Vieira (afiliada do Instituto para a Biotecnologia e a Bioengenharia (IBB) do Centro de Engenharia Biológica (CEB) da Universidade do Minho (UMinho)) por toda a ajuda técnica prestada na realização das análises de tamanho de partícula e Potencial Zeta, assim como nas análises de Calorimetria Diferencial de Varrimento.

Agradeço também à Professora Doutora Eliana Souto pelas sugestões dadas no início da realização deste trabalho. Aos colegas André Azevedo e Luís Miguel Castro, agradeço o companheirismo e os vários momentos de *brainstorming* no laboratório e fora dele.

Aos meus pais, por me terem ensinado a nunca recuar perante novos desafios. Aos meus irmãos, por sempre me apoiarem em todas as situações. Aos meus amigos, pela paciência e pelas palavras de incentivo. Por último ao Miguel, por tudo o que representa para mim.

A todos, o meu sincero agradecimento.

Porto, Junho de 2010

Carla Isabel Dias da Costa

Índice Geral

I. Introdução	15
1. Hipótese	16
2. Objectivos.....	17
3. Estrutura do trabalho monográfico.....	17
II. Estado-da-Arte	18
1. A Lactoferrina	18
i. Estrutura e propriedades moleculares.....	18
ii. Propriedades bioactivas.....	20
iii. Aplicações	22
2. Nanoemulsões múltiplas.....	23
i. Nanoemulsões múltiplas W/O/W'	24
ii. Composição das nanoemulsões W/O/W'	26
iii. Potencial Zeta e a estabilidade	27
III. Materiais e Métodos.....	29
1. Materiais.....	29
i. Proteína bioactiva.....	29
ii. Reagentes.....	29
iii. Equipamento analítico.....	30

2.	Procedimentos experimentais.....	31
i.	Preparação de nanoemulsões múltiplas contendo lactoferrina.....	31
ii.	Optimização da formulação.....	33
iii.	Teste de estabilidade acelerada	33
iv.	Determinação do tamanho hidrodinâmico (TH) e do potencial Zeta (PZ).....	33
v.	Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	34
vi.	Avaliação da actividade anti-microbiana da lactoferrina livre e das nanoemulsões múltiplas com lactoferrina encapsulada	35
vii.	Análise microestrutural por (crio)microscopia electrónica de varrimento.....	36
viii.	Preparação de um colutório e incorporação da nanoemulsão otimizada.....	37
IV.	Resultados e Discussão	38
1.	Optimização da formulação.....	38
i.	Natureza lipídica da fase oleosa	39
ii.	Tempo de homogeneização	41
iii.	Lactoferrina	43
iv.	Influência da concentração de tensioactivos e electrólitos.....	45
2.	Caracterização da formulação otimizada.....	47
i.	Análise macroscópica.....	47
ii.	Microanálise por (crio)microscopia electrónica de varrimento	48
iii.	Avaliação da estabilidade acelerada.....	48
iv.	Tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta	49

v. Actividade antimicrobiana	50
3. Preparação de um colutório incorporando a nanoemulsão otimizada	52
V. Conclusões	54
1. Perspectivas futuras.....	55
Bibliografia.....	56
Anexos.....	64

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura tridimensional da lactoferrina humana	19
Figura 2. Exemplificação da produção de nanoemulsões simples e múltiplas, através de dois ciclos de homogeneização com um homogeneizador de alta velocidade	25
Figura 3. Esquema ilustrativo do potencial Zeta	28
Figura 4. Zetasizer (modelo nanoseries Nano-ZS, Malvern Instruments).	30
Figura 5. Calorímetro diferencial de varrimento (modelo DSC-50, Shimadzu).	30
Figura 6. Microscópio electrónico de varrimento (modelo JSM 6301F, JEOL).....	31
Figura 7. Homogeneizador Ultra Turrax (modelo T25D, IKA).....	32
Figura 8. Esquema ilustrativo do enchimento de uma cuvete (<i>Folded Capillary Cell</i>)	34
Figura 9. Esquema ilustrativo da inserção da cuvete na área de leitura do ZetaSiser...	34
Figura 10. Sequência de etapas na análise das amostras de nanoemulsões com lactoferrina encapsulada por Cryo-SEM	37
Figura 11. Evolução do tamanho hidrodinâmico das nanovesículas produzidas com diferentes lípidos (ciclos de homogeneização: 10 minutos), ao longo do tempo	40
Figura 12. Efeito do tempo de homogeneização no tamanho hidrodinâmico das nanovesículas produzidas, ao longo do período de armazenamento	41
Figura 13. Termogramas de calorimetria diferencial de varrimento de nanoemulsões múltiplas produzidas com diferentes tempos de homogeneização, com e sem LF	42
Figura 14. Efeito da concentração de lactoferrina no tamanho hidrodinâmico (TH) e no potencial Zeta (PZ) das nanovesículas produzidas com o lípido Softisan™.	44

Figura 15. Aspecto visual das (nano)formulações produzidas com diferentes concentrações de NaCl (1, 10 e 100 mM).	45
Figura 16. Efeito da adição de um electrólito (NaCl) no tamanho hidrodinâmico e no potencial Zeta da nanoemulsão ao longo do tempo de armazenamento.....	46
Figura 17. Efeito da variação da quantidade de excipientes no potencial Zeta das nanovesículas produzidas com Softisan™ (tempo de homogeneização: 10 minutos)...	47
Figura 18. Aspecto macroscópico da formulação otimizada (F ₅).	47
Figura 19. Microfotografias electrónicas de varrimento da LF comercial liofilizada e crio-microfotografias electrónicas de varrimento da nanoemulsão otimizada.....	48
Figura 20. Evolução do TH e do PZ da formulação otimizada (F ₅), ao longo dos primeiros 30 dias de armazenamento e com prolongamento até praticamente 1 ano. ...	49
Figura 21. Aspecto final dos vários colutórios formulados (C ₁ a C ₆)	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais actividades <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da lactoferrina descritas na literatura e respectivo mecanismos de acção.	21
Tabela 2. Optimização da composição da formulação inicial (F ₀) até à obtenção da formulação ideal (F ₅).	38
Tabela 3. Resultados da análise microcalorimétrica das dispersões lipídicas com LF (F ₀) produzidas com diferentes tempos de homogeneização e sem LF (F ₁).	43
Tabela 4. Actividade antimicrobiana da LF frente a várias estirpes bacterianas.....	51
Tabela 5. Resultados da actividade antimicrobiana da lactoferrina frente ao fungo oportunista <i>Candida albicans</i>	51
Tabela 6. Composição mássica percentual dos vários colutórios (C _i) preparados.	53

Lista de Abreviaturas

CMI: Concentração Mínima Inibitória

C_n: Colutório número *n*

EDS: Espectroscopia de Dispersão de Energia (“Energy Dispersive Spectrometry”)

F_n: Formulação número *n*

H₂O UP: Água Ultra-Pura

kDa: kilo Daltons

LF: Lactoferrina

NLC: Transportadores lipídicos nanoestruturados (“Nanostructured Lipid Carriers”)

PZ: Potencial Zeta

PF: Ponto de Fusão

SEM: Microscopia Electrónica de Varrimento (“Scanning Electron Microscopy”)

SLN: Nanopartículas Lipídicas Sólidas (“Solid Lipid Nanoparticles”)

T: Temperatura

TH: Tamanho Hidrodinâmico

W/O/W’: Emulsão Múltipla do tipo água-em-óleo-em-água

I. Introdução

Em praticamente todos os alimentos é possível encontrar inúmeras substâncias biologicamente activas. Atendendo às propriedades naturais que apresentam, a sua aplicação biofarmacêutica é uma possibilidade promissora (Petricoin e Liotta., 2003). O leite é um desses exemplos, pois contém muitas proteínas e peptídeos dotados de múltiplas propriedades bioactivas sendo, por isso, alvo de crescente interesse por parte de muitos investigadores (Hakkah *et al.*, 2000; Tsuda *et al.*, 2000).

O leite é constituído por dois grandes grupos proteicos, as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β e κ) constituem cerca de 80% do total proteico do leite de vaca. Os restantes 20% correspondem às proteínas do soro: α -lactoalbumina e β -lactoglobulinas (70 a 80%) e imunoglobulinas, glicomacropéptidos, albumina do soro, lactoferrina, proteoseptonas e várias enzimas (20 a 30%) (Fennema, 1965; Korhonen *et al.*, 1998).

Assim, uma interessante fonte de proteínas lácteas com potencial de aplicação biofarmacêutica e alimentar, como por exemplo a lactoferrina (LF), é o soro de queijo bovino, um subproduto incontornável da indústria de produção de queijos. Com a valorização deste resíduo é possível o isolamento e purificação das proteínas individuais para alimentação e aplicações nutricionais e terapêuticas (Rodrigues e Teixeira, 2007).

A LF é considerada uma proteína multifuncional, estando directamente envolvida em diversos mecanismos biológicos. É conhecida pela sua acção inibitória na proliferação celular, bem como pelas suas actividades anti-inflamatórias, anti-oxidantes e anti-cancerígenas (Tsuda *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2002), o que contribui decisivamente para o seu elevado potencial do ponto de vista de aplicações biofarmacêuticas.

No entanto, como acontece com a grande maioria das proteínas e/ou enzimas, é uma biomolécula bastante sensível. A mínima alteração da sua arquitectura tridimensional pode levar à redução da sua actividade biológica. Para uma aplicação viável da LF, é fundamental a sua estabilização estrutural e funcional. Uma

possibilidade a considerar é a encapsulação da proteína em veículos lipídicos nanométricos, numa tentativa de prevenir a sua desnaturação devido a efeitos de diluição e proteólise, por exemplo.

Além de assegurarem estabilização, as nanopartículas surgem como uma solução promissora para a administração de peptídeos e proteínas uma vez que apresentam um perfil de libertação controlada, têm um tamanho sub-celular e permitem versatilidade no âmbito das suas formulações, assegurando-se a biocompatibilidade ao nível de tecidos e células (Reis *et al.*, 2006a).

1. *Hipótese*

Actualmente, a prevalência de cáries dentárias e de afecções periodontais na população é muito elevada apesar de todos os produtos comercialmente disponíveis para o tratamento de infecções da cavidade oral. Atendendo às propriedades bioactivas da lactoferrina, presume-se que a libertação desta molécula bioactiva na cavidade oral seja útil na prevenção, tratamento e/ou gestão de afecções dentárias e tecidos relacionados, incluindo cáries dentárias, flora microbiana, tártaro, e afecções periodontais.

As nanovesículas lipídicas contendo lactoferrina encapsulada poderiam ser incorporadas, por exemplo, em formulações de colutórios, pastas dentífricas, soluções de limpeza de próteses dentárias, entre outras, com o objectivo de eliminar a microflora oral responsável pela formação de biofilmes orais com uma vantagem óbvia: as nanovesículas poderiam libertar lentamente o seu conteúdo dotado de actividade antibacteriana naturalmente, reduzindo o desenvolvimento de infecções orais. Sendo uma proteína de origem natural, a sua incorporação nas referidas formulações não implicaria quaisquer prejuízos para a saúde, mesmo sendo ingerida.

2. Objectivos

Neste trabalho de investigação pretendeu-se estudar a possibilidade de encapsular lactoferrina em nanovesículas lipídicas para posterior incorporação em formulações destinadas à higiene oral. Para tal, delinearam-se os seguintes objectivos: (i) selecção inicial de excipientes para desenvolvimento da formulação com vista a nanoencapsular LF; (ii) escolha da metodologia que permitisse a conservação das propriedades bioactivas da LF; (iii) optimização da formulação inicial para se garantir a sua estabilidade ao longo do tempo (de armazenamento); (iv) caracterização das propriedades físico-químicas e antimicrobianas da formulação final; (v) incorporação da formulação optimizada num colutório; e (vi) avaliação da sua estabilidade temporal.

3. Estrutura do trabalho monográfico

Para além da “Bibliografia” e dos “Anexos”, esta monografia está dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo, “Introdução”, dá a conhecer ao leitor a temática explorada no presente trabalho monográfico de investigação, bem como os principais objectivos delineados. No segundo capítulo, “Estado-da-Arte”, é feita uma revisão bibliográfica dos principais conceitos subordinados à temática central. Expõem-se, também, os motivos que levaram à escolha da metodologia adoptada.

O terceiro capítulo, “Materiais e Métodos”, está estruturado em dois subcapítulos onde se indicam todos os materiais utilizados bem como todos os procedimentos experimentais adoptados no presente trabalho de investigação. No quarto capítulo, “Resultados e Discussão”, expõem-se todos os resultados experimentais obtidos procedendo-se à respectiva discussão. Encontra-se dividido em vários pontos, apresentados de acordo com a ordem seguida para a optimização da formulação e para a sua caracterização. Por último, no quinto capítulo, “Conclusão”, sintetiza-se o trabalho desenvolvido a partir da hipótese inicialmente proposta e destacam-se as principais conclusões alcançadas. Referem-se, também, questões consideradas pertinentes e que, no futuro, poderão tornar-se o ponto de partida para outros trabalhos de investigação ou de continuação dos trabalhos aqui iniciados.

II. Estado-da-Arte

1. *A Lactoferrina*

A lactoferrina (LF), também conhecida como lactotransferrina, é uma glicoproteína bilobada que pertence à família das proteínas transportadoras de ferro, transferrinas (Lönnerdal e Iyer, 1995; Hoek *et al.*, 1997; Vorland, 1999; Naidu, 2000; Steijns e Hooijdonk, 2000; Brock, 2002; Takakura, 2003; Orsi, 2004).

A descoberta da LF deve-se a Sorensen e Sorensen (1939), que identificaram uma fracção proteica vermelha no leite humano. A LF foi isolada, pela primeira vez, a partir de leite bovino por Groves (1960) e a partir de leite humano por Johanson (1960) (*cit. in Baker et al.*, 2002). Desde então, vários estudos científicos têm decorrido com o objectivo de elucidar a sua estrutura, biosíntese, funções fisiológicas, entre outras, fornecendo um conhecimento aprofundado desta proteína multifuncional.

A importância biológica da LF é evidenciada pela sua localização em diversos fluidos biológicos sujeitos a ataques microbianos. É possível encontrar LF nas excreções das glândulas exócrinas dos aparelhos digestivo, respiratório e reprodutivo de vários mamíferos, tais como leite, lágrimas, saliva e sémen. Também é encontrada nos grânulos de neutrófilos, sendo libertada durante processos inflamatórios. Está presente nos fluidos corporais sem ferro, ligada a uma ou a duas moléculas de ferro (Hoek *et al.*, 1997; Naidu, 2000; Steijns e Hooijdonk, 2000; Baker *et al.*, 2002; Takakura, 2003).

i. Estrutura e propriedades moleculares

A LF humana é constituída por aproximadamente 700 aminoácidos e apresenta um tamanho molecular de 80 kDa (Hoek *et al.*, 1997; Steijns e Hooijdonk, 2000; Baker *et al.*, 2002; Brock, 2002). A LF de diferentes espécies apresenta uma homologia de cerca de 70% na sequência de aminoácidos. Comparando a LF de origem bovina com a LF de

origem humana, verifica-se uma homologia em 60% na sequência de aminoácidos. Apresenta, também, uma grande homologia de sequência com a transferrina (60%) e as suas estruturas tridimensionais são similares (Baker, 1994; Rodrigues e Teixeira, 2007).

No entanto, contrariamente às outras transferrinas, a LF é uma proteína extremamente básica com um ponto isoelétrico de 8-9, sendo possível a sua ligação a moléculas aniónicas. Adicionalmente, mantém a ligação com o ferro mesmo perante reduzidos valores de pH. As transferrinas geralmente libertam o ferro quando o pH baixa para valores entre 5.5-6.0. No caso da LF, o pH terá que baixar para valores inferiores a 3.5, para que tal libertação ocorra (Naidu, 2000; Baker *et al.*, 2002; Brock, 2002).

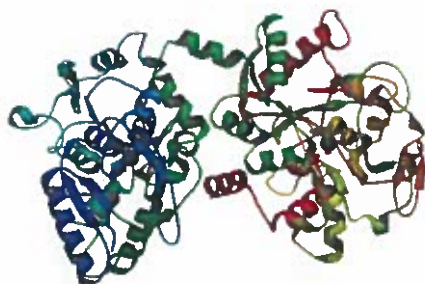


Figura 1. Estrutura tridimensional da lactoferrina humana. [Fonte: RCSB Protein Data Bank Home Page, disponível em <<http://www.rcsb.org>>]

Tridimensionalmente, a LF consiste numa cadeia polipeptídica dobrada em dois lóbulos globulares (N- e C-lóbulo), ligados entre si através de uma hélice α (de três dobras) que lhe confere flexibilidade (ver Figura 1). Em cada lóbulo existe um local de ligação ao ferro encerrado no seu interior, o que dificulta o acesso a esse íon por parte das bactérias. Além disso, a sua localização fechada implica a ocorrência de uma grande alteração conformacional da LF para que ocorra a libertação do ferro. De acordo com o referido anteriormente, tal alteração apenas se verifica perante valores de pH inferiores a 3.5 (Lønnerdal e Iyer, 1995; Vorland, 1999; Steijns e Hooijdonk, 2000; Baker *et al.*, 2002; Brock, 2002).

Assim sendo, a LF deve ser considerada como uma molécula com duas formas estruturais diferentes. Quando se encontra ligada ao ferro apresenta-se como uma

proteína fechada, estável, relativamente rígida e resistente à acção de proteases. Por outro lado, quando está na forma livre, tem uma estrutura aberta, flexível e mais sensível à proteólise (Steijns e Hooijdonk, 2000; Baker *et al.*, 2002). É possível afirmar que a ligação ao ferro assume um papel importante na sua conformação e, consequentemente, no seu papel bioactivo.

ii. Propriedades bioactivas

Atendendo à família a que pertence a LF (proteínas transportadoras de ferro), a investigação inicial prendeu-se com as propriedades relacionados com a sua capacidade de se ligar ao ferro. No entanto, com o decorrer dos estudos foi-se considerando a possibilidade desta glicoproteína exercer outras actividades fisiológicas.

Actualmente, são várias as actividades reconhecidas pela comunidade científica: anti-bacteriana, antiviral, anti-fúngica, anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora (Yamauchi *et al.*, 1993; Hoek *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 2002; Takakura *et al.*, 2003; Orsi, 2004; Rodríguez-Franco *et al.*, 2005).

Na Tabela 1 estão resumidas as principais actividades biológicas da LF, fazendo-se uma breve alusão aos respectivos mecanismos de acção descritos na literatura. Considerando o conjunto de propriedades bioactivas da LF, pensa-se que esta proteína integre o sistema imunitário inato. Por outro lado, também está descrita como participando em reacções imunitárias específicas, ainda que de uma forma indirecta (Orsi, 2004).

A localização da LF na superfície das mucosas privilegia a sua acção na defesa contra infecções microbianas, afectando uma grande variedade de agentes infecciosos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, protozoários e fungos) (Hoek *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2002).

Tabela 1. Principais actividades *in vivo* e *in vitro* da lactoferrina descritas na literatura e respectivo mecanismo de acção.

Actividade	Mecanismo de acção	Referências
Absorção de Ferro	Aumento de solubilidade e absorção mediada por receptor.	Baker <i>et al.</i> , 2002; Brock, 2002; Hoek <i>et al.</i> , 1997.
Antibacteriana	Inibição do crescimento bacteriano por eliminação de Fe ou desintegração (ou possível penetração) da membrana plasmática.	Baker <i>et al.</i> , 2002; Brock, 2002; Hoek <i>et al.</i> , 1997; Naidu e Nimmagudda, 2003; Orsi, 2004; Yamauchi <i>et al.</i> , 1993.
Antiviral	Inibição do processo de adsorção/ligação do vírus às células do hospedeiro.	Baker <i>et al.</i> , 2002; Orsi, 2004; Brock, 2002.
Antiparasitária	Interferência na aquisição de ferro pelo parasita.	Brock, 2002; Steijns e Hooijdonk, 2000.
Anti-fúngica	Aumento da permeabilidade da membrana celular.	Brock, 2002; Orsi, 2004; Takakura <i>et al.</i> , 2003.
Anti-inflamatória e imunomoduladora	Estimulação de células <i>natural-killer</i> , maturação de células T, redução de citocinas pró-inflamatórias.	Baker <i>et al.</i> , 2002; Brock, 2002; Vorland, 1999.
Antioxidante	Remoção do ferro presente no meio.	Baker <i>et al.</i> , 2002; Steijns e Hooijdonk, 2000.

No entanto, a actividade antimicrobiana da LF não se deve apenas à capacidade de ligação ao ferro, privando os microorganismos deste elemento e, conseqüentemente, limitando o seu crescimento. Vários estudos científicos demonstraram que o mecanismo de actividade antimicrobiana é mais complexo do que a simples privação de ferro (Lara *et al.*, 2001), estando implicado, também, um efeito directo na própria bactéria, através da sua ligação à componente lipídica A do polissacarídeo bacteriano, o que leva a um aumento da permeabilidade membranar (Hoek *et al.*, 1997; Orsi, 2004).

Esta acção bactericida directa é atribuída à lactoferricina, um peptídeo obtido através de clivagem enzimática (hidrólise ácida da LF com pepsina), que possui actividade contra um grande número de microorganismos. No intestino, este peptídeo protege o organismo contra o crescimento e a proliferação de microorganismos

intestinais patogénicos (Yamauchi *et al.*, 1993; Hoek *et al.*, 1997; Vorland, 1999; Orsi, 2004).

iii. Aplicações

Considerando todas as funções biológicas desempenhadas pela LF, antevê-se uma grande diversidade de aplicações biotecnológicas para esta proteína bioactiva: suplementos alimentares, produtos para higiene oral, cosméticos (acção anti-oxidante), produtos nutracêuticos, entre outros.

Por exemplo, quando presente no tracto gastrointestinal (TGI) a LF desempenha um papel importante na absorção de ferro pela mucosa intestinal dos recém-nascidos, o que a torna uma possível fonte de ferro para crianças amamentadas. Esse é um dos motivos que levou à introdução desta proteína em formulações lácteas infantis consumidas no Japão, na Coreia e noutros países asiáticos (Orsi, 2004).

Muito promissora parece a combinação desta proteína com fármacos anti-fúngicos. Vários estudos científicos evidenciam as potencialidades da LF quando combinada com certos fármacos, face ao efeito sinérgico que apresenta. São exemplos a associação da LF com fluconazol (Kuipers *et al.*, 1999; Masci, 2000) e com a claritromicina (Orsi, 2004).

A aplicação tópica para o combate de inflamações e/ou infecções também é interessante. Há ainda a considerar a potencial aplicação da LF no tratamento do cancro, actualmente alvo de muita investigação científica (Baker *et al.*, 2002; Rodrigues e Teixeira, 2007).

2. Nanoemulsões múltiplas

A administração oral de compostos biofarmacêuticos baseados em proteínas bioactivas é um dos principais desafios a ultrapassar pela ciência e tecnologia farmacêutica (García-Fuentes *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2006a; Almeida e Souto, 2007; Lee e Yuk, 2007; Sanjula *et al.*, 2009), uma vez que, apesar do seu enorme potencial (bio)tecnológico, ainda se levantam alguns inconvenientes significativos (Yang *et al.*, 2009).

Actualmente, o número de (bio)fármacos baseados em grandes moléculas biológicas, como é o caso das proteínas e dos peptídeos, está a aumentar drasticamente (Reis *et al.*, 2006b). No entanto, factores como por exemplo a estabilidade e o tempo de circulação no TGI, podem afectar fortemente a absorção efectiva das proteínas administradas por via oral (Dupeyrón *et al.*, 2009). O desenvolvimento de estratégias que permitam a estabilização estrutural e funcional das proteínas bioactivas pode aumentar a sua aplicação biofarmacêutica (Srinivas *et al.*, 2010).

Neste contexto, a atenção das comunidades científica e industrial tem-se voltado cada vez mais para o desenvolvimento de técnicas de micro e nanoencapsulação, baseadas no revestimento e isolamento das substâncias bioactivas com materiais de protecção. São exemplos de novos sistemas transportadores de (bio)fármacos, os hidrogéis poliméricos, as nanopartículas, as microesferas e os sistemas lipídicos de distribuição de fármacos, tais como as emulsões lipídicas, os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN) e os transportadores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers*, NLC) (Almeida e Souto, 2007).

Os transportadores à base de lípidos têm merecido especial atenção, sendo encarados como materiais alternativos para a administração de peptídeos e proteínas

bioactivos, permitindo salvaguardar a estabilidade destas biomoléculas (Rawat *et al.*, 2008; Acosta, 2009; Chakraborty *et al.*, 2009).

De acordo com inúmeros trabalhos científicos descritos na literatura da especialidade, actualmente a encapsulação de fármacos em sistemas lipídicos pode ser realizada por diversas técnicas que permitem o controlo da estrutura e das propriedades físico-químicas das partículas nanométricas e asseguram a eficácia da encapsulação e da libertação controlada das substâncias bioactivas encapsuladas.

São exemplos de metodologias experimentais a emulsificação-evaporação do solvente, a emulsificação-difusão, a homogeneização por alta pressão, a microfluidização e a nanoemulsão múltipla (Wissing *et al.*, 2004). Recentemente, uma nova técnica baseada em métodos de nanoencapsulação, desenvolvida para assegurar a estabilidade de proteínas e enzimas, começou a ganhar destaque. Esta técnica consiste na encapsulação de macromoléculas numa matriz nanoporosa através da gelificação da solução (Ferrer *et al.*, 2003; Erdinc, 2007; Ragoonanan e Aksan, 2007).

A técnica da nanoemulsão é bastante utilizada pelas indústrias alimentares, de cosmética e de revestimentos. Atendendo à sua estrutura interna compartimentada, as nanoemulsões múltiplas apresentam vantagens face às emulsões simples, quando utilizadas para encapsulação de biomoléculas. Elas possibilitam a encapsulação simultânea de moléculas polares e não-polares. Adicionalmente, permitem uma libertação controlada mais eficaz das moléculas terapêuticas que transportam (Davis e Walker, 1987; Okochi e Nakano, 2000; Pays *et al.*, 2002; Marcato e Durán, 2008).

i. Nanoemulsões múltiplas W/O/W'

As emulsões água-em-óleo-em-água (W/O/W') são exemplos de emulsões múltiplas, nas quais pequenas gotículas de água (fase aquosa interna, W) se encontram

dispersas em gotas maiores de óleo (fase oleosa, O) que, por sua vez, estão dispersas numa fase aquosa contínua (fase aquosa externa, W') (Ficheux *et al.*, 1998; Bibette *et al.*, 1999; García-Fuentes *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Hanson *et al.*, 2008; Dupeyrón *et al.*, 2009).

Para a obtenção de partículas nanométricas, recorre-se a homogeneizadores de alta velocidade. A Figura 2 ilustra o método de preparação de nanoemulsões (simples e múltiplas) através de dois ciclos sequenciais de homogeneização a alta velocidade. Após o primeiro ciclo de homogeneização (i) as partículas têm ainda um tamanho elevado, mas com o decorrer da agitação (ii) o tamanho das partículas vai sendo progressivamente reduzido (Hanson *et al.*, 2008). A redução do tamanho de partícula oferece um ambiente (hidrofílico) biologicamente relevante onde as reacções ocorrem em pequenos compartimentos, permitindo liberdade às moléculas desde que estas não interajam com as paredes lipídicas das nanovesículas (Dudia *et al.*, 2008).

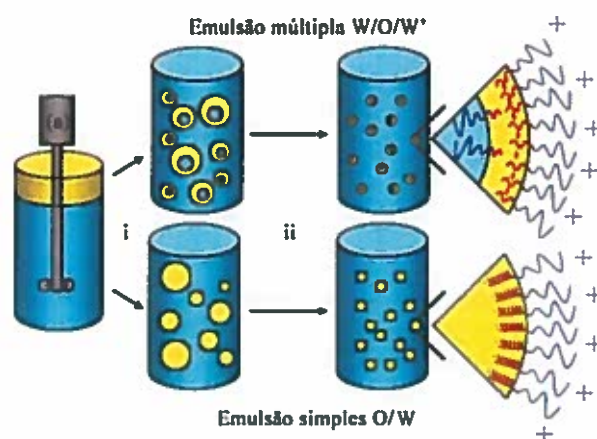


Figura 2. Exemplificação da produção de nanoemulsões simples (O/W) e múltiplas (W/O/W'), através de dois ciclos de homogeneização sequenciais (i e ii) com um homogeneizador de alta velocidade (a). A coloração amarela e a coloração azul representam a fase oleosa e a fase aquosa, respectivamente. [Adaptado de Hanson *et al.* (2008)]

Como se encontram confinadas num ambiente nanométrico (isto é, em nanoporos), os movimentos moleculares das moléculas de água são alterados, diminuindo a sua velocidade. Assim, o aprisionamento de proteínas ou peptídeos no interior dos nanoporos matriciais tem o mesmo efeito que os osmólitos no que diz respeito à alteração da actividade da água e, portanto, modificam as velocidades das reacções bioquímicas. Decorrente tanto do aumento da viscosidade como da diminuição da entropia (aprisionamento físico), os níveis de reacções (de degradação) diminuem e os materiais biológicos permanecem (mais) estáveis durante o seu armazenamento (Ragoonanan e Aksan, 2007; Mozafari *et al.*, 2008).

ii. Composição das nanoemulsões W/O/W'

Os transportadores à base de lípidos constituídos por uma mistura de lípidos sólidos purificados (SLN) tendem a desenvolver uma matriz lipídica cristalina bem ordenada, levando a uma diminuição do espaço livre destinado às moléculas bioactivas que se pretendem encapsular. Quando constituídos por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos (NLC), forma-se uma estrutura desorganizada, aumentando-se a área disponível para encapsular as substâncias bioactivas (Radtke *et al.*, 2005).

A estabilização dos sistemas é extremamente importante, para que possam manter ao longo do tempo a sua estrutura característica. Para tal, recorre-se à incorporação de agentes tensioactivos e outros adjuvantes. O agente tensioactivo mais descrito na literatura científica da especialidade é a lecitina, constituída por uma mistura complexa de fosfolipídeos. Também é descrita a sua associação a outros agentes como o polissorbato 80 e o poloxâmico 188 (Almeida *et al.*, 1997; García-Fuentes *et al.*, 2002; Fronza *et al.*, 2004; Suresh *et al.*, 2007; Bihari *et al.*, 2008; Chorilli *et al.*, 2009).

O poloxâmico 188 (copolímero tribloco não iónico constituído por um núcleo central hidrofóbico de polioxipropileno, ladeado por duas cadeias hidrofílicas de

polioxietileno) caracteriza-se pela sua capacidade de estabilização estérica das suspensões. Assim, emulsões múltiplas água-em-óleo-em-água podem ser preparadas de forma relativamente simples e estabilizadas durante vários meses utilizando tais tensioactivos sintéticos anfífilos (poloxâmeros), que estabilizam até gotículas sujeitas a fluxos extremos, permitindo a produção de nanoemulsões múltiplas robustas propícias a aplicações de encapsulação nanoestruturada nas indústrias alimentares, de cosméticos e de libertação controlada de fármacos (Hanson et al., 2008).

Por sua vez, os electrólitos são utilizados para modificar forças repulsivas entre as partículas. Como a maioria das dispersões lipídicas é estabilizada através da repulsão electrostática, quanto maiores forem as forças repulsivas entre as partículas menor é a probabilidade destas se aproximarem entre si e agregarem-se (coalescerem), levando a um sistema mais estável.

A incorporação de HCl tem por objectivo controlar o pH do sistema, adequando-o ao pH do meio a que se destina a administração destes sistemas de transporte de (bio)fármacos. Outro factor a considerar é a possível oxidação da nanoemulsão, que pode desestabilizar o sistema nanométrico. A inclusão de excipientes com propriedades anti-oxidantes deve por isso ser estudada (Fronza *et al.*, 2004).

iii. Potencial Zeta e a estabilidade

O potencial Zeta (PZ) é o potencial eléctrico medido no plano de corte de uma partícula, que está a uma pequena distância da sua superfície e que pode ser medido através da distribuição de mobilidade de partículas carregadas sujeitas a um campo eléctrico. A mobilidade pode ser definida como a velocidade de uma partícula por unidade de campo eléctrico e é determinada aplicando um campo eléctrico na dispersão das partículas e medindo-se a sua velocidade média.

A carga de superfície de cada partícula afecta a distribuição de iões em seu redor, formando uma dupla camada eléctrica em torno de cada (nano)partícula (ver Figura 3).

Quando uma partícula se move, os íões nas imediações da sua fronteira movem-se com ela, e vice-versa. O PZ é o potencial que existe dentro deste limite, e a sua intensidade é uma indicação do potencial de estabilidade do sistema coloidal, podendo ser quantificado pela determinação da velocidade linear das partículas num campo eléctrico. Este parâmetro depende obviamente da concentração de íões presentes no solvente.

O principal motivo para se determinar o PZ reside na necessidade de se prever a estabilidade coloidal de um dado sistema que, por sua vez, depende das interacções entre as partículas que o constituem. A sua determinação é, portanto, uma tentativa de quantificar essas interacções, prevendo a sua estabilidade.

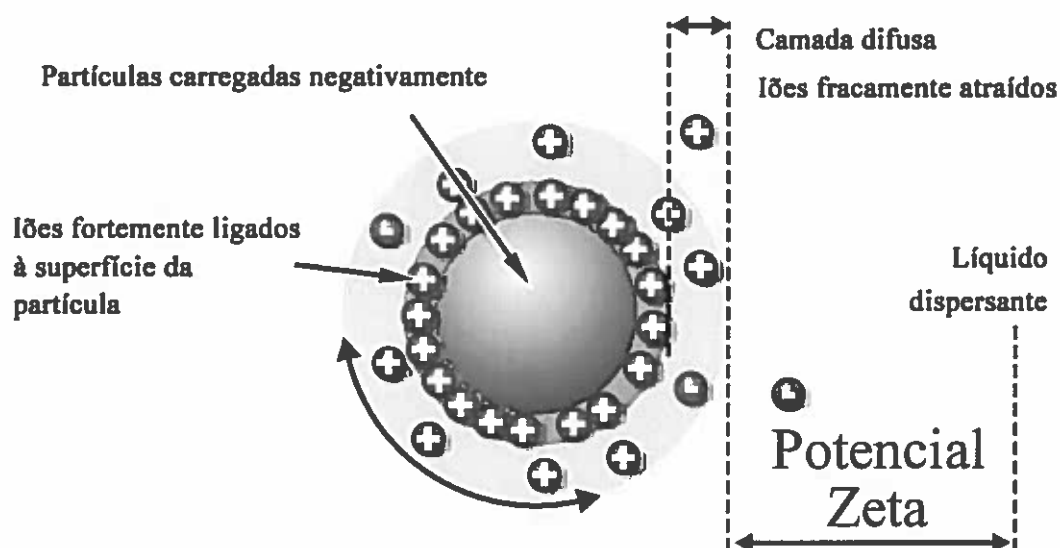


Figura 3. Esquema ilustrativo do potencial Zeta. [Fonte: Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0-317, Issue 2.1, July 2004]

III. Materiais e Métodos

1. *Materiais*

i. *Proteína bioactiva*

A lactoferrina bioactiva utilizada no trabalho de investigação aqui descrito proveio de um extracto puro (96.0% de conteúdo proteico com 98.0% lactoferrina) de soro de leite bovino, gentilmente fornecido pela DMV International (Delhi NY, USA).

ii. *Reagentes*

O Softisan100™ foi comprado à Sasol (Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburgo, Alemanha). O $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi adquirido à Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha). O Lutrol F68™ (poloxâmero 188) foi gentilmente cedido pela BASF ChemTrade GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O Precirol ATO5™ (distearato de glicerol) e o Compritol 888ATO™ (dibehenato de glicerol) foram generosamente fornecidos pela Gattefossé SAS (Saint Priest, França). O Glicerol (anidro) foi comprado à Fluka (Steinheim, Alemanha). O Tween 80 (polissorbato 80) proveio da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Por sua vez, o HCl comercial (37%, m/m) e o NaCl foram comprados à Vaz Pereira (Lisboa, Portugal). A fosfatidilcolina de soja (lecitina) proveio da Acofarma (Barcelona, Espanha). Relativamente aos papéis de filtro (tamanho de diâmetro de poro de 0.22 μm), foram comprados à Nalgene (Nova York, USA), e os filtros não-esterilizantes (tamanho de diâmetro de poro de 0.45 μm) provieram da Nucleopore (Cambridge MA, USA). A água ultra-pura (H_2O UP) foi obtida através da purificação de água desionizada utilizando o sistema Milli-Q Plus 185 (Molsheim, França), tendo uma condutividade final de 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$.

iii. Equipamento analítico

Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas num espectrofotómetro UV-VIS da Shimadzu (Kyoto, Japão), utilizando-se cuvetes de quartzo, no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (DEB-UMinho). O potencial Zeta (ZP) e o tamanho hidrodinâmico (TH) das (nano)partículas foram determinados num DLS (*Dynamic Laser Scattering*) (Zetasizer modelo Nanoseries Nano-ZS, Malvern Instruments Lda., Worcestershire, Reino Unido; ver Figura 4), no DEB-UMinho. Os estudos microcalorimétricos foram executados num calorímetro diferencial de varrimento da Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por um detector (DSC-50) e um analisador térmico (TA-501) (ver Figura 5), no DEB-UMinho.



Figura 4. Zetasizer (modelo nanoseries Nano-ZS, Malvern Instruments).



Figura 5. Calorímetro diferencial de varrimento (modelo DSC-50, Shimadzu).

A caracterização morfológica e estrutural das nanoemulsões lipídicas foi realizada num microscópio electrónico de varrimento de alta resolução da marca JEOL (modelo JSM 6301F, JEOL, Tóquio, Japão), acoplado a um dispositivo de revestimento a ouro por pulverização catódica de iões (modelo JSC1100, JEOL, Tóquio, Japão), a um sistema de microanálise por raios X (modelo INCA 350 Energy X-Ray) através de espectroscopia de dispersão de energia de raio-X (Energy Dispersive Spectrometry, SEM/EDS) proveniente da Oxford Instruments GmbH (Wiesbaden, Alemanha), e a um sistema de observação de amostras a baixas temperaturas da Gatan Inc. (modelo Alto 2500, Gatan Inc, Pleasanton CA, USA) (ver Figura 6), no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).



Figura 6. Microscópio electrónico de varrimento (JEOL, modelo JSM 6301F, Tóquio, Japão).

2. Procedimentos experimentais

Para a produção das nanovesículas lipídicas, o componente bioactivo (LF) foi inicialmente dissolvido numa fase aquosa (W) e disperso na fase lipídica (O), sob homogeneização e temperatura constantes (8000 rpm e cerca de 40 °C, respectivamente). A emulsão resultante foi, posteriormente, emulsionada com uma outra fase aquosa (W'), sob as mesmas condições, obtendo-se uma nanoemulsão múltipla do tipo W/O/W'. As nanoemulsões obtidas foram, então, caracterizadas físico-quimicamente através da observação macro e microscópica, da determinação do tamanho hidrodinâmico de partícula, do Potencial Zeta e do pH, bem como da análise microcalorimétrica. Também a sua actividade antimicrobiana foi estudada através de ensaios *in vitro*, em diversas estirpes microbianas e em meio líquido. Por último, procedeu-se à incorporação da formulação optimizada em diversos colutórios, avaliando-se a sua estabilidade.

i. Preparação de nanoemulsões múltiplas contendo lactoferrina

A produção de nanoemulsões múltiplas água-em-óleo-em-água (W/O/W'), contendo lactoferrina encapsulada, foi realizada com o auxílio de um homogeneizador Ultra Turrax (modelo T25D, IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Alemanha)) (ver Figura 7).



Figura 7. Homogeneizador Ultra Turrax (modelo T25D, IKA). [Fonte: autor]

Primeiro preparou-se uma emulsão simples água-em-óleo (W/O) de acordo com os seguintes procedimentos experimentais: fundiu-se, em banho-maria, 0.5 g de lípido (Softisan™, Precirol™ ou Compritol™) com 0.05 g de lecitina, a uma temperatura não superior a 50 °C (fase oleosa, O); adicionou-se de seguida glicerol (5 mL) previamente aquecido (a $T \approx 40$ °C); em separado, a 5 mL de HCl 0.01 M adicionou-se Tween 80 (0.05 g) e lactoferrina (0.025 g) (fase aquosa interna, W), e aqueceu-se no mesmo banho termostatizado a 40 °C; adicionou-se a fase aquosa (W) à fase oleosa fundida (O), homogeneizando com o Ultra Turrax a 8000 rpm durante o tempo pretendido (5, 10 ou 20 minutos), no banho termostatizado.

De seguida, preparou-se a segunda fase aquosa (fase aquosa externa, W'): dissolveram-se 0.4 g de Lutrol™ (copolímero de natureza não-iônica com um núcleo hidrofóbico central de polioxipropileno ladeado por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno) em 40 mL de água ultra pura (H₂O UP), obtendo-se um gel aquoso de poloxâmero a 1%; aqueceu-se no mesmo banho-maria ($T \approx 40$ °C) metade da quantidade do gel preparado (20 mL).

Por último, emulsionou-se a fase W' na emulsão W/O, para obtenção da emulsão múltipla W/O/W': o gel de poloxâmero aquecido foi adicionado à emulsão W/O, homogeneizando-se com o Ultra Turrax a 8000 rpm, no mesmo banho-maria; no final do tempo de homogeneização definido, retirou-se a emulsão do banho e adicionou-se o restante gel de poloxâmero (20 mL), homogeneizando-se agora suavemente com agitação magnética. Para a produção de nanoemulsões de controlo, seguiram-se os passos anteriormente mencionados, à excepção da adição de lactoferrina. Todas as emulsões preparadas foram armazenadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente (cerca de 25 °C).

ii. Optimização da formulação

Para optimização da formulação inicial, estudou-se o efeito combinado de vários parâmetros: tempo de homogeneização a 8000 rpm (5, 10 e 20 minutos), quantidade de lactoferrina (0.025, 0.050, 0.100, 0.250 e 0.500 g), força iónica (NaCl, 1, 10 e 100 mM) da fase aquosa externa (W') e concentração de excipientes.

iii. Teste de estabilidade acelerada

Amostras das várias nanoemulsões foram sujeitas a testes de centrifugação numa microcentrífuga Eppendorf (MiniSpin centrifuge, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) com diferentes velocidades de rotação (1000, 2500 e 5000 rpm) durante um período de 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, avaliou-se o aspecto macroscópico das amostras, procurando-se sinais de instabilidade (separação de fases, aglomeração das partículas, cremeação, etc.).

iv. Determinação do tamanho hidrodinâmico (TH) e do potencial Zeta (PZ)

Para a determinação do tamanho hidrodinâmico e do potencial Zeta recorreu-se a um ZetaSizer (modelo nanoseries Nano-ZS da Malvern Instruments). O equipamento foi ligado cerca de 30 minutos antes de se efectuar qualquer leitura, garantindo-se a estabilização do laser.

Para as leituras, utilizaram-se cuvetes descartáveis específicas (*Folded Capillary Cell*). O enchimento das cuvetes com a(s) amostra(s) de nanoemulsão(ões) fez-se de acordo com os passos esquematizados na Figura 8: (i) com ajuda de uma micropipeta (ou seringa) introduziu-se lentamente a amostra na cuvette, evitando-se a formação de bolhas de ar; (ii) quando a amostra emergiu na outra extremidade da cuvette, colocou-se uma pequena tampa bloqueando-se assim essa saída; (iii) retirou-se a micropipeta da cuvette, e tapou-se também essa extremidade.

Estando a amostra no interior da cuvette, confirmou-se a ausência de bolhas de ar, que prejudicariam a leitura, e limpou-se a cuvette com papel absorvente. Em seguida,

iniciou-se o software de aquisição de dados do ZetaSizer, seleccionando-se o tipo de leitura pretendida (potencial Zeta e/ou tamanho hidrodinâmico). Quando solicitado pelo software, a cuvete foi introduzida na área de leitura do equipamento (ver Figura 9): (i) colocou-se a cuvete entre placas destinadas a estabilizar a temperatura; (ii) abriu-se a tampa de acesso à área de leitura e (iii) inseriu-se aí a cuvete, evitando tocar na parte inferior da cuvete (área de leitura); (iv) fechou-se a tampa e iniciou-se a leitura. Todos os dados registados foram posteriormente analisados no software de análise.

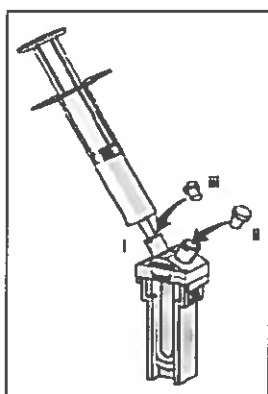


Figura 8. Esquema ilustrativo do enchimento de uma cuvete (*Folded Capillary Cell*). [Fonte: Zetasizer Nano Series, User Manual, *MAN0-317*, Issue 2.1, July 2004]

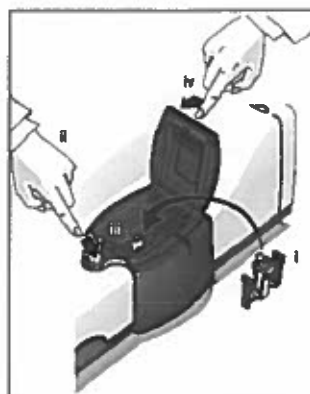


Figura 9. Esquema ilustrativo da inserção de uma cuvete na área de leitura do ZetaSizer. [Fonte: Zetasizer Nano Series, User Manual, *MAN0-317*, Issue 2.1, July 2004]

v. Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A análise com o DSC foi efectuada para obter informações relativas às propriedades físico-químicas das diversas formulações produzidas. Para cada ensaio microcalorimétrico, pesaram-se rigorosamente (com o auxílio de uma microseringa) cerca de 10 mg de nanoemulsão directamente para o interior de uma célula de alumínio de alta pressão (Shimadzu, P/N 557 201-53090, 64U3670609). Posteriormente, cada célula foi selada sob pressão.

Preparou-se igualmente um branco, selando apenas ar dentro de uma outra célula de alumínio. Cada amostra foi aquecida até uma temperatura de 100 °C a uma velocidade

de 5 °C/min. Durante esse período de aumento linear de temperatura registou-se a quantidade de calor absorvido por cada amostra, como resultado de possíveis variações físicas e químicas da amostra, em função da temperatura.

vi. Avaliação da actividade anti-microbiana da lactoferrina livre e das nanoemulsões múltiplas com lactoferrina encapsulada

A monitorização da actividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão. Colónias isoladas dos microorganismos testados (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, and *Candida albicans*), foram suspensas em 0.9% de NaCl estéril, de forma a obter uma turbidimetria *standard* de 0.5 na escala de McFarland (aproximadamente 1×10^5 UFC/mL).

Inoculou-se em tapete cada uma das suspensões preparadas, em placas contendo meio de cultura Mueller Hinton Agar. Depois de secas, fizeram-se poços equidistantes aos quais se adicionaram 60 µL de diferentes amostras de nanoemulsões. Utilizou-se água desionizada estéril como controlo negativo, e antibióticos como controlo positivo (Cloranfenicol para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*, e Ampicilina para *Listeria innocua*). Cada uma das placas foi incubada a 37 °C durante 24 horas.

Terminado o período de incubação, mediu-se o halo de inibição. No caso da LF pura e das nanoemulsões com actividade antimicrobiana, determinou-se a Concentração Mínima Inibitória (CMI)¹ através de ensaios em microplaca, utilizando-se os mesmos microorganismos-teste e o mesmo processo de inoculação. As suspensões dos microorganismos foram então inoculadas em placas de 96 poços contendo caldo

¹ A Concentração Mínima Inibitória (CMI), determinada para se quantificar actividade antimicrobiana de um composto, consiste na concentração mínima desse composto capaz de inibir o crescimento de um dado microorganismo.

Mueller Hinton no caso das bactérias, e caldo Yeast Malt no caso das leveduras, com diferentes concentrações de lactoferrina (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 µg/mL).

A água estéril serviu de controlo negativo e o meio não inoculado correspondeu ao controlo positivo. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. No final desse período, mediu-se a intensidade óptica num leitor de microplacas a 620 nm. A CMI determinada correspondeu à concentração mais baixa de LF (livre ou em nanoemulsão) que apresentou ausência de turbidimetria quando comparada com o controlo positivo.

vii. Análise microestrutural por (crio)microscopia electrónica de varrimento

As nanoemulsões lipídicas contendo LF encapsulada foram analisadas microestrutural e morfológicamente por Crio-Microscopia Electrónica de Varrimento (Cryo-SEM). Para tal, prepararam-se as amostras de acordo com os seguintes passos: (i) as amostras de nanoemulsão foram introduzidas de forma adequada num pequeno suporte ôco de alumínio inserido numa pequena placa metálica revestida a ouro (ver Figura 10a,b,c); (ii) a placa metálica revestida a ouro foi então devidamente fixada na extremidade de uma vara de transferência, e imersa em azoto líquido (lama de azoto) (ver Figura 10d); (iii) a amostra foi então transferida sob vácuo para a câmara de preparação do microscópio electrónico de varrimento (SEM) (também sob vácuo e mantida fria através da adição de azoto líquido) (ver Figura 10e); (iv) no interior da câmara, a amostra congelada a -173 °C foi fracturada, submetida a sublimação (entre 90 s a 300 s) por aumento suave da temperatura de -140 °C para cerca de -90 °C, e revestida por pulverização catódica com 100-200 Å de Au/Pd (durante 20 s) sob forte vácuo (0.5 atm) entre 2-30 mA a 2.5 kV (ver Figura 10e); (v) finalmente, a amostra foi transferida para a câmara do SEM para análise microscópica (ver Figura 10f).

As amostras foram analisadas no CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto) com um microscópio electrónico de varrimento da JEOL, a operar entre 5-15 KV, com um ângulo de incidência de 30°, acoplado a um sistema de microanálise por raios-X.

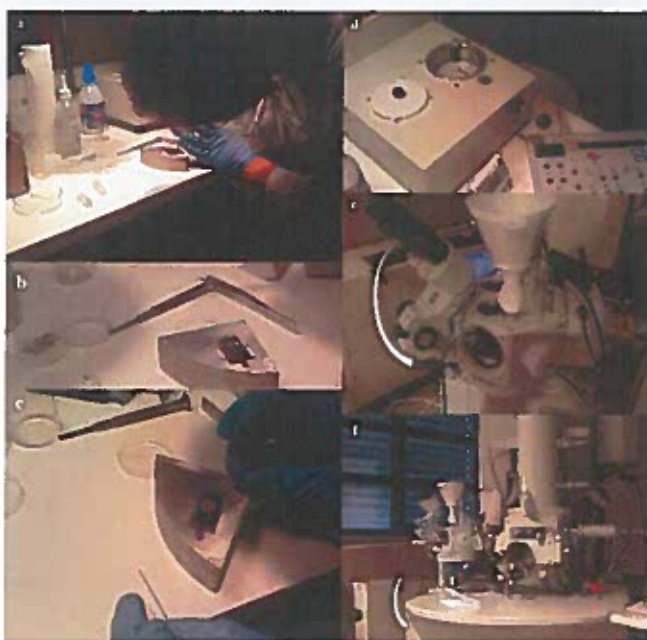


Figura 10. Sequência de etapas na análise das amostras de nanoemulsões com lactoferrina encapsulada por Cryo-SEM (ver legenda da sequência na secção vii - análise microestrutural por Cryo-SEM). [Fonte: autor]

viii. Preparação de um colutório e incorporação da nanoemulsão otimizada

Para a formulação do colutório (elixir) partiu-se da composição-base descrita na literatura de tecnologia farmacêutica, ou seja, utilizaram-se excipientes tensioactivos, espessantes/viscosificantes, humectantes, aromatizantes, conservantes, edulcorantes e o princípio activo (nanoemulsão otimizada) num veículo hidroalcoólico. Todos os constituintes na forma de pó foram triturados num almofariz, sendo posteriormente adicionados de forma gradual os excipientes líquidos.

As concentrações dos espessantes e humectantes foram variadas para se obter um colutório com as características desejadas. Na avaliação do colutório consideraram-se as suas características organolépticas, tais como coloração, odor, turvação, sabor, viscosidade, bem como o valor final de pH.

IV. Resultados e Discussão

1. *Optimização da formulação*

Para se otimizar a formulação nanolipídica estudaram-se diversas variáveis, nomeadamente a natureza lipídica da fase oleosa, a concentração de lactoferrina, a concentração de tensioactivos (lecitina e tween 80), o tempo de homogeneização e a adição de um electrólito (NaCl) (ver Tabela 2). O efeito destes parâmetros foi analisado através do aspecto macro e microscópico das nanoemulsões, bem como do tamanho hidrodinâmico, potencial Zeta e absorção calorimétrica das nanovesículas, imediatamente após a sua preparação e ao longo do tempo de armazenamento.

Tabela 2. Modificação das variáveis em estudo na optimização da composição da formulação inicial (F₀) até à obtenção da formulação ideal (F₅).

Composição (m/m)		F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
Fase aq. interna (W)	Lactoferrina	0.05%	0.00%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
	HCl (0.010 M)	9.80%	9.80%	9.79%	9.79%	9.79%	9.78%
	CaCl ₂ (0.020 M)	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.03%	0.03%
	Tween 80	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.12%	0.15%
Fase oleosa (O)	Lípido	0.98%	0.98%	0.98%	0.98%	0.98%	0.98%
	Lecitina de soja	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.12%	0.15%
	Glicerol	9.80%	9.80%	9.79%	9.79%	9.79%	9.78%
Fase aq. externa (W')	Poloxâmero	0.78%	0.78%	0.78%	0.78%	0.78%	0.78%
	H ₂ O UP	78.39%	78.44%	78.36%	78.32%	78.29%	78.25%
	NaCl (0.010 M)	0.00%	0.00%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%

Na Tabela 2 podem encontrar-se as alterações efectuadas à composição da formulação inicialmente proposta (F₀) até à obtenção da formulação optimizada (F₅), com o objectivo de assegurar e/ou aumentar a estabilidade da nanoemulsão. A formulação F₁ corresponde à formulação controlo, isto é, à formulação sem lactoferrina

encapsulada. Na formulação F₂ acrescentou-se um electrólito (NaCl) para tentar diminuir ainda mais o potencial Zeta e na formulação F₃ incluiu-se CaCl₂ (estabilizante da estrutura tridimensional proteica). Nas formulações F₄ e F₅ aumentou-se em 25% e 50%, respectivamente, a concentração de lecitina e Tween 80.

Após a preparação de cada formulação avaliou-se, em primeiro lugar, o seu aspecto macroscópico. Esta análise é importante já que permite identificar fenómenos de coalescência, floculação e/ou cremeação característicos de nanoemulsões com pouca estabilidade (Schuller e Romanowsky, 1998). A detecção de qualquer um destes fenómenos levou à rejeição da nanoemulsão em questão, assumindo-se que a alteração feita aumentou a instabilidade do sistema nanométrico.

i. Natureza lipídica da fase oleosa

Os lípidos sólidos Precirol™ (distearato de glicerol), Compritol™ (dibehenato de glicerol) e Softisan100™ (glicerídeos de coco hidrogenados, com triacilgliceróis de ácidos gordos desde C10-C18) foram testados como possíveis constituintes da fase oleosa. Todos estes lípidos são considerados agentes de libertação modificada. As formulações preparadas com cada um destes lípidos apresentaram um aspecto leitoso, uniforme e com alguma viscosidade.

Na preparação da fase oleosa das nanoemulsões, os constituintes desta são fundidos. Ora, a utilização de excipientes com um baixo ponto de fusão (PF) permite trabalhar com temperaturas mais próximas da temperatura ambiente evitando-se, assim, a eventual desnaturação térmica da LF. Uma vez que os PF do Compritol™ (72 °C) e do Precirol™ (56 °C) são bastante superiores ao PF do Softisan™ (33.5-35.5 °C), eles foram descartados já que se pretende trabalhar com as temperaturas mais baixas possíveis.

A libertação das substâncias bioactivas encapsuladas nas (nano)partículas lipídicas ocorre simultaneamente através de dois processos: difusão através da, e degradação da, estrutura lipídica. Esta degradação pode ser acelerada com o aumento da temperatura

(Radtke *et al.*, 2005). A formulação aqui descrita destina-se a uma aplicação na cavidade oral. Pretende-se que, quando em contacto com a mucosa oral e sujeitas à temperatura corporal, as nanovesículas se degradem libertando gradualmente a LF encapsulada. Considerando o baixo PF do Softisan™, esta é mais uma das razões que motivaram a sua selecção como constituinte da fase oleosa.

Adicionalmente, a análise do tamanho hidrodinâmico das nanovesículas produzidas com cada um dos três lípidos revelou que, com o Softisan™ é possível obter nanovesículas com um menor tamanho médio (ver Figura 11). Com o decorrer do tempo de armazenamento, o tamanho das nanovesículas lipídicas foi aumentando gradualmente, tornando-se necessário proceder a alterações na composição dos restantes excipientes.

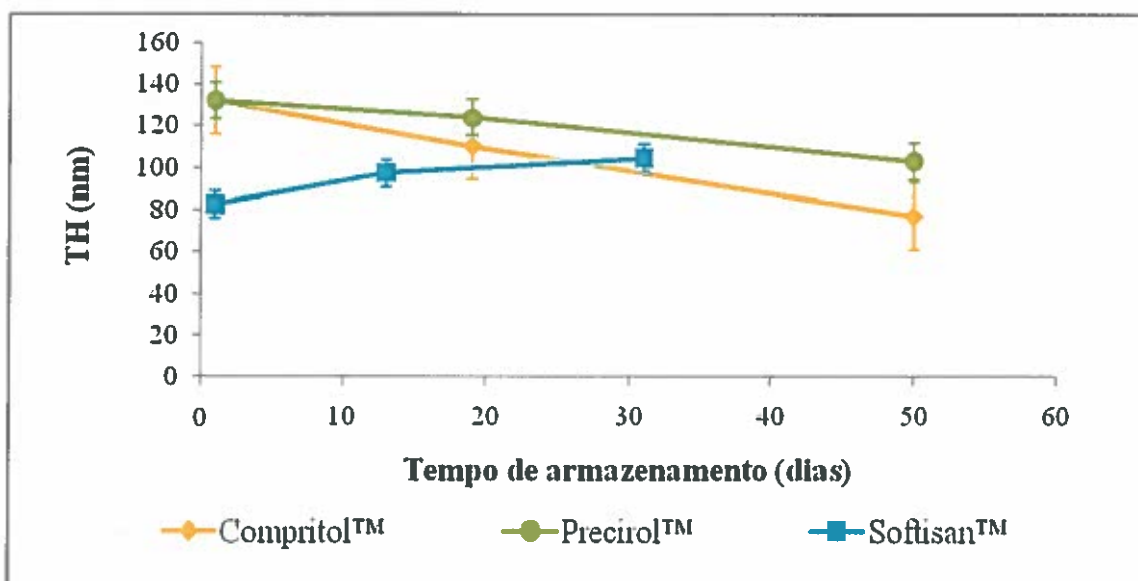


Figura 11. Evolução do tamanho hidrodinâmico das nanovesículas produzidas com diferentes lípidos (ciclos de homogeneização: 10 minutos), ao longo do tempo (cada ponto experimental inclui desvio padrão de três determinações independentes).

ii. Tempo de homogeneização

A preparação das nanoemulsões envolveu a realização de dois ciclos de homogeneização (com um Ultra Turrax a uma velocidade de 8000 rpm), um durante a primeira emulsificação (para obtenção da emulsão primária W/O) e o segundo durante a adição de uma fase externa aquosa à emulsão primária, formando-se a nanoemulsão múltipla W/O/W'.

Com o objectivo de se determinar se a duração dos ciclos de homogeneização constitui um factor crítico na metodologia adoptada, prepararam-se nanoemulsões com as mesmas características (F_0), variando-se apenas o tempo de homogeneização (5, 10 e 20 minutos). A influência deste parâmetro no tamanho hidrodinâmico das nanovesículas resultantes está bem patente na Figura 12 e o seu efeito na absorção microcalorimétrica está representado na Figura 13.

O tempo de homogeneização considerado óptimo foi de 10 minutos, uma vez que durante esse período de homogeneização o tamanho das partículas obtidas se manteve entre 100 a 200 nm (ver Figura 12).

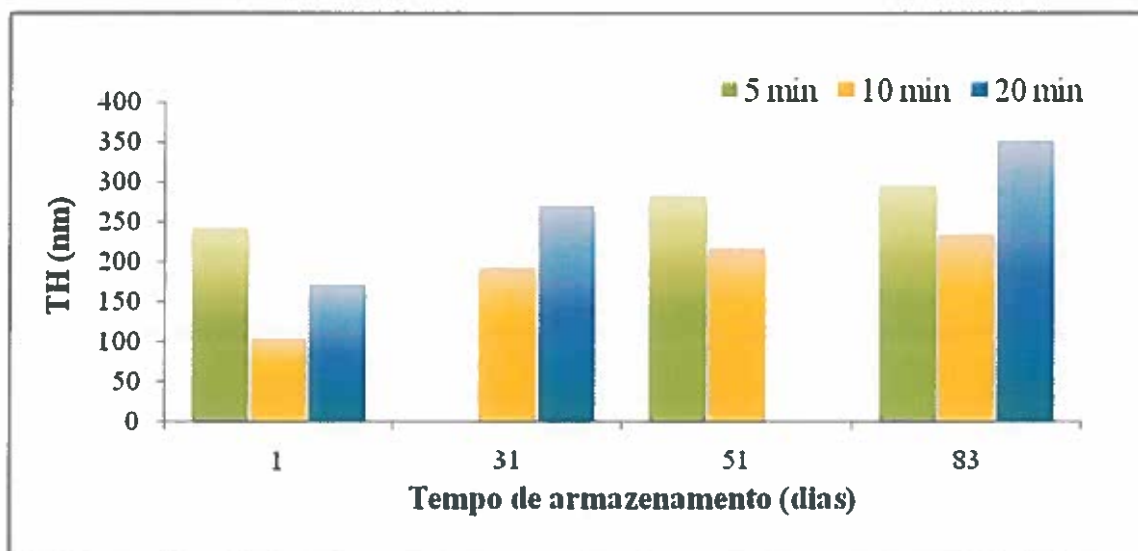


Figura 12. Efeito do tempo de homogeneização (a 8000 rpm) no tamanho hidrodinâmico das nanovesículas produzidas, ao longo do período de armazenamento das várias nanoemulsões.

Com uma agitação de apenas 5 minutos, o tamanho das nanovesículas está compreendido entre 200 e 300 nm. Para 20 minutos de agitação, ainda que o seu tamanho inicial se situasse entre 150 e 200 nm, atingiu os 350 nm decorridos 83 dias desde a sua produção (ver Figura 12).

A importância do tempo de homogeneização também foi evidenciada pela análise microcalorimétrica das formulações (ver Figura 13). A calorimetria diferencial de varrimento permite estudar o grau de cristalização bem como o comportamento de fusão e de cristalização de materiais cristalinos, como é o caso das dispersões lipídicas produzidas (Xia *et al.*, 2007).

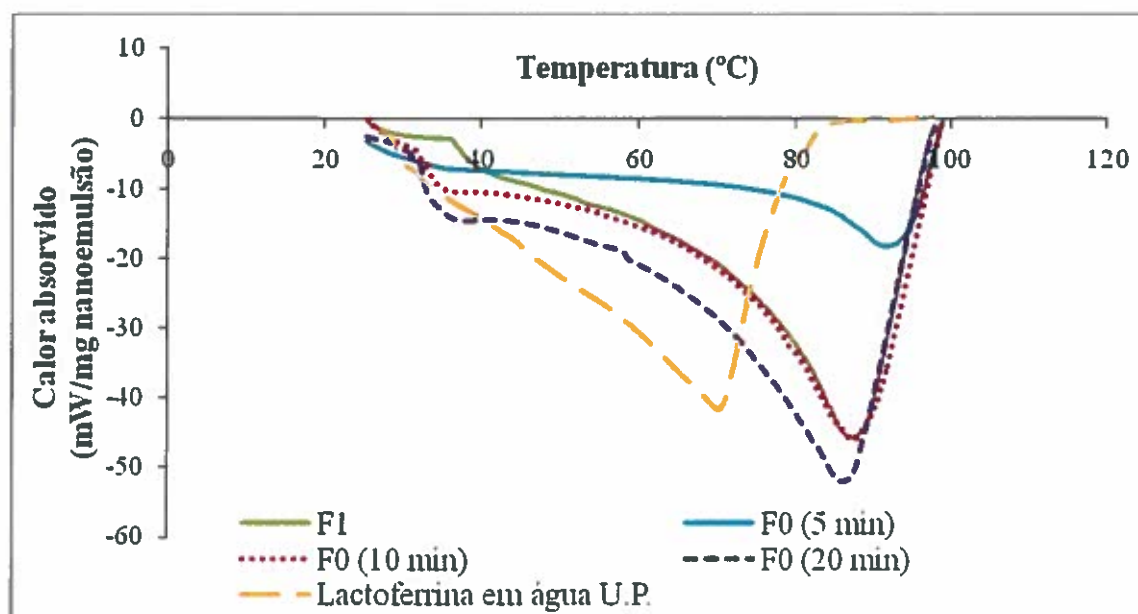


Figura 13. Termogramas de calorimetria diferencial de varrimento de nanoemulsões múltiplas produzidas recorrendo a diferentes tempos de homogeneização, com e sem lactoferrina encapsulada.

O efeito do tempo de homogeneização foi notório na quantidade de calor absorvido (entalpia de fusão) pelas nanovesículas lipídicas com LF encapsulada (F_0): 75.48 J/g_{nanoemulsão} para um tempo de homogeneização de 5 minutos, 245.04 J/g_{nanoemulsão} para um tempo de homogeneização de 10 minutos e 866.64 J/g_{nanoemulsão} para um tempo de homogeneização de 20 minutos (ver Tabela 3). O aumento da duração dos ciclos de homogeneização traduziu-se num aumento dos valores de calor absorvido pelas

nanovesículas (ver Figura 13). Uma possível explicação é a consequente redução do tamanho das nanovesículas com o avançar do tempo de homogeneização e/ou a libertação de lactoferrina para a fase aquosa externa da dispersão lipídica.

Tabela 3. Resultados da análise microcalorimétrica das dispersões lipídicas com lactoferrina (F_0) produzidas com diferentes tempos de homogeneização e sem lactoferrina (F_1), após integração dos vales de absorção térmica (ver Figura 13).

(Nano)dispersão lipídica	Pico (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Calor absorvido (J/g _{nanocemulsão})
F_1 (10 min)	87.54	68.64	97.92	1450
F_0 (5 min)	91.70	82.98	96.28	75.48
F_0 (10 min)	87.64	74,68	91.73	245.04
F_0 (20 min)	86.03	61.95	98.11	866.64

Em relação aos picos de absorção, estes foram registados para temperaturas cada vez mais baixas à medida que se prolongava a duração da homogeneização: 91.70 °C para 5 minutos de homogeneização a 8000 rpm, 87.64 °C para 10 minutos de homogeneização e, por último, 86.03 °C para 20 minutos de homogeneização (ver Tabela 3).

iii. Lactoferrina

A influência da lactoferrina foi estudada através da comparação entre formulações com LF encapsulada (F_0) e formulações controlo (sem LF, F_1), tendo o armazenamento de ambas sido feito sob as mesmas condições. A LF (purificada) tamponada mostrou-se mais estável do que a LF não tamponada.

Tanto as nanovesículas contendo LF como as nanovesículas sem proteína, apresentaram um ligeiro aumento do tamanho médio das partículas bem como dos valores de PZ ao longo do tempo. Relativamente ao aumento da concentração de LF,

esta teve uma marcada influência nos valores de potencial Zeta, ocorrendo aumento dos seus valores de valores negativos para valores positivos (ver Figura 14).

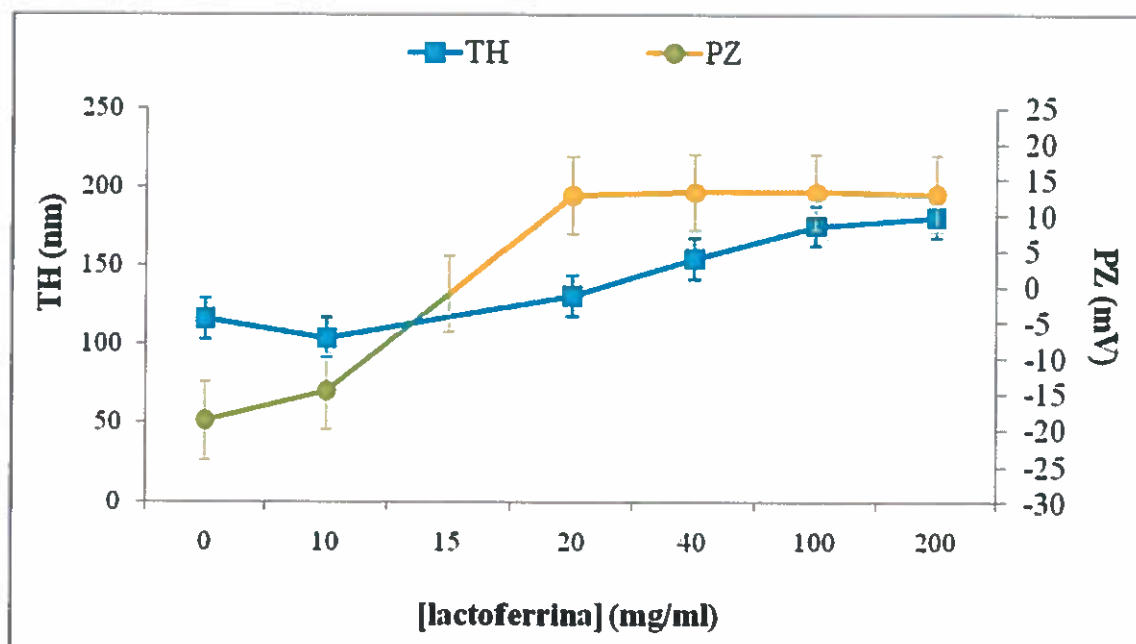


Figura 14. Efeito da concentração de lactoferrina oferecida no processo de nanoencapsulação, no tamanho hidrodinâmico (TH) e potencial Zeta (PZ) das nanovesículas produzidas com o lípido Softisan™.

Também a análise microcalorimétrica revelou o efeito da adição da LF (ver Figura 13 e Tabela 3). A quantidade de calor absorvido pelas nanovesículas “vazias” (F_1) foi de $1450 \text{ J/g}_{\text{nanoemulsão}}$ para um tempo de homogeneização de 10 min, enquanto no caso da nanoemulsão com as mesmas características mas com LF encapsulada (F_0), o calor absorvido foi de $245.04 \text{ J/g}_{\text{nanoemulsão}}$. Quanto ao pico térmico de absorção, a inclusão de LF na formulação (F_0) não levou a mudanças significativas (87.64° C), quando comparado com o branco (F_1) que apresentou um pico de absorção de calor a 87.54° C (ver Tabela 3).

A análise de uma solução aquosa de proteína bioactiva revelou uma entalpia de absorção de $878.79 \text{ J/g}_{\text{nanoemulsão}}$, com pico térmico a 69.97° C . Este resultado é

claramente superior ao do nanoemulsão F_0 , o que evidencia o efeito estabilizador do processo de nanoencapsulação.

iv. Influência da concentração de tensoactivos e electrólitos

A adição de um electrólito (NaCl) aquando da produção das nanoemulsões modificou as propriedades das nanovesículas. Testaram-se três concentrações de NaCl (1 mM, 10 mM e 100 mM). Para a concentração mais elevada de electrólito (100 mM), a separação de fases foi notória logo após a preparação das nanoemulsões. Nesta situação, o valor do potencial PZ aumentou até ligeiramente acima de 0 mV. Ora, se para se obter uma emulsão estável o valor ideal do PZ deve situar-se à volta de $-/+ 30$ mV, já era esperado que valores próximos de 0 mV se traduzissem numa acentuada separação de fases, devido a um aproximar das nanovesículas e consequente coalescência (ver Figura 15). Com as restantes concentrações de NaCl, o PZ não sofreu alterações significativas. No entanto, foi com a adição do electrólito a uma concentração de 10 mM (F_2) que os valores do PZ se apresentaram mais negativos e se mantiveram estáveis com o decorrer do tempo de armazenamento, apesar do tamanho médio hidrodinâmico das nanovesículas ter aumentado (ver Figura 16).



Figura 15. Aspecto visual das (nano)formulações produzidas com diferentes concentrações de NaCl (1, 10 e 100 mM).

A composição da camada estabilizadora do nanosistema foi modificada utilizando-se diferentes proporções de lecitina e Tween 80, o que permitiu o controlo do tempo de degradação das nanovesículas.

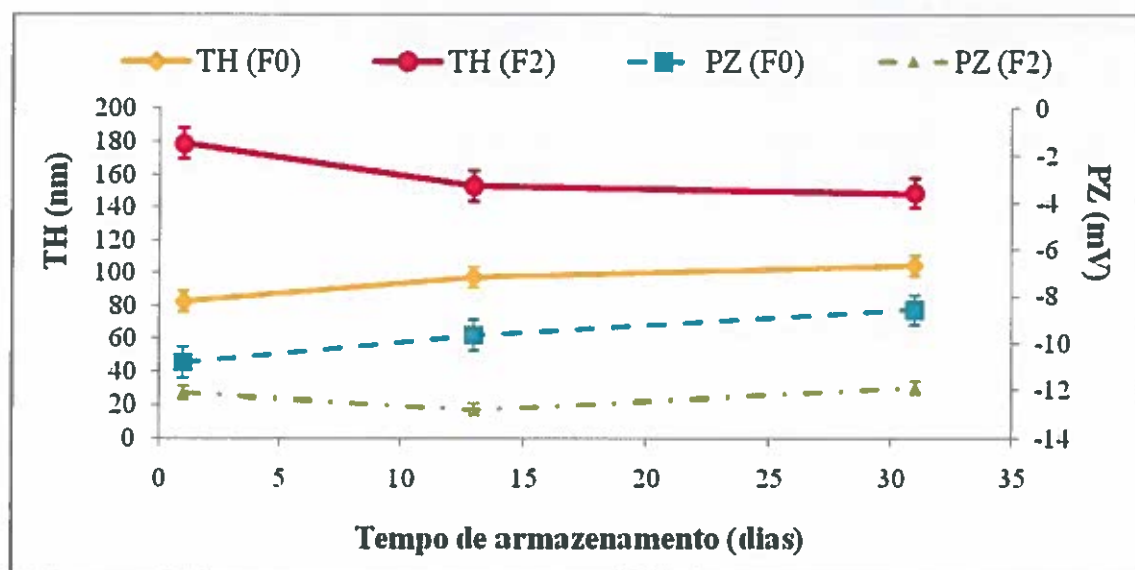


Figura 16. Efeito da adição de um electrólito (NaCl) no tamanho hidrodinâmico (TH) e no potencial Zeta (PZ) da nanoemulsão ao longo do tempo de armazenamento.

Observações macroscópicas efectuadas aos nanosistemas contendo um aumento da quantidade do polímero semicristalino Tween 80 não evidenciaram separação de fases visível nem aderência da(s) preparação(ões) às paredes do recipiente onde se encontravam, mesmo após um armazenamento prolongado, à temperatura ambiente. A compatibilidade entre o aumento da quantidade de Tween 80 e os outros componentes da fase aquosa interna pode ser atribuída às ligações de hidrogénio e à baixa energia cristalina deste polímero, o que teve um impacto notório no perfil de fusão da nanoemulsão optimizada.

Quanto ao PZ, o aumento das concentrações de lecitina e Tween 80 em 25% e em 50% levou à obtenção de valores muito semelhantes. Nas formulações sem NaCl, o PZ diminuiu em módulo, aproximando-se de -5 mV. Por sua vez, nas formulações com NaCl o aumento da concentração de tensoactivos permitiu a observação de valores de PZ mais negativos (ver Figura 17). A formulação F5 foi considerada a melhor formulação, já que apresentou um PZ com os valores mais negativos e com menor variação ao longo do tempo, como se pode observar por inspecção da Figura 17.

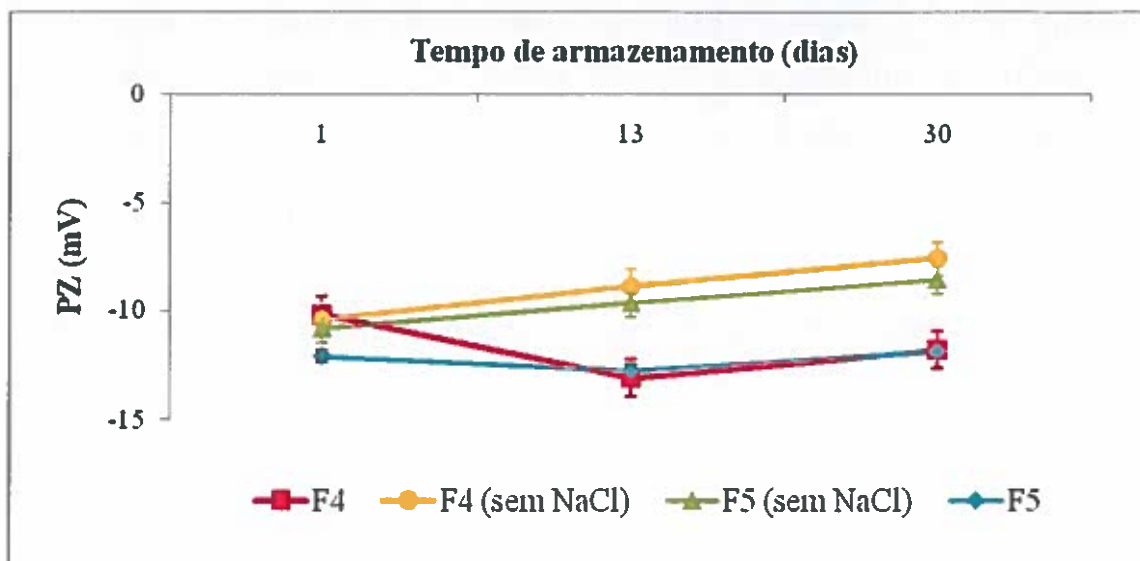


Figura 17. Efeito da variação da quantidade de excipientes no potencial Zeta das nanovesículas produzidas com Softisan™ (tempo de homogeneização: 10 minutos).

2. Caracterização da formulação otimizada

i. Análise macroscópica

Ao longo de todo o período de armazenamento (praticamente 1 ano), a nanodispersão lipídica otimizada foi analisada macroscopicamente. Não foram detectados quaisquer fenómenos de instabilidade da nanoemulsão, tendo esta apresentado sempre um aspecto leitoso e uniforme. Também não ocorreu adesão de nanovesículas às paredes do recipiente onde a emulsão foi armazenada (ver Figura 18).



Figura 18. Aspecto macroscópico da formulação otimizada (F₅).

ii. Microanálise por (crio)microscopia electrónica de varrimento

Na Figura 19 encontram-se microfotografias da LF comercial purificada e liofilizada (400x) (ver Figura 19a) e da nanoemulsão otimizada contendo LF encapsulada para magnificações de 15000x (ver Figura 19b) e 50000x (ver Figura 19c).

Nas crio-microfotografias electrónicas de varrimento pode observar-se a superfície exposta da nanoemulsão (ver Figura 19b,c), sendo visível a estrutura da matriz de poloxâmero e a homogeneidade da distribuição das nanovesículas e do seu diâmetro.

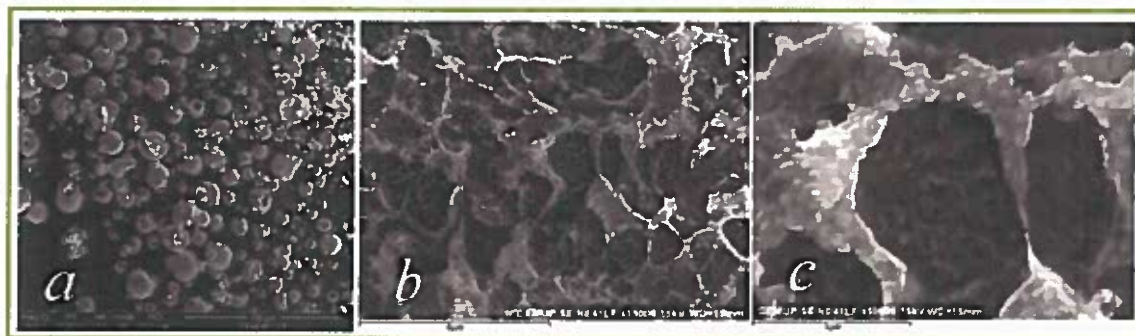


Figura 19. Microfotografias electrónicas de varrimento da LF comercial liofilizada usando uma ampliação de 400x (a) e crio-microfotografias electrónicas de varrimento da nanoemulsão otimizada contendo LF encapsulada, com uma ampliação de 15000x (b) e 50000x (c), evidenciado a rede de poloxâmero da fase aquosa externa após sublimação e revestimento catódico com ouro/paládio.

iii. Avaliação da estabilidade acelerada

As nanovesículas da formulação otimizada (F₅) foram sujeitas a um teste preliminar de estabilidade acelerada com o objectivo de prever o comportamento do sistema nanométrico ao longo do seu armazenamento. Para tal, recorreu-se ao teste de centrifugação a várias velocidades centrífugas (1000, 2500 e 5000 rpm).

A centrifugação de formulações otimizadas a 1000 e 2500 rpm não provocou a ruptura das nanovesículas, não ocorrendo qualquer separação de fases. Isto demonstra a

estabilização e firmeza estrutural das nanovesículas formadas. Para uma velocidade de centrifugação de 5000 rpm já foi visível uma ligeira separação de fases, ocorrendo alguma aglomeração das nanovesículas no sobrenadante.

iv. Tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta

Nas emulsões múltiplas do tipo W/O/W', existe uma correlação positiva entre a estabilidade da emulsão e o comprimento da cadeia carbonada dos ácidos gordos constituintes dos triacilgliceróis que constituem a fase oleosa, e uma correlação negativa com a constante dielétrica do agente emulsificante. O aumento do peso molecular dos triacilgliceróis (como no caso do Softisan 100™, com resíduos de ácidos gordos com tamanhos de cadeia carbonada entre 10 a 18 átomos de carbonos) e a diminuição da constante dielétrica (como no caso do Tween 80) indiciam uma maior hidrofobicidade, levando a uma maior impregnação da interface e a uma nanoemulsão mais estável, o que está claramente de acordo com a estabilidade a longo prazo observada para o sistema de nanoemulsões múltiplas otimizado (ver Figura 20).

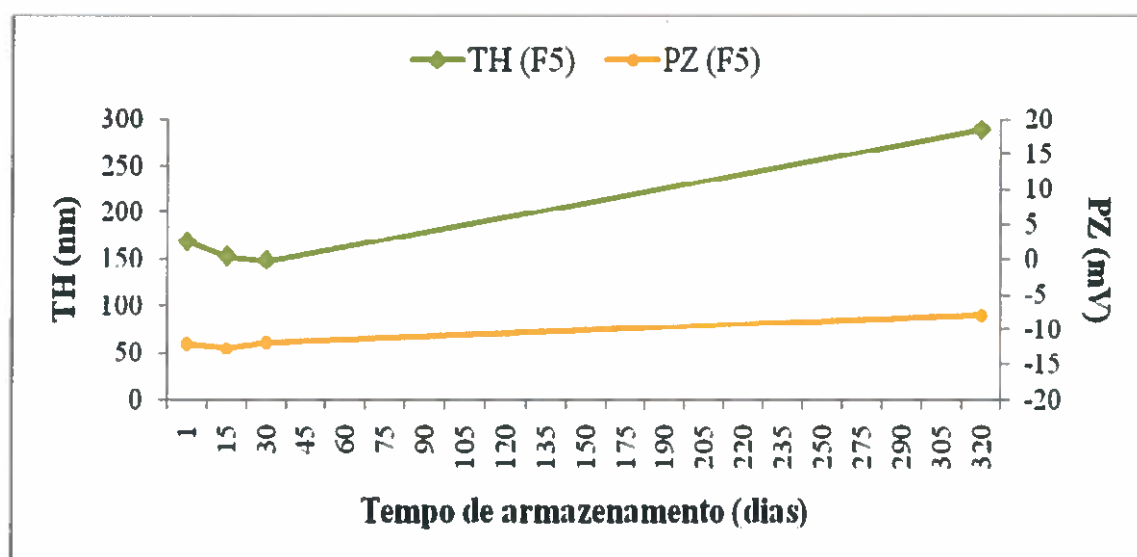


Figura 20. Evolução do tamanho hidrodinâmico (TH) de partícula e potencial Zeta (PZ) das nanovesículas da formulação otimizada (F₅), ao longo dos primeiros 30 dias de armazenamento e com prolongamento até praticamente 1 ano.

As nanovesículas integrantes das formulações otimizadas apresentaram um diâmetro médio entre 100 a 200 nm e um PZ médio de cerca de -14.6 mV (ver Figura 20). Todas as nanoemulsões produzidas de acordo com a metodologia otimizada mantiveram-se estáveis durante um período de armazenamento de cerca de 3 meses.

Verificou-se todavia um ligeiro aumento dos valores do PZ, provavelmente devido à concentração de íões na interface das partículas. Relativamente ao tamanho médio das nanopartículas, este foi diminuindo lentamente durante o primeiro mês de armazenamento, mas mantendo-se dentro do intervalo de 100 a 200 nm, tendo aumentado ao fim de quase 1 ano de armazenamento à temperatura ambiente mas ainda assim para valores abaixo de 300 nm.

v. Actividade antimicrobiana

A actividade antimicrobiana da LF comercial foi determinada através de procedimentos *in vitro* frente a várias estirpes microbianas, incluindo bactérias patogénicas e a levedura *Candida albicans*. Vários estudos descritos na literatura científica demonstraram a interacção da LF com bactérias Gram-negativo, levando à libertação de níveis consideráveis de lipopolissacarídeos através da membrana externa, comprometendo a sua permeabilidade e aumentando a susceptibilidade das células bacterianas a outros agentes antimicrobianos como por exemplo os lisossomas (Ellison *et al.*, 1988; Hoek *et al.*, 1997; Orsi, 2004).

Contudo, no presente trabalho a LF comercial purificada não exibiu actividade antimicrobiana sobre as bactérias Gram-negativo testadas (*Salmonella* spp., *E. coli* e *P. fluorescens*), uma vez que não se observou inibição do seu crescimento (ver Tabela 4). No entanto, a LF poderá ter desestabilizado a membrana externa destas bactérias, de acordo com o referido anteriormente. Possivelmente, poderá observar-se actividade antimicrobiana perante concentrações superiores de lactoferrina (superiores a 2000 µg/mL). A CMI da LF, de acordo com os resultados obtidos, é de 2000 µg/mL perante as bactérias *S. aureus* e *L. innocua* (ver Tabela 4).

Tabela 4. Actividade antimicrobiana da lactoferrina (para várias concentrações) frente a várias estirpes bacterianas.

Bactéria	Concentração de Lactoferrina ($\mu\text{g/mL}$)				
	2000	1000	500	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i>	-	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> spp.	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	+

Legenda: - sem crescimento; + crescimento

No caso da levedura *Candida albicans*, esta mostrou-se sensível a menores concentrações de LF, apresentando uma CMI de 200 $\mu\text{g/mL}$ (ver Tabela 5). A *Candida albicans* é o microorganismo mais comum e mais invasivo presente na cavidade oral, podendo causar infecções tanto superficiais como sistémicas (Epstein *et al.*, 1984). A importância clínica desta levedura tem vindo a aumentar ao longo dos anos (Hermann *et al.*, 2001), sendo um dos principais responsáveis por infecções orais em indivíduos imunocomprometidos. Hipossalivação, Diabetes *mellitus*, uso prolongado de antibióticos e má higiene oral são, também, exemplos de situações de pré-disposição para este tipo de infecção (Takakura *et al.*, 2003).

Tabela 5. Resultados da actividade antimicrobiana da lactoferrina (para várias concentrações) frente ao fungo oportunista *Candida albicans*.

	Concentração de Lactoferrina ($\mu\text{g/mL}$)				
	500	250	200	125	62.5
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+

Legenda: - sem crescimento; + crescimento

Existem vários anti-fúngicos (azóis) eficazes no tratamento da candidíase, mas o seu uso prolongado e/ou indiscriminado tem levado ao aparecimento de resistências. Para contornar este problema, é necessário recorrer a terapias alternativas e desenvolver novos agentes terapêuticos com actividade anti-fúngica. Atendendo aos resultados

obtidos neste trabalho, uma solução a considerar é a utilização da LF isolada ou em associação com anti-fúngicos para obtenção de resultados mais rápidos e eficazes, uma vez que tem comprovada acção anti-fúngica contra este fungo oportunista (Kuipers *et al.* 1999; Masci, 2000; Orsi, 2004).

3. Preparação de um colutório incorporando a nanoemulsão otimizada

Os colutórios são soluções com um considerável teor alcoólico (15° a 50°). Actualmente, é prática comum a substituição do álcool (veículo refrescante, promotor do aromatizante e conservante), empregando-se outro conservante, adicionando polialcoóis e aumentando o teor em água. Neste caso, utilizou-se a glicerina e o sorbitol que actuam, simultaneamente, como humectantes e viscosificantes (tal como a metilcelulose), evitando cristalizações. Além disso, também são dotados de um ligeiro efeito edulcorante. O metilparabeno e o benzoato de sódio foram aplicados como conservantes. O laurilsulfato de sódio, além de solubilizante da essência de baunilha (aromatizante), é um espumante ligeiro que auxilia na remoção da placa bacteriana. O sabor açucarado é conferido pela sacarina sódica (edulcorante).

Depois de seleccionados os excipientes a utilizar, prepararam-se então seis colutórios de acordo com o esquema composicional indicado na Tabela 6. O primeiro colutório preparado (C₁) apresentou alguma viscosidade e um sabor muito intenso (picante). Assim, nos colutórios seguintes variou-se a concentração dos excipientes que interferem com a viscosidade para determinar o seu efeito, tendo-se mantido inalterados os restantes excipientes. O resultado final obtido encontra-se patente na Figura 21. Com o aumento do teor de glicerina (C₂) o colutório ficou semelhante ao colutório C₁, mas com um sabor menos intenso. Elevadas percentagens de metilcelulose (C₃) levaram à obtenção de uma pasta, ou seja, a metilcelulose teve um elevado efeito viscosificante, não permitindo a suspensão das partículas. Também o sorbitol (C₄) contribuiu para um espessamento do colutório (ainda que em menor grau) quando utilizado em maior percentagem, mas o colutório apresentou-se mais homogéneo.

Tabela 6. Composição mássica percentual dos vários colutórios (C_n) preparados.

Constituinte	Composição mássica percentual dos vários colutórios					
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
Sorbitol	2.0	2.0	2.0	4.0	1.0	1.0
Glicerina	5.0	10.0	5.0	5.0	10.0	10.0
Metilcelulose	2.0	2.0	4.0	2.0	1.0	2.0
Essência	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Metilparabeno	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Benzoato de Sódio	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Laurilsulfato de Sódio	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sacarina sódica	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Princípio activo (nanoemulsão otimizada)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
H ₂ O UP	q.b.p. 100 %					

Assim concluiu-se que, para melhorar o colutório C₁, seria necessário diminuir a percentagem de metilcelulose (C₅) e/ou sorbitol (C₆), mantendo-se o aumento da percentagem de glicerina. O resultado foi a obtenção de dois colutórios fluidos, de acordo com o pretendido.

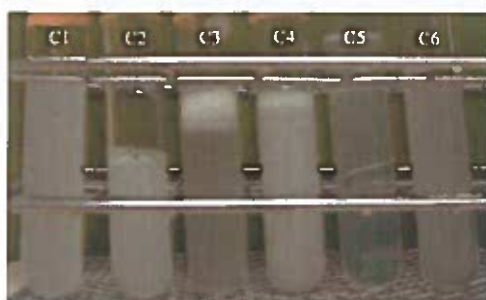


Figura 21. Aspecto final dos vários colutórios formulados (C₁ a C₆) com inclusão da nanoemulsão otimizada com lactoferrina encapsulada (ver legenda ao longo do texto acima).

A formulação considerada ideal foi o colutório C₅, já que apresentou menos turvação (viscosidade suficiente para se obter uma boa suspensão). O seu sabor foi atenuado, mantendo no entanto a sensação refrescante. Para diminuir a turvação poderia adicionar-se uma pequena quantidade de Tween 80 (Nunes *et al.*, 2006), mas devido à sua incompatibilidade com a metilcelulose tal não é aconselhado. O valor de pH é 5.5, adequando-se ao pH da cavidade oral (pH≈6.0).

V. Conclusões

Com o presente trabalho de investigação pretendeu-se desenvolver uma nanoformulação com lactoferrina bovina encapsulada que assegurasse a sua estabilização e garantisse o seu potencial natural antimicrobiano.

Para mimetizar a estrutura multifuncional das membranas biológicas, a lactoferrina bovina foi aprisionada numa nanoemulsão múltipla W/O/W', recorrendo-se a matrizes lipídicas de diversas fontes. O Softisan100™, um lípido com um baixo ponto de fusão, foi considerado o mais apropriado para integrar a fase oleosa da nanoemulsão múltipla.

Com o decorrer dos trabalhos de investigação científica, chegou-se à conclusão de que o tempo de homogeneização (dez minutos) a 8000 rpm, o uso de um electrólito forte com baixa força iónica e a concentração de LF constituem parâmetros processuais críticos na obtenção de nanovesículas lipídicas estáveis. O aumento da concentração de electrólito leva a um aumento nos valores do PZ, muito provavelmente devido à acumulação de iões adsorvidos na superfície das partículas.

A adição do electrólito em concentração de 1 mM mostrou-se mais adequada, obtendo-se nanovesículas com um PZ estável ao longo do tempo. Os resultados obtidos em função da variação das concentrações dos excipientes utilizados permitiram otimizar a formulação inicial, produzindo-se nanovesículas com um diâmetro compreendido entre 100 a 200 nm e um PZ médio de -14.6 mV.

A actividade antimicrobiana das diferentes nanoemulsões testadas *in vitro* contra várias estirpes microbianas revelou diferentes valores de eficácia, dependendo do microorganismo patogénico em causa, sendo maior o seu efeito frente à levedura *Candida albicans*.

A incorporação desta nanoemulsão múltipla (otimizada) num colutório foi bem sucedida, tendo-se obtido um colutório fluído, com um sabor refrescante e ligeiramente adocicado. A utilização do colutório formulado na higiene oral seria pois vantajosa, uma vez que os excipientes utilizados (incluindo a proteína bioactiva antimicrobiana, LF) não apresentam quaisquer efeitos toxicológicos, mesmo para as crianças.

1. Perspectivas futuras

Num futuro próximo, o trabalho de investigação científica aplicada aqui descrito poderá ser mais aprofundado, avaliando-se com rigor a eficiência de nanoencapsulação proteica do método utilizado para nanoencapsular a lactoferrina num veículo lipídico.

Adicionalmente, o estudo da acção antimicrobiana do colutório formulado com a nanoemulsão com LF encapsulada será necessário para avaliar se a quantidade de princípio activo nele contido é suficiente.

Bibliografia

- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **14**, pp. 3-15.
- Almeida, A. J., Runge, S., Miiller, R. H. (1997). Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): influence of production parameters, *International Journal of Pharmaceutics*, **149**, pp. 255-265
- Almeida, A. J., Souto, E. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**, pp. 478-490.
- Baker, E. N., Baker, H. M., Koon, N., Kidd, R. D. (2002). Lactoferrin: Bioactive properties and applications, *Bulletin Int. Dairy Fed.*, **375**, pp. 54-58
- Baker, E. N. (1994). Structure and reactivity of transferrins, *Adv. Inorg. Chem.*, **41**, pp. 389-463.
- Bibette, J., Calderon, F. L., Poulin, P. (1999). Emulsions: Basic principles, *Rep. Prog. Phys.*, **62**, pp. 969-1033.
- Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., Krombach, F. (2008). Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies, *Particle and Fibre Toxicology*, 2008, **5**, pp. 1-14.
- Brock, J. H. (2002). The physiology of lactoferrin, *Biochem. Cell Biology*, **80**, pp. 1-6.
- Chakraborty, S., Shukla, D., Mishra, B., Singh, S. (2009). Lipid – an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **73**, pp. 1-15.
- Chorilli, M., Campos, G. R. C., Bolfarini, P. M. L. (2009). Desenvolvimento e Estudo da Estabilidade Físico-Química de Emulsões Múltiplas A/O/A E O/A/O

- Acrescidas de Filtros Químicos e Manteiga de Karité, *Latin American Journal of Pharmacy*, **28**, pp. 936-40.
- Davis, S. S., Walker, I. M. (1987). Multiple emulsions as targetable delivery systems. *Methods Enzymol.*, **149**, pp. 51-64.
- Dudia, A., Koçer, A., Subramaniam, V., Kanger, J. S. (2008). Biofunctionalized lipid-polymer hybrid nanocontainers with controlled permeability, *Nano Letters*, **8**, pp. 1105-1110.
- Dupeyrón, D., Rieumont, J., González, M., Castaño, V. M. (2009). Protein delivery by enteric copolymer nanoparticles, *Journal of Dispersion Science and Technology*, **30**, pp. 1188-1194.
- Ellison III, R. T., Giehl, T. J., LaForce, F. M. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin, *Infect. Immun.*, **56**, pp. 2774-2781.
- Epstein, J., Truelove, E., Izutzu K. (1984). Oral Candidiasis: Pathogenesis and Host Defense, *Reviews of Infectious Diseases*, **6**, pp. 96-106.
- Ferrer, M. L., Yuste, L., Rojo, F., del Monte, F. (2003). Biocompatible sol-gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrixes, *Chem. Mater.*, **15**, pp. 3614-3618.
- Ficheux, M. F., Bonakdar, L., Leal-Calderon, F., Bibette, J. (1998). Some stability criteria for double emulsions, *Langmuir*, **14**, pp. 2702-2706.
- Fronza, T., Campos, A., Teixeira, H. (2004). Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos, *Acta Farm. Bonaerense*, **23**, pp. 558-66.
- García-Fuentes, M., Torres, D., Alonso, M. J. (2002). Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **27**, pp. 159-168.

- Groves, M. L. (1960). The isolation of a red protein from milk, *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, pp. 3345-3350.
- Hakkak, R., Korourian, S., Shelnutt, S. R., Lensing, S., Ronis, M. J., Badger, T. M. (2000). Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in female rats, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **9**, pp. 113-117.
- Hanson, J. A., Chang, C. B., Graves, S. M., Li, Z., Mason, T. G., Deming, T. J. (2008). Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides, *Nature*, **455**, pp. 85-88 (doi:10.1038/nature07197).
- Hermann, P., Berek, Z., Nagy, G., Kamotsay, K., Rozgonyi, F. (2001). Pathogenesis, microbiological and clinical aspects of oral candidiasis (candidosis), *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **48**, pp. 479-495.
- Hoek, K. S., Milne, J. M., Grieve, P. A., Dionysius, D. A., Smith, R. (1997). Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, pp. 54-59.
- Johansson, B. (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk, *Acta Chem. Scand.*, **14**, pp. 510-512.
- Korhonen, H., Leppälä-Pihlanto, A., Rantamäki, P., Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides, *Trends in food and technology*, **9**, pp. 307-319.
- Kuipers, M., Vries, H. G., Eikelboom, M., Meijer, D., Swart, P. (1999). Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates, *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, pp. 2635-2641.
- Lara, M. G., Collett, J. H., Lara, E. H. G., Bentley, M. V. (2001). Géis de monoleína/água para veiculação de fármacos protéicos: estudos microscópicos, reológicos e de liberação in vitro, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **37**, pp. 189-196.

- Lee, K. Y., Yuk, S. H.** (2007). Polymeric protein delivery systems, *Progress in Polymer Science*, **32**, pp. 669-697.
- Lönnerdal, B., Iyer, S.** (1995). Lactoferrin: molecular structure and biological function, *Annual Review of Nutritional*, **15**, pp. 93-110.
- Marcato, P. D., Durán, N.** (2008). New aspects of nanopharmaceutical delivery systems, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **8**, pp. 1-14.
- Masci, J. R.** (2000). Complete response of severe, refractory oral candidiasis to mouthwash containing lactoferrin and lysozyme, *Official Journal of the International AIDS Society*, **14**, pp. 2403-2404.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., Yurdugul, S.** (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology, *International Journal of Food Properties*, **11**, pp. 833-844.
- Naidu, A. S.** (2000). Lactoferrin: Natural, Multifunctional, Antimicrobial, *Journal of the American College of Nutrition*, **20**, pp. 343-347.
- Naidu, A. S., Nimmagudda, R.** (2003). Activated lactoferrin. Part 1: A novel antimicrobial formulation, *AGROFood industry hi-tech*, March/April, pp. 7-10.
- Nunes, R. S., Lira, A. A., Lacerda, C. M., Silva, D. O., Silva, J. A., Santana, D. P.** (2006). Obtenção e avaliação clínica de dentifícios à base do extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham (*Verbenaceae*) sobre o biofilme dentário, *Revista de Odontologia da UNESP*, **35**, pp. 275-283.
- Okochi, H., Nakano, M.** (2000). Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **45**, pp. 5-26.
- Orsi, N.** (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives, *BioMetals*, **17**, pp. 189-196.

- Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., Leal-Calderon, F. (2002).** Double emulsions: how does release occur?, *J. Control. Release*, **79**, pp. 193-205.
- Petricoin, E., Liotta, A. L. (2003).** Clinical applications of proteomics, *Journal of Nutrition*, **133**: 2476-2484.
- Radtke, M., Souto, E., Müller, R. H. (2005).** Nanostructured Lipid Carriers: A Novel Generation of Solid Lipid Drug Carriers, *Pharmaceutical Technology Europe*, **17**: 45-50.
- Ragoonanan, V., Aksan, A. (2007).** Protein stabilization, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **34**, pp. 246-252.
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., Saraf, S. (2008).** Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides, *Yakugaku Zasshi (The Pharmaceutical Society of Japan)*, **128**, pp. 269-280.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., Veiga, F. (2006a).** Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2**, pp. 53-65.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., Veiga, F. (2006b).** Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2**, pp. 8-21.
- Rodrigues, L., Teixeira, J. A. (2007).** O potencial da lactoferrina na prevenção do cancro de mama, *Leite I + D + T*, **1**, pp. 2-3.
- Rodríguez-Franco, D. A., Vázquez-Moreno, L., Montfort, G. R. C. (2005).** Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **47**, pp. 102-111.

- Sanjula, B., Shah, F. M., Javed, A., Alka, A. (2009).** Effect of poloxamer 188 on lymphatic uptake of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for bioavailability enhancement, *Journal of Drug Targeting*, **17**, pp. 249-256.
- Schuller, R., Romanowsky, P. (1998).** Understanding emulsions, *Cosmetic & Toiletries*, **113**, pp. 39-44.
- Sorensen, M., Sorensen, L. P. (1939).** The proteins in whey, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **23**, pp. 55-59.
- Srinivas, P., Philbert, M., Vu, T., Huang, Q., Kokini, J., Saos, E., Chen, H., Peterson, C., Friedl, K., McDade-Ngutter, C., Hubbard, V., Starke-Reed, P., Miller, N., Betz, J., Dwyer, J., Milner, J., Ross, S. (2010).** Nanotechnology research: applications in nutritional sciences, *Journal of Nutrition*, **140**, pp. 119-124.
- Steijns, J. M., Hooijdonk, A. (2000).** Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin, *British Journal of Nutrition*, **84**, pp. 11-17.
- Suresh, G., Manjunath, K., Venkateswarlu, V., Satyanarayana, V. (2007).** Preparation, Characterization, and In Vitro and In Vivo Evaluation of Lovastatin Solid Lipid Nanoparticles, *AAPS PharmSciTech*, **8**, article 24.
- Takakura, N., Wakabayashi, H., Ishibashi, H., Teraguchi, S., Tamura, Y., Yamaguchi, H., Abe, S. (2003).** Oral lactoferrin treatment of experimental oral Candidiasis in mice, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**, pp. 2619-2623.
- Tsuda, H., Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M., Han, B.S., Moore, M. A. (2000).** Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin, *Mutation Research*, **462**, pp. 227-233.
- Vorland, L. (1999).** Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein, *Apmis*, **107**: 971-981.

Xia, Q., Saupe, A., Müller, R. H., Souto, E. B. (2007). Nanostructured lipid carriers as novel carrier for sunscreen formulations, *International Journal of Cosmetic Science*, **29**, pp. 1-10.

Wang, Y. F., Tao, Z., Gang, H. (2006). Structural evolution of polymer-stabilized double emulsions. *Langmuir*, **22**, pp. 67-73.

Ward, P. P., Uribe-Luna, S., Connely, O. (2002). Lactoferrin and host defense, *Biochemistry and Cell Biology*, **80**, pp. 95-102.

Wissing, S. A., Kayserb, O., Müller, R.H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, pp. 1257-1272.

Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., Ellison, R. T. (1993). Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment, *Infection and Immunity*, **61**, pp. 719-728.

Yang, S., Yuan, W., Jin, T. (2009). Formulating protein therapeutics into particulate forms, *Expert Opinion on Drug Delivery*, **6**, pp. 1123-1133.

Erdinc, B. I. (2007). Micro/nanoencapsulation of proteins within alginate/chitosan matrix by spray drying, M.Sc. Thesis, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, p. 90.

Fennema, O. (1965). *Food Chemistry*, 2nd Ed., Marcel Dekker Inc., New York, p. 796.

RCSB Protein Data Bank Home Page. *Structure of Dimeric Human Lactoferrin* [Em linha]. Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1fck>> [Consultado em 20/05/2010].

Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0-317, Issue 2.1, July 2004 [Em linha]. Disponível em <<http://www.malvern.com>> [Consultado em 10/04/2010].

Anexos

Costa, C. I., Morsy, T. A., Matos, C. M., Amorim, M., Pintado, M. E., Gomes, A. P., Teixeira, J. A., Balcão V. M. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for oral hygiene applications, XVIIth International Conference on Bioencapsulation, Groningen, Netherlands, September 24-26, 2009, Abstract Book pp. 236-237 [P71].

Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for oral hygiene applications

Costa C.I.¹; Morsy T.A.¹; Matos C.M.¹; Amorim, M.³; Pintado, M.E.³; Gomes, A.P.³; Teixeira J.A.²; and Balcão V.M.^{1,2,*,#}

¹ Grupo de Investigação em Bioengenharia e Química Biofarmacêutica, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia nº 296, P-4200-150 Porto, Portugal.

² IBB - Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057, Braga, Portugal.

³ Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, P-4200-072, Porto, Portugal.

* supervisor # contact email: vbalcao@ufp.edu.pt



Carla Costa

INTRODUCTION

Lactoferrin (LF) is a glycoprotein that belongs to iron transporter or transferrin family. It was originally isolated from bovine milk, where it is found as a minor protein component of whey proteins. LF contains 703 amino acids and has a molecular weight of ca. 80 kDa. In addition to its presence in milk, it is also found in exocrine secretions of mammals and is released from neutrophil granules during inflammation. It is considered a multifunctional or multi-tasking protein, and appears to play several biological roles. Owing to its iron-binding properties, LF is thought to play a role in iron uptake by the intestinal mucosa of the suckling neonate, which make it a potential source of iron for breast-fed infants. Additionally, LF showed to have antibacterial, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory activities (Yamauchi et al., 1993; Ward et al., 2002). Bovine LF, derived from whey proteins, is marketed as a nutritional supplement. The development of strategies that may permit structural and functional stabilization of LF via nanoencapsulation may increase the biopharmaceutical applicability of this bioactive protein. Such LF-encasing nanovesicles could be utilized in the formulation of dental elixirs to eliminate the oral microflora responsible for formation of oral biofilms with one clear advantage: the adhesive nanovesicles could slowly liberate its naturally antimicrobial content, thus reducing the development of dental cavities. Water-in-oil-in-water emulsions are examples of multiple emulsions, in which dispersions of small water droplets within larger oil droplets are themselves dispersed in a continuous aqueous phase (Bibette et al., 1999; Ficheux et al., 1998; Wang et al., 2006; Hanson et al., 2008). Emulsions are quite utilized in many ways of processing, and are extensively used by the food, cosmetic, and coating industries. Due to their compartmentalized internal structure, multiple emulsions present advantages over simple oil-in-water (O/W) emulsions for encapsulation, such as the ability to carry both polar and non-polar molecules, and a better control over releasing of therapeutic molecules (Pays et al., 2002; Davis and Walker, 1987; Okochi and Nakano, 2000). In the present research work, the potential of natural antimicrobial, bovine LF, stabilized via nanoencapsulation for incorporation in a mouth wash elixir has been investigated. Bovine LF was entrapped within water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple nanoemulsions, aiming at mimicking the multifunctional design of biology, with several lipid matrices, and stabilizing layer compositions. The composition of the stabilizing layer of the nanosystem was changed by using different proportions of lecithin and different poloxamers (nonionic triblock copolymers with a central hydrophobic core of polyoxypropylene flanked by two hydrophilic chains of polyoxyethylene), thus allowing to control degradation times of the nanovesicles. For the production of nanoemulsions, bioactive compounds were previously dissolved in the aqueous phase prior to be dispersed in the melted lipid during homogenization in a UltraTurrax (model T25D from IKA) under heating (ca 40 °C). The resulting nanoemulsions were subsequently fully characterized physicochemically. Physicochemical characterization of the optimized nanovesicle formulations encasing the bioactive LF encompassed determination of particle size, size distribution and particle

charge, via Zeta potential analysis, surface morphology via scanning electron microscopy (SEM), protein encapsulation efficiency via spectrophotometric analysis, and thermal analysis via Differential Scanning Calorimetry (DSC). The antimicrobial activity of the nanoemulsions were also assessed *in vitro*, upon several microbial strains in liquid medium, including pathogenic bacteria and *Candida albicans*. The use of these multiple nanoemulsions in formulating elixirs for oral hygiene would possess inherent advantages, when compared with the current chemical antimicrobial formulations, in that LF is a naturally harmless protein with bacteriostatic activity, without toxicological risk even for small children.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of multiple LF-encasing nanoemulsions. Production of multiple nanoemulsions (*water-in-oil-in-water*, W/O/W) with nanoencapsulated LF was carried out in an UltraTurrax (model T25D from IKA) under heating (ca 40 °C), with the bioactive LF being previously dissolved in the (inner) aqueous phase (W) prior to being dispersed in the melted lipid (Softisan, from Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburg, Germany) during homogenization (10 min at 8000 rpm). Therefore, final W/O/W dispersion of LF was obtained via a sequential (optimized) homogenization of a W/O dispersion involving two cycles for 10 min. The inner aqueous phase was constituted by HCl 10 mM (from Vaz Pereira), CaCl₂ 20 mM (from Merck), Tween 80 (from Sigma-Aldrich) and pure bovine lactoferrin (from DMV International) (with concentrations ranging from 25 mg to 250 mg); the intermediate oily phase encompassed glycerol (from Merck, Darmstadt, Germany), Softisan (or Precirol or Compritol, from GatteFossé) and soybean phosphatidylcholine (from Acofarma); finally, the outer aqueous phase encompassed Lutrol 68 (poloxamer 188 from BASF), ultrapure water and NaCl (from Vaz Pereira, Portugal) 10 mM. Control nanoparticles were also produced, without LF, and stored for 52 days under the same conditions.

Evaluation of the combined effects of homogenization time, LF concentration and ionic strength of the outer aqueous phase. The stability of the multiple nanoemulsions was evaluated by producing emulsions as result of the combined effect of homogenization time (5, 10 and 20 min), LF concentration (25, 50, 100 and 250 mg) and ionic strength (NaCl 1, 10 and 100 mM) of the aqueous outer phase

Determination of hydrodynamic size and Zeta potential. Zeta potential is the electric potential that prevails in the cutting plan of a particle, which is at a small distance from its surface, and which results from the measure of the mobility distribution of a dispersion of charged particles as they are subject to an electric field. The mobility can be defined as the velocity of a particle per unit electric field, and is determined by applying an electric field to the dispersion of particles and measuring their average velocity. The results obtained allow determination of the hydrodynamic size of the lipid vesicles, of the polydispersion index and of their Zeta potential. The Zeta potential and hydrodynamic size of the nanoemulsion particles were determined in a Zetasizer (model Nanoseries Nano-ZS) from Malvern Instruments.

Thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC). Calorimetric analysis was performed in a differential scanning calorimeter (Shimadzu, Kyoto, Japan). For every calorimetric assay, ca. 10 mg of emulsion were weighed (using a microsyringe) directly into the interior of high-pressure aluminum pans (Shimadzu, P/N 557 201-53090, 64U3670609), and duly sealed by pressure. A reference aluminum pan was also prepared by simply sealing air inside an empty case. The samples were then heated from room temperature to 100 °C at a constant linear scanning rate of 5 °C/min, during which the amount of heat absorbed by the sample was recorded.

Protein encapsulation efficiency. Protein encapsulation efficiency was determined via spectrophotometric analysis of the supernatants, following centrifugation of the nanoemulsions using Centricon tubes (from Millipore).

Antimicrobial activity of LF and multiple nanoemulsions. Screening of antimicrobial activity was determined by the diffusion method. Inocula of each target microorganism - *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua* and *Bacillus cereus*, and of *Candida albicans* were prepared by suspension of a pure colony in 0.9 % sterile NaCl (to reach a standard turbidimetry of 0.5 McFarland). Each suspension was inoculated in Mueller Hinton Agar, and after drying, separated wells were made in the plates, and 60 μ L of different nanoemulsion samples and controls were added. Sterile water was used as negative control, and antibiotics as positive controls (chloramphenicol for *St. aureus*, *Salmonella* sp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B.s cereus* and ampicillin for *L. innocua*). Each plate was incubated at 37 °C for 24 h, after which the inhibition halos were measured. In the case of pure LF and nanoemulsion samples with antimicrobial activity, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microplate assay, using same target microorganisms and inocula as described previously. Each suspension of microorganism was inoculated in 96-well plates containing Mueller Hinton Broth for bacteria and Yeast Malt Broth for yeast, with different LF concentrations (2000, 1000, 500, 250, 125 μ g mL⁻¹). Sterile water was used as negative control and uninoculated media were used as a positive control. The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and optical density was measured by plate reader at 620 nm. The MIC was determined as the lowest concentration of LF (free or in nanoemulsion) that showed absence of turbidimetry when compared with the positive control.

RESULTS AND DISCUSSION

The net charge of each particle surface affects the distribution of ions in the surroundings, thus forming an electrical double layer around each (nano)particle. When a particle moves, ions within the boundary move with it, and vice versa. Zeta potential is the potential that exists at this boundary, and its intensity is an indication of the potential stability in the colloidal system, and can be measured by determination of the linear velocity of the particles in an electric field. The Zeta potential depends on the concentration of ions in the solvent. The main reason why to measure the Zeta potential lies in predicting colloidal stability, which in turn depends on the interactions between particles. Zeta potential is therefore an attempt to quantify such interactions, by predicting stability. The Zeta potential is a measure of the repulsive forces between particles, and since the majority of colloidal aqueous systems is stabilized via electrostatic repulsion, the larger the repulsive forces between particles the smaller the probability for them to become closer and form aggregates, leading to a more stable colloidal system. The mean size and size distribution (polydispersity index) were measured via Dynamic Laser light Scattering (suitable for particles ranging from 5 nm to ca. 3 μ m). DSC measurements provided an insight into the state and degree of cristallinity, and the melting and crystallization behaviour of crystalline materials such as the nanovesicles produced. The amount of heat absorbed by the lipid vesicles was the same when comparing empty vesicles and vesicles incorporating LF, for a homogenization period of 10 minutes. Also, increasing homogenization time led to nanovesicles that exhibited an increase in the amount of heat absorbed by the particles, probably due to a reduction in size and/or to liberation of LF. The antimicrobial activity of the different nanoemulsions, assessed *in vitro* against several microbial strains showed different efficiency depending on the pathogenic microorganism. Buffered LF was found to be more stable than unbuffered, purified LF. Several variables were studied, viz. lipid nature, poloxamer concentration, soy lecithin concentration, homogenization time, and LF concentration. Centrifugation of the optimized nanoformulations did not lead to any LF liberation induced by bursting nanovesicles (as revealed by UV-VIS spectrophotometry), thus evidencing the

firm encapsulation and concomitant structural stabilization of LF. Increasing LF concentration lead to an increase in the values of Zeta potential (from negative to positive values). Optimum homogenization time was found to be 10 minutes, at 8000 rpm, since during such timeframe particle size was maintained at values ranging from 100 – 200 nm. Addition of an electrolyte (sodium chloride) to the external aqueous phase also leads to an increase in the values of Zeta potential. However, when using a higher (100 mM) electrolyte concentration, phase separation was notorious immediately after homogenization. Increasing electrolyte concentration leads to an increase in the values of zeta potential, presumably due to accumulation of adsorbed ions at the particle surfaces. Addition of electrolyte at concentrations of 1 mM proved to be most suitable by producing nanovesicles with stable Zeta potential over time. Storage of the optimized multiple nanoemulsions (with Softisan, due to its mild melting temperature) throughout 63 d at room temperature led to an increase in Zeta potential values, presumably due to ion concentration at particle interface. Control nanoparticles were also produced, without LF, and stored for 52 days under the same conditions; for these, a slight increase in particle size was noticed, together with a slight increase in Zeta potential values. Regarding particle size, no change was observed in the range of 100 – 200 nm. Precirol and Compritol were also tested as lipids for the oily phase, but owing to their high melting points, they were discarded in order to prevent deactivation of LF.

CONCLUSIONS

In this research effort, development and optimization of lipid nanoparticles encasing LF was pursued. A lipid with mild melting temperature was found most appropriate for the discontinuous oily phase. A homogeneization timeframe of 10 min, the use of an electrolyte with a low ionic strength, and low LF concentrations were found to be critical variables for producing stable nanovesicle dispersions with diameters ranging from 100-200 nm and Zeta potential values of ca. -14.6 mV. The use of these multiple nanoemulsions in formulating elixirs for oral hygiene would possess inherent advantages, when compared with the current chemical antimicrobial formulation, in that LF is a naturally harmless protein with bacteriostatic activity.

REFERENCES

- Bibette, J., Calderon, F. L., Poulin, P. (1999) Emulsions: Basic principles. *Rep. Prog. Phys.* **62**: 969–1033.
- Davis, S. S., Walker, I. M. (1987) Multiple emulsions as targetable delivery systems. *Methods Enzymol.* **149**: 51–64.
- Ficheux, M. F., Bonakdar, L., Leal-Calderon, F., Bibette, J. (1998) Some stability criteria for double emulsions. *Langmuir* **14**: 2702–2706.
- Hanson, J. A., Chang, C. B., Graves, S. M., Li, Z., Mason, T. G., Deming, T. J. (2008) Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides, *Nature* **455**: 85-88.
- Okochi, H., Nakano, M. (2000) Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **45**: 5–26.
- Pays K, Giermanska-Kahn J, Pouligny B, Bibette J, Leal-Calderon F. (2002) Double emulsions: how does release occur? *J. Control. Release.* **79**: 193-205.
- Wang, Y. F., Tao, Z., Gang, H. (2006) Structural evolution of polymer-stabilized double emulsions. *Langmuir* **22**: 67–73.
- Ward, P. P., Uribe-Luna, S., Conneely, O. (2002) Lactoferrin and host defense, *Biochemistry and Cell Biology* **80**: 95–102.
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., Ellison, R. T. (1993) 3rd Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment, *Infection and Immunity* **61**: 719–728.

Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for oral hygiene applications



Costa C.I.¹; Morsy T.A.¹; Matos C.M.¹; Amorim M.³; Pintado M.E.³; Gomes A.P.³; Teixeira J.A.²; and Balcão V.M.^{1,2,3}

¹ Grupo de Investigação em Bioengenharia e Química Biofarmacéutica, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia nº 296, P-4200-150 Porto, Portugal.

² IBB – Instituto para a Biotecnologia e a Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, P-4710-057 Braga, Portugal.

³ Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, P-4200-072 Porto, Portugal.

✉ email: vbalcão@ufp.edu.pt



IBB
INSTITUTE FOR BIOTECHNOLOGY
AND BIOENGINEERING

CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA, PEBIO
Escola Superior de Biotecnologia

Abstract

Lactoferrin (LF) is a glycoprotein that belongs to the transferrin family; it is considered a nutritional or anti-tumor protein, and appears to play several biological roles. LF showed to have antibacterial, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory activities (Yamachi et al., 1993; Ward et al., 2002). The development of strategies that may permit structural and functional stabilization of LF via nanoencapsulation may increase the biopharmaceutical applicability of this bioactive protein. Due to their compartmentalized internal structure, multiple emulsions present advantages for encapsulation, such as the ability to carry both polar and non-polar molecules, and a barrier control over releasing of therapeutic molecules (Pays et al., 2002; Davis and Wehrli, 1987; Chooch and Nakano, 2000). Water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions are examples of multiple emulsions, in which dispersions of small water droplets within larger oil droplets are themselves dispersed in a continuous aqueous phase (Boute et al., 1990; Fehouo et al., 1994; Wang et al., 2008; Hanson et al., 2008). In the present research work, the potential of natural antimicrobial, bovine LF stabilized via nanoencapsulation has been investigated. Bovine LF was encapsulated within W/O/W nanoemulsions, aiming at mimicking the multifunctional design of biology, with several lipid matrices, and several stabilizing layer compositions. The antimicrobial activity of the LF was assessed *in vitro*, upon several microbial strains. Physicochemical characterization of the produced formulations encompassed determination of particle size, size distribution, particle charge and thermal analysis via Differential Scanning Calorimetry (DSC). The LF-encasing nanoemulsions could be utilized in the formulation of dental elixirs to circumvent the oral microflora responsible for formation of oral biofilms with one clear advantage: the adhesive nanoemulsions could slowly liberate its naturally antimicrobial content, thus reducing the development of dental caries.

Experimental procedures

PREPARATION OF MULTIPLE LF-ENCASING NANOEMULSIONS.

Production of LF-encasing nanoemulsions was carried out in an UltraTurrax (model T25D from IKA) under heating (ca 40°C). Bioactive LF was dissolved in the (inner) aqueous phase (W) and then dispersed in the melted oil phase, during homogenization (10 min at 8000 rpm). The resulting W/O emulsion was dispersed in the outer aqueous phase, during 10 min. The inner aqueous phase was constituted by HCl 10 mM (from Vaz Pereira), CaCl₂ 20 mM (from Merck), Tween 80 (from Sigma-Aldrich) and pure bovine lactoferrin (from DMV International) (with concentrations ranging from 25 mg to 250 mg); the intermediate oily phase encompassed glycerol (from Merck, Darmstadt, Germany), Softisan™ (from Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburg, Germany) or Precinol™ or Composit™ (from Gattefosse) and soybean phosphatidylcholine (from Acosarma, Spain); finally, the outer aqueous phase encompassed Lutrol™ F88 (polyoxamer 188 from BASF, Germany), ultrapure water and NaCl 10 mM (from Vaz Pereira, Portugal). Control nanoparticles were also produced, without LF, and stored for 52 days under the same conditions.



Figure 1. Experimental setup for the preparation of lipid nanoemulsions encasing lactoferrin.

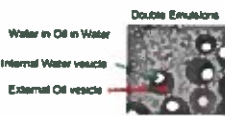


Figure 2. Physical appearance of the lipid nanoemulsions (Water-in-Oil-in-Water multiple emulsion).

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECTS OF THE FORMULATION PARAMETERS.

Optimization of the multiple nanoemulsion was carried out through the combined effect of homogenization time (5, 10 and 20 min), LF concentration (0, 25, 50, 100 and 250 mg), ionic strength of the aqueous outer phase (NaCl 1, 10 and 100 mM) and stabilizing layer composition.

DETERMINATION OF HYDRODYNAMIC SIZE (HS) AND ZETA POTENTIAL (ZP).

Determination of the HS of the lipid nanoemulsions produced, of the polydispersity index and of their ZP were carried out in a Zetasizer (model NanoSeries Nano-ZS) from Malvern Instruments.

THERMAL ANALYSIS BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC).

Calorimetric analyses of the nanoemulsions produced were performed in a differential scanning calorimeter (Shimadzu, Kyoto, Japan), which comprised a detector (DSC-50) and a thermal analyzer (TA-501). The samples were heated from room temperature to 100 °C at a constant linear rate of 5 °C/min, during which the amount of heat absorbed by the sample was recorded.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LF DETERMINED BY THE DIFFUSION METHOD.

Inocula of each target microorganism (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus* and *Candida albicans*) were prepared by suspending a pure culture in 0.9 % sterile NaCl (to reach a standard turbidity of 0.5 McFarland). Each suspension of microorganism was inoculated in 96-well plates containing Mueller Hinton Broth for bacteria and Yeast Malt Broth for yeast, with different LF concentrations (2000, 1000, 500, 250, 125 µg/mL). Sterile water was used as negative control and uninoculated media were used as a positive control. The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and optical density was measured by plate reader at 620 nm. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of LF that showed absence of turbidity when compared with the positive control.

Experimental results and discussion

ANTIMICROBIAL ACTIVITY

The antimicrobial activity of the LF was validated through *in vitro* procedures against several microbial strains, including pathogenic bacteria and yeast *Candida albicans*.

Table 1. Results of antimicrobial activity of lactoferrin.

Yeast	Lactoferrin Concentration (µg/mL)				
	500	250	200	125	62.5
<i>Candida albicans</i>	+++	+++	---	+	+

--- no growth; + growth

- The results showed that the MIC of lactoferrin upon the bacteria *S. aureus* and *L. innocua* was 2000 µg/mL.
- In the case of yeast *Candida albicans*, it was susceptible to lower concentrations of lactoferrin, since the MIC was 200 µg/mL (Table 1).
- It has been demonstrated (Elliott et al., 1988) that lactoferrin interacts with Gram negative bacteria leading to the release of significant levels of lipopolysaccharide from the outer membrane, compromising the outer membrane permeability and increasing bacterial susceptibility to other antimicrobial molecules such as lysozyme. In the research effort undertaken herein, lactoferrin did not exhibit any antimicrobial activity upon Gram negative bacteria (*Salmonella* spp., *E. coli*, *P. fluorescens*) since they were not inhibited, but as mentioned above it may have destabilized their outer membrane.

OPTIMIZATION OF THE FORMULATION

Several variables were studied, viz. lipid nature, polyoxamer concentration, soy lecithin concentration, homogenization time, and LF concentration.

Table 2. Optimization of processing conditions leading to an optimal nanoemulsion.

Formulation parameters	Designed value or condition	Zeta potential (mV)					PDI	PDI (%)
		5 min	10 min	10 min	10 min	10 min		
Homogenization time	5 min	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
Homogenization time	10 min	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
Homogenization time	20 min	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
LF concentration	0 mg	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
LF concentration	25 mg	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
LF concentration	50 mg	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
LF concentration	100 mg	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
LF concentration	250 mg	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
NaCl concentration	1 mM	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
NaCl concentration	10 mM	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
NaCl concentration	100 mM	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	

Buffered LF was found to be more stable than unbuffered, purified LF.

Increasing LF concentration led to an increase in the values of Zeta potential (from negative towards positive values).

Addition of an electrolyte (sodium chloride) to the external aqueous phase also led to an increase in the values of Zeta potential, presumably due to accumulation of adsorbed ions at the particle surface. However, when using a higher (100 mM) electrolyte concentration, phase separation was notorious immediately after homogenization. Addition of electrolyte at concentrations of 10 mM proved to be most suitable, by producing nanoemulsions with (more) stable Zeta potential values over time.

HYDRODYNAMIC SIZE AND ZETA POTENTIAL

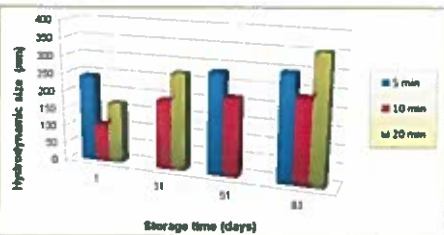


Figure 3. Effect of homogenization time on the hydrodynamic size of the nanoemulsions produced throughout storage time.

Optimum homogenization time was found to be 10 minutes, at 8000 rpm, since during such homogenization timeframe the particle size was maintained at values ranging from 100 – 200 nm (Fig. 3).

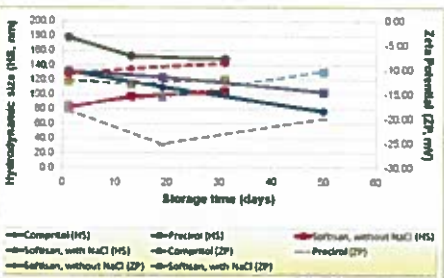


Figure 4. Effect of storage time upon Hydrodynamic Size and Zeta Potential of nanoemulsions produced with several different lipids, for optimized homogenization timeframes (10 min).

Storage of the optimized multiple nanoemulsions (produced with Softisan) throughout 50 days at room temperature led to an increase in the values of ZP, presumably due to ion concentration at particle interface (Fig. 4).

Control nanoparticles were also produced, without LF, and stored for 52 days under the same conditions; for these, a slight increase in particle size was noticed, together with a slight increase in ZP values.

Regarding particle size, no change was observed in the range of 100 – 200 nm. Precinol™ and Composit™ were also tested as lipids for the oily phase, but owing to their high(er) melting points, were discarded in order to prevent deactivation of LF (Fig. 4).



Figure 5. Effect of different excipients in the Zeta Potential of the nanoemulsions using Softisan for 10 min homogenization time.

Lactofen and Tween 80 were selected as suitable excipients, since even at duplicate amounts the ZP values were maintained at lower (negative) values at the same time that HS did not suffer any significative changes over time (Fig. 5).

DSC

The effect of homogenization time was very notorious in the amount of heat absorbed (melting enthalpy) by the lipid nanoemulsion encasing lactoferrin: 73.48 J/g_{nanoparticle} for 5 min homogenization time (absorption peak at 81.70 °C), 245.04 J/g_{nanoparticle} for 10 min homogenization time (absorption peak at 87.64 °C), and 568.04 J/g_{nanoparticle} for 20 min homogenization time (absorption peak at 88.03 °C).

Increasing homogenization time led to production of nanoemulsions that exhibited an increase in the amount of heat absorbed by the particles, probably due to a reduction in size and/or to liberation of LF (see Fig. 6).

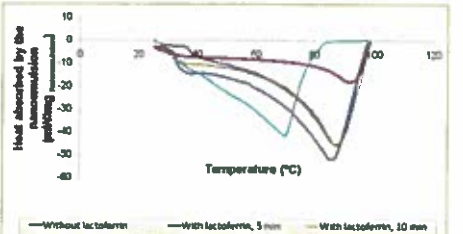


Figure 6. Differential scanning calorimetry thermograms of multiple nanoemulsions produced during several homogenization times, with and without lactoferrin.

A blank (empty) nanoemulsion, prepared without lactoferrin under the same experimental conditions, absorbed 1450 J/g_{nanoparticle} for 10 min homogenization time (absorption peak at 87.54 °C), a value that is 6 times higher than that of the same nanoemulsion encasing lactoferrin. Inclusion of lactoferrin in the nanoemulsion did not lead to significative changes in the peak of heat absorption (87.64 °C), but for the same homogenization timeframe the amount of heat absorbed was significantly lower. Lactoferrin alone in ultrapure water showed a melting enthalpy of 578.79 J/g_{nanoparticle} at a temperature peak of 89.97 °C, a value clearly higher than that of the nanoemulsion encasing LF after 10 min of homogenization, which probably accounts for the stabilizing effect of the nanoencapsulation procedure.

Conclusions

In this research effort, development and optimization of lipid nanoemulsions encasing LF was pursued.

A lipid with a mild melting temperature was found most appropriate for the deactivating oily phase. A homogenization timeframe of 10 min, the use of an electrolyte with a low ionic strength, and low LF concentrations were found to be critical processing variables for producing stable nanoemulsion dispersions with diameters ranging from 100-200 nm and Zeta potential values of ca. -14.6 mV. The inclusion of these multiple nanoemulsions in dental elixir formulations for oral hygiene would possess inherent advantages, when compared with the current chemical antimicrobial formulations, in that LF is a naturally harmless protein with bacteriostatic activity, without toxicological risk even for small children.

References

Boone, A., Goshwin, J., Smith, P. (2010) Bioactive films produced from Poly (PCL) and PEG. *Polym. Degrad. Stab.* 96, 1029-1033.
 Boute, A., G. F. Lopez, J. J. Lopez, J. J. Lopez. (2000) Storage of the outer membrane of *Staphylococcus aureus* by liposomes and emulsions. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 279-283.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2002) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 18, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2003) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 19, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2004) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 20, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2005) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 21, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2006) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 22, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2007) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 23, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2008) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 24, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2009) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 25, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2010) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 26, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2011) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 27, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2012) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 28, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2013) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 29, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2014) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 30, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2015) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 31, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2016) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 32, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2017) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 33, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2018) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 34, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2019) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 35, 2752-2756.
 Chooch, S. P., Smith, P. (2020) The effect of homogenization time on the stability of multiple emulsions. *Langmuir* 36, 2752-2756.



Bioencapsulation
Research Group

**Bioencapsulation
Research Group**
5 rue de la maison Blanche
44240 Sucé sur Erdre
France
Phone : +33 2 51 78 55 45
Fax : +33 2 51 78 54 67
BRG@bioencapsulation.net
<http://bioencapsulation.net>
N° Siret 410 792 154 00024

BRG is a French non profit
association. Bylaws are
available on BRG web site.

Date :
14 September 2009

Object :
XVII International Conference
on Bioencapsulation

Prof Victor Balcao
University Fernando Pessoa
Faculty of Health Sciences
Rua Carlos da Mala, n.º 296
4200-150 Porto Porto
Portugal

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

I, undersigned, Denis Poncelet, President of Bioencapsulation Group, certify that Victor Balcao from University Fernando Pessoa (Portugal) attended to the XVII International Conference on Bioencapsulation held in Groningen, Netherlands, September 24-26, 2009.

Done in Groningen on September 24, 2009

Denis Poncelet
President of Bioencapsulation Group



Bioencapsulation Research Group

Bioencapsulation
Research Group
5 rue de la maison
Blanche
14240 Sucé sur Erdre
France
Phone : +33 2 51 78 55
15
Fax : +33 2 51 78 54 67
BRG@bioencapsulation.net
http://bioencapsulation.net
N° Siret 410 792 154
10024

BRG is a French non profit
association. Bylaws are
available on BRG web site.

Date :
14 September 2009

Object :
XVII International
Conference on
Bioencapsulation

Invoicing address (modify if needed)

Prof Victor Balcao
University Fernando Pessoa
Faculty of Health Sciences
Rua Carlos da Maia, n° 296
4200-150 Porto Porto
Portugal

Your reference (include if needed)

INVOICE

Object	HT	VAT	GROSS
Registration XVII_ICB (Victor Balcao)	350.00 €	0 %	350.00 €
SUBTOTAL (NET)			350.00 €
VAT *			0 €
TOTAL (GROSS)			350.00 €

* Association 1901 non assujettie à la TVA / association not liable to Vat

payment could be done

payment REFERENCE	XVII_ICB - 63 - Victor Balcao
AMOUNT	350.00 Euros
BY CREDIT CARD	Cyberpaiement from BPLC (France) see your electronic registration form
BY BANK TRANSFER	Banque Populaire de Lorraine Champagne
Agence / Office	BPLC DIRECT (00911) 3 r François de Curel, 57000 Metz, France
Account N°	14707 - 00055 - 05519028152 - 11
I.B.A.N.	FR76 1470 7000 5505 5190 2815 211
B.I.C. or swift code	CCBPFRRPMTZ
Account holder	Bioencapsulation Research Group
By check	Drawn on a French Bank
Send to	Bioencapsulation research Group 5 rue de la maison Blanche 44240 Sucé-sur-Erdre, France

Lastname	BALCAO
Firstname	Victor
Affiliation	University Fernando Pessoa
Country	Portugal
Payment	credit_card
Grant	none

GENERAL INSTRUCTIONS FOR GRANTS

- Bring back the requested documents in this folder
- Include this personalized page on top the documents

INSTRUCTION FOR BRG GRANT

- Fill the annexed form and sign it
- Come to the registration desk, **Friday 25, 2009, during the afternoon coffee break**
- Grant will then be provided to you in exchange of this filled form
- Not following this instructions will cancel the grant

INSTRUCTION FOR COST865 GRANT

- Fill the form received from the cost office (some are available at the reception desk)
- If you miss the return train ticket, do not care
- **Do not include your registration fees in the reimbursement**
- Annex all copies of your transportation tickets
- Bring the document to the registration desk **Friday 25, 2009, during the morning coffee break**
- Not following this instructions will cancel the grant

Morsy, T. A., Costa, C. I., Castro, L. M., Azevedo, A. F., Matos, C. M., Moutinho, C. G., Teixeira, J. A., Balcão V. M. Nanoencapsulation of bovine glycomacropeptide for food and biopharmaceutical applications, 1as Jornadas de Bioengenharia, FEUP-UPorto, Porto, Portugal, 27 a 28 de Novembro de 2009.

Nanoencapsulation of bovine glycomacropeptide for food and biopharmaceutical applications

Morsy, T.A.¹, Costa, C.I.¹, Castro, L.M.¹, Azevedo, A.F.¹, Matos, C.M.¹, Moutinho, C.G.^{1,2}, Teixeira, J.A.², Balcão, V.M.^{1,2,*}

¹Bioengineering and Biopharmaceutical Chemistry Research Group (GIBQB), Fernando Pessoa University, Rua Carlos da Maia nº 296, P-4200-150 Porto, Portugal. [15204@ufp.edu.pt]

²IBB - Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, P-4710-057 Braga, Portugal.

Bovine glycomacropeptide (GMP, or k-caseinomacropeptide), derived from whey proteins, is commercially marketed as a nutritional supplement. The bioactivity of bovine GMP has attracted a lot of attention over the last few years, and in particular its ability to bind *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins, inhibit bacterial and viral adhesion, suppress gastric secretions, promote bifidobacterial growth and modulate immune system responses. Of these, protection against toxins, bacteria and viruses, and modulation of the immune system, are the most promising applications for this bioactive dairy macropeptide. The development of strategies that may permit structural and functional stabilization of GMP via nanoencapsulation may increase its food and biopharmaceutical applicabilities. In this research effort, development of a biotechnological process for the targeting of bioactive GMP was investigated, using strategies of nanoencapsulation within lipid nanovesicles. Bovine GMP was stabilized via entrapment within water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple nanoemulsions aiming at mimicking the multifunctional design of biology, with several lipid matrices, and stabilizing layer compositions. In W/O/W multiple emulsions, small water droplets are dispersed within larger oil droplets which are themselves dispersed in a continuous aqueous phase. Due to their compartmentalized internal structure, these emulsions are ideal for encapsulation since they can carry both polar and non-polar molecules. The composition of the stabilizing layer of the nanosystem was changed by using different proportions of lecithin and different poloxamers. Physicochemical characterization of the optimized GMP-encasing nanovesicle formulations encompassed determination of Zeta potential and particle hydrodynamic size, surface morphology via CRYO-SEM, and microcalorimetric analysis via DSC.

Costa, C. I., Morsy, T. A., Matos, C. M., Moutinho, C. G., Amorim, M., Pintado, M. E., Gomes, A. P., Teixeira, J. A., Balcão, V. M. (2010) Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for biopharmaceutical applications, Enzyme and Microbial Technology [to be submitted].

Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for biopharmaceutical applications

Carla I. Costa¹, Tarek A. Morsy¹, Carla M. Matos¹, Carla G. Moutinho^{1,2}, Manuela Amorim³,
Manuela E. Pintado³, Ana P. Gomes³, José A. Teixeira², and Victor M. Balcão^{1,2,*}

¹ Grupo de Investigação em Bioengenharia e Química Biofarmacêutica - GIBQB, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia n° 296, P-4200-150 Porto, Portugal [vbalcao@ufp.edu.pt].

² Instituto para a Biotecnologia e a Bioengenharia - IBB, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, P-4710-057 Braga, Portugal.

³ Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, P-4200-072 Porto, Portugal.

Abstract: Lactoferrin has for long captured the interest of many researchers as a natural compound with a wide variety of uses. Lactoferrin is a monomeric, iron-binding 80 kDa glycoprotein, and appears to be a subfraction of whey with the best documented antiviral, antimicrobial, anticancer and immune modulating/enhancing effects. It belongs to the family of transferrin proteins, and serves to control iron levels in body fluids by sequestering and solubilizing ferric iron. In the present research effort, production of lactoferrin derivatives (starting from a purified commercial extract), encompassing full stabilization of its three-dimensional structure, has been attempted via nanoencapsulation within lipid nanovesicles, integrating a multiple *water-in-oil-in-water* emulsion. Long-term storage of the multiple nanoemulsions produced did not lead to leaching of protein, thus proving the effectiveness of the encapsulation procedure. Furthermore, lactoferrin nanovesicle derivatives prepared under optimal conditions were successfully employed at lab-scale antimicrobial trials.

Keywords: Lactoferrin, lipid nanovesicles, multiple water-in-oil-in-water emulsions, structural stabilization, antimicrobial activity

* Author to whom all correspondence should be addressed.

This manuscript has been submitted for publication in *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.

It is not to be reproduced or cited without the written permission from the authors.

Introduction

Lactoferrin is a glycoprotein that belongs to a broader family of iron transporters and was originally isolated from bovine milk, where it is found as a minor protein component of whey proteins. Lactoferrin contains 703 aminoacids and has a molecular weight of ca. 80 kDa (Hoek *et al.*, 1997). In addition to its presence in milk, it is also found in exocrine secretions of mammals and is released from neutrophil granules during inflammation. It is considered a multifunctional or multi-tasking protein, and appears to play several biological roles. Owing to its iron-binding properties, lactoferrin is thought to play a role in iron uptake by the intestinal mucosa of the suckling neonate, which make it a potential source of iron for breast-fed infants. Additionally, lactoferrin showed to have antibacterial, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory activities (Yamauchi *et al.*, 1993; Hoek *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 2002; Takakura *et al.*, 2003; Orsi, 2004; Rodríguez-Franco *et al.*, 2005). Lactoferrin can show a direct bactericidal activity due to its binding to the lipid A part of bacterial lipopolysaccharide, with an associated increase in membrane permeability, an action that is due to lactoferricin, a peptide obtained from lactoferrin by enzymatic cleavage, which is active not only against bacteria, but even against fungi, protozoa and viruses (Orsi, 2004). Bovine lactoferrin, derived from whey proteins, is marketed as a nutritional supplement, but has a high potential for biopharmaceutical applications. However, as most proteins or enzymes, it is fragile, and even small conformational changes may reduce its activity, and therefore stabilisation is required. One possibility is to encapsulate the protein into nanometer-sized vesicles to protect the bioactive protein from denaturation by proteolysis and dilution effects. The development of strategies that may permit structural and functional stabilization of lactoferrin via nanoencapsulation may increase the biopharmaceutical applicability of this bioactive protein (Srinivas *et al.*, 2010). Such lactoferrin-encasing nanovesicles could be utilized, e.g. in the formulation of dental elixirs to eliminate the oral microflora responsible for formation of oral biofilms with one clear advantage: the adhesive nanovesicles could slowly liberate its naturally antimicrobial content, thus reducing the development of dental cavities. Oral delivery of proteins has been long identified as one of the main challenges in drug delivery science and technology (García-Fuentes *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2006a; Almeida and Souto, 2007; Lee and Yuk, 2007; Sanjula *et al.*, 2009), since in addition to its great technological potential, important drawbacks for its development still exist (Yang *et al.*, 2009). Currently, the number of drugs based on large biological molecules, such as proteins and peptides, is

drastically increasing (Reis *et al.*, 2006b). However, various factors, including stability and circulation time in the gastrointestinal tract, can strongly affect the effective absorption of oral-delivered proteins (Dupeyrón *et al.*, 2009).

Lipid-based carriers have attracted increasing scientific and commercial attention during the last few years as alternative materials for the delivery of peptides and proteins concerned with stability issues (Rawat *et al.*, 2008; Acosta, 2009; Chakraborty *et al.*, 2009). Recently, a newly developed technique for stabilization of proteins and enzymes based on nanoencapsulation procedures has started to gain momentum, based on encapsulation of macromolecules in a nanoporous matrix by the gelation of a solution (Ferrer *et al.*, 2003; Erdinc, 2007; Ragoonanan and Aksan, 2007). Due to being entrapped in a very confined environment (i.e. in the nanopores), the molecular motions of water molecules are altered, slowing down. Therefore, confinement of proteins and/or peptides within nanoporous matrices (or coatings) has the same effect as the osmolytes with respect to changing the water activity and therefore modifying the biochemical reaction rates. Due to increased viscosity and entropic confinement (physical entrapment), the (degradation) reaction rates are slowed down and the biological materials can be stabilized for storage (Ragoonanan and Aksan, 2007; Mozafari *et al.*, 2008). Water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions are examples of multiple emulsions, in which dispersions of small water droplets within larger oil droplets are themselves dispersed in a continuous aqueous phase (Bibette *et al.*, 1999; Ficheux *et al.*, 1998; García-Fuentes *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Hanson *et al.*, 2008; Dupeyrón *et al.*, 2009). Emulsions are quite utilized in many ways of processing, and are extensively used by the food, cosmetic, and coating industries. Due to their compartmentalized internal structure, multiple emulsions present advantages over simple oil-in-water (O/W) emulsions for encapsulation, such as the ability to carry both polar and non-polar molecules, and a better control over releasing of therapeutic molecules (Pays *et al.*, 2002; Davis and Walker, 1987; Okochi and Nakano, 2000; Marcato and Durán, 2008). In the present research work, the potential of natural antimicrobial, bovine lactoferrin, stabilized via nanoencapsulation for incorporation in a mouth wash elixir has been investigated. Bovine lactoferrin was entrapped within W/O/W multiple nanoemulsions, aiming at mimicking the multifunctional design of biological membranes, with several lipid matrices, and stabilizing layer compositions. The composition of the stabilizing layer of the nanosystem was changed by using different proportions of lecithin and different poloxamers (nonionic triblock copolymers with a central hydrophobic core of polyoxypropylene flanked by two hydrophilic chains of polyoxyethylene), thus allowing to control degradation times of the nanovesicles. For the production of nanoemulsions, bioactive

compounds were previously dissolved in the aqueous phase prior to be dispersed in the melted lipid during homogenization in a UltraTurrax (model T25D from IKA) under heating (ca 40 °C). The resulting nanoemulsions were subsequently fully characterized physicochemically. Characterization of the optimized nanovesicle formulations encasing the bioactive lactoferrin encompassed determination of particle size, size distribution and particle charge, via Zeta potential analysis, surface morphology via Scanning Electron Microscopy (SEM), and thermal analysis via Differential Scanning Calorimetry (DSC). The antimicrobial activity of the nanoemulsions was also assessed *in vitro*, upon several microbial strains in liquid medium, including pathogenic bacteria and *Candida albicans*.

Nanovesicles serve as a biologically relevant environment, where reactions occur in small compartments, providing freedom to the molecules, as long as they are not interacting with the nanovesicle lipid walls (Dudia *et al.*, 2008). The use of these multiple nanoemulsions in formulating elixirs for oral hygiene would possess inherent advantages, when compared with the current chemical antimicrobial formulations, in that lactoferrin is a naturally harmless protein with bacteriostatic activity, without toxicological risk even for small children.

Materials and methods

Materials

Bioactive protein. The bioactive lactoferrin used consisted of a purified extract (protein content of 96.0 %, of which lactoferrin accounts for 98.0 %) from bovine whey, and was kindly supplied by DMV International (Delhi NY, USA).

Chemicals. Softisan100™ was purchased from Sasol (Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburg, Germany). $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was obtained from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Lutrol F68™ (poloxamer 188) and Lutrol F127™ were kindly supplied by BASF ChemTrade GmbH (Ludwigshafen, Germany). Precirol ATO5 (glycerol distearate) and Compritol 888ATO (glycerol dibehenate) were kindly supplied from Gattefossé SAS (Saint Priest, France). Glycerol (anhydrous) was purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Tween 80 was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Commercial HCl (37%) and NaCl were purchased from Vaz Pereira (Lisbon, Portugal). Soybean phosphatidylcholine (lecithin) was purchased from Acofarma (Barcelona, Spain). Filter paper (0.22 μm) was purchased from Nalgene (New York NY, USA), and nonsterile filters (0.45 μm) were purchased from Nucleopore (Cambridge MA, USA). Tap water was purified in a Milli-Q Plus 185 system (Molsheim, France) to a final conductivity of ca. 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$. The solvents used were all analytical grade or better, and were used without further purification.

Analytical equipment. All spectrophotometric readings were carried out using quartz cuvettes in an UV-VIS spectrophotometer from Shimadzu (Kyoto, Japan). The Zeta Potential and Hydrodynamic Size of the nanoemulsion particles were determined in a Zetasizer (model Nanoseries Nano-ZS) from Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, United Kingdom). Calorimetric studies were carried out in a differential scanning calorimeter (Shimadzu, Kyoto, Japan), which comprised a detector (DSC-50) and a thermal analyzer (TA-501). Cryo-SEM analysis of lipid nanoemulsions were carried out in a Scanning Electron Microscope from JEOL (model JSM 6301F from JEOL, Tokyo, Japan), coupled with a Ion Sputter-Coater JSC1100 (JEOL, Tokyo, Japan), an INCA 350 Energy X-Ray microanalysis system via Energy Dispersive Spectrometry (SEM/EDS) from Oxford Instrument GmbH (Wiesbaden, Germany), and a cryo transfer system from Gatan Inc. (model Alto 2500 from Gatan Inc, Pleasanton CA, USA).

Experimental procedures

Preparation of multiple lactoferrin-encasing nanoemulsions. Production of multiple nanoemulsions (*water-in-oil-in-water*, W/O/W) with nanoencapsulated lactoferrin were carried out in an UltraTurrax (model T25D from IKA) under heating (ca 40 °C), with the bioactive lactoferrin being previously dissolved in the (inner) aqueous phase (W) prior to being dispersed in the melted lipid (O) (Softisan) during homogenization (10 min at 8000 rpm). Therefore, final W/O/W dispersions of lactoferrin were obtained via sequential (optimized) homogenization of a W/O dispersion involving two cycles for 10 min. The inner aqueous phase was constituted by HCl 10 mM, CaCl₂ 20 mM, Tween 80 and pure bovine lactoferrin (with concentrations ranging from 25 mg to 250 mg); the intermediate oily phase encompassed glycerol, Softisan (or Precirol or Compritol) and soybean phosphatidylcholine; finally, the outer aqueous phase encompassed Lutrol F68 (or Lutrol F127), ultrapure water and NaCl 10 mM. Control nanoparticles were also produced, without lactoferrin, and stored for 52 days under the same conditions.

Evaluation of the combined effects of homogenization time, lactoferrin concentration and ionic strength of the outer aqueous phase, for optimization of the nanoformulation. Stability of the multiple nanoemulsions was evaluated by producing emulsions as result of the combined effect of homogenization time (5, 10 and 20 min), lactoferrin concentration (25, 50, 100 and 250 mg) and ionic strength (NaCl 1, 10 and 100 mM) of the aqueous outer phase.

Determination of Hydrodynamic Size and Zeta potential. Zeta potential is the electric potential that prevails in the cutting plan of a particle, which is at a small distance from its surface, and which results from the measure of the mobility distribution of a dispersion of charged particles as they are subject to an electric field. The mobility can be defined as the velocity of a particle per unit electric field, and is determined by applying an electric field to the dispersion of particles and measuring their average velocity. The results obtained allow determination of the hydrodynamic size of the lipid nanovesicles, of the polydispersion index and of their Zeta potential.

Thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC). For every calorimetric assay, ca. 10 mg of (nano)emulsion were weighed (using a microsyringe) directly into the interior of high-pressure aluminum pans (Shimadzu, P/N 557 201-53090, 64U3670609), and duly sealed by pressure. A reference aluminum pan was also prepared by simply sealing air inside an empty case. The samples were then heated from room temperature to 100 °C at a constant linear scanning rate of 5 °C/min, during which the amount of heat absorbed by the samples was recorded.

Antimicrobial activity of lactoferrin and multiple nanoemulsions. Screening of antimicrobial activity was determined by the diffusion method. Inocula of each target microorganism - *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, and *Candida albicans* - were prepared by suspension of a pure colony in 0.9 % sterile NaCl (to reach a standard turbidimetry of 0.5 McFarland). Each suspension was inoculated in Mueller Hinton Agar, and after drying, separated wells were made in the plates, and 60 µL of different nanoemulsion samples and controls were added. Sterile water was used as negative control, and antibiotics as positive controls (chloramphenicol for *S. aureus*, *Salmonella* sp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *B. cereus* and ampicillin for *L. innocua*). Each plate was incubated at 37 °C for 24 h, after which the inhibition halos were measured. In the case of pure lactoferrin and nanoemulsion samples with antimicrobial activity, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microplate assay, using same target microorganisms and inocula as described previously. Each suspension of microorganism was inoculated in 96-well plates containing Mueller Hinton Broth for bacteria and Yeast Malt Broth for yeast, with different lactoferrin concentrations (2000, 1000, 500, 250, 200, 125, 62.5 µg/mL). Sterile water was used as negative control and uninoculated media were used as a positive control. The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and optical density was measured by plate reader at 620 nm. The MIC was determined as the lowest concentration of lactoferrin (free or in nanoemulsion) that showed absence of turbidimetry when compared with the positive control.

(Cryo-) Scanning Electron Microscopy analyses. Lipid nanoemulsions encasing lactoferrin were analyzed for microstructural and morphological characteristics via Cryo-SEM. Briefly, lactoferrin-encasing nanoemulsion samples were prepared for analysis as follows: (i) samples were mounted in an appropriate (aluminum) support inserted into a gold-coated plate; (ii) the gold-coated plate was then duly fixed in a transfer stick; (iii) the support containing the sample was immersed in liquid (slush) nitrogen; (iv)

the sample was then transferred under vacuum into the SEM preparation chamber (also under vacuum and maintained cold via addition of liquid nitrogen); (v) inside the chamber, the deep-frozen sample was fractured, undergone sublimation (during 90 s to 300 s) by gently increasing the temperature from -140 °C to ca. -90 °C, and was sputter-coated with 100-200 Å of Au/Pd (during 20 s) in a strong vacuum (0.5 atm) between 20-30 mA at 2.5 kV; (vi) finally, the sample was transferred into the SEM chamber for microscopy analysis. The samples were analyzed at CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto) with a scanning electron microscope from JEOL operating at 5-15 kV, with an incidence angle of 30°, coupled with X-Ray microanalysis. A cryo transfer system for SEM analysis was used for all sample transfer prior to SEM analysis.

Results and discussion

(Cryo-) Scanning Electron Microscopy. Magnifications of pure lactoferrin powder of 400x and of lactoferrin-encasing nanoemulsions of 15,000x and 50,000x are depicted in Figures 1a, 1b and 1c, respectively. The cryo scanning electron microphotographs of the exposed (fractured) surface of lactoferrin-encasing nanoemulsions (see Figures 1b and 1c) show the poloxamer matrix structure developed during the manufacturing process and the highly homogeneous distribution of nanovesicle diameters.

Optimization of the formulation. For producing an optimal nanoformulation, several variables were studied, viz. lipid nature, poloxamer concentration, soy lecithin concentration, homogenization time, and lactoferrin concentration (see Table 1). (Purified) buffered lactoferrin was found to be more stable than unbuffered lactoferrin. Centrifugation of the optimized nanoformulations did not lead to any lactoferrin liberation induced by bursting nanovesicles (as revealed by UV-VIS spectrophotometry), thus evidencing the firm encapsulation and concomitant structural stabilization of lactoferrin. Increasing lactoferrin concentration led to an increase in the values of Zeta potential (from negative towards positive values). Addition of an electrolyte (sodium chloride) to the external aqueous phase also led to an increase in the values of Zeta potential (see Figure 2), presumably due to accumulation of adsorbed ions at the particle surfaces. However, when using a higher (100 mM) electrolyte concentration, phase separation was notorious

immediately after homogenization. Addition of electrolyte at concentrations of 10 mM proved to be most suitable, by producing nanovesicles with (more) stable Zeta potential values over time.

Hydrodynamic size and Zeta Potential. The net charge of each particle surface affects the distribution of ions in the surroundings, thus forming an electrical double layer around each (nano)particle. When a particle moves, ions within the boundary move with it, and vice versa. Zeta potential is the potential that exists at this boundary, and its intensity is an indication of the potential stability in the colloidal system, and can be measured by determination of the linear velocity of the particles in an electric field. The Zeta potential depends on the concentration of ions in the solvent. The main reason why to measure the Zeta potential lies in predicting colloidal stability, which in turn depends on the interactions between particles. Zeta potential is therefore an attempt to quantify such interactions, by predicting stability. The Zeta potential is a measure of the repulsive forces between particles, and since the majority of colloidal aqueous systems is stabilized via electrostatic repulsion, the larger the repulsive forces between particles the smaller the probability for them to become closer and form aggregates, leading to a more stable colloidal system. The mean size and size distribution (polydispersity index) were measured via Dynamic Laser light Scattering (suitable for particles ranging from 5 nm to ca. 3 μ m). Optimum homogenization time was found to be 10 minutes, at 8000 rpm, since during such homogenization timeframe the particle size was maintained at values ranging from 100 – 200 nm (see Figures 2 and 3). Storage of the optimized multiple nanoemulsions (produced with Softisan) throughout 50 days at room temperature led to an increase in the values of Zeta potential, presumably due to ion concentration at particle interface (see Figure 2). Control nanoparticles were also produced, without lactoferrin, and stored for 52 days under the same conditions; for these, a slight increase in particle size was noticed, together with a slight increase in Zeta potential values. Regarding particle size, no change was observed in the range of 100 – 200 nm. Precirol™ and Compritol™ were also tested as lipids for the oily phase, but owing to their high(er) melting points, were discarded in order to prevent deactivation of lactoferrin (see Figure 2). Lecithin and Tween 80 were selected as suitable excipients, since even at duplicate amounts the Zeta potential values were maintained at lower (negative) values at the same time that hydrodynamic size did not suffer any significant changes over time (see Figure 2). Increasing electrolyte concentration leads to an increase in the values of Zeta potential, presumably due to accumulation of adsorbed ions at the particle surfaces. Addition of electrolyte at concentrations of 1 mM proved to be most suitable by producing nanovesicles with stable Zeta potential over time. Storage of the optimized multiple

nanoemulsions (with Softisan, due to its mild melting temperature) throughout several days at room temperature led to an increase in Zeta potential values (see Figure 4), presumably due to ion concentration at particle interface.

Antimicrobial Activity. Probably, the best known role of lactoferrin is as an iron-binding protein, as it is known to have an extremely high affinity for this metal. Many pathogenic bacteria need a supply of free iron to multiply and in the presence of lactoferrin are strongly inhibited or killed. The antimicrobial activity of the different nanoemulsions, assessed *in vitro* against several microbial strains showed different efficiency depending on the pathogenic microorganism. The antimicrobial activity of the lactoferrin (see Table 2) was validated through *in vitro* procedures against several microbial strains, including pathogenic bacteria and yeast *Candida albicans*. The results showed that the MIC of lactoferrin upon the bacteria *S. aureus* and *L. innocua* was 2000 µg/mL. In the case of yeast *Candida albicans*, it was susceptible to lower concentrations of lactoferrin, since the MIC was 200 µg/mL (see Table 2). It has been demonstrated (Ellison *et al.*, 1988) that lactoferrin interacts with Gram negative bacteria leading to the release of significant levels of lipopolysaccharide from the outer membrane, compromising the outer membrane permeability and increasing bacterial susceptibility to other antimicrobial molecules such as lysozyme. In the research effort entertained herein, lactoferrin did not exhibit any antimicrobial activity upon Gram negative bacteria (*Salmonella* sp, *E. coli*, *P. fluorescens*) since they were not inhibited, but as mentioned above it may have destabilized their outer membrane.

Microcalorimetric analysis. Differential scanning calorimetric measurements provided an insight into the state and degree of crystallinity, and the melting and crystallization behaviour of crystalline materials such as the lipid nanovesicles produced. The amount of heat absorbed by the lipid nanovesicles was the same when comparing empty vesicles and vesicles incorporating lactoferrin, for an (optimized) homogenization period of 10 minutes (see Figure 5). Also, increasing homogenization time led to nanovesicles that exhibited an increase in the amount of heat absorbed by the particles, probably due to a reduction in size and/or to liberation of lactoferrin (see Figures 3 and 5). The effect of homogenization time was very notorious in the amount of heat absorbed (melting enthalpy) by the lipid nanoformulation encasing lactoferrin: 75.48 J/g_{nanoemulsion} for 5 min homogenization time (absorption peak at 91.70 °C), 245.04 J/g_{nanoemulsion} for 10 min homogenization time (absorption peak at 87.64 °C), and 866.64 J/g_{nanoemulsion} for 20 min homogenization time

(absorption peak at 86.03 °C). Increasing homogenization time led to production of nanovesicles that exhibited an increase in the amount of heat absorbed by the particles, probably due to a reduction in size and/or to liberation of lactoferrin (see Figure 5). A blank (empty) nanoemulsion, prepared without lactoferrin under the same experimental conditions, absorbed 1450 J/g_{nanoemulsion} for 10 min homogenization time (absorption peak at 87.54 °C), a value that is 6 times higher than that of the same nanoemulsion encasing lactoferrin. Inclusion of lactoferrin in the nanoformulation did not lead to significant changes in the peak of heat absorption (87.64 °C), when compared with the blank (empty) counterpart (87.54 °C), but for the same homogenization timeframe the amount of heat absorbed was significantly lower. Lactoferrin alone in ultrapure water showed a melting enthalpy of 878.79 J/g_{nanoemulsion}, at a temperature peak of 69.97 °C, a value clearly higher than that of the nanoemulsion encasing lactoferrin after 10 min of homogenization, which probably accounts for the stabilizing effect of the nanoencapsulation procedure. Macroscopic observations of optimized nanosystems with increased amount of the semicrystalline polymer (Tween 80, i.e. poly(oxyethylene) sorbitan monooleate) showed no visible phase separation, and absence of adherence to the container walls even after a prolonged storage at room temperature. The optimized nanosystem encompassed nanovesicles with an average size of ca. 100-200 nm and an average Zeta Potential of ca. -14.6 mV (see Figures 2 and 4), which were maintained stable over a storage timeframe of nearly 3 months. Compatibility between increased amounts of Tween 80 and other components of internal aqueous phase can be attributed to hydrogen bonding and to the lower crystalline lattice energy of this polymer, which had a notorious impact in the melting profile of the optimized nanoemulsion. In water-in-oil emulsions (such as our nanovesicles), there is a positive correlation between emulsion stability and fatty acid chain length and a negative correlation with the dielectric constant of the emulsifier. Increasing molecular weight (such as in Softisan 100™, with C₁₀-C₁₈ fatty acid moieties) and decreasing dielectric constant (such as in Tween 80) indicates greater hydrophobicity, leading to a greater impregnation of the interface and to a more stable (nano)emulsion, which is in clear agreement with the long-term stability observed for our multiple nanoemulsion systems.

Conclusions

In this research effort, development and optimization of lipid nanovesicles encasing lactoferrin was pursued. A lipid with mild melting temperature was found most appropriate for the discontinuous oily phase. A homogenization timeframe of 10 min, the use of an electrolyte with a low ionic strength, and low lactoferrin concentrations were found to be critical variables for producing stable nanovesicle dispersions with diameters ranging from 100-200 nm and Zeta potential values of ca. -14.6 mV. The use of these multiple nanoemulsions in formulating elixirs for oral hygiene would possess inherent advantages, when compared with the current chemical antimicrobial formulation, in that lactoferrin is a naturally harmless protein with bacteriostatic activity, without toxicological risk even for small children.

Acknowledgements

TAM gratefully acknowledges financial support from Fundação Ensino e Cultura Fernando Pessoa (Porto, Portugal). The authors are grateful to Dr. Madalena Vieira (affiliated with the IBB) for technical help.

References

- Acosta, E. (2009) Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **14**: 3-15.
- Almeida, A. J., Souto, E. (2007) Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**: 478-490.
- Bibette, J., Calderon, F. L., Poulin, P. (1999) Emulsions: Basic principles. *Rep. Prog. Phys.* **62**: 969-1033.

- Chakraborty, S., Shukla, D., Mishra, B., Singh, S. (2009) Lipid – an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **73**: 1-15.
- Davis, S. S., Walker, I. M. (1987) Multiple emulsions as targetable delivery systems. *Methods Enzymol.* **149**: 51–64.
- Dudia, A., Koçer, A., Subramaniam, V., Kanger, J. S. (2008) Biofunctionalized lipid-polymer hybrid nanocontainers with controlled permeability, *Nano Letters* **8**: 1105-1110.
- Dupeyrón, D., Rieumont, J., González, M., Castaño, V. M. (2009) Protein Delivery by Enteric Copolymer Nanoparticles, *Journal of Dispersion Science and Technology* **30**:1188–1194.
- Ellison III, R. T., Giehl, T. J., LaForce, F. M. (1988) Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin, *Infect. Immun.* **56**: 2774–2781.
- Erdinc, B. I. (2007) Micro/nanoencapsulation of proteins within alginate/chitosan matrix by spray drying, M.Sc. Thesis, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, pp.90.
- Ferrer, M.L., Yuste, J., Rojo, F., del Monte, F. (2003) Biocompatible sol-gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrixes, *Chem. Mater.* **15**: 3614–3618.
- Ficheux, M. F., Bonakdar, L., Leal-Calderon, F., Bibette, J. (1998) Some stability criteria for double emulsions, *Langmuir* **14**: 2702–2706.
- García-Fuentes, M., Torres, D., Alonso, M. J. (2002) Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **27**: 159-168.
- Hanson, J. A., Chang, C. B., Graves, S. M., Li, Z., Mason, T. G., Deming, T. J. (2008) Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides, *Nature* **455**: 85-88.

- Hoek, K. S., Milne, J. M., Grieve, P. A., Dionysius, D. A., Smith, R. (1997) Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 54-59.
- Lee, K. Y., Yuk, S. H. (2007) Polymeric protein delivery systems, *Progress in Polymer Science* **32**: 669-697.
- Marcato, P. D., Durán, N. (2008) New aspects of nanopharmaceutical delivery systems, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **8**: 1-14.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., Yurdugul, S. (2008) Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology, *International Journal of Food Properties* **11**: 833-844.
- Okochi, H., Nakano, M. (2000) Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **45**: 5-26.
- Orsi, N. (2004) The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives, *BioMetals* **17**: 189-196.
- Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., Leal-Calderon, F. (2002) Double emulsions: how does release occur? *J. Control. Release.* **79**: 193-205.
- Ragoonanan, V., Aksan, A. (2007) Protein stabilization, *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **34**: 246-252.
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., Saraf, Swarnlata (2008) Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides, *Yakugaku Zasshi (The Pharmaceutical Society of Japan)* **128**: 269-280.

- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., Veiga, F. (2006a) Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2: 53-65.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., Veiga, F. (2006b) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2: 8-21.
- Rodríguez-Franco, D. A., Vázquez-Moreno, L., Montfort, G. R.-C. (2005) Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales, *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47: 102-111.
- Sanjula, B., Shah, F. M., Javed, A., Alka, A. (2009) Effect of poloxamer 188 on lymphatic uptake of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for bioavailability enhancement, *Journal of Drug Targeting* 17: 249-256.
- Srinivas, P. R., Philbert, M., Vu, T. Q., Huang, Q., Kokini, J. L., Saos, E., Chen, H., Peterson, C. M., Friedl, K. E., McDade-Ngutter, C., Hubbard, V., Starke-Reed, P., Miller, N., Betz, J. M., Dwyer, J., Milner, J., Ross, S. A. (2010) Nanotechnology research: applications in nutritional sciences, *Journal of Nutrition* 140: 119-124.
- Takakura, N., Wakabayashi, H., Ishibashi, H., Teraguchi, S., Tamura, Y., Yamaguchi, H., Abe, S. (2003) Oral lactoferrin treatment of experimental oral Candidiasis in mice, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 2619-2623.
- Wang, Y. F., Tao, Z., Gang, H. (2006) Structural evolution of polymer-stabilized double emulsions. *Langmuir* 22: 67-73.
- Ward, P. P., Uribe-Luna, S., Conneely, O. (2002) Lactoferrin and host defense, *Biochemistry and Cell Biology* 80: 95-102.

Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., Ellison, R. T. (1993) Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment, *Infection and Immunity* **61**: 719–728.

Yang, S., Yuan, W., Jin, T. (2009) Formulating protein therapeutics into particulate forms, *Expert Opinion on Drug Delivery* **6**: 1123-1133.

FIGURE CAPTIONS

- Figure 1: Scanning electron microscopy analysis of the lactoferrin lyophilizate using x400 magnification (a) and cryo-scanning electron microphotographs of lactoferrin-encasing nanoemulsions, showing the poloxamer network in the outer aqueous phase after sublimation and sputter coating with gold/palladium, for x15,000 magnification (b) and x50,000 magnification (c).
- Figure 2: Effect of storage time upon Hydrodynamic Size and Zeta Potential of nanovesicles produced with several (different) lipids, for optimized homogenization timeframe (10 min).
- Figure 3: Effect of homogenization time in the hydrodynamic size of the nanovesicles produced throughout storage time.
- Figure 4: Effect of different excipients in the Zeta Potential of the nanovesicles using Softisan for 10 min homogenization time.
- Figure 5: Differential scanning calorimetry thermograms of multiple nanoemulsions produced during several homogenization times, with and without lactoferrin.

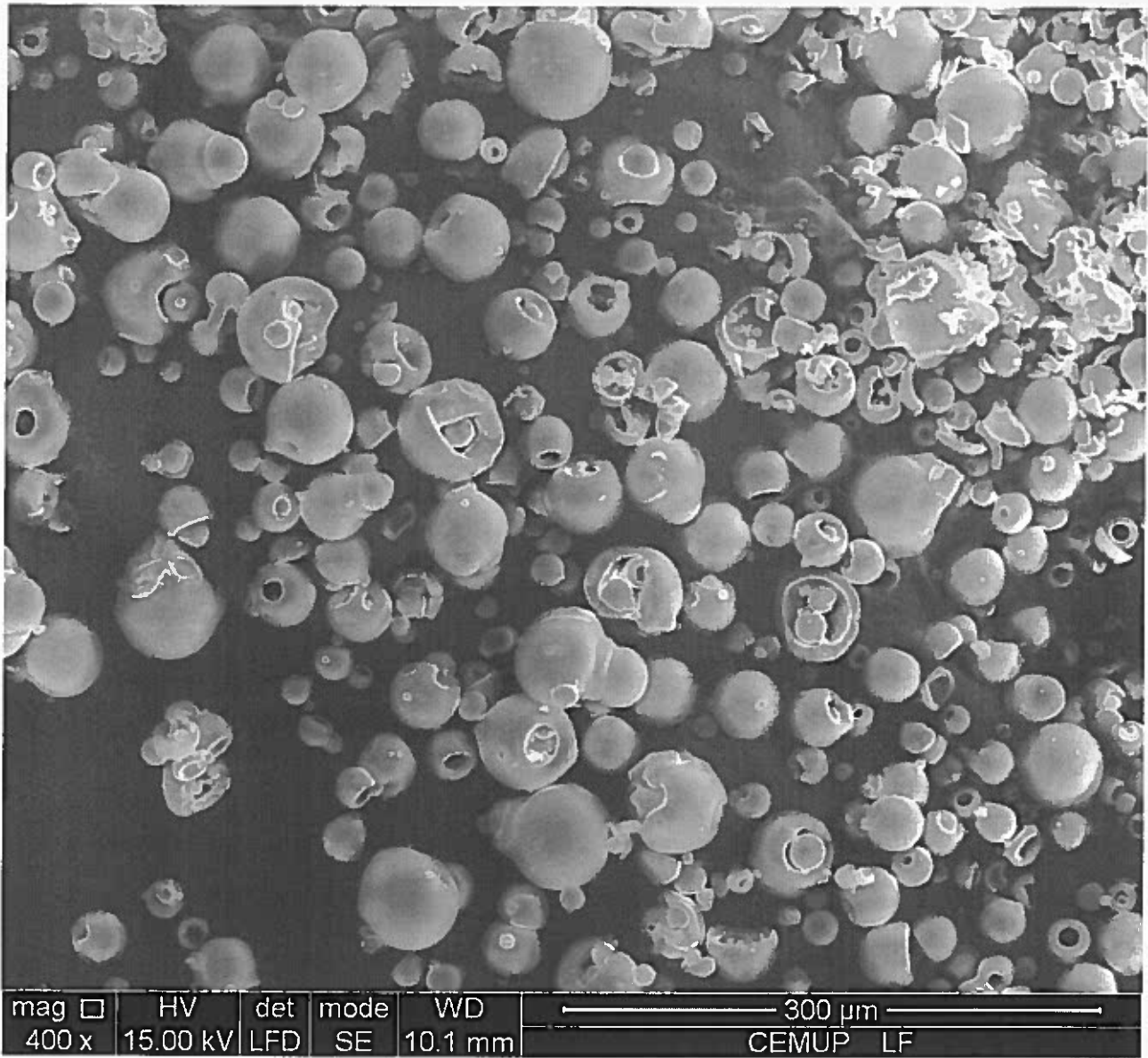


Figure 1a

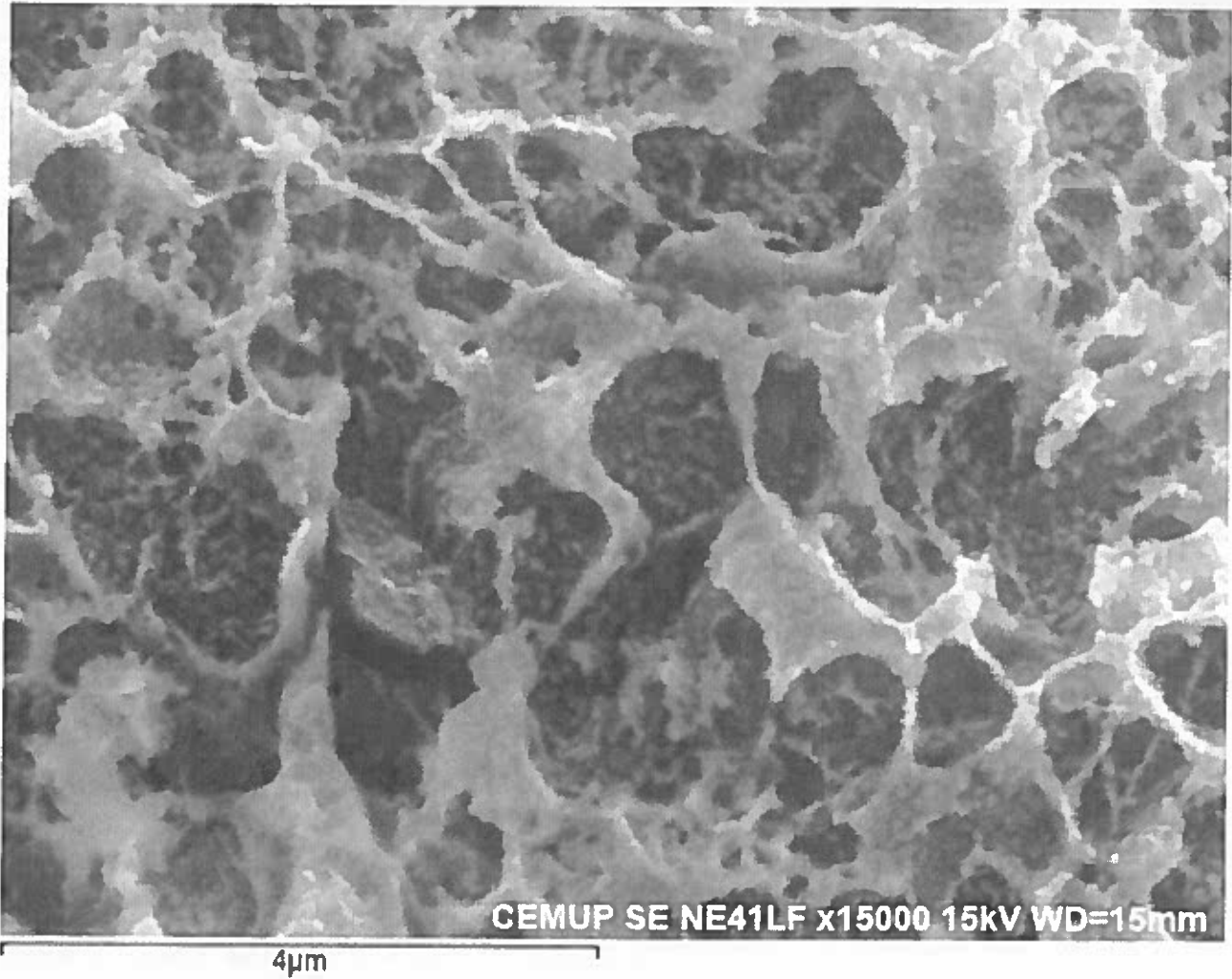


Figure 1b

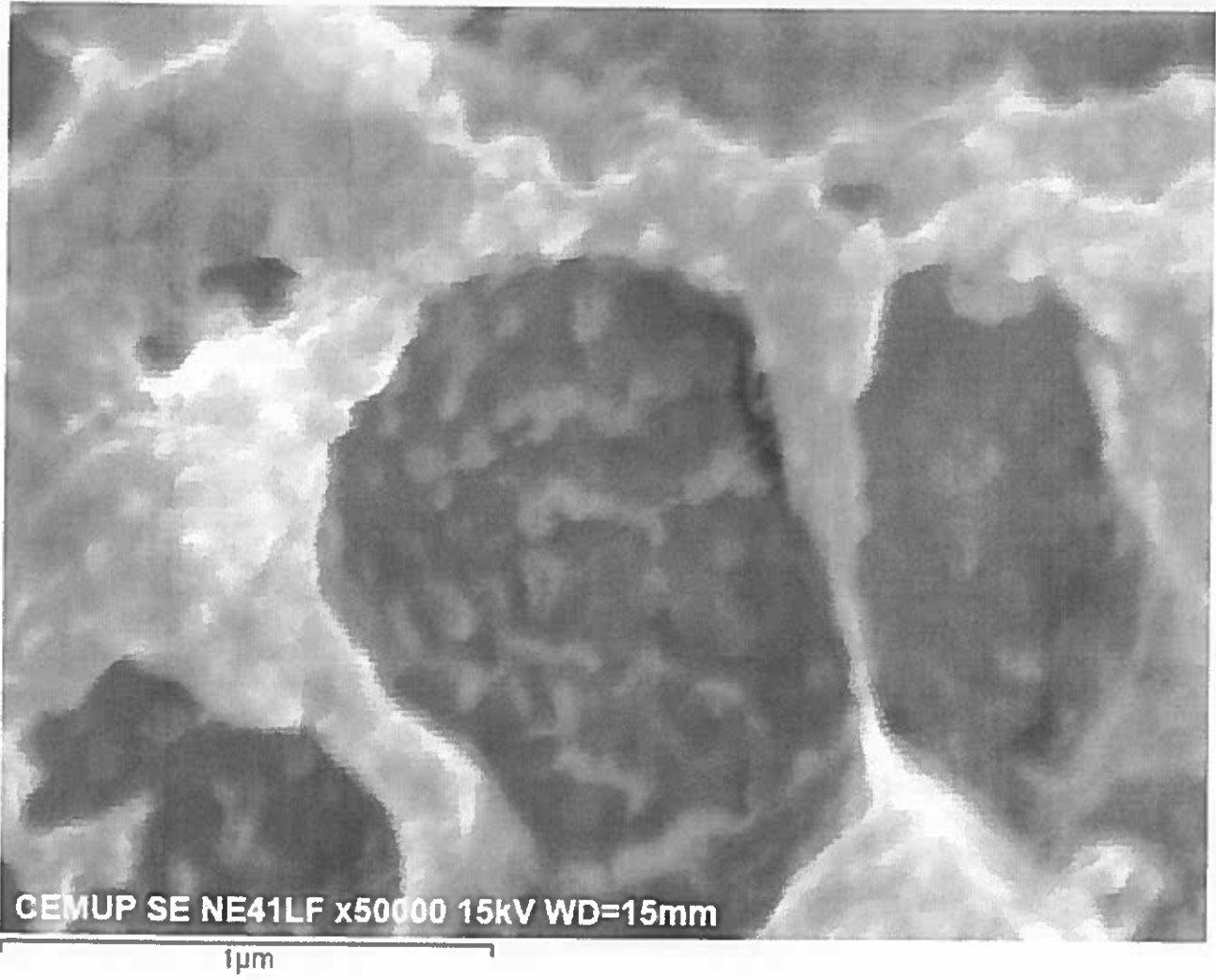


Figure 1c

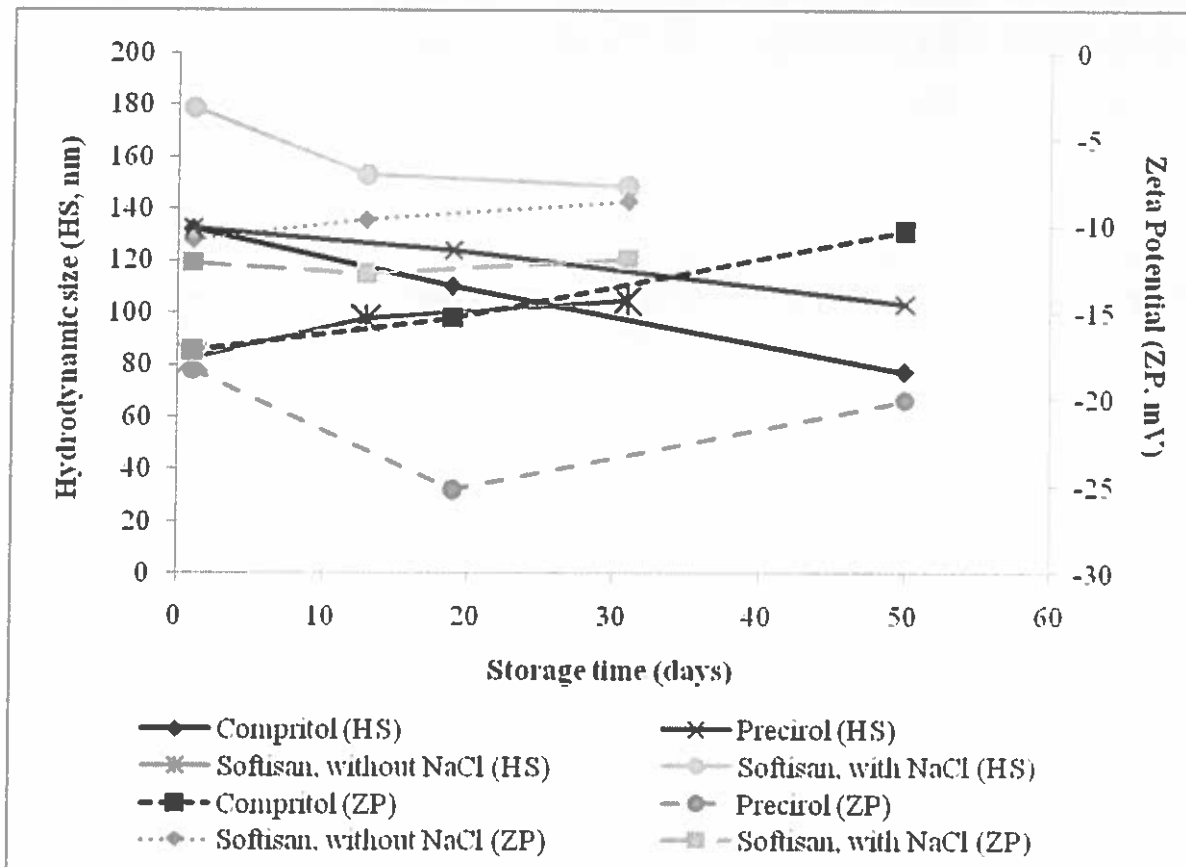


Figure 2

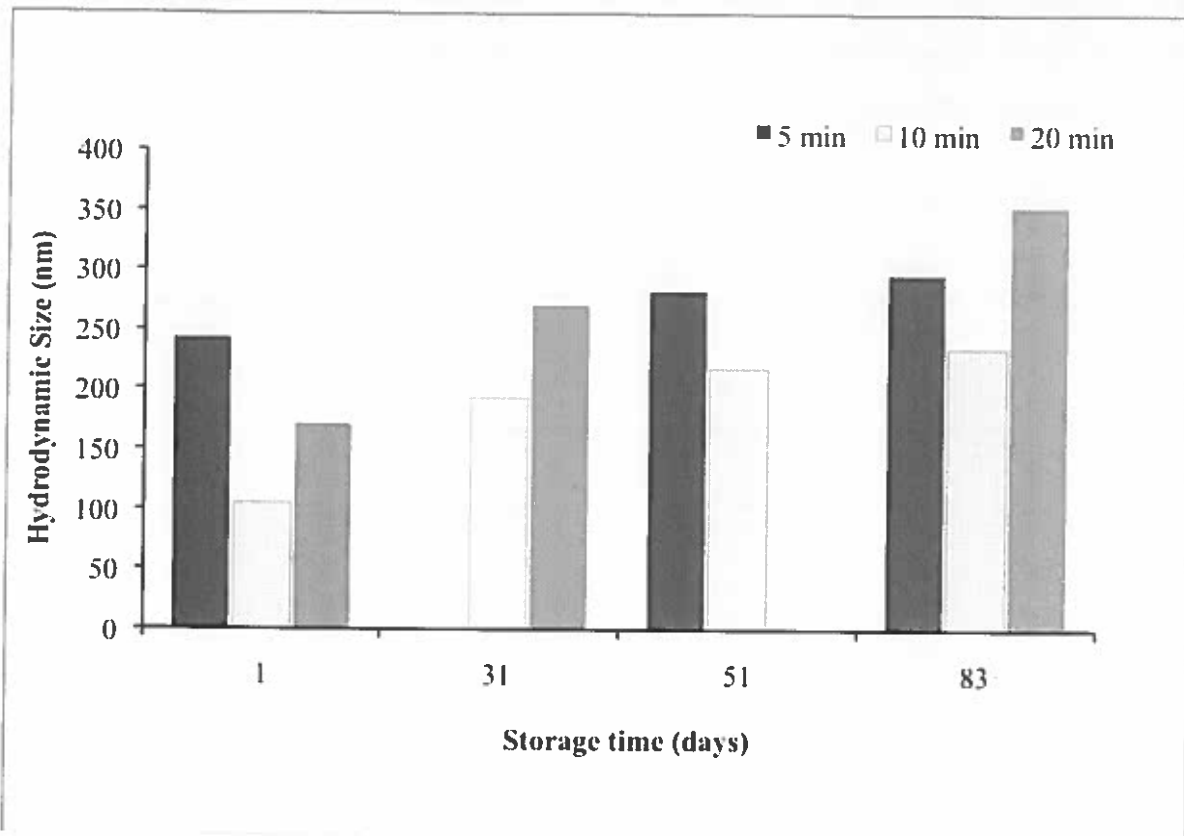


Figure 3

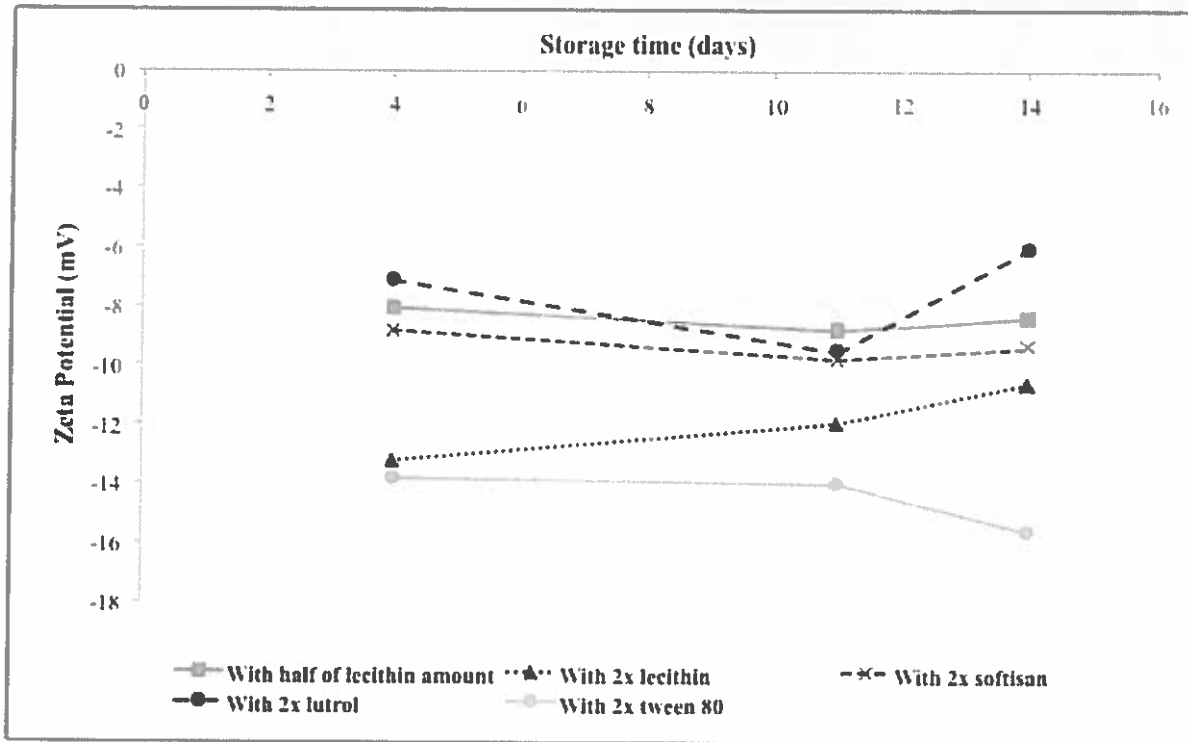


Figure 4

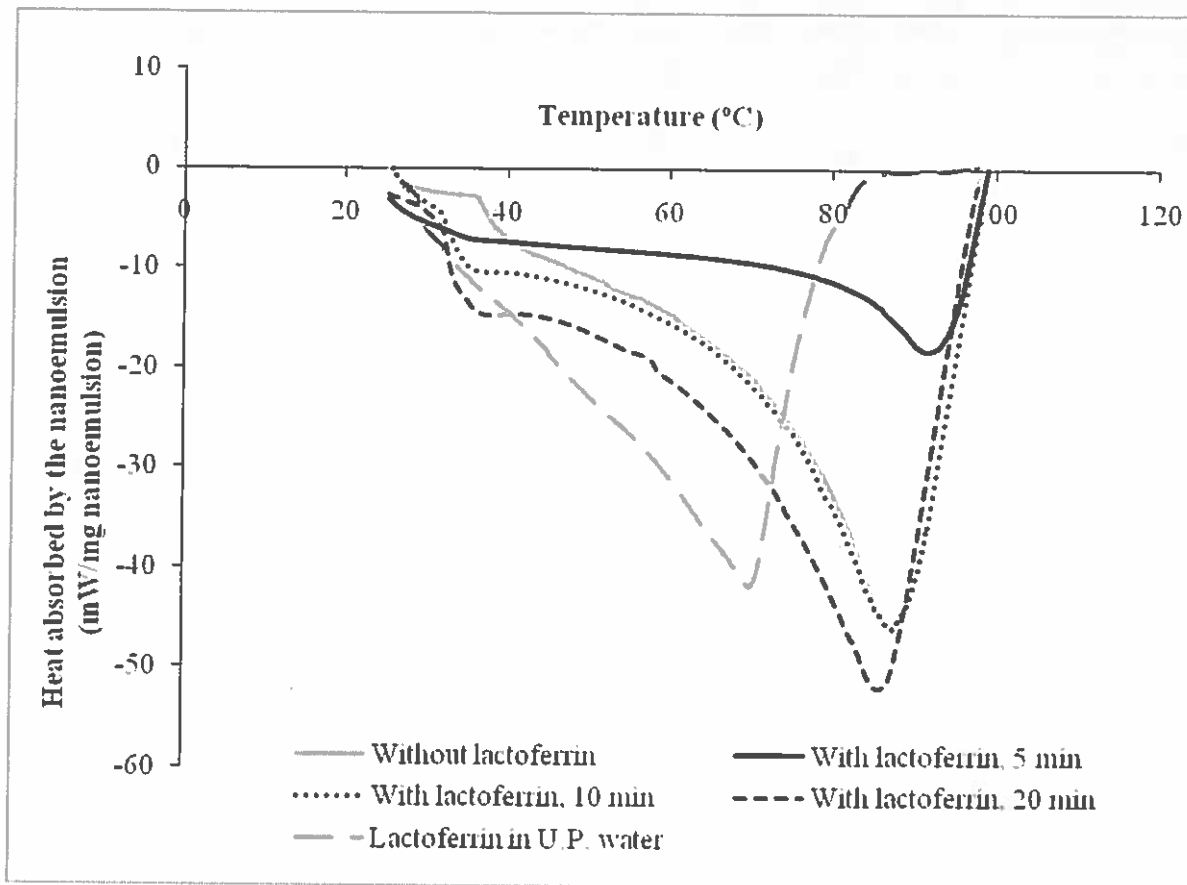


Figure 5

Table 1. Optimization of processing conditions leading to an optimal nanoformulation.

Formulation parameters		Composition of the several nanoformulations (w/w)					
		Designed starting conditions	Without lactoferrin (control)	With lactoferrin and NaCl	With lactoferrin, NaCl and CaCl ₂	With 25% more of lecithin and tween 80	With 50% more lecithin and Tween 80
Internal aqueous phase		8000	8000	8000	8000	8000	8000
	Homogenization speed (rpm)	8000	8000	8000	8000	8000	8000
	Lactoferrin	0,05%	0,00%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
	HCl (0.010 M)	9,80%	9,80%	9,79%	9,79%	9,79%	9,78%
	CaCl ₂ (0.020 M)	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,03%	0,03%
	Tween 80	0,10%	0,10%	0,10%	0,10%	0,12%	0,15%
Oil phase		0,98%	0,98%	0,98%	0,98%	0,98%	0,98%
	Lipid	0,98%	0,98%	0,98%	0,98%	0,98%	0,98%
	Soybean lecithin	0,10%	0,10%	0,10%	0,10%	0,12%	0,15%
External aqueous phase		9,80%	9,80%	9,79%	9,79%	9,79%	9,78%
	Glycerol	9,80%	9,80%	9,79%	9,79%	9,79%	9,78%
	Poloxamer (Lutrol F68)	0,78%	0,78%	0,78%	0,78%	0,78%	0,78%
	Ultrapure H ₂ O	78,39%	78,44%	78,36%	78,32%	78,29%	78,25%
	NaCl (0.010 M)	0,00%	0,00%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%

Best formulation achieved

Table 2. Results of antimicrobial activity of nanoencapsulated lactoferrin.

	Lactoferrin Concentration ($\mu\text{g/mL}$) in nanoemulsions				
Yeast	500	250	200	125	62.5
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	+	+

— no growth; + growth

Os valores médios obtidos para o número de consultas realizadas no ano que antecedeu a realização do inquérito não permitem que se retire qualquer conclusão já que o desvio padrão da amostra é tão grande que estes acabam por não ter qualquer significado.

As consultas médicas para check up realizadas no ano que antecedeu a realização do inquérito foram, em termos globais, inexistentes para 49,30% de todos os inquiridos. No entanto, de todos os alunos que efectuaram pelo menos uma consulta com este fim, verifica-se que a maioria realizou apenas uma consulta, não havendo grandes diferenças entre os dois grupos estudados.

À semelhança do que acontece com o número médio de consultas médicas realizadas no ano que antecedeu a realização do inquérito chega-se à conclusão que o desvio padrão da amostra é tão grande que os valores obtidos acabam por não ter qualquer significado.

Para os exames de rotina realizados, constata-se que cerca de um terço dos inquiridos não realizou qualquer exame com esse propósito. Além disso, as diferenças encontradas entre os dois grupos estudados não são significativas.

Mais uma vez se constata que quando se pretende determinar o número médio, neste caso de exames de rotina, o desvio padrão da amostra é tão grande que os valores obtidos acabam por não ter qualquer significado.

Em termos de higiene oral, 93,8% dos indivíduos inquiridos lava os dentes pelo menos duas vezes por dia. Este valor acaba por ser idêntico nos dois grupos analisados não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos.

No 3º INS e para a mesma faixa etária, 1,00% dos indivíduos nunca lava os dentes, 8,60% lava os dentes à vezes, 24,36% lava os dentes uma vez ao dia, 40,90% lava os dentes duas vezes ao dia e 25,00% lava os dentes mais do que duas vezes ao dia. Assim, constata-se que os valores obtidos neste estudo são substancialmente superiores aos do 3º INS no que se refere ao número de vezes em que cada um lava os seus dentes, contudo, face ao nível académico em que toda a amostra deste estudo se encontra tal seria de esperar.

Segundo Peterson (2005, p. 278) à medida que aumenta o nível académico dos pais dos indivíduos, menor é o risco de cárie dentária. Este facto está muitas vezes ligado aos hábitos de higiene oral mas também ao nível sócio-económico atingido que permite com maior facilidade o acesso a consultas da área.

Quando se pergunta se no ano que antecedeu a realização do inquérito consultou algum estomatologista, dentista ou técnico de saúde dentária a resposta obtida foi afirmativa em 76,03% dos alunos e idêntica para ambos os grupos analisados, não havendo por isso diferenças significativas entre eles.

No 4º INS e para a mesma faixa etária, 48,1% dos indivíduos consultaram no período de 12 meses que antecedeu a entrevista um estomatologista, dentista ou técnico de saúde dentária. Uma vez mais o valor do 4º INS é inferior ao aqui obtido mas atendendo ao nível económico do grupo em estudo, uma vez que frequenta uma Universidade privada, tal seria de esperar.

No ano que antecedeu a realização deste inquérito, cerca de dois terços dos inquiridos foi entre 1 e 3 vezes a uma consulta de saúde oral, mais precisamente 64,29% sendo que os restantes inquiridos que recorreram a estas consultas fizeram-no por mais do que 3 vezes. À semelhança do que aconteceu para as restantes consultas estudadas, os valores obtidos para ambos os grupos são idênticos não se tirando daí diferenças estatisticamente significativas.

No 3º INS 37,57% dos inquiridos consultaram um estomatologista, dentista ou técnico de saúde dentária durante o ano que antecedeu a entrevista entre 1 e 3 vezes enquanto 11,18% dos inquiridos fizeram-no mais do que 3 vezes. Os restantes não consultaram nenhum destes técnicos.

No que se refere à automedicação, conclui-se que uma percentagem elevada de alunos tanto do 1º ano como do 5º o faz (respectivamente 42,68% e 55,93%). As diferenças entre os dois grupos tornam-se no entanto significativas no que se refere à frequência com que o fazem. DE facto os alunos do 5º ano recorrem com maior frequência à automedicação do que os alunos do 1º ano.

Segundo Casarin (2007, p. 17), os indivíduos com maior escolaridade, pelo facto de possuírem mais informação, sentem-se mais confiantes apresentando valores mais elevados de automedicação. Neste caso em particular, os alunos do 5º ano foram adquirindo ao longo do seu curso conhecimentos importantes sobre o medicamento que podem justificar estas diferenças.

Em relação à toma concomitante de fármacos prescritos com fármacos automedicados, as respostas obtidas cifraram-se nos 78,38% não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos inquiridos.

Em relação aos hábitos tabagistas conclui-se que os que fumam constituem 34,37% de toda a amostra sendo que desses 71,43% fuma diariamente e os restantes 34,27% fumam ocasionalmente. A diferença entre os dois grupos não é, no entanto, estatisticamente significativa.

No 4º INS, para a faixa etária correspondente, 24,2% da população fuma. Dos fumadores, e segundo o mesmo estudo, 84,4% fuma diariamente e 15,6% fuma ocasionalmente. 75,8% são não fumadores. Os valores obtidos neste estudo são ligeiramente superiores aos do 4º INS, no que se refere à percentagem de fumadores, todavia tal facto pode justificar-se pela comparação dos grupos aqui estudados estar a ser efectuada com um grupo de idades mais abrangente compreendidas entre 15 e 24 anos. Na realidade, segundo Oh *et al.* (2010) a idade média de início do hábito de fumar é de 18,2 anos razão que poderá justificar as diferenças obtidas. Ao compararmos os valores obtidos no 4º INS com aqueles aqui determinados também é possível concluir que os fumadores deste estudo fazem-no com uma menor frequência do que a população inquirida no 4º INS, para a faixa etária correspondente.

Em termos da idade de início do acto de fumar são os alunos do 1º ano que iniciam mais cedo este feito. De qualquer modo as devidas salvaguardas devem ser feitas nomeadamente no que respeita à diferença de idades dos dois grupos. Apesar de tudo, os valores encontrados para um grupo e outro não são estatisticamente significativos.

No que se refere à quantidade de cigarros fumados em média por dia pelos alunos inquiridos não se encontraram diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Salienta-se

contudo o facto de, em média, cada aluno do 1º ano fumar 12,38 cigarros por dia contra 9,24 cigarros dos alunos do 5º ano. Se as diferenças entre os dois grupos não são significativas, dado os elevados desvios padrão obtidos, servem contudo para comparar com os dados do 3º INS que refere que em média, e para o grupo etário correspondente, cada português fumava em média 12,1 cigarros por dia, valor que vai de encontro aos valores obtidos neste estudo.

Quando se questionam os inquiridos relativamente aos hábitos tabágicos no ano anterior à realização do inquérito verifica-se uma diferença significativa entre os dois grupos. Na realidade, 51,85% dos alunos fumadores do 1º ano admitem ter fumado menos no ano anterior contra 11,54% dos alunos do 5º ano. Já para a maioria dos alunos do 5º ano os hábitos tabagistas mantiveram-se de um ano para o outro.

No 3º INS, para o grupo etário correspondente foi efectuada a mesma pergunta mas para um espaço temporal de dois anos tendo-se obtido os seguintes valores: 20,95% fumava menos, 55,20% fumava o mesmo, 10,21% fumava mais e 10,88% não fumava. Se compararmos estes resultados aos aqui obtidos podemos observar algumas diferenças, nomeadamente ao nível do 1º ano onde no ano que antecedeu o estudo se verifica que os alunos fumavam substancialmente menos em relação à actualidade, valor bastante superior ao do 3º INS.

No que se refere à ingestão diária de refeições não se verificam grandes diferenças entre os dois grupos estudados. De facto em ambos os casos o número de refeições ingeridas pela maioria dos indivíduos questionados é maior ou igual a 4, como se pode observar através da Tabela 32. Em relação à média destas o mesmo acontece pelo que não há diferenças estatísticas significativas (Tabela 33).

No 3º INS e para a faixa etária correspondente, 1,10% da população afirma fazer 2 refeições diárias, 15,96% da população afirma fazer 3 refeições diárias, 48,35% da população afirma fazer 4 refeições diárias, 26,76% da população afirma fazer 5 refeições diárias e 7,43% da população afirma fazer 6 refeições diárias. Comparativamente com este estudo, o 3º INS obteve um maior número de refeições diárias por habitante.

Quando se questionou acerca dos alimentos ingeridos nas 24 horas que antecederam a realização do inquérito verificou-se que o peixe foi o alimento menos ingerido (28,87%) e o

grupo das batatas, do arroz e da massa foi o mais ingerido (88,03%). Para a sopa, carne, fruta e outros alimentos as percentagens foram de 58,04%, 85,21%, 71,13% e 72,93% respectivamente. Em qualquer um destes 6 alimentos não se verificou contudo diferenças significativas entre os dois grupos analisados. Foi no pão e nos legumes e hortaliça que se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Assim, os alunos do 1º ano consumiram menos pão (64,20%) e menos legumes e hortaliças (56,10%) do que os alunos do 5º ano em que 80,00% ingeriu pão e 75,00% ingeriu legumes e hortaliças.

No 3º INS e para a faixa etária correspondente, apuraram-se os seguintes resultados em relação aos alimentos consumidos nas 24 horas antecedentes: 51,76% das pessoas comeram sopa, 48,15% das pessoas comeram peixe, 86,63% das pessoas comeram carne, 93,82% das pessoas comeram batatas/arroz/massa, 77,42% das pessoas comeram legumes e hortaliça, 86,66% das pessoas comeram fruta, 93,26% das pessoas comeram pão e 75,70% das pessoas comeram outros alimentos. Os valores obtidos neste estudo foram ligeiramente inferiores aos do 3º INS nomeadamente no que se refere ao peixe, aos legumes e hortaliça, à fruta e ao pão o que indica que a alimentação dos dois grupos estudados é menos variada do que a da população nacional.

Das bebidas analisadas, a mais ingerida foi a cerveja (64,54%) e a menos ingerida foram as do grupo referente ao bagaço, aguardente e brandy (26,95%). O grupo referente ao vinho do porto, martini e licores obteve 40,43% das escolhas dos inquiridos e o grupo do whisky e do gin obteve a escolha de 38,30% dos inquiridos. Para qualquer um dos 4 grupos referidos não foi possível encontrar diferenças significativas nas escolhas das bebidas ingeridas. A bebida em que de facto se denotam diferenças entre os dois grupos inquiridos foi o vinho já que fez parte da opção de 54,88% dos alunos do 1º ano mas de 71,67% dos alunos do 5º ano.

No 4º INS, e para a faixa etária correspondente, os valores obtidos foram os seguintes: 22,9% ingeriu vinho nos 12 meses anteriores à entrevista, 32,6% ingeriu cerveja, 3,4% ingeriu Bagaço/aguardente/brandy, 17,4% ingeriu vinho do porto/martini/licores e 17,0% ingeriu Whisky/gin. Como o grupo em estudo do 4º INS abrange as idades compreendidas entre os 15 e os 24 anos facilmente se explicam as diferenças nos valores obtidos uma vez que os indivíduos de idade mais jovem não têm um tão fácil acesso a este tipo de bebidas.

Nos 12 meses que antecederam a realização deste inquérito, cerca de dois terços dos inquiridos ingeriu alguma das bebidas atrás referidas mensalmente ou mesmo raramente, não sendo significativa a diferença entre os dois grupos estudados.

No 3º INS, e para a faixa etária correspondente, 33,70% dos inquiridos bebeu destas bebidas várias vezes por semana, 17,24% bebeu destas bebidas cerca de uma vez por semana, 6,63% dos inquiridos bebeu destas bebidas cerca de uma vez por mês e 41,93% dos inquiridos raramente bebeu destas bebidas. Neste estudo em particular, verificou-se uma menor frequência na ingestão destas bebidas alcoólicas em ambos os grupos estudados.

Do total dos inquiridos, aproximadamente metade bebeu leite diariamente. Salienta-se contudo que ainda existe uma percentagem relativamente elevada (11,35%) que não ingeriu leite em nenhum dos dias da semana.

No 3º INS, e para a faixa etária correspondente, 17,07% dos inquiridos não bebeu leite em nenhum dia da semana, 5,83% bebeu leite entre 1 e 3 dias, 2,93% bebeu leite 4 a 6 dias e 74,19% bebeu leite todos os dias. Neste estudo em particular, verificou-se uma menor percentagem tanto daqueles que ingeriram pouco ou nenhum leite como daqueles que tomaram leite todos os dias da semana.

Metade dos alunos afirma ter ingerido em média um copo de leite por dia e para apenas 12% esse valor foi igual ou superior a 3 copos.

No 3º INS, e para a faixa etária correspondente, 39,68% dos inquiridos tomou em média um copo de leite por dia, 36,14% dos inquiridos tomaram em média dois copos de leite por dia e 24,17% dos inquiridos tomaram em média três ou mais copos de leite por dia. Assim sendo, os grupos estudados ingeriram em média menos copos de leite por dia do que a média nacional.

Metade dos alunos afirma praticar regularmente actividade física o que é um valor bastante superior ao do 3º INS onde, para a faixa etária correspondente, 70,68% dos indivíduos afirmou não praticar nenhuma actividade física regular o suficiente para começar a sentir cansaço.

Das pessoas que afirmam praticar actividade física de forma regular, cerca de metade fá-lo pelo menos 3 vezes por semana. No 3º INS e para a faixa etária correspondente, 25,96% dos inquiridos fá-lo uma vez por semana, 36,53% fá-lo 2 vezes por semana e 37,14 % fá-lo três ou mais vezes por semana. Neste estudo, a prática regular de exercício físico é mais frequente o que denota uma maior preocupação com a manutenção de um corpo saudável.

IV. Conclusão

A saúde é uma área que a nós todos diz respeito e cada um de nós é responsável pela mesma. A saúde não se restringe a um tipo de doença sendo que, factores como a idade, o género, o peso, a altura, os cuidados de saúde, a automedicação, os hábitos alimentares, a prática de exercício físico para além de verificações regulares do estado de saúde do indivíduo não só contribuem para o bem-estar e qualidade de vida do indivíduo como podem influenciar toda uma predisposição para uma determinada doença.

Por outro lado, coloca-se a questão se, os ensinamentos de um curso na área das ciências da saúde alteram comportamentos nessa mesma área.

Foi possível detectar diferenças entre os alunos do 1º e do 5º ano nomeadamente no que se refere ao peso já que os alunos do 5º ano têm mais problemas de excesso de peso. Outra das diferenças está na frequência da automedicação onde se conclui que são os alunos do 5º ano que mais frequentemente recorrem à automedicação. Outro dos parâmetros estudados onde se encontraram diferenças entre os dois grupos foi no que se refere ao consumo do tabaco. Se por um lado os alunos do 1º ano aumentaram o consumo de tabaco durante o ano que antecedeu este estudo, para os alunos do 5º ano esse consumo manteve-se inalterado. Finalmente, no consumo de alimentos e bebidas verificou-se que os alunos do 5º ano consomem mais legumes e hortaliças, mais pão e ingerem mais vinho do que os alunos do 1º ano.

No que se refere à questão colocada neste estudo, “Ensinamos saúde?”, não foi possível concluir se a frequência num curso na área das ciências da saúde altera comportamentos. De facto, apesar de se terem encontrado algumas diferenças entre os dois grupos analisados, não foi possível eliminar algumas variáveis que poderão ter influenciado o resultado, nomeadamente a idade e a alteração de hábitos inerente à entrada para a faculdade. Assim sendo, seria necessário fazer um controlo com dois grupos não relacionados com a área da saúde para se poder concluir que foi efectivamente a frequência num curso da área das ciências da saúde que influenciou a mudança de comportamentos.

BIBLIOGRAFIA

Albuquerque, C.; Matos, A. (2006). Estilo de Vida, Percepção de Saúde e Estado de Saúde em Estudantes Universitários Portugueses: Influência da Área de Formação. *International Journal of Clinical and Health Psychology*, 6(3), pp. 647-663.

Amorim, M. (1999). *Qualidade de vida e coping na doença crónica: Um estudo em diabéticos não insulino-dependentes*. Porto, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

ANF Home Page [Em Linha]. Pratique uma automedicação responsável. Disponível em http://www.anf.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=1158&Itemid=56. [Consultado em 27/03/2009].

Cabrera, M.; Filho, W. (2001). Obesidade em idosos: prevalência, distribuição e associação com hábitos e co-morbidades. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 45(5), pp. 494-501.

Carmo, I. *et al.* (2009). *Obesidade em Portugal e no Mundo*. Lisboa, Faculdade de Medicina de Lisboa.

Casarin, L. (2007). O uso de medicamentos na saúde colectiva. Campinas, Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic.

CBS News Home Page. [Em Linha]. Global recession sees increase in fast-food consumption. Disponível em <http://bx.businessweek.com/the-great-recession/view?url=http%3A%2F%2Ffeedproxy.google.com%2F~r%2Fco%2FHcaY%2F~3%2FRLfxvt-W99M%2FDefault.aspx>. [Consultado em 28/03/2010].

Center for Science in the Public Interest Home Page [Em Linha]. Food Marketing in Other Countries. Disponível em <http://www.cspinet.org/nutritionpolicy/>. [Consultado em 28/03/2010].

Chandra, R. (1993). Symposium on nutrition and immunity in serious illness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 52, pp. 77-84.

Colussi, C. (2004). Perfil epidemiológico da cárie e do uso e necessidade de prótese na população idosa de Biguaçu, Santa Catarina. *Rev. bras. Epidemiol.*,7(1), pp. 88-97.

Decreto-Lei n.º 176/2006. Diário da República, 1.ª série, n.º 167 de 30 de Agosto de 2006.

Despacho n.º 17690/2007. Diário da República, n.º 154, de 10 de Agosto de 2007, 2.ª série.

Despacho Ministerial n.º 153/2005. Diário da República, n.º 3 de 5 de Janeiro, 2.ª série.

Despacho Ministerial n.º 4324/2008. Diário da República, n.º 35 de 19 de Fevereiro, 2.ª série.

Direcção Geral de Saúde [Em Linha]. A Actividade física e o desporto: um meio para melhorar a saúde e o bem-estar. Disponível em http://www.srsdocs.com/parcerias/normas/circulares/dgs/2007/actividade_fisica.pdf. [Consultado em 29/03/2010].

Direcção Geral de Saúde (2010). Plano Nacional de Saúde (2004-2010). [Em linha]. Disponível em http://static.publico.clix.pt/docs/pesoemedia/DGS_Plano_Nacional_de_Saude_2004_Prioridades.pdf. [Consultado em 20/03/2010].

European Commission Home Page. [Em Linha]. O álcool na Europa. Disponível em http://ec.europa.eu/health-eu/doc/alcoholineu_sum_pt_en.pdf. [Consultado em 29/03/2010].

Eurostat Home Page. [Em Linha]. Food: from farm to fork statistics. Disponível em <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/>. [Consultado em 28/03/2010].

Eyben, F. *et al.* (2003). Riesgos para la salud derivados del consumo voluntario e involuntario de tabaco. *Rev. Esp. Salud Publica*, 77(1), pp. 11-36.

FCNAUP Home Page. [Em Linha]. A nova Roda dos Alimentos. Disponível em www.fcna.up.pt . [Consultado em 28/03/2010].

Fenten, P. (1994). ABC of Sports Medicine: Benefits of exercise in health and disease . *BMJ*, 308, pp. 1291-1295.

Filho, A. *et al.* (2002). Prevalência e fatores associados à automedicação: resultados do projeto Bambuí. *Rev. Saúde Pública*, 36(1), pp, 55-62.

Fraga, S. *et al.* (2005). Tabagismo em Portugal. *Arquivos de Medicina*, 19(5-6), pp. 207-229.

Frias-Bulhosa, J.; Beça, H. (2006). Evidência ou Conveniência. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, 22, pp. 333-335.

Gomes, C. (2004). Relação entre IMC, Actividade Física, Tipo de Transporte e os Comportamentos Sedentários em Jovens Adolescentes. Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física.

Instituto Nacional de Estatística Home Page. [Em Linha]. Hábitos Alimentares dos Portugueses Alteraram-se. Disponível em http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=72105&DESTAQUESmodo=2. [Consultado em 28/03/2010].

Instituto Nacional de Estatística em conjunto com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2007). 4º Inquérito Nacional de Saúde – 2005/2006. [Em linha]. Disponível em http://ra09.ine.pt/ngt_server/attachfileu.jsp?look_parentBoui=6487190&att_display=n&att_download=y. [Consultado em 01/05/2008].

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge Home Page [Em linha]. 4º INS. Disponível em <http://www.insa.pt/>. [Consultado em 01/05/2008].

Leighton, F.; Urquiaga, I. (2007). Changes in Cardiovascular Risk Factors Associated with Wine Consumption in Intervention Studies in Humans. *Elsevier*, 17, pp. S32-S36.

Machado, F. *et al.* (2003). Classes sociais e estudantes universitários: Origens, oportunidades e orientações. *Revista Crítica de Ciências Sociais*, 66, pp. 45-80.

Maria, V. (2000). Automedicação, Custos e Saúde. *Revista Portuguesa Clínica Geral*, 16, pp. 11-14.

Matos, M. *et al.* (2001). Os Jovens Portugueses e o Tabaco. *FMH/PEPT/GPT*, 6(1), pp. 1-8.

Matsudo, S. *et al.* (2000). Efeitos benéficos da actividade física na aptidão física e saúde mental durante o processo de envelhecimento. *Rev. Actividade Física & Saúde*, 5(2), pp. 60-76.

Ministério da Saúde. [Em Linha]. Estudo da Prevalência da Diabetes em Portugal. Disponível em <http://www.min-saude.pt/NR/rdonlyres/219DAD78-CD13-43CE-9221-42744B24176C/0/EstudoprevalenciaDiabetesemPortugal.pdf>. [Consultado em 22/04/2010].

Ministry of food Home Page. [Em Linha]. Disponível em <http://www.jamieoliver.com/jamies-ministry-of-food/>. Consultado em 28/03/2010.

National Center for Chronic Disease Prevention and for Health Promotion Home Page. [Em Linha]. Physical Activity and Health. Disponível em <http://www.cdc.gov/nccdphp/sgr/pdf/sgraag.pdf>. [Consultado em 29/03/2010].

Oh, D. *et al.* (2010). Determinants of smoking initiation among women in five European countries: a crosssectional survey. *BMC Public Health*, 10(74), pp. 1-11.

OMS. (1998). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva, OMS.

OMS. (1988). Self-Medication in Europe. Copenhaga, OMS.

OMS (1998). *The Role of the Pharmacist in Self-Care and Self-Medication*. Geneva, OMS.

OMS Home Page. [Em Linha]. Chronic Diseases and Health Promotion. Disponível em <http://www.who.int/chp/en/>. [Consultado em 23/03/2010].

OMS Home Page. [Em Linha]. Global Status Report on Alcohol 2004. Disponível em http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_status_report_2004_overview.pdf. [Consultado em 29/03/2010].

OMS Home Page. [Em Linha]. Rational use of medicines. Disponível em http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/en/. [Consultado em 26/03/2010].

OMS Home Page. [Em Linha]. The Tobacco Atlas. Disponível em http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/en/. [Consultado em 27/03/2010].

OMS Home Page. [Em Linha]. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008. Disponível em http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_tobacco_crisis_2008.pdf [Consultado em 27/03/2010].

Onsa Home Page. [Em Linha]. INS – Inquérito Nacional de Saúde, Dados Gerais 1998/99. Disponível em www.onsa.pt. [Consultado em 30/06/2008]

Peterson, P. (2005). Sociobehavioural risk factors in dental caries – international perspectives. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 33, pp. 274–279.

Portal da Saúde Home Page. [Em Linha]. Problemas ligados ao álcool. Disponível em <http://www.portaldasaude.pt/portal/conteudos/enciclopedia+da+saude/estilos+de+vida/alcoolismo.htm>. [Consultado em 29/03/2010].

Rihs, L. *et al.* (2008). Dor de dente e sua relação com a experiência de cárie em adolescentes. *RGO*, 56(4), pp. 361-365.

Rodrigues, H. *et al.* (2008). O que (não) se sabe sobre higiene oral... *Saúde Infantil*, 30(3), pp 102-105.

Shaw, J. *et al.*, (2009). *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes research and Clinical Practice. [Em Linha]. Disponível em <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0168-8227/PIIS016882270900432X.pdf>. [Consultado em 24/03/2010].

Sichieri, R. *et al.* (2000). Recomendações de alimentação e nutrição saudável para a população brasileira. *Arq. Bras Endocrinol Metab.*, 44(3), pp. 227-232.

Sinde, S. [Em Linha]. Alimentação saudável para quê? Disponível em http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/action/2/cnt_id/1227/?textpage=2. [Consultado em 28/03/2010].

The World Bank Home Page. [Em Linha]. Tobacco Control, 2003. Disponível em <http://web.worldbank.org/WBSITE/EXTERNAL/TOPICS/EXTHEALTHNUTRITIONANDPOPULATION/EXTPHAAG/0,,contentMDK:20799536~menuPK:64229773~pagePK:64229817~piPK:64229743~theSitePK:672263,00.html>. [Consultado em 27/03/2010].

Universidade Fernando Pessoa Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://www.ufp.pt/>. [Consultado em 01/05/2008].

U.S. Department of Health and Human Services & U.S. Department of Agriculture Home Page. [Em Linha]. Dietary Guidelines for Americans 2005. Disponível em <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/pdf/DGA2005.pdf>. [Consultado em 28/03/2010].

Vítor, R. *et al.* (2008). Padrão de consumo de medicamentos sem prescrição médica na cidade de Porto Alegre, RS. *Ciência & Saúde Colectiva*, 13(Sup), pp. 737-743.

ANEXOS

Anexo I - Questionário

1 - CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA	1 - CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA
1. A SUA IDADE É	<input type="text"/> <input type="text"/> anos
2. É DO SEXO FEMININO 1 MASCULINO 2	<input type="checkbox"/>
2 - INFORMAÇÕES GERAIS DE SAÚDE	2 - INFORMAÇÕES GERAIS DE SAÚDE
3. DE UMA MANEIRA GERAL, COMO CONSIDERA O SEU ESTADO DE SAÚDE? MUITO BOM 1 BOM 2 RAZOÁVEL 3 MAU 4 MUITO MAU 5	<input type="checkbox"/>
4. QUAL A SUA ALTURA?	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> cm
5. QUANTO PESA SEM ROUPAS E SEM SAPATOS?	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Kg
3 - INCAPACIDADE TEMPORÁRIA	3 - INCAPACIDADE TEMPORÁRIA
6. NESTE ÚLTIMO MÊS QUANTOS DIAS DEIXOU DE FAZER ALGUMA COISA QUE HABITUALMENTE FAZ, SEJA EM CASA, NO TRABALHO OU NO TEMPO LIVRE, DEVIDO A DOENÇA, ACIDENTE OU A MOTIVOS RELACIONADOS COM A SAÚDE (TAIS COMO CONSULTAS, ANÁLISES, RADIOGRAFIAS, TRATAMENTOS, INTERNAMENTOS, ETC.)?	<input type="text"/> <input type="text"/> dias
7. DESTES DIAS QUANTOS TEVE DE FICAR DE CAMA, TODO O DIA OU A MAIOR PARTE DO DIA (INCLUINDO INTERNAMENTOS)?	<input type="text"/> <input type="text"/> dias
4 - DOENÇAS CRÔNICAS	4 - DOENÇAS CRÔNICAS
8. TEM DIABETES? SIM 1 NÃO 2 NÃO SABE 3	<input type="checkbox"/>

4 - DOENÇAS CRÓNICAS	4 - DOENÇAS CRÓNICAS
9. FEZ ALGUM RASTREIO DA DIABETES NESTE ÚLTIMO ANO? SIM 1 NÃO 2	<input type="checkbox"/>
10. TEM OU TEVE NOS ÚLTIMOS 12 MESES ASMA OU BRONQUITE ASMÁTICA? SIM 1 NÃO 2	<input type="checkbox"/>
11. TEM OU TEVE NOS ÚLTIMOS 12 MESES ALGUMA ALERGIA? SIM 1 NÃO 2	<input type="checkbox"/>
12. SOFRE DE TENSÃO ALTA? SIM 1 NÃO 2	<input type="checkbox"/>
13. COSTUMA MEDIR A SUA TENSÃO ARTERIAL? SIM 1 NÃO 2	<input type="checkbox"/>
14. SE RESPONDEU SIM NA RESPOSTA ANTERIOR, COM QUE REGULARIDADE COSTUMA MEDIR A SUA TENSÃO ARTERIAL? DIARIAMENTE 1 SEMANALMENTE 2 MENSALMENTE 3 UMA VEZ DE 3 EM 3 MESES 4 UMA VEZ DE MEIO EM MEIO ANO 5 ANUALMENTE 6	<input type="checkbox"/>
5 - CUIDADOS MÉDICOS	5 - CUIDADOS MÉDICOS
15. NO ÚLTIMO ANO QUANTAS VEZES CONSULTOU O MÉDICO?	<input type="text"/> <input type="text"/> vezes
16. NO ÚLTIMO ANO QUANTAS VEZES CONSULTOU O MÉDICO PARA UM CHECK-UP GERAL SEM SER POR MOTIVO DE DOENÇA?	<input type="text"/> <input type="text"/> vezes

17. NOS ÚLTIMOS DOIS ANOS QUANTAS VEZES FEZ EXAMES DE ROTINA SEM SER POR MOTIVO DE DOENÇA?	<input type="text"/> <input type="text"/> vezes
6 - SAÚDE ORAL	6 - SAÚDE ORAL
18. ESCOVA OS DENTES? NUNCA 1 ÀS VEZES 2 UMA VEZ AO DIA 3 DUAS VEZES AO DIA 4 MAIS DO QUE DUAS VEZES AO DIA 5	<input type="text"/>
19. NOS ÚLTIMOS 12 MESES CONSULTOU ALGUM ESTOMATOLOGISTA, DENTISTA OU TÉCNICO DE SAÚDE DENTÁRIA? SIM 1 NÃO 2	<input type="text"/>
20. QUANTAS VEZES? 1 A 3 1 MAIS DE 3 2	<input type="text"/>
7 - CONSUMO DE TABACO	7 - CONSUMO DE TABACO
21. FUMA? DIARIAMENTE 1 OCASIONALMENTE 2 NÃO FUMA 3	<input type="text"/>
22. QUANTOS CIGARROS FUMA EM MÉDIA POR DIA?	<input type="text"/> <input type="text"/> cigarros
23. DESDE QUE IDADE FUMA?	<input type="text"/> <input type="text"/> anos
24. HÁ UM ANO ATRÁS FUMAVA MENOS, O MESMO OU MAIS? FUMAVA MENOS 1 FUMAVA O MESMO 2 FUMAVA MAIS 3 NÃO FUMAVA 4	<input type="text"/>

8 - CONSUMO DE ALIMENTOS E BEBIDAS	8 - CONSUMO DE ALIMENTOS E BEBIDAS
25. QUANTAS REFEIÇÕES É QUE FAZ HABITUALMENTE POR DIA?	<input type="text"/> refeições
<p>26. ONTEM O QUE COMEU AO LONGO DO DIA?</p> <p style="text-align: right;">SIM..... 1 NÃO..... 2</p> <p>SOPA <input type="checkbox"/></p> <p>PEIXE <input type="checkbox"/></p> <p>CARNE <input type="checkbox"/></p> <p>BATATAS/ARROZ/MASSA <input type="checkbox"/></p> <p>LEGUMES E HORTALIÇA <input type="checkbox"/></p> <p>FRUTA <input type="checkbox"/></p> <p>PÃO <input type="checkbox"/></p> <p>OUTROS ALIMENTOS <input type="checkbox"/></p>	
<p>27. DURANTE OS ÚLTIMOS 12 MESES TOMOU ALGUMA DESTAS BEBIDAS?</p> <p style="text-align: right;">SIM..... 1 NÃO..... 2</p> <p>VINHO <input type="checkbox"/></p> <p>CERVEJA <input type="checkbox"/></p> <p>BAGAÇO/AGUARDENTE/BRANDY <input type="checkbox"/></p> <p>VINHO DO PORTO/MARTINI/LICORES <input type="checkbox"/></p> <p>WHISKY/GIN <input type="checkbox"/></p>	
<p>28. QUANTAS VEZES TOMOU DESSA(S) BEBIDA(S)?</p> <p>VÁRIAS VEZES POR SEMANA 1</p> <p>CERCA DE UMA VEZ POR SEMANA 2</p> <p>CERCA DE UMA VEZ POR MÊS 3</p> <p>RARAMENTE 4</p>	<input type="text"/>
29. NA ÚLTIMA SEMANA (7 DIAS) QUANTOS <u>DIAS</u> BEBEU LEITE	<input type="text"/> dias
30. QUANTOS COPOS BEBEU EM MÉDIA POR DIA?	<input type="text"/> copos

9 - ACTIVIDADE FÍSICA	9 - ACTIVIDADE FÍSICA
<p>31. DEDICA-SE A ALGUMA ACTIVIDADE FÍSICA REGULAR (CORRER, ANDAR DE BICICLETA OU OUTRAS) O SUFICIENTE PARA COMEÇAR A SENTIR CANSAÇO?</p> <p>SIM 1</p> <p>NÃO 2</p>	<p><input type="checkbox"/></p>
<p>32. QUANTOS DIAS POR SEMANA?</p>	<p><input type="checkbox"/> dias</p>