

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

**INCORPORAÇÃO DE *FLAVOBACTERIUM COLUMNARE* INATIVADO
EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO E QUITOSANA
PARA A IMUNIZAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)
POR VIA ORAL**

Priscila Soares Costa Sacchetin
Autora

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

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

Campinas – São Paulo
23 de Junho de 2009

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

Sa14i Sacchetin, Priscila Soares Costa
Incorporação de Flavobacterium columnare inativado
em micropartículas de alginato e quitosana para a
imunização de tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus)
por via oral / Priscila Soares Costa Sacchetin. --
Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Alginatos. 2. Quitosana. 3. Peixe. 4. Imunização.
I. Moraes, Ângela Maria. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Título em Inglês: Inactivated Flavobacterium columnare incorporation in alginate
and chitosan microparticles to Nile tilapia (Oreochromis niloticus)
oral immunization

Palavras-chave em Inglês: Alginates, Chitosan, Fish, Immunization

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos


Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Meuris Gurgel Carlos da Silva, Pedro Luiz Onófrío Volpe

Data da defesa: 23/06/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Priscila Soares Costa Sacchetin e aprovada
no dia 23 de junho de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



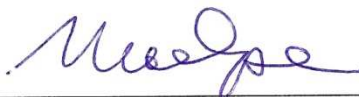
Prof.ª Dr.ª Ângela Maria Moraes

Orientadora – Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP



Prof.ª Dr.ª Meuris Gurgel Carlos da Silva

Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP



Prof. Dr. Pedro Luiz Onófrio Volpe

Instituto de Química/UNICAMP

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Priscila Soares Costa Sacchetin em 23 de junho de 2009.

A handwritten signature in blue ink, reading "Ângela Maria Moraes", written over a horizontal line.

Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Moraes

Orientadora

Aos meus amados pais.

*“Não há assunto tão velho
que não possa ser dito algo de novo sobre ele.”*

Fiódor Mikhailovich Dostoiévski

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes que sempre esteve disposta e presente para ajudar em tudo que foi preciso.

Ao Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo e a Carlos Augusto Gomes Leal que mesmo distantes foram responsáveis por ajudas essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da Unicamp, pela atenção e cuidado dispensado na realização deste trabalho.

Aos meus amados pais por todo incentivo e apoio em todos os sentidos, durante todos estes anos.

Às minhas irmãs Ana Paula e Christiane por toda compreensão.

Ao meu querido marido Marcelo Carvalho Sacchetin por todo amor e por sempre estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos.

Às amigas Ana Paula Rodrigues, Érika Ohta Watanabe, Oselys Rodrigues Justo e Lidiana Cristina de Góes pelos bons momentos de trabalho e descontração.

À Deus por ter me abençoado com o privilégio de trabalhar com pessoas tão importantes para minha carreira e para minha vida.

E, por fim, ao CNPq e a FAPEMIG pelo suporte financeiro, que possibilitaram a plena realização deste trabalho.

RESUMO

A imunização oral destaca-se por sua praticidade, custo moderado e ao baixo estresse que provoca nos animais. Esta técnica possui como principal entrave a dificuldade de proteger o agente de imunização dos processos digestivos e da decomposição por enzimas às quais este é submetido durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo propiciar ao agente antigênico um sistema de proteção frente à ação de degradação no trato gastrointestinal. Para isso, propôs-se a incorporação de um antígeno-modelo (células inativadas de *Flavobacterium columnare*) em partículas de alginato e de quitosana recobertas com alginato preparadas por métodos passíveis de escalonamento baseados na formação de emulsões. Aspectos como a temperatura, o uso de diferentes impelidores, a alteração na concentração dos biopolímeros no diâmetro e na forma das micropartículas produzidas foram avaliadas. O comportamento *in vitro* destes sistemas microestruturados, sua estabilidade e o perfil de liberação do agente antigênico foram também analisados. Micropartículas com diâmetros médios inferiores a 50 µm foram obtidas. As micropartículas de alginato foram capazes de encapsular praticamente 100% das células inativadas, enquanto que as de quitosana incorporaram até 84% do agente antigênico. As partículas produzidas resistiram às condições gastrointestinais simuladas de tilápia do Nilo, liberando um máximo de 4% do antígeno em pH estomacal e de 9% em pH intestinal. As partículas produzidas poderiam, desta forma, ser eficientemente empregadas, hipoteticamente, no controle de columnariose em tilápias do Nilo.

Palavras-chave: alginato, quitosana, micropartículas, emulsão, *Flavobacterium columnare*, vacinação oral de peixes.

ABSTRACT

Oral immunization is a practical and low cost fish vaccination method with the advantage of causing low stress to the animals. The main concern regarding oral vaccination is related to protecting the immunizing agent from exposure to the digestive processes and enzymatic decomposition when crossing the gastrointestinal tract. In this context, the goal of this work was to provide a protection system to the antigenic agent when facing degradation action in gastrointestinal conditions. Thus, the incorporation of a model antigen (inactivated *Flavobacterium columnare* cells) in alginate microparticles and also in chitosan microparticles coated with alginate was evaluated, using methods suited to up-scaling based on emulsion formation. Aspects such as temperature, the use of distinct impellers and the variation on the biopolymers concentration in the diameter and shape of the produced microparticles were analyzed. The microstructured system behavior *in vitro*, its stability and the antigenic agent release profile were also evaluated. Microparticles with less than 50 μm in average diameter were produced. The alginate microparticles were capable of encapsulating almost 100% of the inactivated cells, while the chitosan microparticles incorporated up to 84% of the antigenic agent. The produced particles were resistant to Nile tilapia simulated gastrointestinal conditions, releasing at most 4% of the cells in stomach pH and less than 9% in intestinal pH. The produced particles, in this way, could be successfully employed, hypothetically, to control Nile tilapia columnariosis.

Keywords: alginate, chitosan, microparticles, emulsion, *Flavobacterium columnare*, oral fish vaccination

SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	<i>xi</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xiii</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>xix</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>xxi</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Justificativa e Relevância</i>	1
1.2. <i>Objetivo</i>	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. <i>Relevância da Aqüicultura no Brasil</i>	5
2.2. <i>Doenças Infecciosas na Aqüicultura</i>	7
2.3. <i>Columnariose</i>	8
2.4. <i>Técnicas de Imunização de peixes</i>	11
2.5. <i>Sistemas de Liberação Controlada</i>	16
2.5.1. <i>Alginato</i>	18
2.5.2. <i>Quitosana</i>	23
2.5.3. <i>Métodos de Encapsulação de Agentes Bioativos em Partículas de Alginato e Quitosana</i>	29
2.5.3.1. <i>Spray Drying</i>	30
2.5.3.2. <i>Método de gotejamento seguido de reticulação</i>	31
2.5.3.3. <i>Coacervação</i>	32
2.5.3.4. <i>Gelificação de partículas obtidas por emulsão</i>	33
2.5.3.5. <i>Formação de partículas recobertas</i>	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. <i>Materiais</i>	41
3.2. <i>Métodos</i>	42
3.2.1. <i>Obtenção do agente antigênico <i>Flavobacterium columnare</i></i>	42
3.2.2. <i>Preparação das Partículas de Alginato</i>	42

3.2.2.1.	<i>Avaliação do efeito da variação de temperatura sobre a viscosidade da emulsão de alginato e sobre o diâmetro e morfologia das micropartículas</i>	44
3.2.2.2.	<i>Avaliação do efeito de diferentes impelidores no diâmetro e morfologia das partículas de alginato</i>	45
3.2.2.3.	<i>Preparação de Partículas de Alginato Recobertas com Quitosana</i>	46
3.2.2.3.1.	<i>Produção e recobrimento em estágio único (MR1)</i>	46
3.2.2.3.2.	<i>Produção e recobrimento em dois estágios (MR2)</i>	47
3.2.3.	<i>Preparação de Partículas de Quitosana</i>	48
3.2.3.1.	<i>Preparação das Partículas de Quitosana Recobertas com Alginato</i>	50
3.2.4.	<i>Caracterização das Partículas</i>	50
3.2.4.1.	<i>Morfologia</i>	50
3.2.4.2.	<i>Diâmetro e distribuição de tamanho das partículas</i>	51
3.2.4.3.	<i>Eficiência de incorporação de <i>Flavobacterium columnare</i></i>	51
3.2.4.4.	<i>Estabilidade in vitro das partículas de alginato e das partículas de quitosana recobertas ou não com alginato</i>	52
4.	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	53
4.1.	<i>Preparação e Caracterização de Partículas de Alginato</i>	53
4.1.1.	<i>Influência da variação de temperatura sobre a morfologia e diâmetro das partículas de alginato</i> ... 54	
4.1.2.	<i>Influência do uso de diferentes impelidores sobre a morfologia, o diâmetro e a distribuição de diâmetros das partículas de alginato</i>	61
4.1.3.	<i>Partículas de alginato recobertas com quitosana</i>	68
4.1.3.1.	<i>Avaliação do recobrimento, da morfologia, diâmetro e distribuição de tamanhos das partículas utilizando-se a metodologia MR1</i>	68
4.1.3.2.	<i>Avaliação do recobrimento, da morfologia, do diâmetro e da distribuição de tamanhos das partículas utilizando-se a metodologia MR2</i>	71
4.1.4.	<i>Ensaio de incorporação de <i>Flavobacterium columnare</i> nas partículas de alginato</i>	74
4.1.5.	<i>Ensaio de estabilidade in vitro das partículas de alginato em meios que simulam as condições gastrointestinais da tilápia do Nilo</i>	79
4.2.	<i>Preparação e Caracterização de Partículas de Quitosana</i>	81

4.2.1. Efeito da concentração de quitosana e da taxa de agitação sobre a formação, morfologia e distribuição de diâmetros das partículas.....	81
4.2.2. Efeito da proporção das fases aquosa e oleosa sobre a formação, morfologia e distribuição de diâmetros das partículas.....	84
4.2.3. Efeito da variação da concentração de tensoativo nas características das partículas de quitosana.	89
4.2.4. Ensaio de incorporação da <i>Flavobacterium columnare</i> em partículas de quitosana.....	96
4.2.5. Avaliação da formação, morfologia e distribuição de diâmetro das partículas de quitosana recobertas com alginato	101
4.2.6. Ensaio de estabilidade <i>in vitro</i> das partículas de quitosana em meios que simulam as condições gastrointestinais da tilápia do Nilo	104
5. CONCLUSÕES	107
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais espécies de peixes produzidas pela aquicultura continental, segundo dados do IBAMA (2007).....	6
Tabela 2: Vacinas orais para peixes desenvolvidas por diferentes autores.....	14
Tabela 3: Comparação dos custos empregando os três diferentes métodos existentes de vacinação de peixes (adaptação de VARVARIGOS, 2003).	15
Tabela 4: Métodos de preparação de micropartículas de quitosana usado por diversos autores.....	28
Tabela 5: Diferentes categorias de agentes medicamentosos encapsulados em partículas de quitosana (adaptado de SINHA <i>et al.</i> , 2004).....	29
Tabela 6: Temperaturas de formação das partículas de alginato.....	44
Tabela 7: Impelidores usados para a formação da emulsão	45
Tabela 8: Variáveis envolvidas na preparação das micropartículas de quitosana.....	49
Tabela 9: Diâmetros médios das partículas obtidas nos ensaios realizados com variação de temperatura.....	59
Tabela 10: Aspectos inerentes à produção de micropartículas com diferentes impelidores.	67
Tabela 11: Características das micropartículas preparadas na presença de diferentes concentrações de suspensão celular.	75
Tabela 12: Perfil de liberação da bacterina nas micropartículas contendo 14,3 mg de bactéria/mL de gel de alginato em soluções aquosas de diferentes valores de pH e a variação do diâmetro médio após exposição a estas condições gastrointestinais simuladas.	80
Tabela 13: Característica das partículas obtidas para os ensaios em que se variou a concentração da solução de quitosana e a taxa de agitação.	83
Tabela 14: Efeito da proporção das fases aquosa e oleosa nas partículas de quitosana formadas a partir de solução aquosa de quitosana a 2,0%.	88
Tabela 15: Efeito da adição e concentração de Span 80 à fase oleosa sobre a formação, morfologia e distribuição de tamanhos das partículas de quitosana obtidas.....	89
Tabela 16: Características das micropartículas de quitosana preparadas na presença de diferentes concentrações de suspensão celular.	100

Tabela 17: Perfil de liberação da bacterina nas micropartículas contendo 8,6 mg de bactéria/mL de gel de quitosana em soluções aquosas de diferentes valores de pH simulando as condições gastrointestinais de tilápias do Nilo.	104
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Colônia rizóide típica de <i>Flavobacterium columnare</i> em placa de ágar e (B) morfologia celular observada por microscopia eletrônica de transmissão (SUOMALAINEN, 2005).	9
Figura 2: Sinais clínicos da columnariose: (A) pigmentação amarela, com sinais de erosão nas brânquias; (B) lesão do dorso; (C) aparecimento de muco amarelado (DURBOROW <i>et al.</i> , 1998).	10
Figura 3: Sistema digestivo típico de peixes. A parte marcada com tracejado em azul representa a região de pH ácido e a com tracejado vermelho, a região de pH alcalino (adaptado de ROTTA, 2003).	17
Figura 4: Estrutura química do alginato: (A) cadeia de resíduos de ácido manurônico; (B) cadeia de resíduos de ácido gulurônico; (C) cadeia de resíduos alternados de ácidos manurônicos e gulurônicos (adaptado de KAWAGUTI e SATO, 2008).	19
Figura 5: Formação da rede de gel de alginato de cálcio: (A) ligação entre as cadeias poliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos de carga negativa; (B) formação da rede de gel das cadeias unidas pelos íons cálcio (adaptado de KAWAGUTI e SATO, 2008).	20
Figura 6: Estrutura química da quitosana: (A) unidade estrutural n-acetilglicosamina; (B) unidade estrutural glicosamina; (C) quitosana formada pelas unidades estruturais.	24
Figura 7 Métodos de preparação de micropartículas de quitosana (adaptado de SINHA <i>et al.</i> , 2004).	27
Figura 8: Desenho esquemático do processo de encapsulação por <i>Spray Drying</i> (adaptado de CresTechnologies, 2008).	31
Figura 9: Desenho esquemático do processo de encapsulação pelo método de gotejamento seguido de reticulação.	32
Figura 10: Desenho esquemático do processo de encapsulação pelo método de coacervação.	33
Figura 11: Encapsulação através do método de gelificação inotrópica via emulsão (adaptado de RODRIGUES <i>et al.</i> , 2006).	38
Figura 12: Sistema empregado na preparação das partículas.	43
Figura 13: Diferentes tipos de impelidores testados: A) naval; B) pás inclinadas; C) âncora perfurada e D) centrífugo.	45

Figura 14: Produção e recobrimento em um único estágio das partículas de alginato com quitosana.	47
Figura 15: Produção e recobrimento em dois estágios das partículas de alginato com quitosana. ...	48
Figura 16: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato obtidas pela reprodução da metodologia de RODRIGUES <i>et al.</i> (2006).	53
Figura 17: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de alginato.	54
Figura 18: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas a 20 °C (Ensaio A1).	55
Figura 19: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas a 20 °C (Ensaio A1).	55
Figura 20: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas a 25 °C (Ensaio A2).	56
Figura 21: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas a 25 °C (Ensaio A2).	56
Figura 22: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas a 30 °C (Ensaio A3).	57
Figura 23: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas a 30 °C (Ensaio A3).	57
Figura 24: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas a 35°C (Ensaio A4).	58
Figura 25: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas a 35°C (Ensaio A4).	58
Figura 26: Variação da viscosidade com o aumento de temperatura (●: emulsão de solução aquosa de alginato a 3,5% em óleo de milho contendo 0,2% de Span 80 (9:63, v/v); ●: óleo de milho).	60
Figura 27: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas com o impelidor naval (Ensaio B1).	62
Figura 28: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas com o impelidor naval (Ensaio B1).	62

Figura 29: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas com o impelidor de pás inclinadas (Ensaio B2).....	63
Figura 30: Perfil de distribuição de tamanhos das partículas produzidas com o impelidor de pás inclinadas (Ensaio B2)	63
Figura 31: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas com o impelidor âncora perfurada (Ensaio B3).....	64
Figura 32: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas com o impelidor âncora perfurada (Ensaio B3).....	64
Figura 33: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas com o impelidor centrífugo (Ensaio B4).	65
Figura 34: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas com o impelidor centrífugo (Ensaio B4).	65
Figura 35: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas e recobertas com quitosana em uma única etapa.	69
Figura 36: Aspecto morfológico típico em microscópio eletrônico de varredura (aumento de 1.000x) das partículas de alginato recobertas com quitosana em uma única etapa.	69
Figura 37: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas recobertas com quitosana em uma única etapa.....	70
Figura 38: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas e recobertas com quitosana em duas etapas.	71
Figura 39: Aspecto morfológico típico em microscópio eletrônico de varredura (aumento de 1.000x) das partículas de alginato produzidas e recobertas com quitosana em duas etapas.	72
Figura 40: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas e recobertas com quitosana em duas etapas.	72
Figura 41: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (A: aumento de 100x; B: aumento do 200x) das partículas de alginato preparadas na presença de 0,57 g.L ⁻¹ de bactérias.	76
Figura 42: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de alginato preparadas na presença de 0,57 g.L ⁻¹ de bactérias.....	76

Figura 43: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (A: aumento de 100x; B: aumento de 200X) das partículas de alginato preparadas na presença de 6,48 g.L ⁻¹ de bactérias.....	77
Figura 44: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de alginato preparadas na presença de 6,48 g.L ⁻¹ de bactérias.....	77
Figura 45: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (A: aumento de 100x; B: aumento de 200x) das partículas de alginato preparadas na presença de 14,62 g.L ⁻¹ de bactérias.....	78
Figura 46: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de alginato preparadas na presença de 14,62 g.L ⁻¹ de bactérias.....	78
Figura 47: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas nos diferentes ensaios.	82
Figura 48: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E3).....	84
Figura 49: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:9 e taxa de agitação de 2.000 rpm. (Ensaio E11).	85
Figura 50: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:9 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E11).....	85
Figura 51: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:15 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E12).	86
Figura 52: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:15 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E12).	86
Figura 53: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E13).	87

Figura 54: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E13).	87
Figura 55: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 1% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E14).....	90
Figura 56: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 1% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E14).	90
Figura 57: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 2% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E15).....	91
Figura 58: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 2% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E15).	91
Figura 59: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 3% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E16).....	92
Figura 60: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 3% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E16).	92
Figura 61: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 4% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E17).....	93
Figura 62: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 4% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E17).	93
Figura 63: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 3,0% com adição de 1% de Span 80 à fase oleosa, proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm.	95
Figura 64: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 3,0% com adição de 1% de Span 80 à fase oleosa, proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm.	95

Figura 65: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de alginato preparadas na presença de 1,17 g.L ⁻¹ de bactérias.....	97
Figura 66: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana preparadas na presença de 1,17 g.L ⁻¹ de bactérias.....	97
Figura 67: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de alginato preparadas na presença de 4,53 g.L ⁻¹ de bactérias.....	98
Figura 68: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana preparadas na presença de 4,53 g.L ⁻¹ de bactérias.....	98
Figura 69: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de alginato preparadas na presença de 10,23 g.L ⁻¹ de bactérias.....	99
Figura 70: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana preparadas na presença de 10,23 g.L ⁻¹ de bactérias.....	99
Figura 71: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de quitosana recobertas com alginato.	102
Figura 72: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana recobertas com alginato.....	102
Figura 73: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de quitosana recobertas com alginato contendo 8,60 g.L ⁻¹ de bactérias.	103
Figura 74: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana recobertas com alginato contendo 8,60 g.L ⁻¹ de bactérias.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa e Relevância

Nos últimos anos, tem-se observado uma grande preocupação dos governos quanto a uma possível crise no abastecimento de alimentos. Segundo estimativa da WORLD FOOD PROGRAMME (2008), agência de auxílio alimentar vinculada à Organização das Nações Unidas (ONU), a falta de alimentos ameaça como um “tsunami silencioso”, e poderá atingir mais de 100 milhões de pessoas nos próximos anos.

Com base nisso, em todo o mundo, observa-se a criação de diversos programas de incentivo à pesquisa e de técnicas para melhorar e aumentar a produção e disponibilização de alimentos. Dentre os setores que têm sofrido diversas mudanças destaca-se a piscicultura, um ramo específico da aquicultura que tem por objetivo a produção de peixes em cativeiro. Esta atividade tem se mostrado muito promissora, especialmente no Brasil que conta com uma ampla malha hidrográfica e que dispõe de clima favorável à prática desta atividade.

Atualmente observa-se um crescimento médio da aquicultura de cerca de 9,2% ao ano, sendo que na vanguarda desta atividade destaca-se a China, que detém 71% de todo volume de pescado produzido e 50% do faturamento mundial, segundo dados da FAO (2006). Previsões indicam que nos próximos anos a aquicultura será responsável pela produção de 40% de todo pescado consumido no mundo, em decorrência do aumento populacional.

Como resultado da crise no abastecimento de alimentos e das mudanças no perfil de consumo com relação à busca por menores preços e maior padronização dos produtos, a criação de peixes em cativeiro tem se mostrado como uma alternativa capaz de suprir as necessidades do mercado. Atualmente, o consumo de pescado no Brasil é ainda bastante tímido, situando-se em torno de 8 quilos de pescado *per capita*, de acordo com dados da FAO (2006). No entanto, levando-se em consideração as mudanças que estão ocorrendo no mundo, pode-se prever que este consumo tende a aumentar com o passar do tempo, fazendo com que a atividade seja muito atrativa do ponto de vista socioeconômico.

Apesar da criação de peixes em cativeiro ser uma atividade com grande potencial socioeconômico, deve-se salientar que este crescimento vem acompanhado por preocupações como a redução das perdas dos estoques pesqueiros por doenças acometidas por patógenos. Desta forma, busca-se propiciar a produção de sistemas de criação mais racionais e produtivos, que possibilitem a exploração em escala industrial.

Segundo GUDDING *et al.* (1999), doenças infecciosas que ocorrem de forma esporádica em diversas populações de peixes tendem a causar alta mortalidade destas populações em sistemas de produção intensiva. Isso ocorre porque nestes sistemas existe uma grande densidade de peixes, expostos a um meio de fácil veiculação (no caso, a água) destes patógenos. Desta forma, para que a indústria da aquicultura cresça de forma próspera, é necessário que as perdas de peixes por doenças e o uso de antibióticos sejam reduzidos a níveis mínimos.

Assim, têm-se desenvolvido, atualmente, pesquisas focadas na criação de veículos de imunização de peixes, estimulando a imunidade específica e não específica destes, de modo a garantir aos sistemas de bioprodução aquáticos resistência frente às doenças acometidas por patógenos. Existem, até o presente momento, três diferentes modos de se alcançar este tipo de imunização através do uso de vacinas veterinárias, que são administradas por imersão, via injeção intraperitoneal ou por via oral. Cada um destes métodos possui vantagens e desvantagens quanto ao tipo de imunização fornecida, efeitos colaterais, praticidade e custo associado à técnica (GUDDING *et al.*, 1999).

Tanto a vacinação por injeção intraperitoneal quanto a vacinação por imersão são, atualmente, técnicas bem consolidadas nos meios intensivos de produção de peixes. O maior entrave ao desenvolvimento das vacinas orais é a dificuldade de se desenvolver sistemas efetivos de proteção do antígeno da ação de enzimas e ácidos estomacais quando da passagem pelo trato gastrointestinal. Além disso, observa-se a necessidade de se desenvolver mecanismos que, além de serem capazes de proteger o antígeno também favoreçam a liberação destes agentes nos sítios de atuação de forma controlada, aumentando-se assim, a eficiência deste tipo de imunoprofilaxia.

Ao longo das duas últimas décadas, observou-se o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada por via intravenosa de fármacos, peptídeos terapêuticos e proteínas.

Mais recentemente, nota-se a intensificação de pesquisas focadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de drogas e vacinas orais, envolvendo o uso de carreadores, principalmente na forma de partículas poliméricas (RIEUX *et al.*, 2006). Diferentes materiais poliméricos podem ser utilizados para a formação das partículas, observando-se o emprego de polímeros sintéticos e naturais, como a albumina, gelatina, alginato, colágeno e quitosana.

Desta forma, no presente trabalho busca-se obter meios de liberação controlada de um antígeno, no caso células inativadas de *Flavobacterium columnare*, que possam ser usadas na vacinação de peixes contra a columnariose, uma infecção bacteriana comum no cultivo em alta densidade de tilápias, a principal espécie de peixe obtida na aquicultura continental brasileira. Para isso, se utilizará da adaptação do protocolo de formação de partículas via emulsão proposto por RODRIGUES *et al.* (2006) para a formação de carreadores orais constituídos à base dos biopolímeros alginato e quitosana, de modo a produzir partículas com diâmetros entre 5 e 50 μm e que sejam estáveis nas condições gastrointestinais de tilápias do Nilo, nas quais o pH pode variar de 2 a 9.

1.2. Objetivo

O objetivo deste projeto foi contribuir para o desenvolvimento de vacinas orais para peixes. Assim, foi proposta a formulação de partículas de gel de alginato e quitosana para a imunização de peixes do tipo Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por via oral contra *Flavobacterium columnare*, tendo-se os seguintes objetivos específicos:

- Obtenção de partículas de alginato e quitosana recobertas ou não, com diâmetro médio e distribuição de tamanhos adequados, capazes de encapsular e proteger a bactéria *Flavobacterium columnare* das condições adversas do trato gastrointestinal dos peixes.
- Determinação da influência de variáveis de processo e operação, como o uso de diferentes impelidores, variação de temperatura, concentração de agente antigênico, concentração dos biopolímeros alginato e quitosana, variação na proporção da fase aquosa/oleosa e uso de surfatante nas características das partículas formadas.

- Estudo de incorporação de *Flavobacterium columnare* nas partículas de alginato e quitosana e de quitosana recobertas com alginato.
- Estudo de estabilidade *in vitro* das partículas em condições gastrointestinais simuladas da tilápia do Nilo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Relevância da Aquicultura no Brasil

Uma das maiores contribuições da aquicultura para o país é a garantia da presença de peixe na mesa do consumidor brasileiro, possibilitando, sobretudo, o acesso a uma rica fonte protéica. O que contribui para o franco desenvolvimento desta atividade é o fato de muitos estoques pesqueiros naturais estarem em vias de se esgotarem, devido ao intenso extrativismo ocorrido ao longo dos anos. Desta forma, a maneira encontrada para dar continuidade ao fornecimento de peixes está no estabelecimento e desenvolvimento da aquicultura no país.

Assim como ocorre em outras regiões do mundo, o Brasil também vem acompanhando o acelerado crescimento desta atividade, porém, esbarra em entraves como a carência de pesquisas nessa área bem como o fato de usar o seu potencial de forma ainda pouco racional e sustentável, o que dificulta a realização da atividade de forma intensiva por longos períodos.

Segundo dados do IBAMA (2007), a produção de pescado no Brasil no ano de 2005, considerando-se a pesca extrativa e a aquicultura, girou em torno de 1.009.073 de toneladas, sendo que deste montante, aproximadamente 232.430 toneladas foram obtidas da pesca extrativa industrial, 518.864 toneladas oriundas da pesca extrativa artesanal e 257.780 toneladas da aquicultura. Em 2005, a prática da aquicultura em águas continentais somou 71,7% do total de peixes produzidos pela aquicultura, sendo o restante, em águas marinhas, com crescimento médio estimado de 20% ao ano. De todo o montante produzido, 69,6% são compostos por peixes de água doce, no caso tilápias, carpas e bagres, e os demais 30,4% divididos entre crustáceos e moluscos (IBAMA, 2007).

A região Nordeste do Brasil é a que mais contribui para a produção nacional de pescado pela aquicultura, cerca de 94.322 toneladas (sendo que deste montante 62,6% corresponde à aquicultura marinha e 37,4% à aquicultura continental), acompanhada pela região Sul, que detém 76.896 toneladas da produção (sendo 23% correspondente à aquicultura marinha e 77% à aquicultura continental). Mais timidamente, as regiões Centro-

Oeste e Sudeste seguem com produção de 33.511 toneladas e 33.073 toneladas respectivamente, seguida da região Norte, responsável por 19.978 toneladas da produção nacional (sendo que praticamente 99% da produção é continental) (IBAMA, 2007). As principais espécies de peixes produzidas pela aquicultura continental no Brasil estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Principais espécies de peixes produzidas pela aquicultura continental, segundo dados do IBAMA (2007).

Espécie	Produção (t/ano)	Principal estado produtor
Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	67.850,5	Ceará
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	42.490,2	Rio Grande do Sul
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	25.011,0	Paraná
Tambacu (<i>Oligosarcus jenynsii</i>)	10.874,5	Mato Grosso do Sul
Pacu (<i>Metynnis spp.</i>)	9.044,0	Mato Grosso
Piau (<i>Leporinus spp.</i>)	4.066,5	Mato Grosso do Sul
Curimatã (<i>Prochilodus costatus</i>)	2.413,0	Sergipe
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	2.351,5	São Paulo
Bagre Americano (<i>Ictalurus punctatus</i>)	1.684,5	Santa Catarina

O destaque da aquicultura fica por conta da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), na qual se concentra 37,8% de toda a produção nacional. A região Nordeste detém 37,8% desta produção, seguidas das regiões Sul com 31,8%, Sudeste com 20,7%, Centro-Oeste com 9,3% e Norte com 0,4%. Os estados que mais se destacam na produção de Tilápia do Nilo são Ceará, Paraná, São Paulo, Santa Catarina, Goiás e Bahia (IBAMA, 2007).

As tilápias do Nilo são nativas do continente Africano e da Ásia Menor, sendo que esta espécie é predominante de águas quentes, com temperaturas que variam entre 20 a 30 °C, ainda que tenha sido constatado que possam suportar temperaturas ainda menores,

como 12 °C, aproximadamente (IGARASHI, 2008; VOLPATO *et al.*, 2003). Estes peixes se reproduzem facilmente em águas paradas, o que favorece o seu alojamento para reprodução. Outros fatores que levam esta espécie a ser amplamente difundida na aquicultura são o seu rápido crescimento, rusticidade, alta adaptabilidade (que facilita a colonização em diversos ambientes) e seu sabor (de grande aceitação).

O início da reprodução das tilápias se dá três ou quatro meses após o nascimento dos alevinos, no entanto, o controle reprodutivo desta espécie apresenta grandes desafios para o desenvolvimento da atividade. A maturação precoce ou até mesmo a reprodução descontrolada levam a um superpovoamento dos viveiros, fazendo com que ocorram disputas por alimento e espaço, ocasionando assim, baixo crescimento e conversão alimentar, o que geralmente propicia grande heterogeneidade de tamanho e prejudica esta atividade intensiva (MAINARDES-PINTO *et al.*, 2000). Desta forma, segundo DIAS-KOBERSTEIN *et al.* (2007), para se evitar este tipo de problema, faz-se a inversão sexual das fêmeas, de modo a obterem-se indivíduos machos para a engorda, evitando-se problemas provenientes de gastos energéticos seja pela cópula, desova, excesso populacional ou até mesmo o crescimento desordenado dos machos com relação às fêmeas. Assim, realiza-se frequentemente a adição de hormônios masculinizantes à ração, o que faz com que as fêmeas adquiram fenótipos de machos.

O grande desafio da aquicultura está relacionado à prevenção e controle das doenças causadas por patógenos, especialmente ligadas ao fato desta prática estar relacionada a grandes densidades populacionais, bem como a facilidade do meio (no caso, a água) de disseminar agentes patogênicos, podendo ocasionar grandes mortandades de peixes em confinamento, o que leva os produtores, a longo prazo, a desistir dessa atividade.

2.2. Doenças Infeciosas na Aquicultura

No Brasil, embora não existam números oficiais, sabe-se que entre as principais causas de prejuízos econômicos na aquicultura comercial encontram-se as doenças acometidas por patógenos. Com a intensificação e ampliação desta atividade, a ocorrência

destas doenças tende a aumentar, fazendo com que a saúde dos peixes torne-se prioridade para o prosseguimento eficiente desta importante atividade comercial.

Dentre as enfermidades identificadas em peixes, as de etiologia bacteriana estão entre as mais impactantes, devido às altas taxas de mortalidade e ao custo elevado para sua prevenção e controle. Nesta categoria, a espécie *Flavobacterium columnare* vem sendo intensivamente estudada desde que foi identificada, uma vez que é considerada um patógeno de ocorrência mundial, capaz de causar doenças em praticamente todos os tipos de peixes de água doce (AUSTIN e AUSTIN, 1987).

Desta forma, as características inerentes a este microorganismo, bem como a doença causada por este patógeno são mais detalhadamente descritas a seguir.

2.3. Columnariose

O agente causador da columnariose foi primeiramente descrito por Davis em 1922, ano em que se verificou uma grande mortandade de peixes na Estação Biológica localizada no Rio Mississippi, em Fairport, no estado de Iowa, nos Estados Unidos (DAVIS, 1922). A dificuldade de cultivar este patógeno não impediu que Davis viesse a descrever esta espécie. Ao colocar parte do material advindo das lesões provocadas pela bactéria em gotas de água, Davis observou que ocorria uma formação natural de massas bacterianas e que as células destes patógenos possuíam o formato de bastonetes. Desta forma, esta bactéria foi chamada primeiramente de *Bacillus columnaris*.

Porém, este patógeno só veio a ser isolado em 1944 por Ordal e Rucker, quando os mesmos concluíram que o patógeno obtido possuía a mesma forma, tamanho e flexibilidade característica dos observados por Davis. A *Flavobacterium columnare* é um bacilo gram-negativo, que apresenta variações no tamanho e forma, sendo que normalmente mede de 0,3 a 0,6 µm de diâmetro, podendo variar 3,5 µm a 10,5 µm em comprimento (THOMAS-JINU e GOODWIN, 2004). As colônias de *Flavobacterium columnare* podem apresentar três diferentes morfologias, sendo elas do tipo rizóide, mucóide ou ainda na forma de favo de mel (DECOSTERE *et al.*, 1997; SONG *et al.*, 1988; TRIYANTO e WAKABAYASHI,

1999). Na Figura 1, pode-se observar a morfologia típica deste patógeno e uma colônia do tipo rizóide.

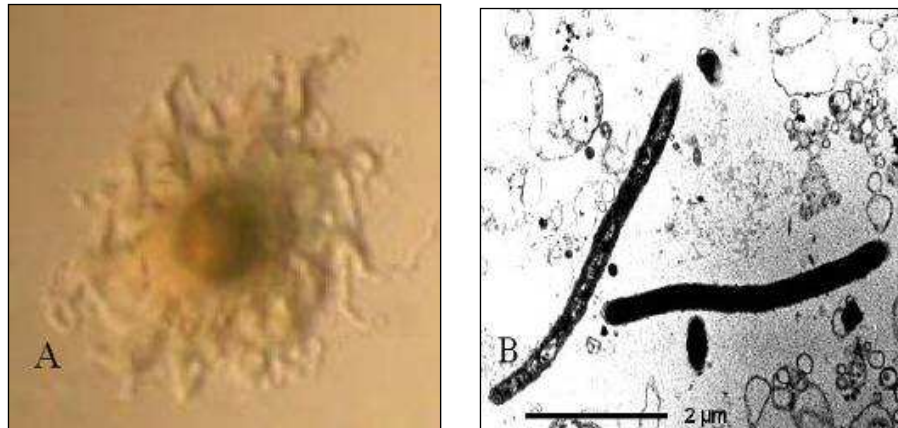


Figura 1: (A) Colônia rizóide típica de *Flavobacterium columnare* em placa de ágar e (B) morfologia celular observada por microscopia eletrônica de transmissão (SUOMALAINEN, 2005).

O crescimento deste microorganismo ocorre em temperaturas ótimas em torno dos 25 a 35 °C. De acordo com BERNADET (1989) e BERNADET e GRIMONT (1989), este microorganismo tem seu crescimento afetado pela quantidade de sal presente na solução, observando-se crescimento a 0,5% de NaCl e ausência à 1% de NaCl.

Segundo SCHRECKENBERGER (1998), quando o crescimento é realizado em meio sólido, observa-se o desenvolvimento de coloração amarelo clara, que após alguns dias torna-se mais intensa. A coloração amarelada da colônia é resultante da produção de um tipo de pigmento, conhecido como flexirrubina. Já em meio líquido, segundo SUOMALAINEN (2005), o crescimento é evidenciado pela formação de pequenas películas no frasco de cultivo que, ao serem submetidas a temperaturas inferiores a 18 °C tendem a decantar.

Observa-se também o aparecimento de formas celulares atípicas, que se apresentam comumente na forma de esferoplastos. Estas formas celulares podem

representar algum tipo de estratégia de sobrevivência das espécies ou ainda podem constituir-se uma forma típica de degradação celular (GARNJOBST, 1945).

Segundo TRIPATHI *et al.* (2005), a doença provocada pela *Flavobacterium columnare* normalmente afeta as superfícies externas do peixe, sendo que os sintomas mais comuns da columnariose são o aparecimento de lesões na região da cabeça, dorso, brânquias e nadadeiras. Estas lesões são caracterizadas por apresentarem uma cor acinzentada brilhante, sendo habitualmente rodeadas por zonas avermelhadas. A ação patogênica da *Flavobacterium columnare* ocorre através da liberação de enzimas proteolíticas que acarretam o aparecimento de processos necróticos no peixe. Na Figura 2 estão apresentados alguns dos sinais clínicos desta doença.



Figura 2: Sinais clínicos da columnariose: (A) pigmentação amarela, com sinais de erosão nas brânquias; (B) lesão do dorso; (C) aparecimento de muco amarelado (DURBOROW *et al.*, 1998).

Geralmente, a progressão da doença se dá de forma muito rápida, observando-se a morte do peixe poucas horas após a detecção dos primeiros sintomas. Isso se dá uma vez que estes danos na pele do peixe causam severas perdas na regulação osmótica e na homeostase eletrolítica (TRIPATHI *et al.*, 2005). Além disso, esta situação é agravada pela liberação de toxinas bacterianas e pelas liberadas pelo próprio hospedeiro, somadas à intensa ação proteolítica da própria bactéria.

Devido à gravidade com que a *Flavobacterium columnare* ataca os peixes, vem-se buscando formas eficientes de se tratar ou prevenir a doença. Atualmente, o tratamento

mais eficiente é o uso de antibióticos, especialmente os pertencentes à família das tetraciclina (SUOMALAINEN, 2005). No entanto, o uso de antibióticos é muito problemático, devido a duas razões. A primeira delas consiste no fato de que o uso repetitivo destes antibióticos no tratamento da doença pode levar ao desenvolvimento de linhagens resistentes ao mesmo. De acordo com SCHMIDT *et al.* (2000) isto já foi observado na Dinamarca, onde ocorreu o aparecimento de linhagens resistentes ao tratamento com as tetraciclina. A segunda razão deve-se à possibilidade destes antibióticos se difundirem no ambiente através da água, espalhando-se em outras áreas de aquicultura e às demais regiões, elevando o risco de desenvolvimento de bactérias naturalmente resistentes no ambiente.

Outro tipo de tratamento que tem se mostrado eficiente, é o uso de desinfetantes químicos, especialmente na fase inicial da doença, uma vez que nesta fase, a infecção se restringe às superfícies epidérmicas. Dentre os desinfetantes que têm demonstrado bons resultados em condições experimentais, destacam-se a cloroamina-T, o permanganato de potássio, o cloreto de benzalcônio e o peróxido de hidrogênio. No entanto, todas estas substâncias podem causar danos tanto nos peixes quanto para os que as manipulam.

Diante disto, observa-se que a alternativa mais econômica e ecologicamente correta se faz através da imunoprofilaxia, que consiste do estímulo da imunidade específica e não específica do peixe, evitando o desenvolvimento da infecção dos mesmos pelo patógeno em questão.

2.4. Técnicas de Imunização de peixes

Segundo RUMA (2006), todos os organismos vertebrados possuem sistemas de controle de patógenos, e dentre estes, os peixes são os organismos mais primitivos que possuem este sistema imune adaptativo. O seu mecanismo de imunização constitui-se da imunidade não-específica (ou inata) e a imunidade adaptativa (ou adquirida). O primeiro sistema caracteriza-se por não necessitar de uma exposição prévia do peixe ao patógeno em questão, observando-se a ação de barreiras físicas como a pele e as mucosas, e de células especializadas, como os macrófagos, que impedem que o peixe venha a desenvolver a

doença. Já no sistema imune adaptativo de peixes, observa-se o aparecimento de imunoglobulinas, receptores de células T, citocinas e moléculas de histocompatibilidade, responsáveis por produzir diversos eventos em cascata capazes de regular e aumentar a resposta celular frente à presença do antígeno.

A ação e a eficiência de ambos os sistemas de resposta imune dependem de diversos fatores, tais como: o tipo de agente infeccioso, rota de infecção, histórico de contato prévio com o antígeno, além de outros fatores como o estresse do peixe e sua condição nutricional. Desta forma, é possível o desenvolvimento de mecanismos capazes de aumentar a resposta imune adaptativa e inata dos peixes pelo contato com patógenos atenuados e/ou inativados, sendo estes administrados na forma de vacinas.

As vacinas veterinárias são parte essencial no que se diz respeito ao controle de sanidade de sistemas intensivos de produção de peixes. O emprego destas vacinas pode reduzir e prevenir doenças e, conseqüentemente, diminuir a dependência do uso de antibióticos (THORARINSSON e POWELL, 2006). A eficácia desta técnica de imunização tem importante papel, já que influencia significativamente no custo final de produção, uma vez que o aumento das taxas de infecção e de mortalidade pela doença pode comprometer o crescimento dos peixes, bem como a taxa de conversão alimentar dos mesmos (SAWYER e STROUT, 1975).

Os peixes podem ser imunizados de três maneiras distintas, sendo elas: a injeção (aplicada intraperitonealmente), a imunização por imersão (em que a solução da vacina é diluída nos tanques de estocagem dos peixes e entra em contato com os animais pelas mucosas), e por último, a vacinação administrada oralmente (incorporada à ração animal). Cada um destes métodos possui vantagens e desvantagens no que diz respeito ao nível de proteção, efeitos colaterais, praticidade e custo-benefício. Somente as técnicas de injeção e imersão estão atualmente bem consolidadas. No entanto, atualmente no Brasil, não existem vacinas comerciais licenciadas que integrem as práticas e rotinas de produção, de modo a serem utilizadas em escala industrial para produção de peixes em confinamento (THUNE *et al.*, 1997; GUDDING *et al.*, 1999; NAKANISHI *et al.*, 2002).

De acordo com NAKANISHI *et al.* (2002), a vacinação intraperitoneal é atualmente o método comercial de imunização mais empregado, devido à sua alta eficácia e por ser um método amplamente seguro. Dentre as suas principais desvantagens, destacam-se o alto nível de estresse que provoca nos peixes, os altos custos de manejo, o tempo requerido e os cuidados necessários a fim de garantir a segurança do operador, bem como a dos peixes. Outra grande desvantagem deste método é o fato de não poder ser empregado em peixes jovens, uma vez que estes são muito pequenos e frágeis a este tipo de imunização, porém muito suscetíveis ao ataque de doenças infecciosas.

Na vacinação por imersão, o primeiro contato com o patógeno inativado ou atenuado se faz através das superfícies da mucosa do peixe, desta forma, o sistema imune da mucosa faz com que este antígeno seja identificado e assim seja possível produzir um anticorpo específico capaz de impedir que o peixe venha a adquirir a doença. A vacinação por imersão é um método efetivo de vacinação em massa, especialmente para peixes pequenos, no entanto, é necessária uma grande quantidade de vacina para induzir a resposta imune, o que encarece o processo. Além disso, a proteção imune é geralmente menor que a induzida através da vacinação intraperitoneal (NAKANISHI e OTOTAKE, 1997). Também se enfrentam problemas quanto ao descarte do resíduo vacinal, sendo necessário o estabelecimento de técnicas de degradação por produtos químicos ou filtração com carvão ativado (BEARDMORE *et al.*, 2001; BOMBARDELLI e HAYASHI, 2005).

A aplicação oral de vacinas na aquicultura tem-se mostrado bastante interessante do ponto de vista econômico, praticidade e por apresentar caráter não-invasivo. Este tipo de administração de vacinas é atraente especialmente por apresentar custo moderado frente aos demais métodos, uma vez que não necessita de intensa mão-de-obra especializada, além de poder ser facilmente implantado em sistemas intensivos de produção, já que o agente vacinal é misturado à ração dos peixes, prevenindo qualquer nível de estresse dos mesmos, o que poderia vir a comprometer o processo de imunização.

De acordo com THORARINSSON e POWELL (2006), na vacinação oral, as pesquisas desenvolvidas têm focado a proteção do antígeno contra os processos digestivos e sua possível decomposição durante a passagem da vacina pelo estômago até a parte anterior dos intestinos. Desta forma, espera-se que o antígeno seja capaz de chegar até a parte

posterior do intestino, onde ocorre o processo de estimulação imunocompetente dos tecidos desta região.

Com base na diferença de custos dos métodos utilizados na administração de vacinas em peixes, tem-se observado atualmente o desenvolvimento de diversas pesquisas que visam ampliar o uso e a produção de vacinas orais. Buscam-se meios de torná-las disponíveis na forma e dosagem adequada de modo a propiciar a imunização apropriada e, que possam ser utilizadas como mecanismo de imunização oral contra uma grande variedade de patógenos causadores de doenças infecciosas em peixes importantes para o desenvolvimento da aquicultura a custos competitivos.

Na Tabela 2 podem-se observar algumas das diversas pesquisas que estão sendo realizadas recentemente, visando à produção de vacinas veterinárias para administração oral.

Tabela 2: Vacinas orais para peixes desenvolvidas por diferentes autores.

Espécie imunizada	Patógeno	Referência
Bagre africano (<i>Clarias gariepinus</i>)	<i>Vibrio anguillarum</i>	VERVARCKE <i>et al.</i> (2004)
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Viral hemorrhagic septicemia virus</i>	ROMALDE <i>et al.</i> (2004) ADELMANN <i>et al.</i> (2008)
Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	<i>Streptococcus iniae</i>	SHOEMAKER <i>et al.</i> (2006)
Carpa colorida (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Koi herpesvirus</i>	YASUMOTO <i>et al.</i> (2006)

A comparação entre os custos do emprego das técnicas utilizadas para imunização de peixes é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3: Comparação dos custos empregando os três diferentes métodos existentes de vacinação de peixes (adaptação de VARVARIGOS, 2003).

Componente do Custo	Intraperitoneal	Imersão	Oral
Itens de consumo	Vacina	Vacina	
	Anestésico	Anestésico	
	Oxigênio	Oxigênio	Vacina
	Combustível ou energia para bombas de água e ar	Combustível ou energia para bombas de ar	
	Itens auxiliares	Itens auxiliares	
Força laboral	5 a 6 trabalhadores/tanque	3 a 4 trabalhadores/tanque	1 a 2 trabalhadores/tanque
Taxa média de processamento	3000 peixes/h	200 kg de peixes/h	Ilimitada
Equipamentos (depreciação)	Bomba de ar e água		
	Medidor de temperatura e de oxigênio	Bomba de ar	
	Pistola de injeção		Misturador de ração
	Contador automático	Medidor de temperatura e de oxigênio	
Perdas por estresse no manejo, lesões e erros operacionais	Acima de 0,2% até 1% do total (consistindo de peixes grandes e de valor comercial considerável)	Insignificantes (0,05%), com perdas de peixes pequenos, de baixo valor comercial	Sem perdas

Como se pode observar na Tabela 3, a vacinação oral é muito atrativa, uma vez que demonstra ser uma técnica muito prática e rápida, sendo mais facilmente empregada, demandando menor força laboral e estrutural. Esta abordagem pode ser usada para vacinação de peixes de todas as idades e espécies, não causando perdas significativas em decorrência de estresse no manejo, erros operacionais e lesões nos peixes.

Desta forma, para que a vacinação oral seja de fato efetiva, tem-se adotado a estratégia de incorporar os agentes imunizadores em mecanismos de liberação controlada, podendo para isso, se utilizar de micropartículas à base de polímeros naturais e/ou sintéticos.

2.5. Sistemas de Liberação Controlada

Sistemas microestruturados que têm tamanho similar às estruturas biológicas, capazes de carrear e liberar drogas, protegendo-as no trânsito pelo sistema digestivo, têm se mostrado muito atraentes atualmente para a administração oral de agentes bioativos (CIOFANI *et al.*, 2008). Para que estes sistemas sejam eficientes, faz-se necessário que estas estruturas possuam propriedades como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, antigenicidade apropriada, proteção do antígeno e/ou fármaco, manutenção de sua integridade até que o tecido alvo seja alcançado, minimização de efeitos colaterais, alta capacidade de se difundir através das membranas e liberação controlada do agente encapsulado.

Dentre as propriedades citadas acima, a estabilidade do agente de imunização quando usado oralmente é fator crítico para o desenvolvimento de vacinas orais, razão pela qual, ainda hoje, as vacinais intraperitoneais são mais empregadas. O trato gastrointestinal dos peixes pode variar de muito ácido, no estômago, com valores de pH próximos de 1,2, até levemente alcalino na região anterior do intestino, como demonstrado na Figura 3.

Sistemas carreadores microparticulados orais não só necessitam se associar a uma alta quantidade de antígeno, bem como precisam transpor problemas relacionados à fraca permeabilidade através da mucosa gastrointestinal e à transposição da barreira de absorção durante a primeira fase de metabolização, de modo que o agente de imunização alcance a corrente sanguínea (XING *et al.*, 2003).

No caso de veiculação de compostos terapêuticos por via oral em mamíferos, a absorção dos agentes ativos encapsulados pelo tecido linfóide associado ao intestino pode ser favorecida pela utilização de partículas com diâmetros iguais ou menores que 10 μm (SINGH e O'HAGAN, 1998; LEMOINE *et al.*, 1998; O'HAGAN, 1998). Observações similares foram feitas também por VAN DER LUBBEN *et al.* (2001) e WIKINGSSON e SJÖHOLM (2002). Embora não se disponha de dados detalhados similares para a absorção de agentes ativos por via oral em peixes, sabe-se que para estes animais, supostamente, o principal processo de absorção de antígenos através das células epiteliais da mucosa intestinal (enterócitos) é a pinocitose (ELLIS, 1998), de forma que partículas de diferentes

tamanhos poderiam ser empregadas com distintas funções. Se apenas a proteção do agente antigênico do trato gastrointestinal é requerida, partículas com diâmetros até 300 μm podem ser usadas com sucesso, no entanto, uma faixa de diâmetros mais estreita, entre 5 e 50 μm parece ser mais apropriada (SINGH e O'HAGAN, 1998). Nesta faixa de tamanho, ROMALDE *et al.* (2004) observaram níveis eficientes de proteção de trutas contra *Lactococcus garvieae* utilizando micropartículas de alginato de cerca de 30 μm , enquanto TIAN *et al.* (2008) obtiveram efetiva indução de resposta imune em linguados empregando micropartículas de quitosana com diâmetro da ordem de 10 μm , ambas as vacinas administradas oralmente. Para tilápias, não foram localizados relatos do uso de micropartículas como sistemas de liberação controlada de agentes vacinais por via oral, supondo-se, no entanto, que a faixa de tamanhos de 5 a 50 μm seria adequada. Destaca-se que não somente o diâmetro médio, mas também a distribuição de tamanhos das partículas tem relevância quando da aplicação biológica final, sendo importante caracterizar o material também quanto a este aspecto.

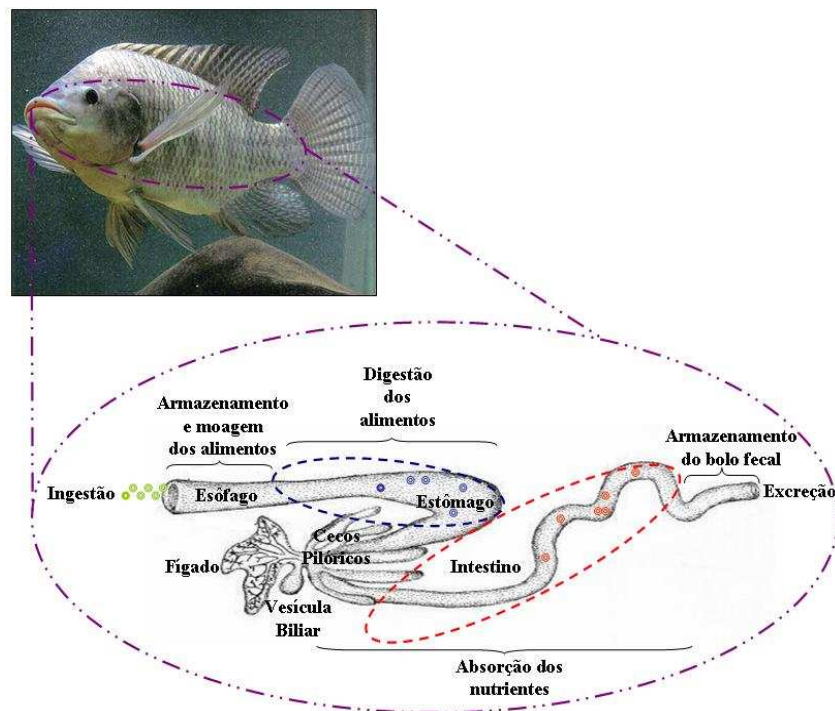


Figura 3: Sistema digestivo típico de peixes. A parte marcada com tracejado em azul representa a região de pH ácido e a com tracejado vermelho, a região de pH alcalino (adaptado de ROTTA, 2003).

Segundo GALINDO-RODRIGUEZ *et al.* (2005), atualmente têm sido desenvolvidos com sucesso sistemas de liberação controlada que fazem uso de partículas poliméricas. Estes sistemas de liberação controlada são interessantes, uma vez que podem ser mais estáveis no trato gastrointestinal, se comparados a outros carreadores coloidais, como lipossomas. Além disso, há a possibilidade de se modificar as características físico-químicas destas partículas, quando se faz a associação de diferentes materiais poliméricos para a constituição destes sistemas de liberação. Exemplos disso são as alterações no potencial zeta e na hidrofobicidade das partículas, além de mudanças nas propriedades de liberação e do comportamento biológico das mesmas, com alterações expressivas nas características de bioadesividade e especificidade das partículas.

Dentre os biopolímeros freqüentemente utilizados para formação de sistemas de liberação controlada, encontram-se o alginato e a quitosana, que são amplamente utilizados tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia e são descritos a seguir.

2.5.1. Alginato

O alginato é comumente extraído da parede celular de três espécies de algas marrons comuns de regiões costeiras, sendo elas a *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e da *Macrocystis pyrifera*, na forma de um sal sódico do ácido algínico. O alginato é responsável por garantir que não ocorra o ressecamento destas algas durante a maré baixa.

Constitui-se de um polissacarídeo solúvel em água à temperatura ambiente, composto por grupamentos alternados de copolímeros lineares de resíduos de ácido α -L-gulurônico e α -D-manurônico. A Figura 4 representa a estrutura química do alginato.

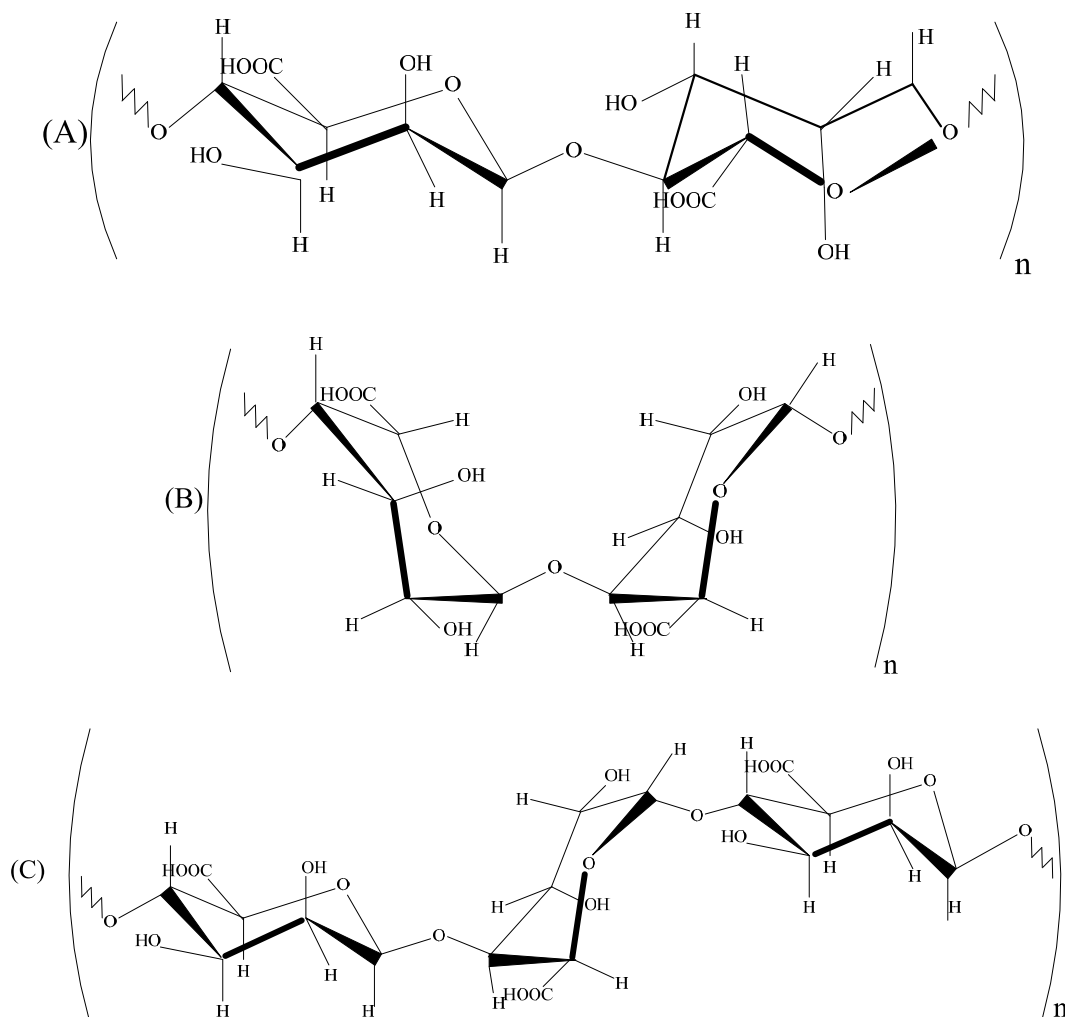


Figura 4: Estrutura química do alginato: (A) cadeia de resíduos de ácido manurônico; (B) cadeia de resíduos de ácido gulurônico; (C) cadeia de resíduos alternados de ácidos manurônicos e gulurônicos (adaptado de KAWAGUTI e SATO, 2008).

A principal propriedade do alginato está associada à sua habilidade de formar gel quando em contato com cátions divalentes como o Ba^{2+} , Ca^{2+} e Sr^{2+} . A formação do gel resulta das ligações cruzadas que ocorrem com os cátions divalentes, de modo que estes se alojam entre as cadeias do polímero, levando à produção de uma estrutura em que há a formação de uma rede. A formação desta estrutura pode ser observada na Figura 5, para o alginato em presença de íons cálcio.

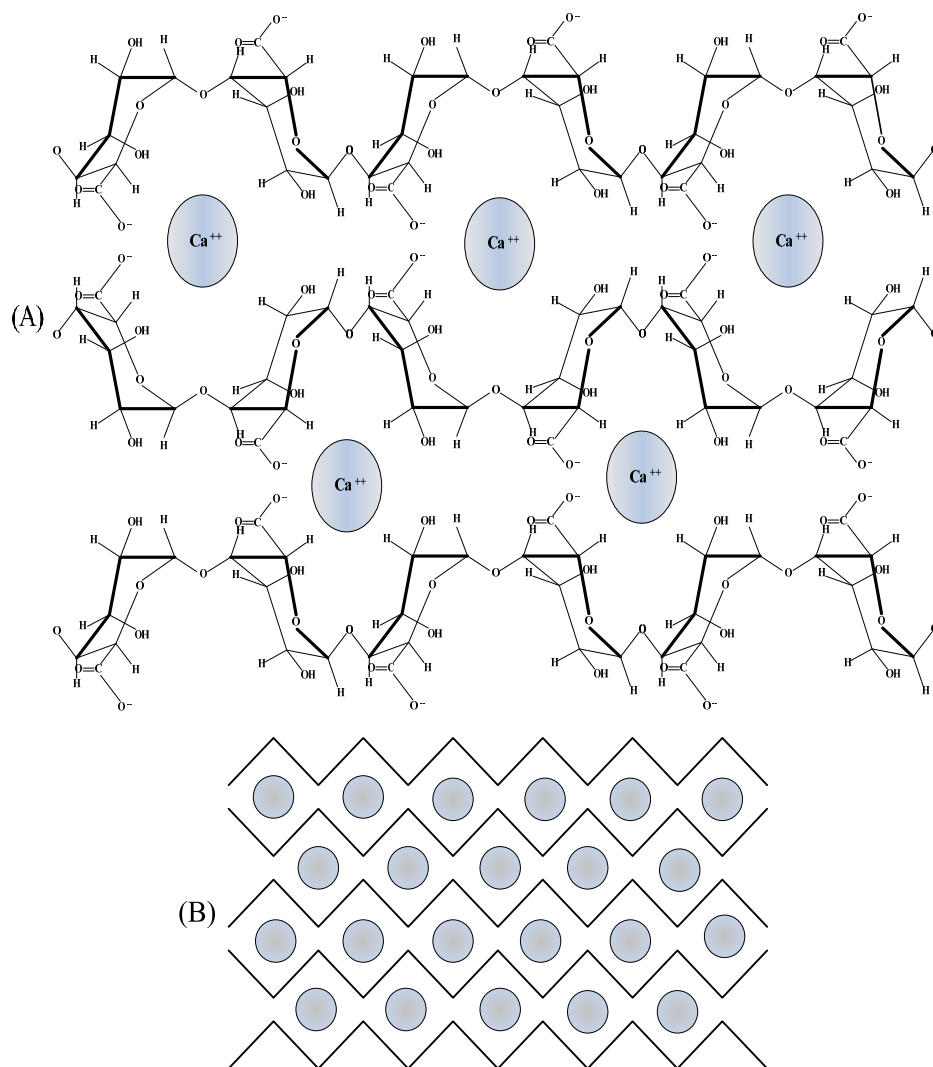


Figura 5: Formação da rede de gel de alginato de cálcio: (A) ligação entre as cadeias poliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos de carga negativa; (B) formação da rede de gel das cadeias unidas pelos íons cálcio (adaptado de KAWAGUTI e SATO, 2008).

De acordo com GEORGE e ABRAHAM (2006), a quantidade íons Ca^{2+} presente no sistema influencia na estabilidade destas redes poliméricas, podendo se estabelecer associações inter-cadeias temporárias ou até mesmo permanentes. Quando os níveis de cálcio na rede de gel são pequenos, observam-se formações do tipo temporárias que posteriormente transformam-se em soluções altamente viscosas e tixotrópicas, ou seja, géis que se liquefazem quando submetidos à determinada quantidade de calor ou tensão

mecânica, como cisalhamento e/ou vibrações. No entanto, quando a quantidade de íons cálcio é elevada, ocorrem associações de cadeias do tipo permanente, observando-se a formação de gel ou mesmo de um precipitado. Diversos estudos têm demonstrado que fatores como a estrutura química e o tamanho da molécula de alginato, assim como a cinética de formação do gel, aliada ao tipo de íon empregado são determinantes sobre diversas propriedades do mesmo, como a porosidade, a capacidade de intumescimento, a biodegradabilidade, a estabilidade, a resistência do gel, a biocompatibilidade, e suas características imunológicas.

Segundo GEORGE e ABRAHAM (2006), diversas características do alginato fazem-no um bom carreador oral. Dentre essas propriedades destacam-se:

- a) **Biocompatibilidade:** O alginato é considerado pela FDA (Food and Drug Administration) um composto seguro e não-tóxico. Quando administrado oralmente, o alginato tem a capacidade de induzir a uma resposta imune muito mais eficiente de quando administrado na forma intravenosa. O alginato tem se mostrado como composto de fácil biodegradabilidade, o que o torna muito atraente como carreador oral.
- b) **Bioadesividade:** O alginato possui a característica de ser um biopolímero capaz de gerar sistemas de liberação mucoadesivos. A mucoadesividade é um fator importante para sistemas de liberação, uma vez que a sua principal característica é aumentar o tempo de residência do agente encapsulado no sítio de atuação ou absorção. Estudos mostram que polímeros com alta densidade de cargas podem ser usados como bons agentes mucoadesivos, visto que tais cargas podem favorecer a adesão da matriz de liberação ao tecido da mucosa. Estudos como o de CHICKERING e MATHIOWITZ (1995) demonstram que polímeros poliânicos, como o alginato, são mais eficientes como agentes bioadesivos que polímeros catiônicos ou até mesmo não-iônicos.
- c) **Sensibilidade ao pH:** Em condições de pH muito baixo, como é o caso do fluido gástrico, o alginato possui a capacidade de manter-se como um gel íntegro, protegendo efetivamente o agente encapsulado. No entanto, quanto submetido à elevação de pH, como no trato intestinal, o alginato é convertido em uma solução

viscosa. Desta forma, ocorre a dissolução das matrizes de alginato em pH elevados, resultando na liberação do agente encapsulado.

- d) Condições brandas de gelificação: Sabe-se que o alginato possui a capacidade de formar gel quando em contato com íons divalentes, como por exemplo, o Ca^{2+} , em variadas condições de temperatura.

O mecanismo de liberação do agente encapsulado pelo alginato também é muito importante. Sabe-se que o agente pode ser liberado de duas formas, a primeira delas é por difusão através dos poros da rede de polímeros; já a segunda forma de liberação se faz através da degradação da rede polimérica e conseqüente liberação do agente. Para se conseguir sistemas de liberação mais eficientes, deve-se priorizar que esta liberação se dê principalmente pelo mecanismo difusivo. Desta forma, observa-se a importância do controle da formação da rede de gel, bem como do tamanho dos seus poros. Outro fator que pode influenciar a taxa de liberação do agente encapsulado pelas redes de gel de alginato é a quantidade de ácido α -L-gulurônico, pois como demonstrado por MURATA *et al.* (1993), baixas quantidades deste ácido, associadas à baixa massa molar do alginato, tendem a liberar o agente encapsulado mais rapidamente. Assim, diversos estudos são realizados visando melhorar o desempenho de liberação das micropartículas de alginato. Desta forma, pesquisas recentes propõem alterações na estrutura do gel de alginato, sejam por modificações químicas covalentes, modificações na hidrofobicidade do alginato ou até mesmo pela sua associação na forma de complexos polieletrólitos.

Dentre as modificações estudadas, uma das que se mostra mais promissora é a pesquisa de sistemas de liberação controlada pela associação do alginato com a quitosana na forma de complexos polieletrólitos. Estes complexos têm mostrado muito êxito na encapsulação tanto de células, fármacos, proteínas e outras substâncias. Devido ao fato de diversos estudos demonstrarem as vantagens dessa associação, no presente trabalho, foi utilizada esta abordagem para a formação das micropartículas para a constituição destes sistemas de liberação controlada.

2.5.2. Quitosana

A quitosana comercialmente disponível é obtida a partir da desacetilação da quitina, um polissacarídeo natural que só não é mais abundante que a celulose. A quitina é um componente estrutural muito comum na carapaça de crustáceos, moluscos, parede da celular de fungos, e no exoesqueleto de insetos. A maior parte da quitosana obtida comercialmente encontra-se na forma de α -quitosana, oriunda da quitina de crustáceos.

No processo de obtenção da quitina, as carapaças de crustáceos são desmineralizadas através de tratamentos com ácidos, para reduzir o teor de cinzas da matéria-prima, sendo então desproteinizadas através de tratamento com álcalis, de modo a reduzir o teor de nitrogênio protéico (GEORGE e ABRAHAM, 2006). Logo após ser extraída, a quitina é desacetilada por hidrólise alcalina a altas temperaturas, até que se obtenha a quitosana. A quitosana é um polissacarídeo linear catiônico, composto essencialmente de resíduos de β (1 \rightarrow 4) glicosamina ligadas à porção de N-acetilglicosamina (PENICHE *et al.*, 2003). Sua estrutura é muito similar à da celulose e pode ser observada na Figura 6.

A quitosana possui em sua estrutura uma amina primária e dois grupamentos hidroxil livres. Devido à disponibilidade dos grupos amino livres, a quitosana pode apresentar-se na forma positivamente carregada, o que a torna passível de reagir com muitos polímeros carregados negativamente, além de possibilitar a sua quelação com diversos íons metálicos, como o cobre e o cobalto. Desta forma, é amplamente utilizada na adsorção de metais. A quitosana está disponível comercialmente na forma de flocos secos, em solução e na forma de pós finos, sendo que possui, em média, grau de desacetilação entre 66% e 95%, e massa molar média variando de 10 a 1000 KDa (GEORGE e ABRAHAM, 2006). Segundo SINHA *et al.* (2004), a quitosana é uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos, podendo ser solubilizada em soluções aquosas ácidas diluídas (pH < 6,5). Forma precipitado quando em contato com soluções alcalinas ou com poliânions e forma gel em condições de pH baixo. A quitosana também é capaz de agir como agente floculante no tratamento de águas residuárias.

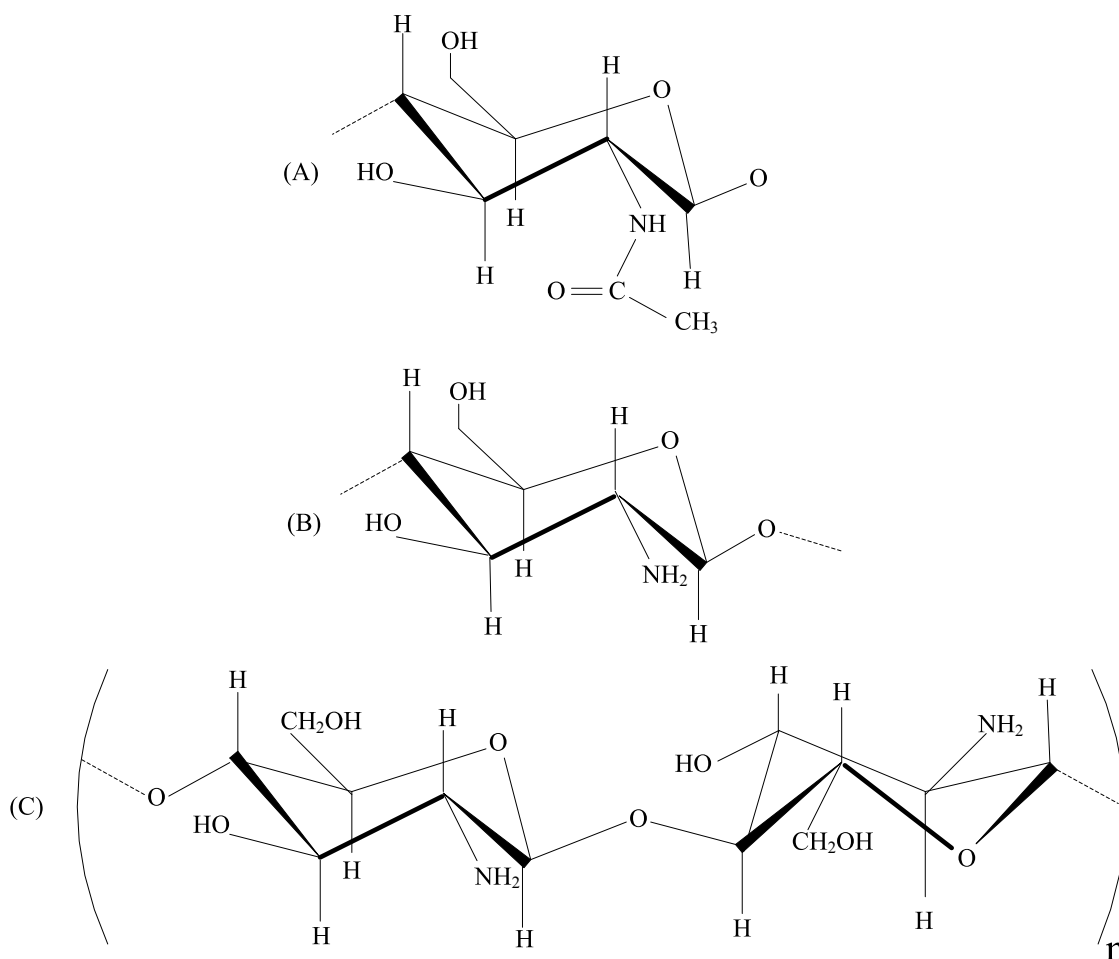


Figura 6: Estrutura química da quitosana: (A) unidade estrutural n-acetilglicosamina; (B) unidade estrutural glicosamina; (C) quitosana formada pelas unidades estruturais.

Assim como no caso do alginato, diversas características da quitosana fazem-na ser um bom carreador oral (GEORGE e ABRAHAM, 2006). Dentre essas propriedades destacam-se:

- a) **Biocompatibilidade e biodegradabilidade:** A quitosana é usada em todo o mundo, para variadas aplicações seja como aditivo (na indústria de alimentos), como redutor do colesterol, sendo amplamente empregada em formulações para emagrecimento, uma vez que possui a capacidade de capturar os lipídios presentes no intestino, devido à sua natureza catiônica. Por ser digerida por certas enzimas, a quitosana é considerada um composto biodegradável.

- b) Mucoadesividade: A quitosana é um material adesivo. GÅSERØD *et al.* (1998) demonstraram a capacidade da quitosana de aderir à mucosa gástrica, podendo ser usada potencialmente como um sistema de liberação controlada em sítios específicos do trato gastrointestinal, como o estômago, intestino e mucosa bucal. Esta propriedade adesiva da quitosana se deve principalmente ao efeito da hidratação, bem como às pontes de hidrogênio aliadas às interações iônicas que ocorrem entre os grupamentos amino positivamente carregados da quitosana com a mucosa negativamente carregada. Em condições de baixo pH, observa-se uma grande densidade de cargas positivas na estrutura da quitosana, notando-se também o aumento na sua massa molar, fenômeno este que provoca uma maior adesão à mucosa. Trabalhos como o de HE *et al.* (1998) demonstram que a quantidade de micropartículas aderidas ao intestino tende a aumentar quando a quantidade de grupamentos amino livres também é maior.
- c) Efeito de permeação: Estudos têm demonstrado a capacidade da quitosana de favorecer a rota de absorção paracelular, que se sabe, ser muito importante para o transporte de compostos hidrofílicos como peptídeos terapêuticos e oligonucleotídeos através da membrana celular. Este efeito de permeação foi observado por SCHIPPER *et al.* (1997) que constataram que as cargas positivas do polímero interagem com a membrana celular, resultando numa reorganização estrutural que permite seu transporte através destas membranas.
- d) Sensibilidade ao pH: A quitosana demonstra ser um polímero bastante sensível à mudanças de pH, sendo facilmente solubilizada em meios ácidos, e insolúvel em meios básicos. Segundo YAO *et al.* (1994), esta sensibilidade às mudanças de pH se deve principalmente à protonação dos grupamentos amino, que ocorre em condições ácidas. Esta protonação leva à repulsão das cadeias de quitosana entre si, possibilitando a difusão de prótons e contra-íons e a conseqüente dissociação de interações secundárias. Devido a esta propriedade, tem-se desenvolvido amplamente o estudo de avaliação da quitosana como carreador de drogas para sistema de liberação controlada no intestino. No entanto, seu uso é limitado, uma vez que a quitosana pode se dissolver no interior do estômago.

- e) Condições brandas de gelificação: um dos agentes de reticulação mais empregados para a formação da rede de gel é o tripolifosfato, já que é um poliânion não-tóxico, capaz de interagir eletrostaticamente com a quitosana. Pode-se também preparar hidrogéis de quitosana através de interações do tipo covalentes, já que este tipo de ligação ajuda a reforçar as propriedades químicas e mecânicas da quitosana, tornando a rede de gel ainda mais estável. Os reticulantes sintéticos mais utilizados em associação com a quitosana são os dialdeídos como o glioxal e o glutaraldeído, podendo também ser utilizados reticulantes naturais como a genipina (SINHA *et al.*, 2004).
- f) Fácil modificação química: isso ocorre uma vez que na quitosana nota-se a presença de grupamentos amino livres, o que propicia o aumento na reatividade deste polímero.

Diversos métodos são usados na preparação de partículas de quitosana, como se pode observar na Figura 7. Dentre os métodos usados, o mais amplamente empregado é a reticulação iônica, em que o polímero é precipitado usualmente com sulfato de sódio, seguido pela reticulação química com glutaraldeído ou formaldeído. Também se faz uso de genipina. A reação da quitosana com quantidades controladas de ânions multivalentes resulta na reticulação das moléculas da quitosana. Esta reticulação pode ser obtida em meios ácidos, neutros e básicos, dependendo do método aplicado.

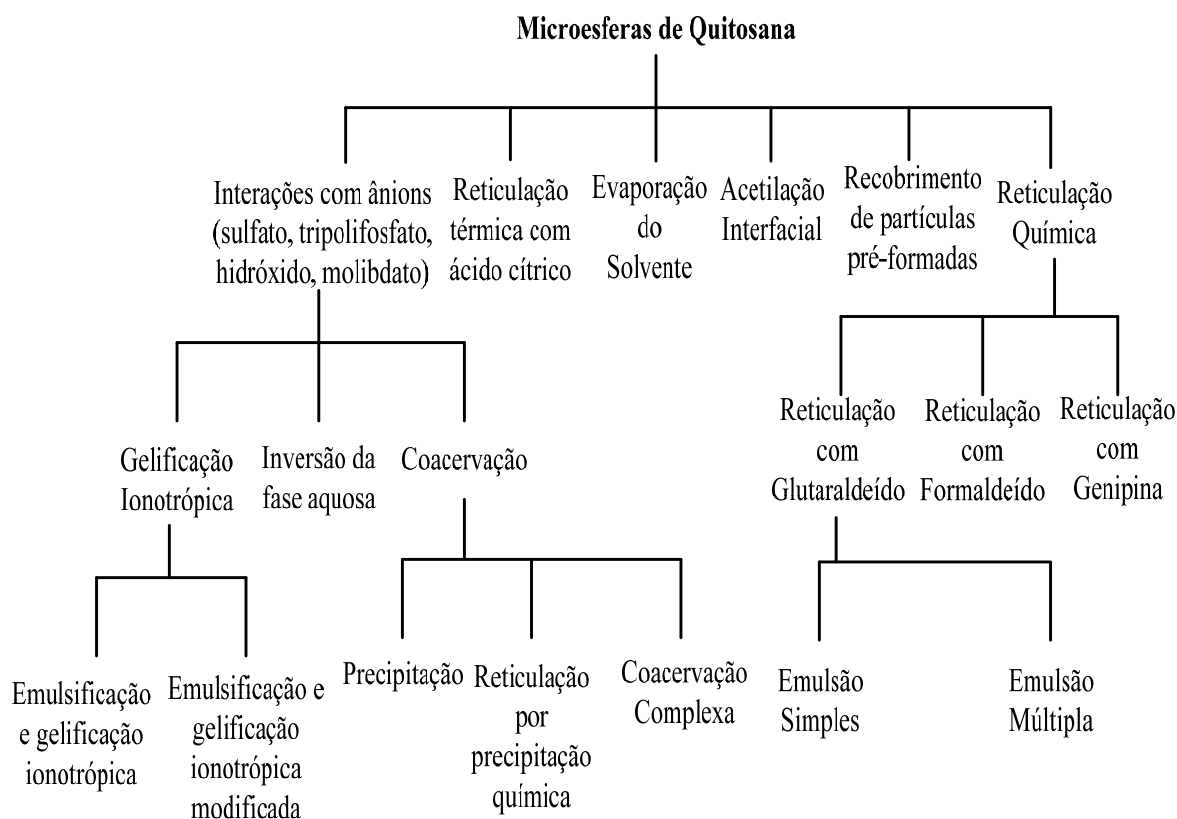


Figura 7 Métodos de preparação de micropartículas de quitosana (adaptado de SINHA *et al.*, 2004).

A Tabela 4 apresenta diferentes métodos utilizados para a produção de micropartículas de quitosana por diferentes autores, usados para a incorporação de vários agentes terapêuticos como anticancerígenos, anti-inflamatórios, esteróides, proteínas, aminoácidos, antidiabéticos e diuréticos. Alguns dos tipos de agentes bioativos encapsulados em partículas de quitosana estão exemplificados na Tabela 5.

Visando melhorar o desempenho dos sistemas de liberação controlada, pode-se buscar como alternativa realizar modificações covalentes no polímero, de modo a alterar as suas características físico-químicas. Algumas das modificações que mais têm obtido sucesso são as do tipo covalentes na forma de acoplamento do grupo tiol e trimetiol à quitosana, e nas associações da quitosana na forma de complexos polieletrólitos, como se

observa nos complexos de quitosana-pectina, quitosana-carragena e no mais usual, quitosana-alginato.

Tabela 4: Métodos de preparação de micropartículas de quitosana usado por diversos autores.

MÉTODO		REFERÊNCIA	
<i>Gelificação ionotrópica</i>	Emulsificação/gelificação ionotrópica	LIM <i>et al.</i> (1997)	
	Emulsificação/gelificação ionotrópica modificada	SHU e ZHU (2001)	
Interação com ânions	<i>Inversão de fase</i>	MI <i>et al.</i> (1999)	
	<i>Coacervação</i>	Precipitação	BERTHOLD <i>et al.</i> (1996)
		Reticulação por precipitação química	AGGARWAL <i>et al.</i> (2001)
	Coacervação complexa	CHELLAT <i>et al.</i> (2000)	
Reticulação térmica com ácido cítrico		ORIENT <i>et al.</i> (1996)	
Evaporação do solvente		LIM <i>et al.</i> (2000)	
Acetilação interfacial		MI <i>et al.</i> (1997)	
Reticulação com glutaraldeído	Emulsão simples	GOHEL <i>et al.</i> (1994)	
	Emulsão Múltipla	WU e LI (2002)	
Recobrimento de partículas pré-formadas		LIN e KANG (2003)	

Tabela 5: Diferentes categorias de agentes medicamentosos encapsulados em partículas de quitosana (adaptado de SINHA *et al.*, 2004).

CATEGORIA	TIPO	
<i>Drogas Anticancerígenas</i>	Fluorouracil	Oxantrazol
	Cisplatina	Citarabina
	Mitoxantrona	Metotrexato
<i>Drogas Anti-inflamatórias</i>	Indometacina	Quetoprofeno
	Diclofenaco de sódio	Ibuprofeno
	Prednisolona	Acetaminofeno
	Piroxicam	Dexametasona
<i>Agentes Cardíacos</i>	Hidrocloreto de Diltiazem	Cloridrato de Propanolol
	Nifedipina	Mononitrato-5 de isossorbida
<i>Antibióticos</i>	Amoxicilina	Sulfadiazina
	Ampicilina	Griseofulvina
	Tetraciclina	Sulfatiazol
<i>Agentes que atuam no Sistema Nervoso Central</i>	Teofilina	Pentazocina
	Fenobarbitona	Hidrocloreto de lidocaína
	Fenitoína	Analgésicos opióides
<i>Proteínas</i>	Antígenos	Albumina de soro bovino
<i>Agentes Anti-diabéticos</i>	Insulina	
<i>Fatores de Crescimento</i>	Fator de crescimento endotelial	
<i>Agentes Diuréticos</i>	Furosemida	
<i>Agentes reguladores de lipídios</i>	Genfibrozil	
<i>Agentes Anti-infectivos</i>	Diacetato de Clorexidina	

2.5.3. Métodos de Encapsulação de Agentes Bioativos em Partículas de Alginato e Quitosana

Existem diversas maneiras de se produzir micropartículas de alginato e quitosana, e é importante que se conheça as características de cada um destes polímeros para que a escolha do método favoreça a uma boa encapsulação do agente ativo, bem como atenda aos

requisitos de liberação controlada a que a micropartícula será submetida. Com base nisso, a seguir tem-se a descrição dos métodos de encapsulação mais comumente relatados na literatura e de maior relevância para o desenvolvimento deste trabalho.

2.5.3.1. *Spray Drying*

O método de microencapsulação que usa como base a técnica de *Spray Drying* já é empregado há muitos anos, sendo que há registros do seu emprego desde 1927, de acordo com PENICHE *et al.* (2003). Este método consiste em dispersar a substância, fármaco ou agente ativo em uma solução aquosa contendo os polímeros formadores da matriz de encapsulação, que será usada como carreador. Esta solução aquosa é posteriormente aspergida em um meio de secagem (normalmente o ar), de modo que serão obtidas partículas na forma de pó, devido à rápida evaporação da água.

A encapsulação por *Spray Drying* fornece uma estrutura onde o composto de interesse encontra-se disperso ao longo da matriz formada pelo polímero. Devido a este tipo de distribuição, observa-se que esta técnica resulta em partículas com diversos núcleos (ALVIM, 2005). Na Figura 8, pode-se observar o desenho esquemático do processo de *Spray Drying*.

Por apresentar baixo custo e gerar partículas com boa estabilidade e alto grau de retenção do agente encapsulado, esta técnica tem sido amplamente estudada e aplicada em diversos setores da economia.

No entanto, o grande entrave ao seu emprego visando à confecção de vacinas orais é o fato desta técnica fazer uso muitas vezes de altas temperaturas de secagem, que poderia levar à possível degradação do antígeno durante o processo, o que comprometeria a eficácia da vacina.

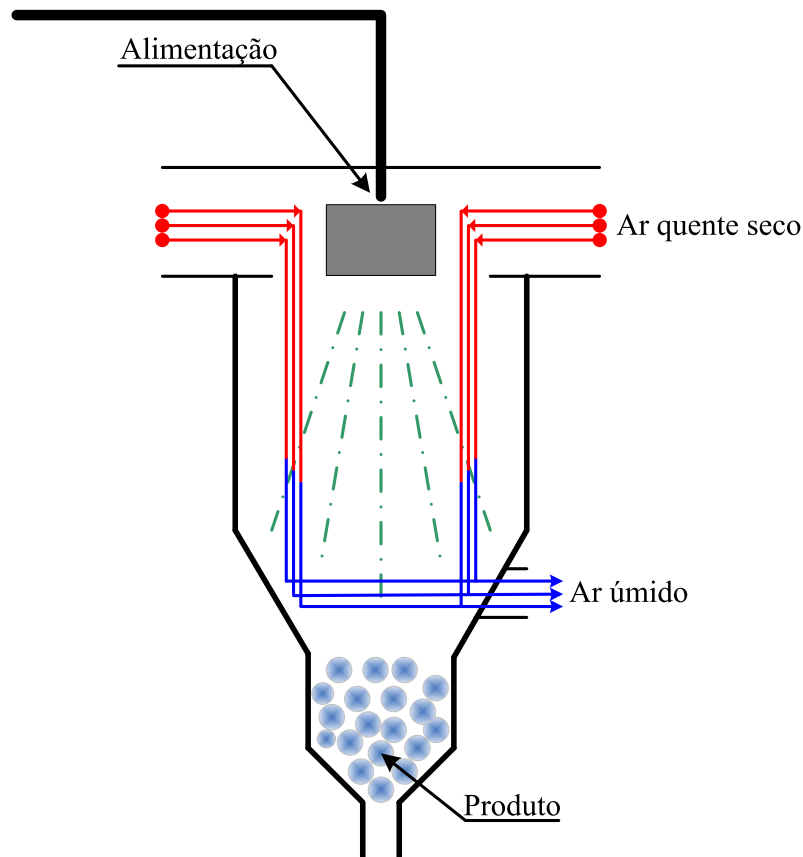


Figura 8: Desenho esquemático do processo de encapsulação por *Spray Drying* (adaptado de CresTechnologies, 2008).

2.5.3.2. Método de gotejamento seguido de reticulação

Este método consiste da rápida gelificação da solução polimérica quando gotejada em uma solução contendo um agente reticulante (cloreto de cálcio, para o alginato e tripolifosfato para quitosana), como se pode observar na Figura 9. Nesta metodologia observa-se a formação de partículas através do processo de gelificação superficial, verificando-se ao longo do tempo a difusão do agente reticulante rumo ao centro do gel (OLIVEIRA, 2004). Esta técnica se mostra muito eficiente para a encapsulação de agentes bioativos, uma vez que possibilita a formação de micropartículas capazes de apresentar uma matriz contendo o agente a ser encapsulado. Além disso, é considerada uma técnica simples, uma vez que para o processo de gotejamento, faz-se necessário para escala

laboratorial somente o uso de seringas e/ou buretas, e de bombas para a escala industrial (RODRIGUES, 2004).

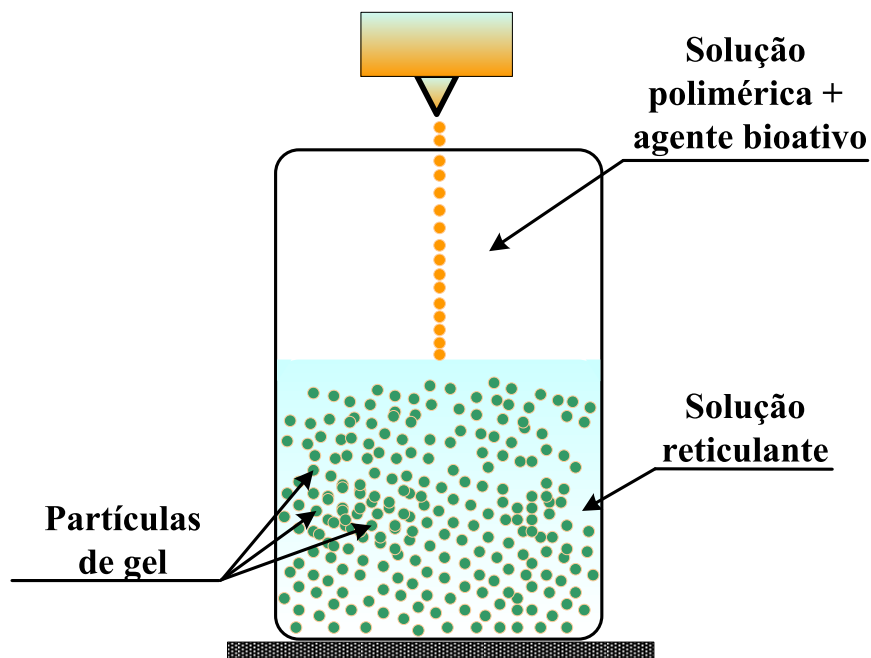


Figura 9: Desenho esquemático do processo de encapsulação pelo método de gotejamento seguido de reticulação.

No entanto, o entrave ao uso desta técnica para a produção de veículos para vacinação oral consiste no fato da mesma produzir partículas da ordem de milímetros, o que é inadequado, já que, como discutido anteriormente, a obtenção de partículas com diâmetros da ordem de 5 a 50 μm seria desejável.

2.5.3.3. Coacervação

Em sistemas aquosos, observa-se a existência de dois tipos de coacervação, sendo elas a simples e a complexa (PENICHE *et al.*, 2003). Na coacervação simples, um material coloidal hidrofílico é submetido à presença de uma substância competitiva, também hidrofílica, que pode ser um sal ou até mesmo um álcool. Assim, com a retirada do solvente, as moléculas do polímero tendem a se aproximar, formando aglomerados. Na

coacervação complexa observa-se a produção de partículas pela adição de polieletrólitos de cargas opostas, como se pode observar na Figura 10. A separação do complexo polieletrólito formado se dá pela diferença entre fases coexistentes, uma muito diluída e outra muito rica em polímero. Na técnica de coacervação observa-se a interação por complexação de polímeros de cargas opostas que, ao formarem complexos, acabam por criar uma espécie de repulsão ao solvente, assim produzindo a separação em uma solução polimérica diluída: uma fase rica em polímero e outra extremamente diluída, praticamente livre da presença de polímeros, constituída fundamentalmente pelos solventes.

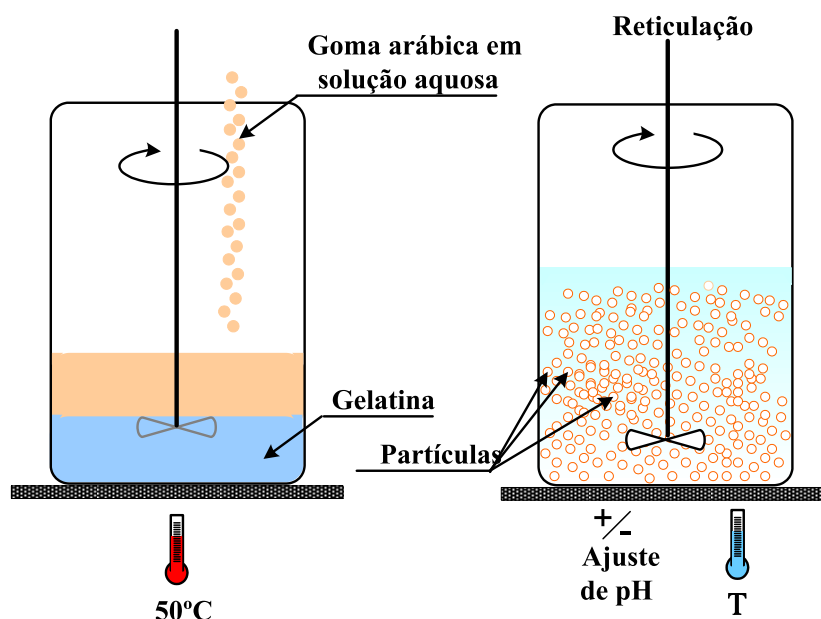


Figura 10: Desenho esquemático do processo de encapsulação pelo método de coacervação.

2.5.3.4. Gelificação de partículas obtidas por emulsão

O método de gelificação de partículas obtidas por emulsão tem como base a associação do polímero ionizado com contra íons provenientes da dissociação de um sal, de forma similar ao observado no método de gotejamento, porém, resultando em partículas muito menores.

Observa-se primeiramente a formação de gotículas da solução de um polímero hidrofílico dispersas na emulsão. Em seguida, a rede de gel primária é estabilizada pela

ação de um agente reticulante. Atualmente, esta metodologia vem sendo amplamente usada para a formação de micropartículas para a encapsulação e proteção de agentes ativos.

Dentre os polímeros que têm demonstrado maior sucesso no emprego desta técnica destacam-se o alginato e a quitosana, pois além de possuírem propriedades que os habilitam como bons agentes de encapsulação e liberação, nas últimas duas décadas, ocorreu um grande aumento da disponibilidade destes polímeros comercialmente, associada paralelamente à manutenção da qualidade dos lotes disponibilizados, o que permite que se faça uma boa caracterização físico-química dos mesmos (REIS *et al.*, 2006).

O método proposto por PONCELET *et al.* (1999), é atualmente um dos mais utilizados e estudados para a preparação de micropartículas de alginato úteis como sistemas de liberação controlada. Este método foi recentemente empregado com sucesso por RODRIGUES *et al.* (2006) para a vacinação oral de peixes com células inativadas de *Aeromonas hydrophila* e por REIS *et al.* (2007) como veículo de administração oral de insulina. Pode-se realizar a gelificação por duas diferentes abordagens. A primeira delas é a gelificação do tipo interna, em que ocorre a dispersão do agente ativo na solução polimérica, sendo esta solução posteriormente misturada com o agente reticulante. A mistura solução polimérica/reticulante é dispersa sob agitação vigorosa numa fase oleosa. Após a formação da emulsão, realiza-se o processo de gelificação das micropartículas pelo ajuste de pH, através de ácidos orgânicos solúveis à fase oleosa. As partículas formadas são então recuperadas por filtração e consecutivas lavagens para a remoção do óleo residual (REIS *et al.*, 2006). Já o método de gelificação externa consiste na dispersão do agente a ser encapsulado na solução de alginato de sódio, que é misturada à fase oleosa sob agitação. A fase oleosa pode ser constituída de óleo vegetal ou mineral. Uma vez que a emulsão é formada, e as gotículas possuem uma boa distribuição de tamanho, inicia-se o processo de gelificação, fazendo-se para isso a adição do agente reticulante, como cloreto de cálcio, e realizando-se o ajuste do pH da solução. O processo de gelificação dura, em média, entre 5 a 10 minutos. Após o término da gelificação, faz-se a inversão da solução, de modo a produzir uma dispersão do tipo óleo em água, o que leva à formação de duas fases distintas: uma que contém o óleo residual, localizada na parte superior, e a uma fase aquosa onde se observa as micropartículas dispersas.

Um método similar pode ser empregado para a obtenção de partículas de quitosana. Neste caso, baseado na gelificação ionotrópica, faz-se a adição da solução aquosa de quitosana em uma fase contínua não-aquosa (constituída de um óleo vegetal ou mineral, mais comumente o isooctano e um emulsificante como o Span 80), a fim de formar uma emulsão do tipo água em óleo (SINHA *et al.*, 2004). Em seguida, faz-se a adição de solução de agente reticulante que pode ser de baixa massa molar (como pirofosfato, tripolifosfato, tetrapolifosfato, hidróxido de sódio, citrato ou sulfato) e de alta massa molar (como octil sulfato de sódio) em diferentes intervalos de tempo a esta emulsão formada, o que leva ao processo de gelificação. As micropartículas formadas podem ser recuperadas por filtração, sendo posteriormente lavadas, secas e armazenadas (LIM *et al.*, 1997).

Diversos são os fatores que afetam a produção de micropartículas de alginato obtidas pelo método de gelificação via emulsão. De acordo com REIS *et al.* (2006), dentre estes fatores destacam-se os discutidos a seguir:

- a) Composição e concentração do polímero: Sabe-se que a composição do polímero é um parâmetro essencial na formação das micropartículas. As quantidades dos monômeros do polímero bem como a sua viscosidade sofrem alterações conforme a estação do ano em que são extraídas das algas, uma vez que os estágios de maturação das mesmas influem sobre estas características. Estudos têm mostrado que as quantidades de grupamentos de ácido gulurônico influenciam tanto a viscosidade do gel, quanto as associações formadas entre o polímero e o cátion divalente. Altas quantidades de ácido gulurônico e grupos de homopolímeros levam à formação de um gel mais estável e, conseqüentemente, mais forte. No entanto, em processos que usam emulsões, altas quantidades de ácido gulurônico levam a uma formação prematura da rede de gel, o que permite a formação de partículas maiores e mais porosas (PONCELET, 2001). Já quando se tem alginato com altas concentrações de ácido manurônico, o que se observa é a formação de uma rede de gel mais fraca, podendo ser facilmente solubilizada, ainda que a quantidade de cálcio no sistema seja elevada. A concentração do polímero no sistema também é muito importante, pois como observado por RODRIGUES *et al.* (2006), baixas concentrações de alginato tendem a

favorecer a formação de partículas de tamanhos menores, no entanto, a diminuição das concentrações de alginato pode resultar na formação de partículas deformadas e também tende a reduzir suas propriedades de resistência mecânica e estabilidade em condições gastrointestinais.

- b) Tipo e concentração do cátion divalente: Para que se obtenha uma gelificação bem sucedida, com a formação de um gel homogêneo, é necessário que se faça o controle da adição ou da formação do cátion divalente por dissociação de um sal. A seleção do cátion divalente usado no processo de gelificação também é dependente da faixa de pH inicial e final do processo. Dentre os sais que poderiam ser usados na reticulação, destacam-se o citrato, carbonato, cloreto, fosfato, oxalato e tartarato de cálcio. No entanto, como demonstrado por PONCELET *et al.* (1995), tanto o oxalato quanto o tartarato não são capazes de reticular as partículas, visto que o cálcio não é dissociado destes complexos sem que se faça um ajuste adequado do seu pH. Também foram constatados problemas no uso do fosfato, pois este se apresenta na forma de grânulos maiores, de difícil solubilização, o que poderia comprometer a formação das partículas. O citrato é considerado também um sal problemático, uma vez que as partículas formadas são grandes e com alta variabilidade na distribuição de tamanho. Dentre os sais testados por PONCELET *et al.* (1995), o carbonato de cálcio resultou em partículas com formato esférico e distribuição de tamanho adequada. Entretanto, o cloreto de cálcio também resulta em partículas com boa esfericidade, com diâmetro médio de 32,3 μm e adequada distribuição de tamanhos unimodal, como demonstrado por RODRIGUES *et al.* (2006).
- c) Faixa de pH durante a obtenção da emulsão: Depende de diversos parâmetros como o tipo de polímero usado, sal de cálcio e do agente a ser encapsulado, ou seja, os valores de pH poderão variar de muito altos a muito baixos, conforme a tolerância destes agentes a essa variação.
- d) Tipo de ácido: Existe uma grande variedade de ácidos que podem ser empregados no processo de formação de partículas através da emulsão. No entanto, é necessário que este seja um ácido orgânico solúvel em óleo. Dentre estes, encontram-se os ácidos láctico, cítrico e acético, sendo que este último é o mais amplamente utilizado.

- e) Tipo e concentração de óleo: Para a preparação das partículas, pode-se fazer uso tanto de óleos de origem vegetal (como o óleo de milho, canola, soja, coco, nozes, amendoim) quanto os minerais (como óleo de parafina, isooctano e silicone). Esta escolha é feita com base no custo e na viscosidade dos mesmos, uma vez que este último parâmetro é capaz de produzir variações no tamanho das gotas formadas. A proporção entre a fase aquosa/oleosa também é importante, uma vez que influi significativamente sobre o tamanho das partículas formadas. Diversos trabalhos relatam a efetiva formação de partículas quando preparadas na presença de proporção de fase aquosa/oleosa variando de 1:1 até 1:5. RODRIGUES *et al.* (2006) observaram que a elevação da proporção da fase aquosa de 10 para 50% levou ao aumento dos diâmetros médios das partículas, de 56 para 109,4 μm .
- f) Tipo e concentração do emulsificante: Em processos envolvendo emulsificação, os surfatantes são responsáveis pela redução da tensão superficial entre a fase oleosa e a água, facilitando assim a dispersão da solução de alginato no óleo. Estes compostos são também responsáveis pela estabilização das gotas formadas, impedindo assim, que ocorra a coalescência das mesmas. Existem diversos tipos de emulsificantes frequentemente usados, sendo eles de origem natural (no caso, a lecitina) e os de origem sintética (como o Span 80, Span 85 e o Tween 80). A quantidade de surfatante também é muito importante, uma vez que em baixas concentrações o mesmo pode não ser capaz de recobrir totalmente as gotas formadas, o que causa um declínio na estabilidade das gotas. Já em altas concentrações, pode-se observar resistência à transferência de massa relativa ao transporte dos prótons, o que pode vir a prolongar a gelificação, causando uma baixa conversão de solução de polímero em partículas. Partículas formadas na presença de quantidades de Span 80 superiores a 0,2% apresentam-se mais deformadas que as obtidas na presença de uma menor proporção deste emulsificante (RODRIGUES *et al.*, 2006).

A Figura 11 representa esquematicamente o processo de gelificação inotrópica por emulsão.

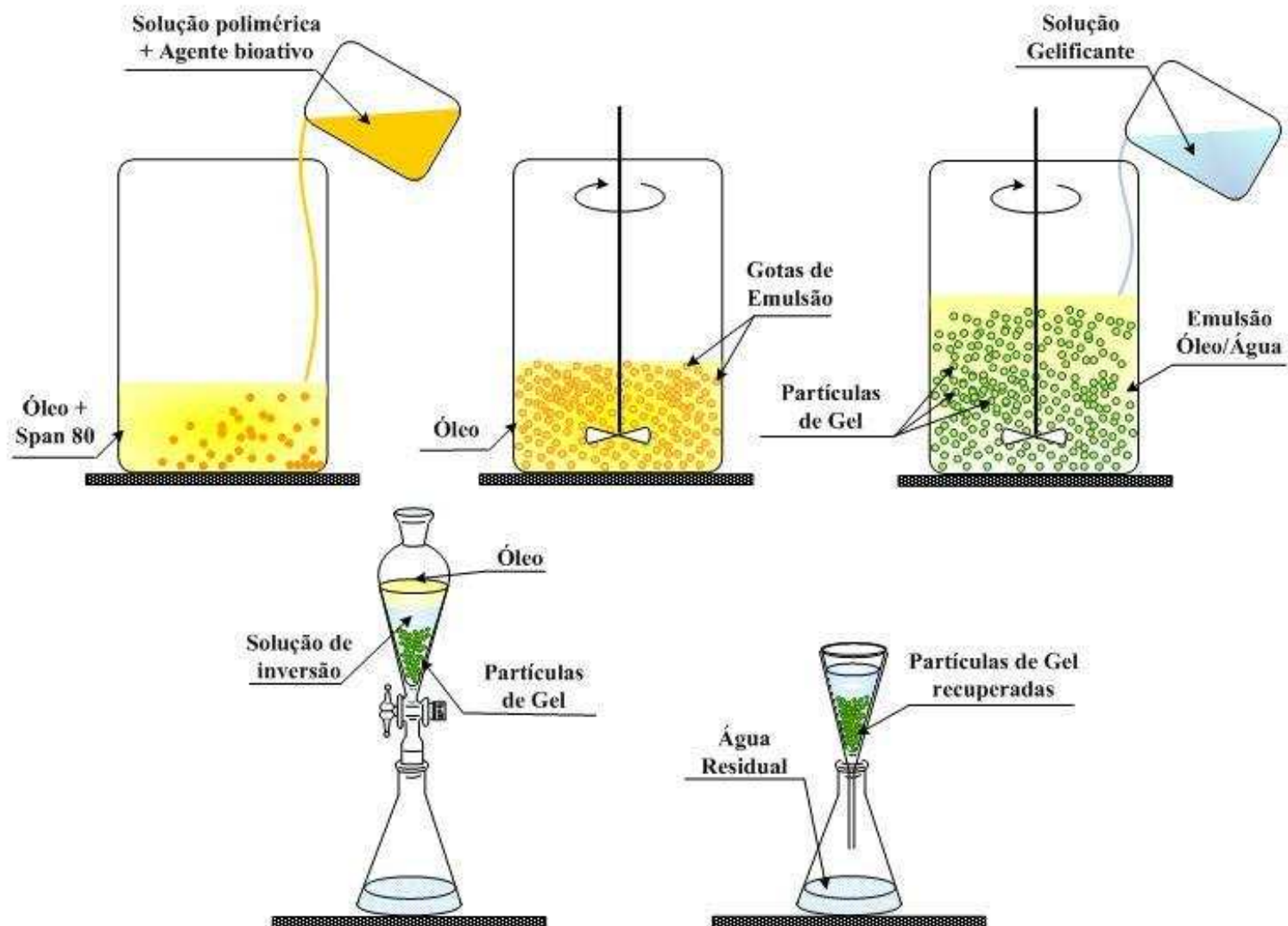


Figura 11: Encapsulação através do método de gelificação intrópica via emulsão (adaptado de RODRIGUES *et al.*, 2006).

2.5.3.5. Formação de partículas recobertas

As partículas de alginato formadas, em geral, possuem problemas relacionados à sua porosidade, pois quando se obtém partículas por gelificação interna observa-se que estas são mais porosas que as formadas por gelificação externa. No entanto, partículas formadas por gelificação externa são mais compactadas e por isto oferecem resistência à difusão. Visando melhorar este problema, sem afetar a propriedade de difusão das partículas de alginato formadas por gelificação interna, alternativamente, estudos como os de RIBEIRO *et al.* (2005) propõem o recobrimento das mesmas com quitosana. Esta associação é possível, uma vez que tanto a quitosana quanto o alginato são polieletrólitos, e, portanto, são passíveis de serem associados para o recobrimento das partículas. Os complexos polieletrólitos são formados através de interações intermoleculares, seja por pontes de hidrogênio, forças de Coulomb ou forças de van der Waals (SARMENTO *et al.*, 2006).

Em micropartículas de gel de alginato recobertas por uma membrana resultante do complexo formado por alginato e quitosana, a principal função do gel de alginato de cálcio é capturar o material a ser encapsulado de forma rápida e nas condições mais brandas possíveis, dando à partícula o formato esférico (PENICHE *et al.*, 2003). A membrana de quitosana formada é estável e apresenta-se fortemente ligada à rede de gel, o que possibilita a redução e o controle da permeabilidade da partícula.

Segundo GÅSERØD *et al.* (1999), o recobrimento de partículas de alginato com quitosana depende de diversos fatores. O método de produção das partículas determina claramente a quantidade limite de quitosana a ser ligada ao alginato para a formação da membrana. Em processos em que as partículas são formadas em um único estágio, a quantidade de quitosana associada ao alginato será menor. Isto provavelmente ocorre, pois a quitosana só se liga sobre a superfície da partícula, formando uma película com pequenos poros que impede a difusão da quitosana para dentro da partícula, o que promove a formação da rede de gel superficial. No entanto, quando as partículas de alginato são suspensas em solução de quitosana, mais quitosana pode se ligar, tanto dentro quanto fora da rede de gel da partícula. Em processos que se usam dois estágios para a formação de

partículas, observa-se um aumento de até cem vezes na quantidade de quitosana ligada à matriz, quando comparado a processos de único estágio. Por fim, a estrutura final desta película de recobrimento é dependente da sua extensão e espessura de recobrimento da quitosana, da porosidade do gel de alginato, do pH, do grau de desacetilação da quitosana e também de sua massa molar.

Estudos realizados por RIBEIRO *et al.* (2005) demonstraram que, partículas de alginato recobertas com quitosana mostraram-se bastante resistentes em meios que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal. Partículas recobertas com quitosana são capazes de se manter íntegras e de diminuir a taxa de liberação do agente ativo em condições de pH baixo, quando comparadas com partículas não recobertas com quitosana.

Similarmente, podem-se recobrir partículas de quitosana contendo um agente bioativo encapsulado com alginato, para a melhoria de algumas das propriedades do dispositivo de liberação controlada. Quando incubada em meios fisiológicos, a quitosana diminui muito suas propriedades mucoadesivas e ocorre uma maior permeação do bioproduto devido especialmente à protonação da quitosana. Além disso, a quitosana tem sua habilidade de liberação controlada comprometida devido à sua natureza hidrofílica e à fácil solubilidade em meios ácidos (LI *et al.*, 2008), o que é particularmente problemático se sua administração é feita por via oral. Desta forma, o recobrimento das partículas de quitosana com um polímero ácido-resistente, como o alginato, capaz de interagir facilmente com as micropartículas de quitosana para formar complexos polieletrólitos via interação eletrostática, passa a ser de grande relevância. Diversos estudos, como os de BORGES *et al.* (2008) e LI *et al.* (2008) demonstraram que micropartículas de quitosana recobertas com alginato mostram-se bastante eficientes para a administração oral de biomoléculas, uma vez que tais sistemas propiciaram uma boa modulação sobre o comportamento de liberação, bem como mostraram-se efetivas como barreira a degradação no meio ácido.

Neste contexto, o presente trabalho propõe o estudo de formação e caracterização destas partículas de modo a incorporar células inativadas de *Flavobacterium columnare* para serem usadas como veículos na vacinação oral de tilápias do Nilo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Agente antigênico: Foram empregadas suspensões da bactéria *Flavobacterium columnare* FL 07-02 inativada em formol, gentilmente cedidas pelo laboratório AQUAVET, do Departamento de Medicina Veterinária (Núcleo de Aquacultura) da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

Reagentes: Alginato de sódio (Sigma Chemical Co.), óleo de milho Liza, ácido acético glacial (Ecibra), álcool etílico (Synth), acetona (Synth), isopropanol (Merck), cloreto de cálcio dihidratado (Merck), Span 80 (Fluka), quitosana com 85% de desacetilação (Sigma Chemical Co.), hidróxido de potássio (Synth), água deionizada em sistema Milli-Q Académic Quantum EX (Millipore).

Equipamentos: Agitador mecânico de alto torque microprocessado modelo Q250M e impelidores de aço inoxidável (Quimis), agitador magnético (Fisaton), balança analítica (Quimis), banho ultratermostático com circulador modelo Q214M (Quimis), bomba peristáltica modelo Minipuls 3 (Gilson), incubadora de bancada refrigerada digital microprocessada (Licit), centrífuga modelo 5804 R (Eppendorf), estufa de cultura bacteriológica série 410 D (Nova Ética), medidor de pH modelo 430 (Corning), espectrofotômetro de espalhamento de laser Mastersizer S modelo S-MAM 5005 (Malvern Instruments), microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 440i (Leica), microscópio ótico modelo DMLM acoplado a computador modelo Q 500 IW (Leica), espectrofotômetro UV-visível modelo DU640 (Beckman).

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção do agente antigênico *Flavobacterium columnare*

As células foram cultivadas no laboratório AQUAVET (UFLA/MG), em meio Agar Hsu-Shotts (MHS) por 24 horas à 25 °C. Posteriormente, uma colônia foi selecionada, inoculada em 200 mL de caldo MHS e cultivada por 24 horas a 25 °C a 150 rpm. Na seqüência, as células foram centrifugadas a 3.500 rpm por 30 min e o *pellet* bacteriano foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) a 1 mol.L⁻¹ em pH 7,0 por duas vezes. Para a inativação das bactérias, os *pellets* foram ressuspensos no mesmo volume inicial de PBS a 1 mol.L⁻¹ com 0,2% formaldeído e armazenados a 4 °C por 24 horas. Em seguida, o inóculo foi centrifugado (6000 x g, a 4 °C por 20 minutos) e o *pellet* lavado duas vezes com solução salina estéril. A bacterina foi então acondicionada em frasco estéril e transportada sob refrigeração até Campinas.

Antes da incorporação da bacterina às partículas, realizou-se a centrifugação da suspensão celular a 10.000 rpm por 10 minutos a 6 °C e ressuspensão em solução de NaCl a 0,9% (m/v) a pH 7,4, sendo que este procedimento foi repetido por três vezes, para garantir a eliminação do formaldeído e do tampão fosfato residual, que poderiam comprometer o processo de gelificação do alginato.

3.2.2. Preparação das Partículas de Alginato

As partículas foram preparadas utilizando-se o metodologia proposta por RODRIGUES *et al.* (2006), uma vez que este método mostrou-se eficaz na incorporação de bactérias inativadas de *Aeromonas hydrophila* via gelificação inotrópica por emulsão para vacinação oral de tilápias do Nilo. Este método consiste da formação da emulsão pela agitação a 2.000 rpm, durante 5 minutos, de uma alíquota de 7 mL de solução aquosa de alginato de sódio a 3,5 % (m/v) com 63 mL de óleo de milho contendo 0,2% (v/v) de Span 80. Quando desejado, incorporou-se à solução de alginato, alíquotas da suspensão do agente antigênico, em concentrações finais ajustadas na faixa de 0,57 a 14,62 g.L⁻¹ em

termos de massa seca celular por litro de solução de alginato. À emulsão formada, adicionou-se 70 mL de solução gelificante composta por 5,98 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 33,87 mL de água deionizada, 33,87 mL de etanol e 2,26 mL de ácido acético glacial, sob agitação de 2.000 rpm por 10 minutos. Para a preparação das partículas utilizou-se o sistema mostrado na Figura 12, que consiste de um vaso de aço inoxidável encamisado, com dimensões internas de 8 cm de diâmetro por 15 cm de altura, de modo a manter a temperatura constante ao longo do processamento do material.



Figura 12: Sistema empregado na preparação das partículas.

Depois que as partículas foram formadas, realizou-se a recuperação das mesmas vertendo-se a emulsão obtida em 150 mL de solução de cloreto de cálcio a $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. Após a separação da fase oleosa da fase aquosa, as partículas foram filtradas em papel de filtro (poros com $14 \mu\text{m}$ de diâmetro). Em seguida as partículas foram coletadas e armazenadas em frascos contendo água deionizada.

Para fins analíticos, de modo a garantir que não houvesse óleo residual na amostra obtida, e assim diminuir as possíveis interferências nas análises posteriores das partículas, efetuou-se o procedimento de lavagem, adaptado de REIS *et al.* (2007), pelo qual as partículas suspensas em água deionizada foram dispersas a 100 rpm por 10 minutos em

24,5 mL de solução de lavagem composta por 17,1 mL de acetato à pH 4,5, 3,7 mL de acetona e 3,7 mL de isopropanol. Posteriormente, a suspensão resultante foi centrifugada a 12.500 g por 30 minutos. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, para garantir a remoção do óleo residual. Deve-se destacar que este procedimento de lavagem só é utilizado para fins de caracterização das partículas, uma vez que o uso do isopropanol e da acetona pode vir a desnaturar as proteínas do antígeno, não sendo, portanto, recomendado para a produção da vacina.

3.2.2.1. Avaliação do efeito da variação de temperatura sobre a viscosidade da emulsão de alginato e sobre o diâmetro e morfologia das micropartículas

As partículas foram obtidas através da metodologia descrita no item 3.2.2, empregando-se temperaturas no vaso de mistura variando entre 20 a 35 °C, como demonstrado na Tabela 6, sendo que as amostras foram produzidas em quadruplicata. Todas as amostras foram caracterizadas quanto ao aspecto e tamanho.

Tabela 6: Temperaturas de formação das partículas de alginato.

Ensaio	Temperatura (°C)
A1	20
A2	25
A3	30
A4	35

A viscosidade da emulsão formada pela mistura da solução aquosa de alginato em óleo de milho foi avaliada em reômetro Haake RheoStress 1 (Thermo Electron Corporation), em cuba de geometria Z20 Din Titanium com um volume de amostra de 8,2 mL. O sistema foi acoplado a um banho termostático (Haake DC 30), e empregou-se uma rampa de temperatura com taxa de elevação de 1 °C.min⁻¹, na faixa de 20 a 35 °C, mantendo-se a tensão de cisalhamento constante em 10 Pa.

3.2.2.2. Avaliação do efeito de diferentes impelidores no diâmetro e morfologia das partículas de alginato

As partículas foram formadas através da metodologia descrita no item 3.2.2. utilizando-se diferentes impelidores de aço inoxidável (Quimis), conforme indicado na Figura 13.

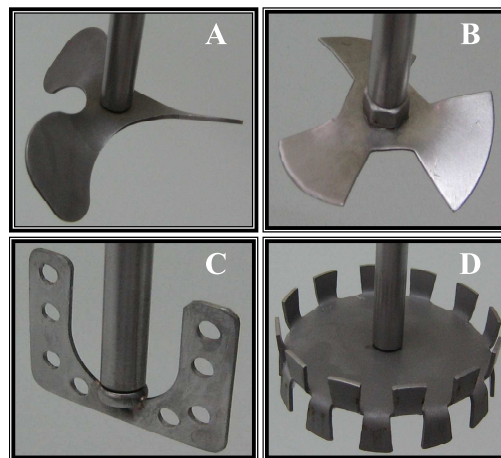


Figura 13: Diferentes tipos de impelidores testados: A) naval; B) pás inclinadas; C) âncora perfurada e D) centrífugo.

Estes ensaios foram realizados em quadruplicata, à temperatura de 25 °C, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7: Impelidores usados para a formação da emulsão

ENSAIO	IMPELIDOR
B1	Naval
B2	Pás Inclinadas
B3	Âncora Perfurada
B4	Centrífugo

3.2.2.3. Preparação de Partículas de Alginato Recobertas com Quitosana

Foram testadas duas metodologias baseadas no trabalho descrito por RIBEIRO *et al.* (2005). Nestas metodologias, realizou-se a formação das partículas de alginato e o posterior recobrimento das mesmas em um único estágio (MR1) e em dois estágios (MR2).

3.2.2.3.1. Produção e recobrimento em estágio único (MR1)

Para obtenção das partículas de alginato recobertas com quitosana, preparou-se uma emulsão contendo 24,5 mL de solução de quitosana a 0,53% (m/v) dispersa em solução de ácido acético a 1% (v/v) a pH 5,6 em 55,5 mL de óleo de milho. Esta emulsão foi formada pela agitação mecânica da mistura a 2.000 rpm por 10 minutos.

Posteriormente, fez-se a adição desta emulsão às partículas de alginato reticuladas produzidas como descrito no item 3.2.2, dispersas em óleo, seguida da agitação mecânica desta mistura a 2.000 rpm por 30 minutos a 25 °C.

Esta mistura foi vertida em 250 mL de solução de acetato de sódio a 0,3 mol.L⁻¹ e pH 5,6, e deixada em repouso por 20 minutos. Esta etapa tem como finalidade minimizar as possíveis perdas de água, evitando-se assim, a formação de pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxil do polímero, que poderiam levar à formação de agregados.

Com a formação de duas fases distintas, procedeu-se com a filtração da fase aquosa e conseqüente armazenagem das partículas em água deionizada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o esquema de recobrimento das micropartículas pode ser observado na Figura 14.

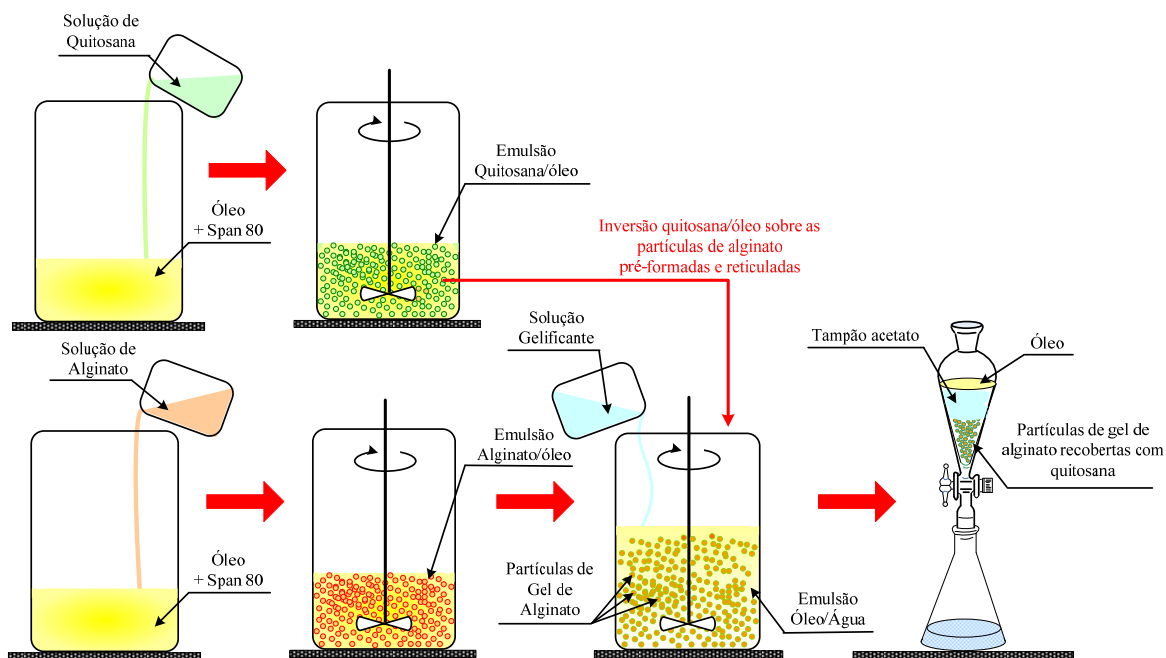


Figura 14: Produção e recobrimento em um único estágio das partículas de alginato com quitosana.

3.2.2.3.2. Produção e recobrimento em dois estágios (MR2)

As partículas de alginato reticuladas com cálcio obtidas através da metodologia descrita no item 3.2.2 e ressuspensas em 50 mL de água deionizada foram misturadas com 24,5 mL de uma solução de quitosana a 0,53% (m/v) em ácido acético a 1% (v/v) diluído em água, a pH 5,6 e mantidas sob agitação magnética por 30 minutos. Posteriormente, a mistura foi filtrada e acondicionada em água deionizada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o esquema de recobrimento das micropartículas pode ser observado na Figura 15.

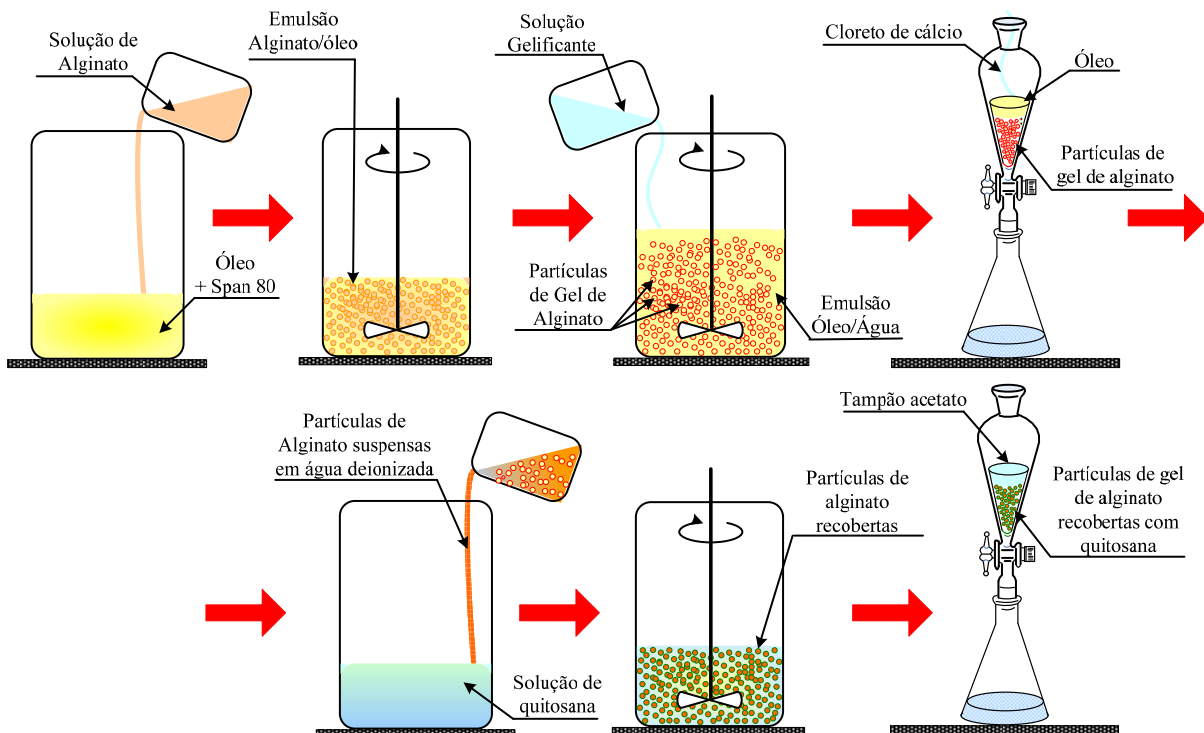


Figura 15: Produção e recobrimento em dois estágios das partículas de alginato com quitosana.

3.2.3. Preparação de Partículas de Quitosana

Foram realizados ensaios em triplicata para a formação das partículas de quitosana, em que 10 mL de solução de quitosana a 3% (m/v) dissolvida em solução de ácido acético a 1% (v/v) foram emulsificados em 200 mL de óleo de milho contendo 1% de Span 80, sob agitação mecânica de 2.000 rpm por 20 minutos a 25 °C. Completada a emulsificação, gotejou-se uma solução de 200 mL de hidróxido de potássio a 0,5 mol.L⁻¹, a uma taxa de 0,004 L.h⁻¹, para a gelificação das micropartículas, sendo a mistura agitada por 1 hora, com o impelidor do tipo naval.

A mistura resultante foi vertida sobre 300 mL de solução de hidróxido de potássio a 0,05 mol.L⁻¹, de modo a se garantir a reticulação total das partículas de quitosana e também propiciar a separação das fases aquosa e oleosa da emulsão para facilitar a

recuperação das partículas obtidas. A fase aquosa foi coletada e centrifugada a 7.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi então descartado, sendo as micropartículas ressuspendidas em água deionizada e então centrifugadas por mais duas vezes, sendo por fim ressuspendidas em água deionizada e armazenadas a 4 °C. A fim de investigar mais detalhadamente a produção das micropartículas de quitosana, diversas variáveis do processo foram selecionadas através de ensaios preliminares, de modo a se verificar seus efeitos nas características das partículas formadas, conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8: Variáveis envolvidas na preparação das micropartículas de quitosana.

Ensaio	Concentração de quitosana (%)	Taxa de agitação (rpm)	Proporção fase aquosa/oleosa (v/v)	Concentração de Span 80 na fase oleosa (%)
E1		1.000		
E2	2,0	1.500	1:5	---
E3		2.000		
E4		1.000		
E5	2,5	1.500	1:5	---
E6		2.000		
E7		1.000		
E8	3,0	1.500	1:5	---
E9		2.000		
E10			1:5	
E11			1:9	
E12	2,0	2.000	1:15	---
E13			1:20	
E14				1,0
E15				2,0
E16	2,0	2.000	1:20	3,0
E17				4,0

3.2.3.1. Preparação das Partículas de Quitosana Recobertas com Alginato

Foram adicionados 20 mL de solução de alginato a 0,1% (m/v) a uma vazão de $0,06 \text{ L.h}^{-1}$ às partículas de quitosana ressuspensas em 50 mL de água deionizada a pH 5,6, obtidas previamente através da metodologia descrita no item 3.2.3., sendo mantidas sob agitação magnética por 30 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 7.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e as partículas ressuspensas em 50 mL de solução aquosa de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Posteriormente centrifugou-se as partículas a 3.400 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as partículas em água deionizada, armazenando-as a 4°C .

3.2.4. Caracterização das Partículas

As partículas produzidas foram caracterizadas quanto a sua morfologia, diâmetro, distribuição de tamanhos, eficiência de incorporação de bactéria inativada e a sua estabilidade em soluções aquosas similares às condições gastrointestinais de tilápias do Nilo.

3.2.4.1. Morfologia

A morfologia e as características superficiais das partículas foram investigadas através do uso de microscopia ótica (RODRIGUES *et al.*, 2006) e microscopia eletrônica de varredura (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura foram coletadas alíquotas das partículas formadas, e estas foram mantidas a 25°C por 24 horas em dessecador para a secagem do material que foi, em seguida, recoberto com ouro e posteriormente analisado.

3.2.4.2. Diâmetro e distribuição de tamanho das partículas

Os diâmetros médios das partículas e suas distribuições de tamanho foram avaliados através de espectrofotometria de espalhamento a laser (RODRIGUES *et al.*, 2006). Cada medida foi efetuada cinco vezes para amostras de, no mínimo, três lotes diferentes, compreendendo até 15% da massa de cada lote por amostra.

3.2.4.3. Eficiência de incorporação de *Flavobacterium columnare*

A eficiência de incorporação do agente antigênico foi avaliada pela razão entre a quantidade de bactérias efetivamente encapsuladas e a quantidade inicial empregada na formação das partículas, ambas determinadas por espectrofotometria de luz visível com base na análise gravimétrica da massa seca de um volume conhecido de suspensão celular. Foram obtidas curvas de calibração com diferentes lotes de suspensão celular. Para cada lote, uma alíquota de 15 mL de suspensão celular foi filtrada através de uma membrana com poros de 0,22 μm . Em seguida, a membrana foi seca à 35 °C até obtenção de massa constante. Descontou-se a massa equivalente da membrana determinando-se, assim, a quantidade de células na suspensão filtrada.

No caso de partículas de alginato, uma amostra de 1 g de partículas úmidas preparadas seguindo a metodologia descrita no item 3.2.2 foi dissolvida em 9 mL de citrato de sódio a 0,05 mol.L⁻¹, de modo a obter-se a liberação das células bacterianas incorporadas pela dissolução da matriz de alginato. A amostra foi mantida sob agitação a 26 °C por 12 horas e em seguida foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em solução salina a 0,9% (m/v). A concentração bacteriana foi determinada por análise espectrofotométrica a 600 nm. O efeito dos componentes do gel foi descontado, tendo-se por base o tratamento similar de uma amostra com a mesma massa de micropartículas não contendo células.

Similarmente, amostras de 1 g de partículas úmidas de quitosana preparadas seguindo a metodologia descrita no item 3.2.3. foram dissolvidas em 9 mL de ácido acético a 1% (v/v) de modo a liberar bactérias incorporadas da matriz de quitosana. A amostra foi

mantida sob agitação a 26 °C por 12 horas e em seguida foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em solução salina a 0,9% (m/v). O efeito dos componentes do gel foi descontado, tendo-se por base o tratamento similar de uma amostra com a mesma massa de micropartículas não contendo células.

3.2.4.4. Estabilidade *in vitro* das partículas de alginato e das partículas de quitosana recobertas ou não com alginato

A estabilidade das micropartículas bem como a liberação das bactérias incorporadas em soluções que simulavam as condições gastrointestinais foram avaliadas pela incubação das micropartículas úmidas em soluções com diferentes valores de pH. Amostras contendo 0,2 g de micropartículas foram incubadas em tubos eppendorf a 26 °C por 12 horas (tempo médio de permanência do alimento no trato gastrointestinal das tilápias do Nilo) em 1,8 mL de água deionizada a pH 2,0 e 4,5 (previamente ajustada com HCl), PBS a pH 7,4 e tampão Tris a pH 9,0. Depois de incubadas, as amostras nas diferentes condições foram centrifugadas a 1.000 rpm por 30 minutos, para a remoção das partículas, (mas não das bactérias suspensas), sendo o sobrenadante analisado espectrofotometricamente a 600 nm de modo a se obter a quantidade de bactérias liberadas, empregando-se, para tal, curvas de calibração obtidas com cada solvente de forma isolada. A estabilidade das micropartículas foi analisada através de microscopia ótica após o tratamento com as diferentes soluções de incubação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparação e Caracterização de Partículas de Alginato

Para os estudos iniciais de formação de partículas de alginato não incorporando a bacterina e teste da reprodutibilidade de dados da literatura, selecionou-se o protocolo proposto por RODRIGUES *et al.* (2006). Nestes ensaios, realizou-se a formação das partículas a 25 °C, utilizando-se um impelidor do tipo naval. Na Figura 16 está apresentada a morfologia das partículas formadas através desta metodologia. Partículas com umidade entre 90 a 95%, esféricas e bastante lisas foram obtidas, e notou-se a presença de uma quantidade relativamente pequena de óleo residual. Na Figura 17 está apresentado o perfil de distribuição de tamanhos das partículas de alginato, percebendo-se a formação de uma curva de distribuição unimodal, com diâmetro médio de $39,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$. Estes resultados corroboram com os de RODRIGUES *et al.* (2006), que relatam a obtenção, nestas condições, de partículas de 32,9 μm de diâmetro médio.

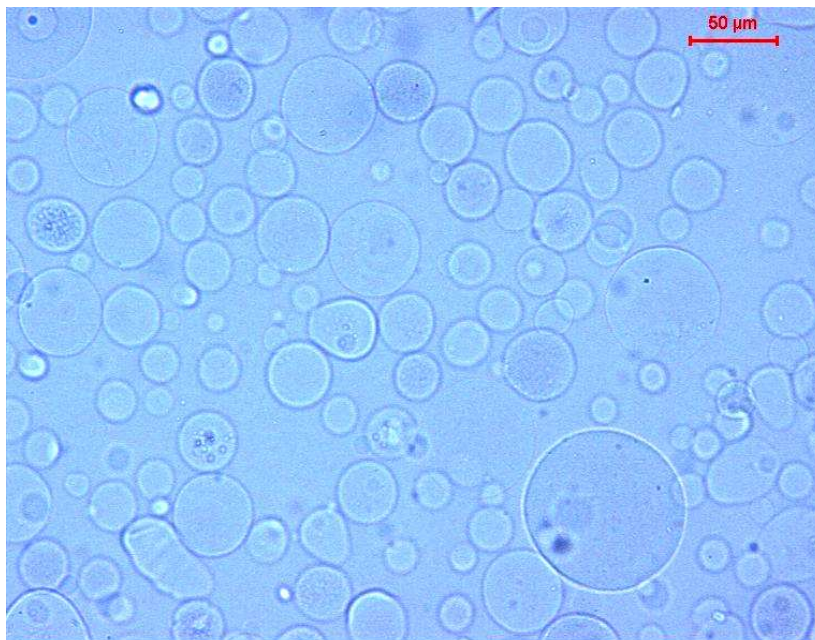


Figura 16: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato obtidas pela reprodução da metodologia de RODRIGUES *et al.* (2006).

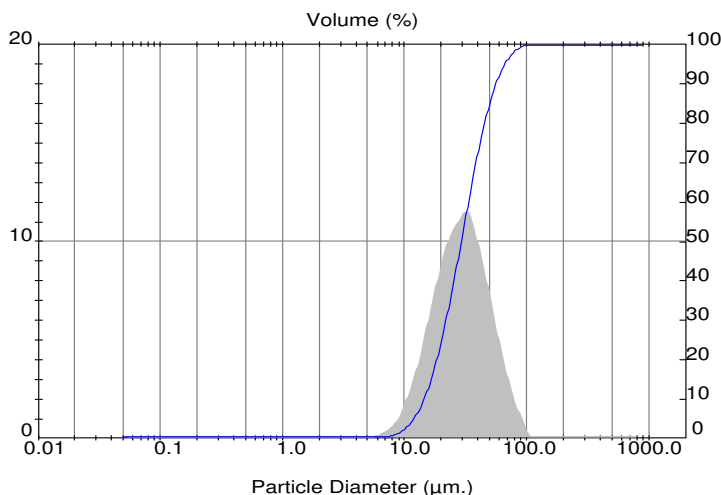


Figura 17: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de alginato.

Por apresentar tamanhos de partículas relativamente pequenos, ou seja, abaixo de 50 μm , este método pode ser usado como base para a construção dos sistemas desejados de liberação controlada de *Flavobacterium columnare*, realizando-se estudos posteriores quanto ao aprimoramento e padronização da metodologia para a construção de vacinas veterinárias de uso oral.

4.1.1. Influência da variação de temperatura sobre a morfologia e diâmetro das partículas de alginato

Tomando como base a metodologia proposta por RODRIGUES *et al.* (2006), buscou-se verificar de que forma fatores como a temperatura de formação das partículas seriam capazes de alterar suas características, mais especificamente a morfologia e a distribuição de tamanhos das partículas.

Nestes ensaios, realizou-se a formação das partículas utilizando-se o impelidor naval. Da Figura 18 à Figura 25, pode-se observar a diferença na morfologia e na distribuição de tamanhos típicos das partículas conforme foi alterada a temperatura

utilizada no sistema e na Tabela 9 são mostradas as variações no diâmetro médio provocadas pela alteração desta variável durante a formação de partículas.

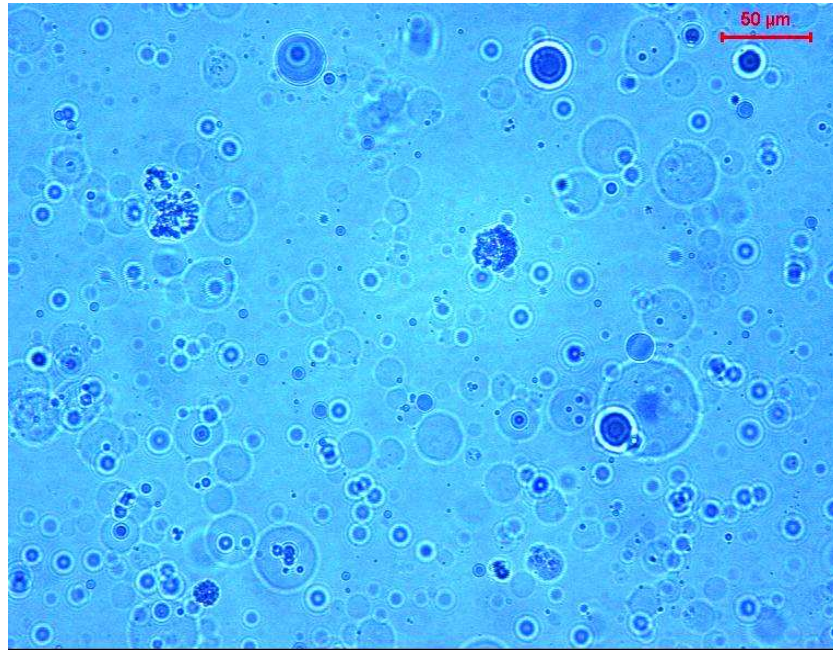


Figura 18: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas a 20 °C (Ensaio A1).

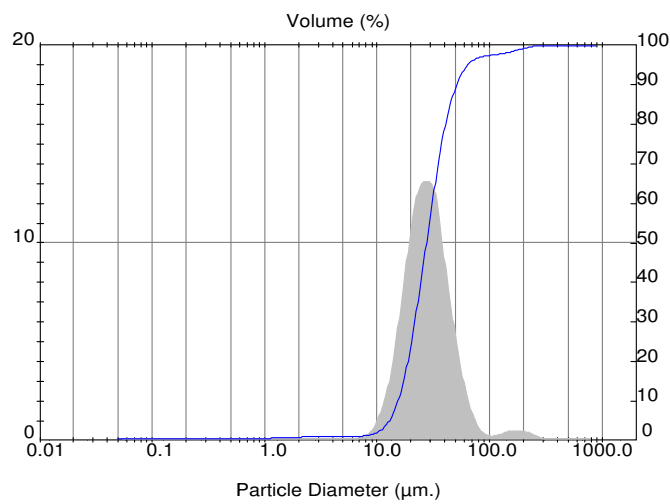


Figura 19: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas a 20 °C (Ensaio A1).

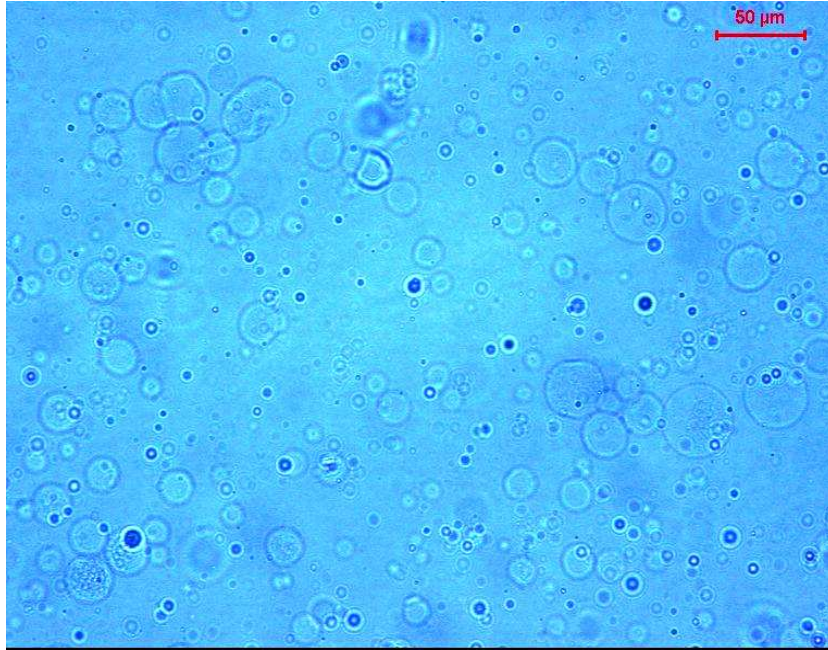


Figura 20: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas a 25 °C (Ensaio A2).

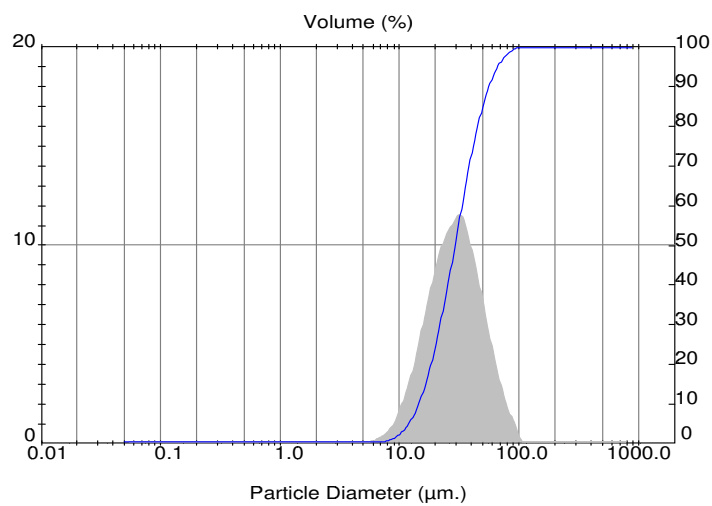


Figura 21: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas a 25 °C (Ensaio A2).

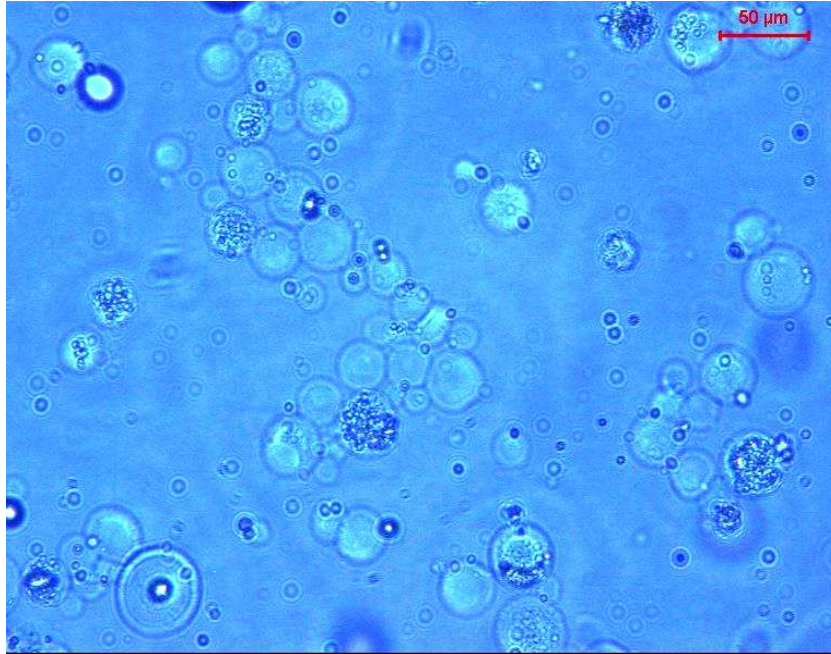


Figura 22: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas a 30 °C (Ensaio A3).

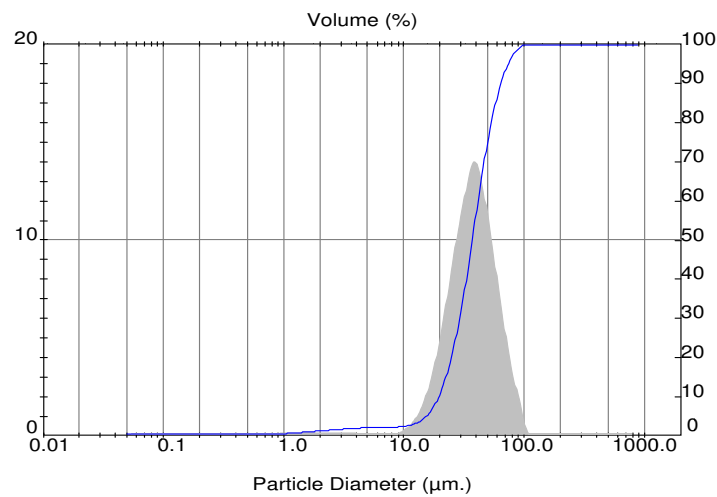


Figura 23: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas a 30 °C (Ensaio A3).

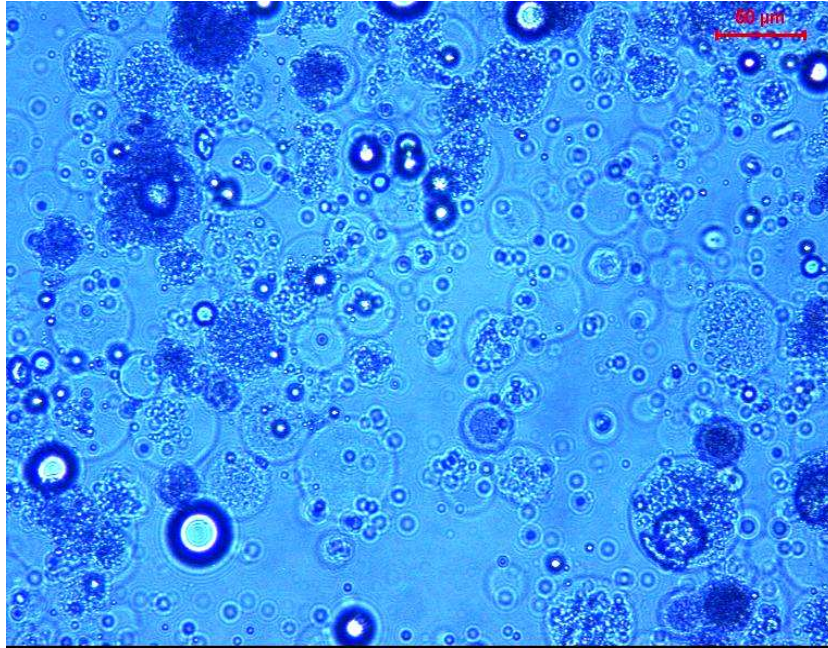


Figura 24: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas a 35°C (Ensaio A4).

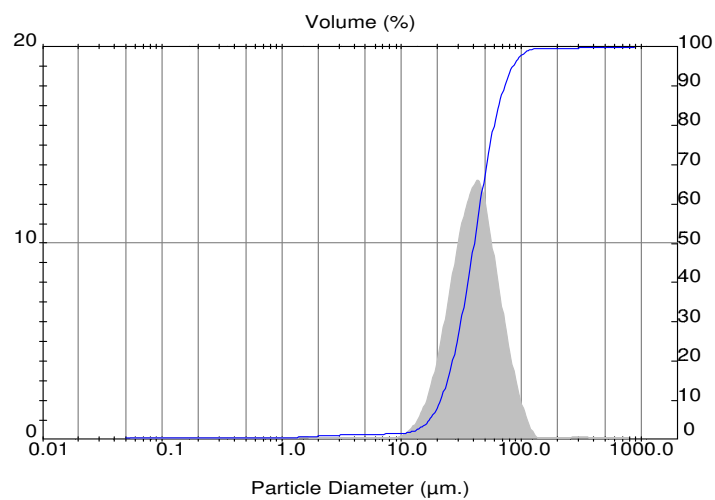


Figura 25: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas a 35°C (Ensaio A4).

Tabela 9: Diâmetros médios das partículas obtidas nos ensaios realizados com variação da temperatura média do vaso de mistura.

Ensaio	Temperatura (°C)	Diâmetro médio (μm)
A1	20	40 ± 3
A2	25	43 ± 1
A3	30	39 ± 1
A5	35	44 ± 2

Os dados coletados durante o experimento mostraram que os diâmetros médios das partículas não diferiram significativamente, quando analisados através do teste ANOVA ($p < 0,05$). Entretanto a morfologia, a distribuição de tamanhos e a retenção de óleo variaram.

No ensaio A1 observou-se a formação de partículas de tamanhos muito variados, desde muito grandes a muito pequenas, o que aumentou a faixa de distribuição de diâmetros. Além disso, notou-se maior presença de óleo residual na amostra, o que tende a interferir nas medições de distribuição de tamanhos. Outro detalhe a ser levado em consideração é o aparecimento de dois picos secundários na curva na distribuição de tamanhos, que podem ser oriundos da agregação das partículas no sistema de análise e da grande retenção de óleo nas amostras.

Pode-se observar com base nos resultados mostrados anteriormente que a condição que promoveu melhores resultados de formação de partículas foi a do ensaio A2, em que se utilizou a temperatura de 25 °C para a formação das partículas. Neste ensaio se observa a formação de partículas mais regulares, com menor retenção de óleo e boa distribuição de tamanhos, apresentando curva unimodal.

Nos ensaios A3 e A4 observa-se a gradual tendência à formação de partículas maiores, oriundas de intensa coalescência, assim como a formação de partículas muito pequenas, o que compromete a obtenção de picos estreitos de distribuição de tamanhos das

partículas. Também se observou uma forte tendência à retenção de óleo nas amostras, o que dificulta a própria análise de distribuição de tamanhos das mesmas.

Os diferentes comportamentos observados podem ser explicados pela alteração na viscosidade das soluções em decorrência da variação da temperatura e, conseqüentemente, nas propriedades da emulsão (ALMUTAIRI, 2008). Observou-se que a viscosidade da emulsão tende a diminuir com o aumento da temperatura, variando de 70,4 mPa.s a 20 °C para 38,1 mPa.s a 35 °C, principalmente devido à diminuição da viscosidade da fase contínua, no caso, o óleo, que neste mesmo intervalo de temperatura apresentou variação de viscosidade de 69,0 a 37,9 mPa.s (como indicado na Figura 26).

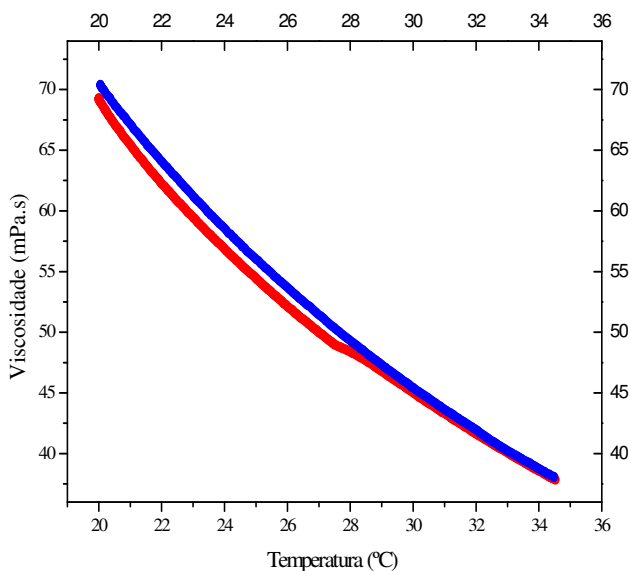


Figura 26: Variação da viscosidade com o aumento de temperatura (●: emulsão de solução aquosa de alginato a 3,5% em óleo de milho contendo 0,2% de Span 80 (9:63, v/v); ●: óleo de milho).

Estudos realizados por ALMUTAIRI (2008) demonstram que o aumento da temperatura de 25 até 80 °C reduzem a viscosidade de emulsões produzidas a diferentes taxas de agitação. PAL (1996) observou considerável influência da viscosidade de emulsões sobre o tamanho das gotas formadas, apontando uma clara relação entre o

aumento da temperatura e a diminuição da viscosidade e, por conseqüência, a formação de gotículas maiores. Como verificado no presente trabalho, o aumento da temperatura de formação da emulsão acarretou na obtenção de partículas maiores, uma vez que a elevação da temperatura tende a desestabilizar a emulsão, afetando as forças interfaciais e aumentando a coalescência das gotas do sistema. De acordo com OPAWALE e BURGUESS (1998), a elasticidade interfacial de surfatantes como o Span 80 é alterada pela variação da temperatura empregada no sistema, o que também pode ser responsável, em parte, pela desestabilização da emulsão. Apesar de menos sensível às alterações de temperatura em comparação a outros surfatantes lipofílicos de cadeia saturada, o Span 80 tende a favorecer a formação de emulsões mais estáveis quando a quantidade de sais na fase aquosa é baixa ou ausente e quando se faz uso de temperaturas mais brandas de formação da emulsão (OPAWALE e BURGUESS, 1998), como na presente situação. Como vantagem adicional, o uso de temperaturas mais amenas tem menor potencial de causar a degradação dos antígenos.

Segundo SHUBERT *et al.* (2005), a coalescência das gotas da fase dispersa pode ser reduzida pelo aumento da viscosidade da fase contínua, de modo a diminuir as colisões entre as gotas, o que pode levar à formação de micropartículas maiores ou a sua ruptura, resultando na formação de grandes aglomerados. No presente trabalho, apesar de a 20 °C as micropartículas produzidas apresentarem um diâmetro médio menor ($40 \pm 3 \mu\text{m}$), esta temperatura forneceu dois picos de distribuição de tamanhos, o que poderia comprometer a encapsulação do agente antigênico e o desempenho *in vivo* do biomaterial obtido. Assim, nos ensaios subseqüentes utilizou-se a temperatura de 25 °C.

4.1.2. Influência do uso de diferentes impelidores sobre a morfologia, o diâmetro e a distribuição de diâmetros das partículas de alginato

Neste ensaio, procurou-se verificar se diferentes impelidores usados no preparo da emulsão influenciariam a formação das partículas, alterando assim a sua forma, distribuição de tamanhos e superfície característica. Nestes ensaios, realizou-se a formação das

partículas a 25 °C. Da Figura 27 a Figura 34 pode-se observar a morfologia bem como a distribuição de tamanhos resultantes do uso dos diferentes impelidores.

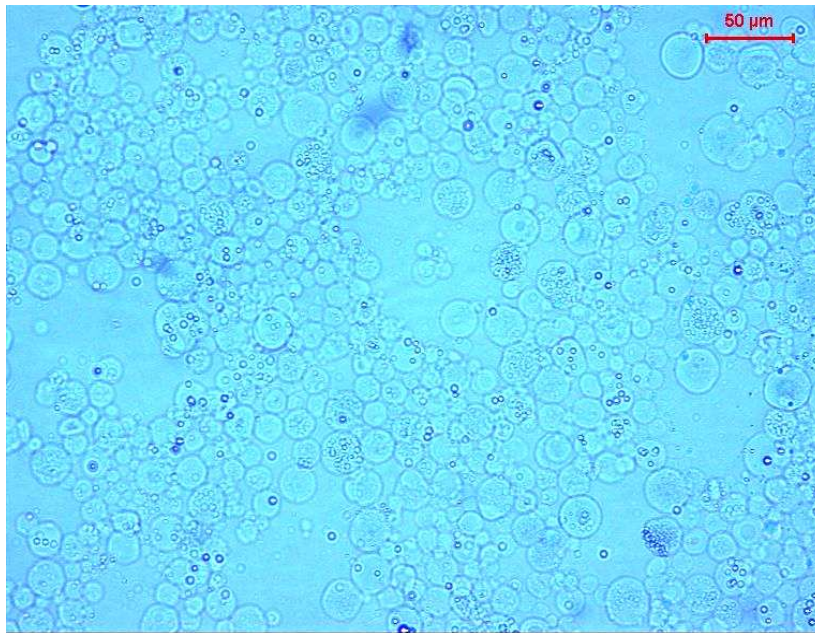


Figura 27: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas com o impelidor naval (Ensaio B1).

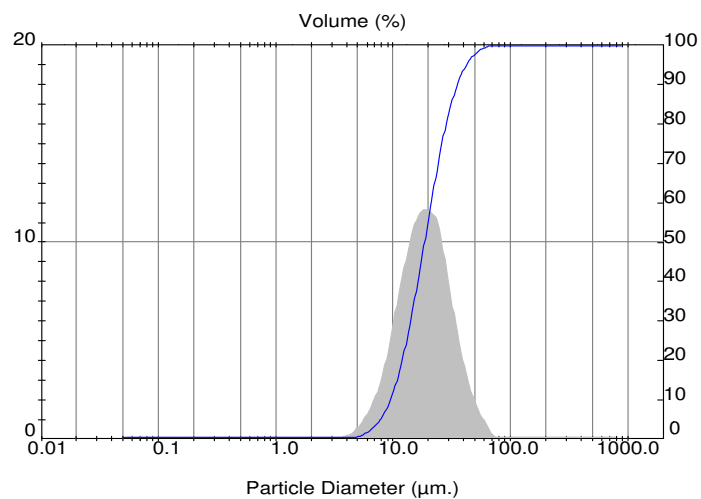


Figura 28: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas com o impelidor naval (Ensaio B1).

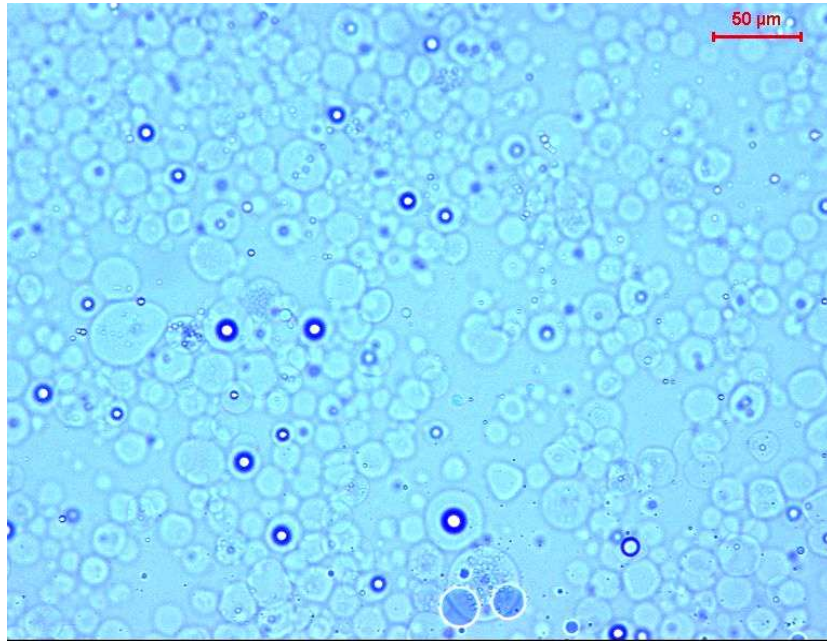


Figura 29: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas com o impelidor de pás inclinadas (Ensaio B2).

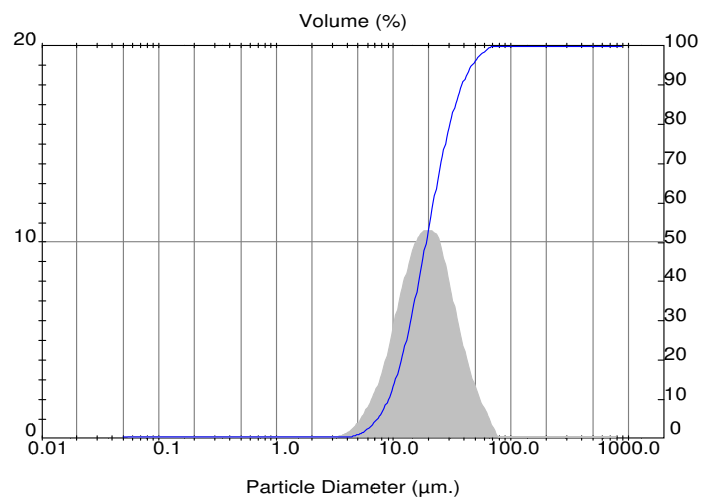


Figura 30: Perfil de distribuição de tamanhos das partículas produzidas com o impelidor de pás inclinadas (Ensaio B2)

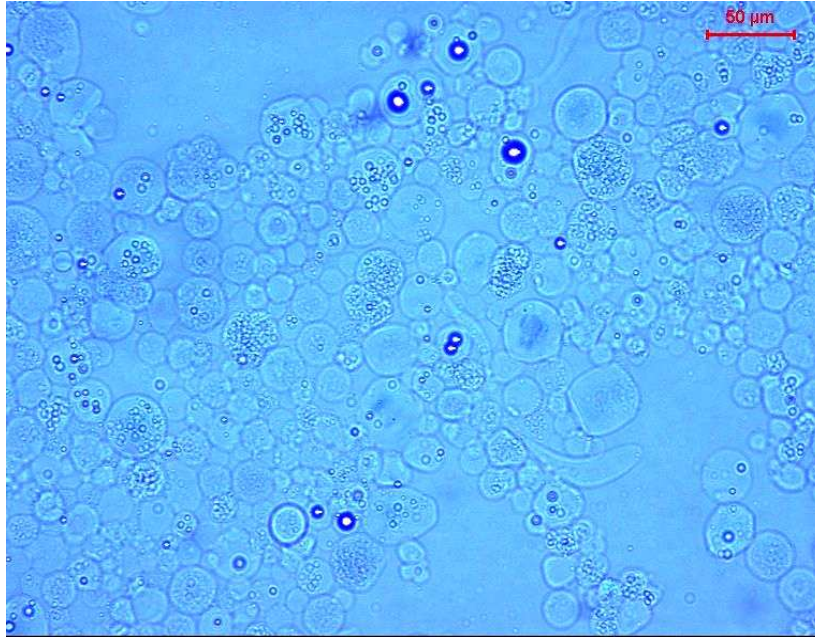


Figura 31: Aspecto morfológico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas com o impelidor âncora perfurada (Ensaio B3).

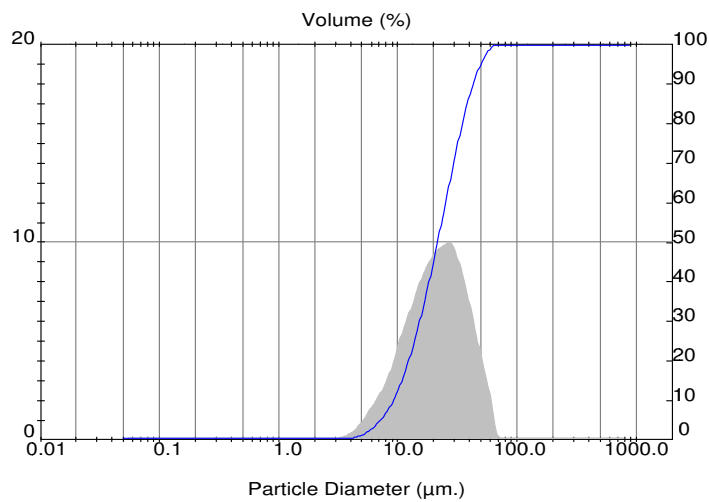


Figura 32: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas com o impelidor âncora perfurada (Ensaio B3).

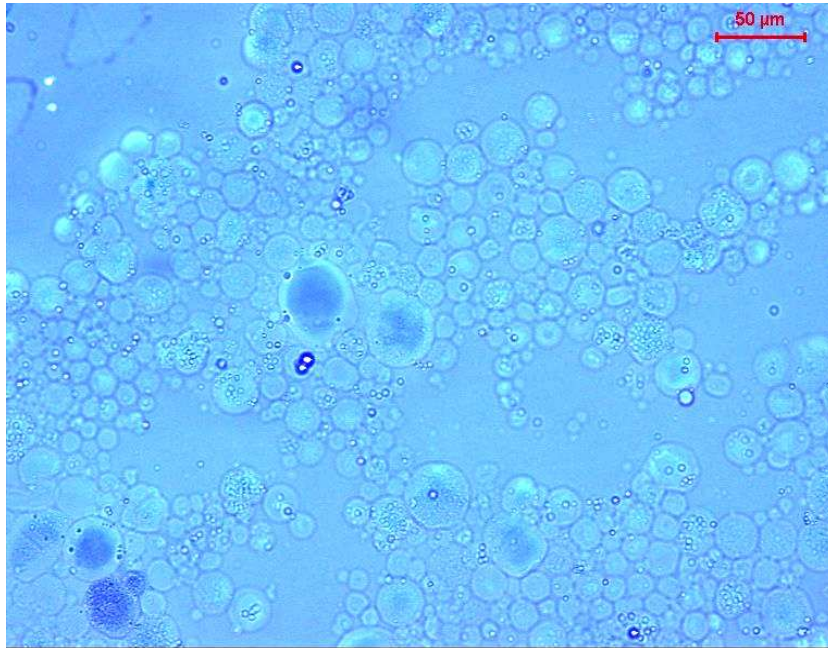


Figura 33: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas com o impelidor centrífugo (Ensaio B4).

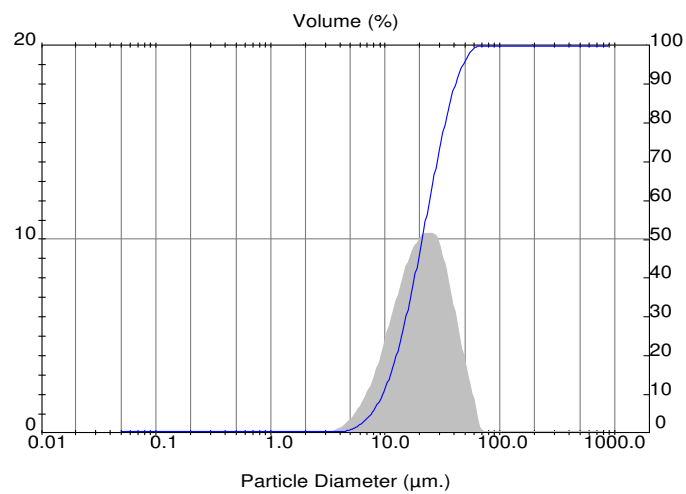


Figura 34: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas com o impelidor centrífugo (Ensaio B4).

Como se pode observar, o ensaio no qual se utilizou o impelidor do tipo naval (ensaio B1) produziu partículas esféricas, de superfície lisa e com boa distribuição de tamanhos, apresentando curva unimodal.

O ensaio B2 produziu partículas esféricas, com boa distribuição de tamanhos, porém observou-se que o uso deste tipo de hélice propiciou uma maior retenção de óleo nas amostras, o que pode comprometer a análise de distribuição de tamanhos.

O ensaio B3, resultou em partículas apresentando curva de distribuição unimodal. Apesar disto, nota-se a presença de partículas de formato irregular. Este comportamento não é desejado, uma vez que poderia vir comprometer o processo de encapsulação das bactérias, já que partículas deformadas além de incorporarem quantidades variadas de agente antigênico, também não teriam um comportamento mais previsível quanto à liberação do agente em condições gastrointestinais.

No ensaio B4, apesar de se ter obtido curvas de distribuição de tamanhos apropriadas, notou-se intensa retenção de óleo nas partículas de alginato formadas. Além disso, ocorreu a formação de partículas de tamanhos próximos a 50 μm e de partículas muito pequenas, de cerca de 4 μm de diâmetro. Este tipo de comportamento é bastante problemático, pois propicia uma encapsulação ineficiente do antígeno, resultando em números não uniformes de bactérias por partícula, o que pode comprometer a imunização dos peixes, uma vez que se deve, na medida do possível, garantir que os peixes recebam uma quantidade uniforme dos agentes antigênicos. Na Tabela 10 sumarizam-se as características das partículas obtidas, listando-se também seus diâmetros médios. Observa-se que, pelo teste ANOVA ($p < 0,05$), os tamanhos de todas as partículas diferiram significativamente em função do uso de distintos impelidores.

Com base nos ensaios realizados, constatou-se que o impelidor mais adequado para a formação de micropartículas de alginato é a hélice do tipo naval, pois apesar do diâmetro médio das partículas obtidas não ter sido o menor em valores absolutos, nesta condição, este sistema resulta em apenas moderada perda de material por espirramento e menor retenção de óleo, sendo atualmente o tipo de impelidor mais frequentemente relatado na literatura para a formação de micropartículas de alginato (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Tabela 10: Aspectos inerentes à produção de micropartículas com diferentes impelidores.

Ensaio	Impelidor	Diâmetro médio (μm)	Aspecto morfológico das partículas	Perda de material por espirramento	Presença de óleo residual
B1	Naval	26 ± 2	Pequena variabilidade de tamanhos Formato esférico	Moderada	Pouca
B2	Pás inclinadas	35 ± 2	Pequena variabilidade de tamanhos Formato esférico	Pequena	Moderada
B3	Âncora Perfurada	21 ± 1	Grande variabilidade de tamanhos Formato irregular	Grande	Moderada
B4	Centrífugo	24 ± 1	Grande variabilidade de tamanhos Formato esférico	Grande	Moderada

Segundo KICHATOV *et al.* (2003), o efeito do tipo de impelidor sobre a distribuição de tamanhos das gotas da emulsão formada é de difícil avaliação, devido especialmente às dificuldades associadas quanto à modelagem da coalescência das gotas. Entretanto, supõe-se que os diferentes resultados obtidos muito provavelmente decorrem do tipo de fluxo produzido por cada um dos impelidores testados, fluxos estes abordados em detalhes por JOAQUIM JR *et al.* (2007). O impelidor do tipo naval apresenta predominantemente componentes de velocidade axial que, para a produção de emulsões do tipo água/óleo, é mais conveniente, visto que impelidores que produzem fortes componentes de velocidade do tipo tangencial, como no caso dos demais impelidores, tendem a aumentar as perdas por espirramento de material no reator durante a homogeneização. Verificou-se no presente trabalho que, as componentes do tipo axial produzem micropartículas com boa distribuição de diâmetros, enquanto as componentes do tipo radial/tangencial (como é o caso do impelidor de pás inclinadas) tendem a formar micropartículas com diâmetros médios maiores.

O uso do impelidor do tipo âncora perfurada resultou em micropartículas deformadas, com grande distribuição de tamanhos, o que é bastante problemático do ponto de vista da aplicação final. A formação de partículas com o uso do impelidor do tipo centrífugo também é inadequada, uma vez que produz micropartículas com apreciável distribuição de tamanhos, apesar de estas terem formato regular e esférico.

Apesar destes impelidores apresentarem componentes de velocidade predominantes, seus padrões de fluxo poderiam ser alterados por parâmetros como o diâmetro e a posição do impelidor, a viscosidade do líquido, a utilização de mais de um impelidor por tanque e o emprego de chicanas (JOAQUIM JR *et al.*, 2007). Tais parâmetros não foram, entretanto, avaliados no presente trabalho.

4.1.3. Partículas de alginato recobertas com quitosana

No presente trabalho, duas diferentes metodologias de recobrimento de partículas de alginato com quitosana foram testadas. O objetivo destes ensaios era produzir partículas de alginato recobertas em toda a sua superfície pela quitosana, na forma de uma membrana de recobrimento. Segundo PENICHE *et al.* (2003), as partículas de alginato são capazes de se ligar fortemente à quitosana, havendo formação de uma membrana capaz de estabilizar a rede de gel iônica e desta forma, reduzir e controlar a permeabilidade da partícula ao agente encapsulado.

4.1.3.1. Avaliação do recobrimento, da morfologia, diâmetro e distribuição de tamanhos das partículas utilizando-se a metodologia MR1

Os resultados da metodologia de produção e recobrimento em um único estágio das partículas de alginato com quitosana estão demonstrados da Figura 35 à Figura 37, produzidas a 25 °C utilizando-se o impelidor naval.

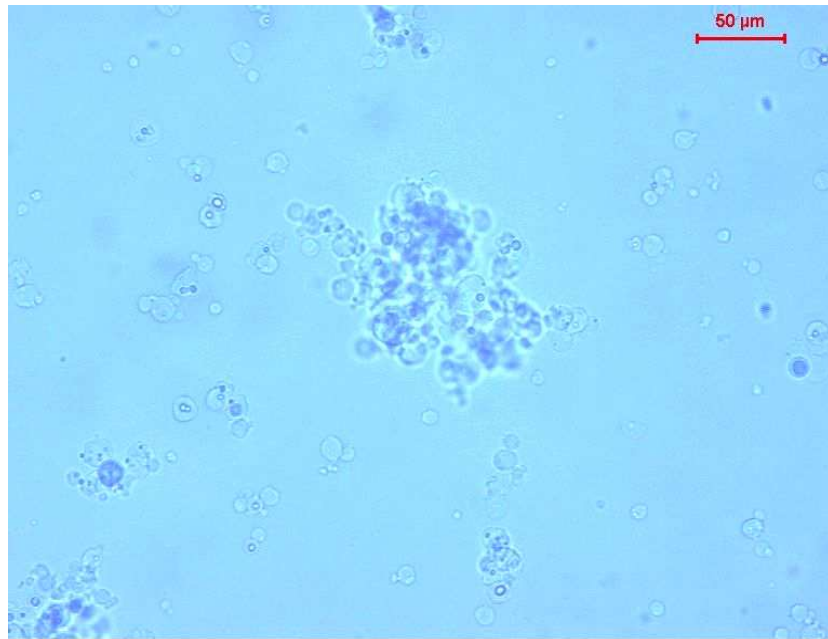


Figura 35: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas e recobertas com quitosana em uma única etapa.

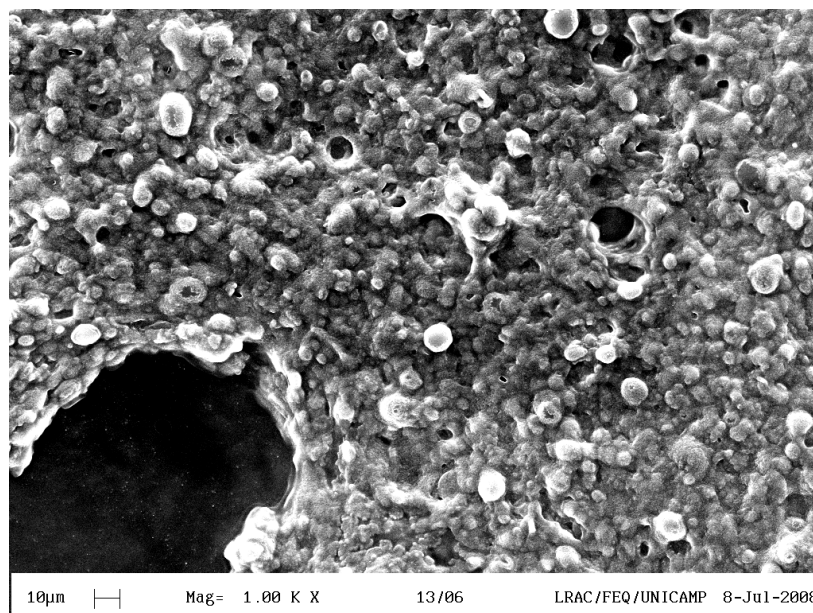


Figura 36: Aspecto morfológico típico em microscópio eletrônico de varredura (aumento de 1.000x) das partículas de alginato recobertas com quitosana em uma única etapa.

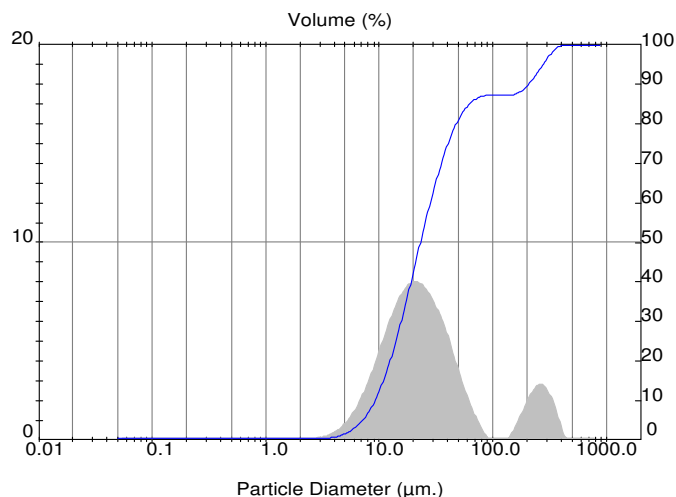


Figura 37: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas recobertas com quitosana em uma única etapa.

Como se pode observar, as partículas de alginato produzidas possuem formato esférico, e com o recobrimento, esta forma típica não foi modificada. Entretanto, nota-se, na Figura 35, a presença de aglomerados em toda a extensão da amostra, formados por coacervados de quitosana/alginato. Estes aglomerados são responsáveis pela formação de uma curva secundária de distribuição de tamanhos, como se constata na Figura 37. Nota-se, portanto que, esta metodologia tende a formar grandes aglomerados de partículas, de modo a aumentar a distribuição de tamanhos, e conseqüentemente aumentar também o diâmetro médio da amostra, que foi de $55 \pm 3 \mu\text{m}$.

Na Figura 36, observa-se a superfície das partículas recobertas, e nota-se a presença de uma fina membrana sobre a amostra. Observa-se também que ocorreu o recobrimento parcial das partículas de alginato. Isto pode ter acontecido em decorrência de limitada exposição das partículas de alginato à quitosana, devido à presença da fase oleosa, o que pode ter impedido a interação entre os polímeros em algumas regiões.

A agregação observada pode ser atribuída à forte interação eletrostática existente entre o alginato e a quitosana nas regiões de contato, já que estes se constituem em polieletrólitos de cargas opostas. Estes resultados são condizentes com os obtidos por

SILVA *et al.* (2006), que observaram um aumento no diâmetro médio das partículas de alginato recobertas com quitosana, de 18 para 150,8 μm , em processos de único estágio. Entretanto, no presente trabalho, a variação não foi tão intensa, já que a população de agregados era significativamente menor que a de partículas não aglomeradas. Nota-se que, enquanto o diâmetro médio da população principal foi de cerca de 22,5 μm , o diâmetro médio da população de agregados foi da ordem de 301,7 μm , o que de certa forma, se aproxima dos resultados observados por SILVA *et al.* (2006). No próximo item será discutido como se poderia contornar este tipo de problema.

4.1.3.2. Avaliação do recobrimento, da morfologia, do diâmetro e da distribuição de tamanhos das partículas utilizando-se a metodologia MR2

Os resultados do emprego da metodologia de produção e recobrimento em dois estágios das partículas de alginato com quitosana estão indicados da Figura 38 à Figura 40.

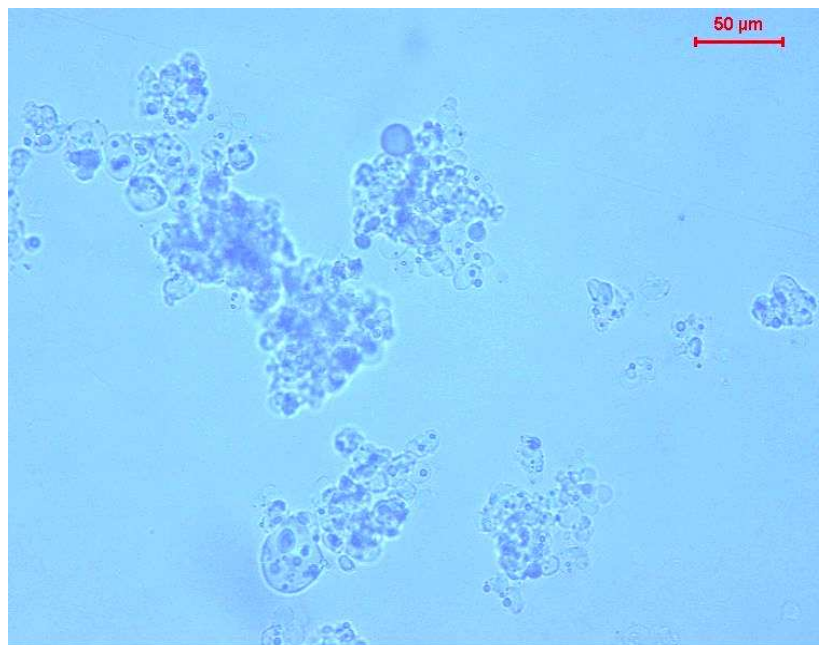


Figura 38: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de alginato produzidas e recobertas com quitosana em duas etapas.

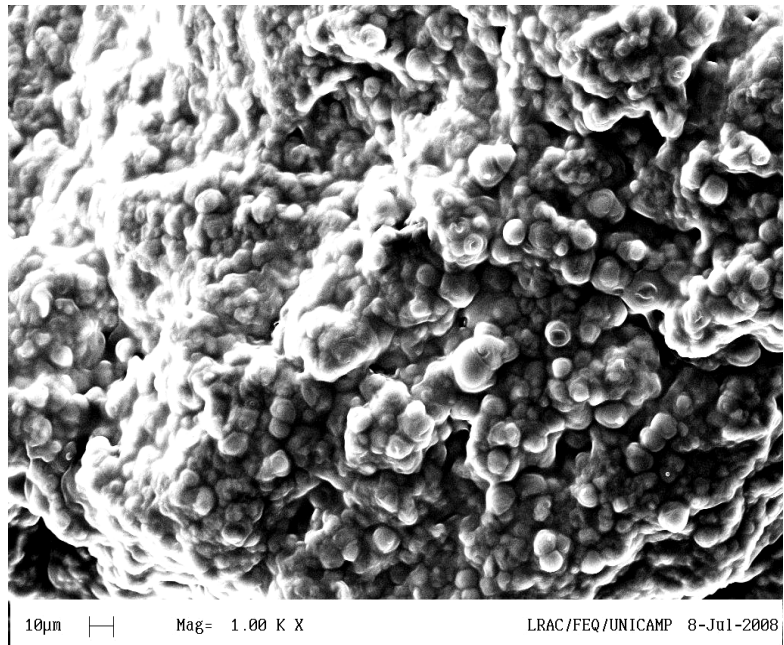


Figura 39: Aspecto morfológico típico em microscópio eletrônico de varredura (aumento de 1.000x) das partículas de alginato produzidas e recobertas com quitosana em duas etapas.

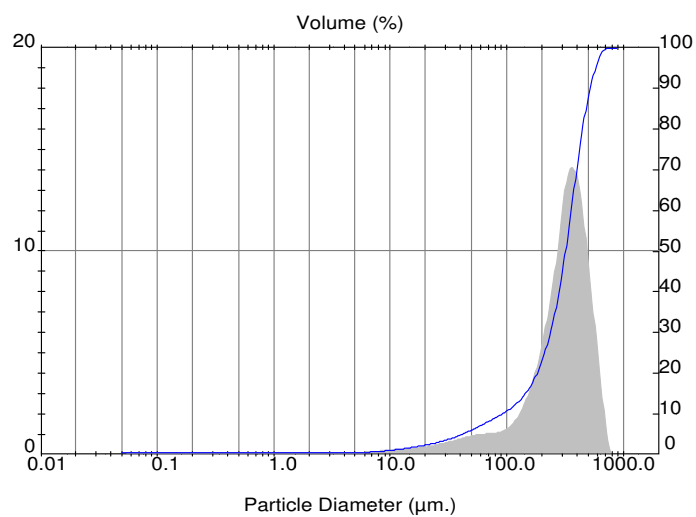


Figura 40: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas e recobertas com quitosana em duas etapas.

Na Figura 38 observa-se uma situação distinta da anterior, com maior preponderância de grandes agregados no sistema do que de partículas isoladas ou agregadas em pequeno número. Assim como verificado no procedimento MR1, a formação destes agregados se deve principalmente à forte interação entre a quitosana e o alginato, de modo que regiões das partículas de alginato não recobertas interagem com a fina camada de quitosana das partículas já recobertas. Apesar deste tipo de agregação não ser desejado, ele comprova a existência de ligações iônicas cooperativas entre as cargas opostas dos polímeros, como demonstrado por GÅSERØD *et al.* (1999). Com a formação destes agregados, verifica-se que o perfil de distribuição de tamanhos não é regular, conforme mostrado na Figura 40, com o deslocamento da curva de distribuição à direita, de modo a conferir um maior diâmetro médio para as partículas, estimado em $315 \pm 3 \mu\text{m}$.

No entanto, apesar desta metodologia implicar em um alto grau de agregação, a mesma mostrou-se eficiente no recobrimento das partículas de alginato pré-formadas, uma vez que, pela Figura 39, pode-se constatar o aparente recobrimento total e uniforme das partículas.

O recobrimento de partículas de alginato com quitosana utilizando procedimentos similares foram realizados por SILVA *et al.* (2006), que constataram que a molécula alvo incorporada (no caso, hemoglobina) em partículas recobertas pelo método MR1 apresentou liberação equivalente a de partículas não recobertas. Já para partículas recobertas pelo método MR2, notou-se uma redução de 50% na liberação de hemoglobina quando comparada com a de partículas não recobertas em contato com fluídos gástricos simulados. Este comportamento, segundo estes autores, se deve especialmente à intensa agregação das partículas, que contribuíram para uma maior retenção da proteína em pH baixo, uma vez que a área superficial de difusão era menor para estas partículas.

Com base nos resultados experimentais obtidos no presente trabalho e nos dados de SILVA *et al.* (2006), optou-se, então, por interromper os ensaios de recobrimento de partículas de alginato com quitosana, uma vez que as partículas recobertas pelo método MR1 não alterariam de forma significativa o perfil de liberação dos agentes antigênicos e

também porque com o método MR2, a melhora no perfil de liberação só seria alcançada devido à agregação das partículas, o que é, do ponto de vista da aplicação final, indesejado.

Apesar da metodologia MR2 fornecer partículas de alginato completamente recobertas com a quitosana, deve-se priorizar a redução da quantidade de agregados no sistema, de modo a aumentar a difusão das partículas no interior do trato gastrointestinal, e assim, melhorar a eficiência de liberação do antígeno. Para isso, seria necessária a realização de ajustes no modo de produção destas partículas recobertas.

Uma modificação possível seria a diminuição da quantidade de quitosana utilizada, de modo a reduzir a saturação do sistema, impedindo assim a formação de grandes aglomerados devido ao excesso de quitosana disponível. Outro possível ajuste seria a diminuição do tempo de exposição das partículas de alginato à quitosana, produzindo assim um filme mais fino, e com menor tendência à agregação às partículas circunvizinhas. Também se poderia alterar a velocidade de mistura das partículas pré-formadas à quitosana, diminuindo a quantidade de choques entre elas, reduzindo assim a possível interação interpartículas. Por último, poder-se-ia dar preferência ao gotejamento da quitosana sobre as partículas pré-formadas, e não a inversão das mesmas sobre a solução de quitosana. Isso melhora a dispersão da quitosana sobre o sistema, diminuindo o fenômeno de agregação, sem que ocorresse prejuízo sobre o recobrimento das partículas. Tais modificações, entretanto, não foram testadas.

4.1.4. Ensaios de incorporação de *Flavobacterium columnare* nas partículas de alginato

Buscou-se verificar qual a eficácia de incorporação da bacterina testada nas partículas de alginato produzidas pela metodologia proposta por RODRIGUES *et al.* (2006). Para tanto, produziu-se partículas de alginato na presença de diferentes quantidades iniciais de agente antigênico, variando-se a concentração da suspensão celular de 0,57 a 14,62 g.L⁻¹ (em termos de massa seca celular por litro de solução de alginato). Os resultados obtidos estão listados na Tabela 11.

Tabela 11: Características das micropartículas preparadas na presença de diferentes concentrações de suspensão celular.

Concentração inicial da suspensão celular (g.L⁻¹)	Eficiência de Incorporação (%)	Diâmetro médio (µm)
0,57	98,7	24 ± 1
6,48	99,3	27 ± 1
14,62	98,2	32 ± 1

Observou-se, para todos os casos, que a quantidade de bacterina incorporada foi de praticamente 100%. Notou-se também que as partículas apresentaram formato esférico e regular. A maior diferença nas características morfológicas deve-se à maior rugosidade apresentada pelas partículas nas quais a concentração celular utilizada foi maior, resultados estes que corroboram com os de RODRIGUES *et al.* (2006) de incorporação de *Aeromonas hydrophila* em partículas de alginato. As partículas obtidas apresentaram adequada distribuição de tamanhos, com pouca variação no diâmetro médio (partículas sem bactérias obtidas similarmente têm diâmetro médio de 24 µm). Isso pode ter ocorrido em função da bactéria utilizada apresentar tamanho pequeno, o que permite a encapsulação de uma grande quantidade de células sem que ocorram grandes alterações no diâmetro das partículas. As morfologias e a distribuições de tamanhos típicas das partículas são mostradas da Figura 41 a Figura 46.

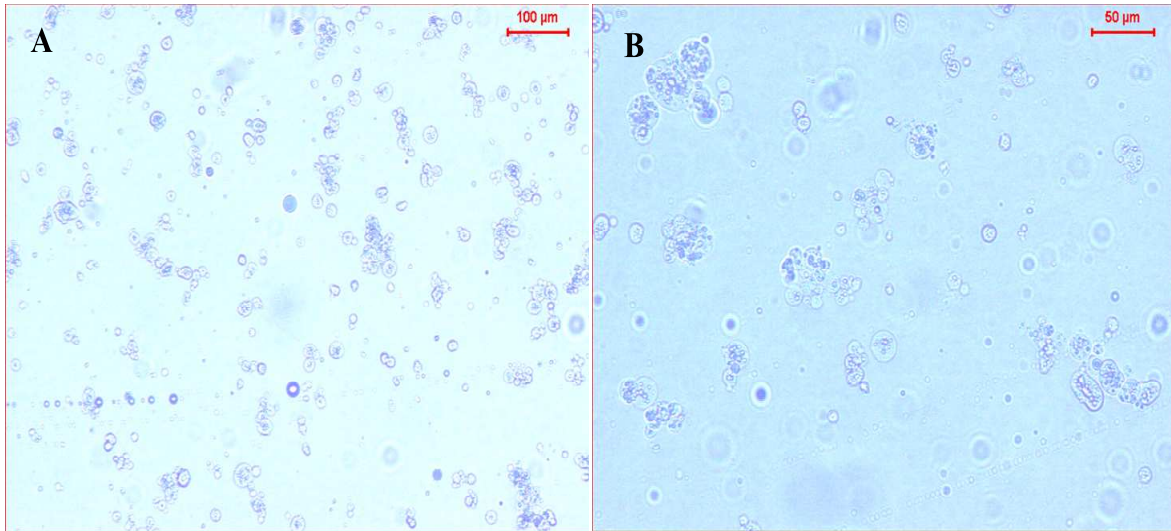


Figura 41: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (A: aumento de 100x; B: aumento do 200x) das partículas de alginato preparadas na presença de $0,57 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

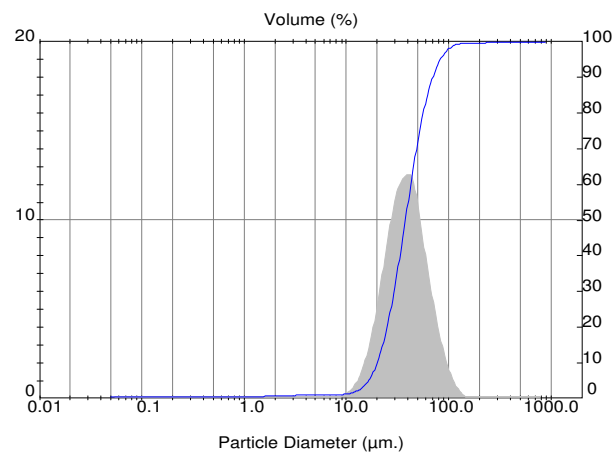


Figura 42: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de alginato preparadas na presença de $0,57 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

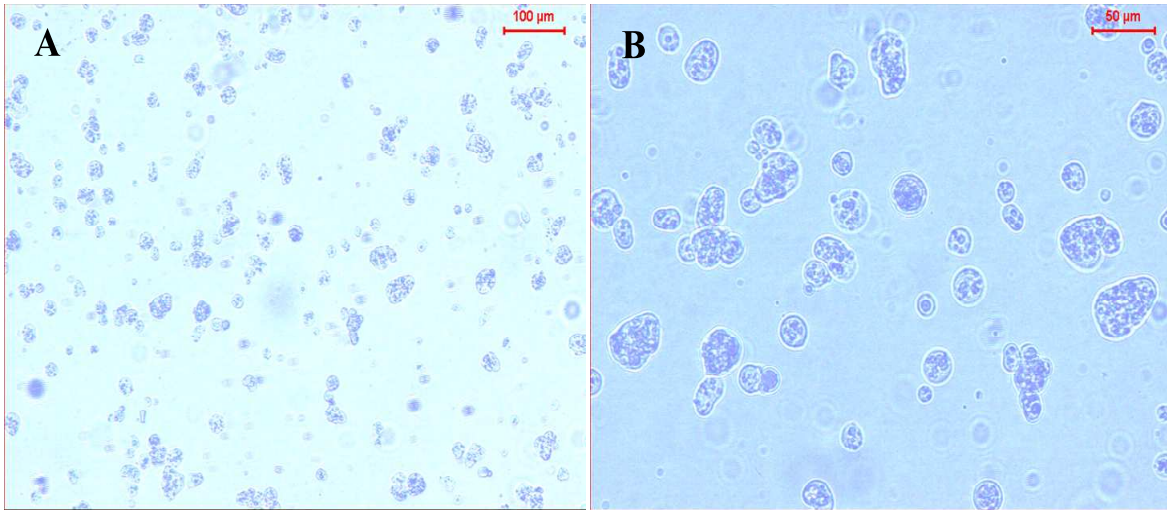


Figura 43: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (A: aumento de 100x; B: aumento de 200X) das partículas de alginato preparadas na presença de $6,48 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

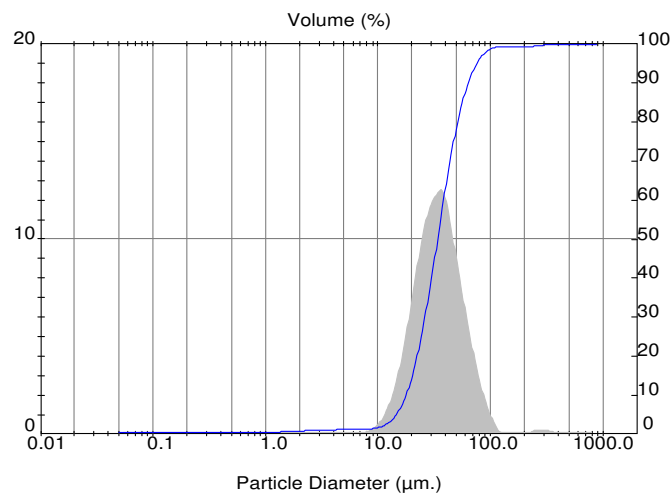


Figura 44: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de alginato preparadas na presença de $6,48 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

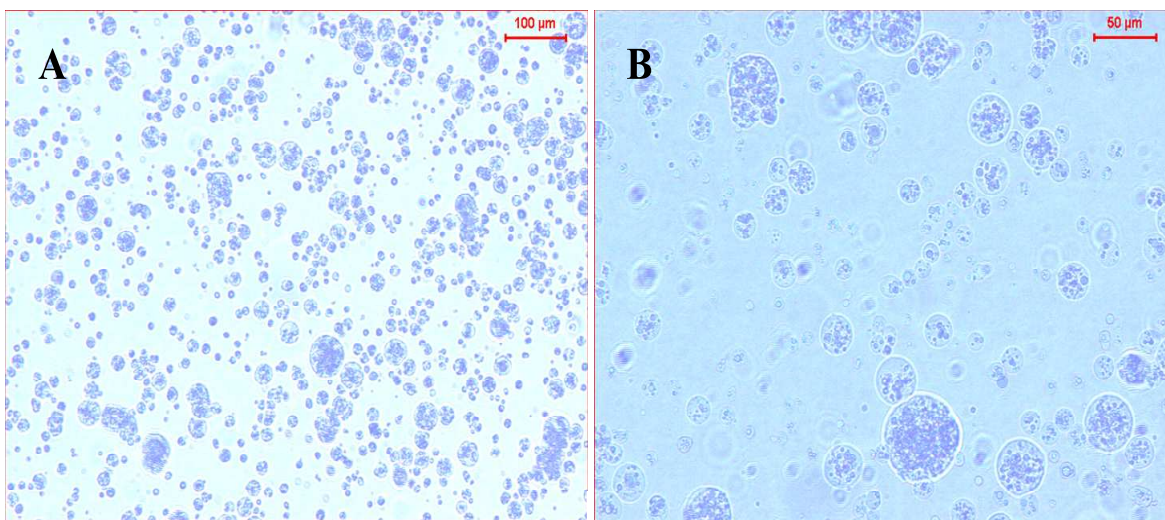


Figura 45: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (A: aumento de 100x; B: aumento de 200x) das partículas de alginato preparadas na presença de $14,62 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

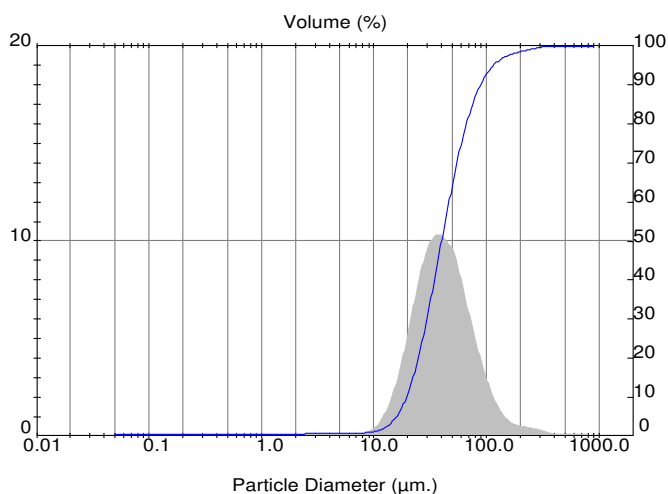


Figura 46: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de alginato preparadas na presença de $14,62 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

Na Figura 41 pode-se observar o efeito da incorporação da *Flavobacterium columnare* nas partículas de alginato quanto se utiliza uma concentração bastante baixa de antígeno. Nota-se que, aparentemente, nem todas as partículas observadas por microscopia

continham a mesma quantidade de antígeno. Isto deve ter ocorrido em função do pequeno tamanho da bactéria, além da forte tendência de aglomeração das mesmas, aliada ao fato de se tratar de um microorganismo translúcido, o que aumenta a dificuldade de visualização através da microscopia ótica.

Na Figura 43, nota-se a formação de partículas de formato menos regular, o que deve ser conseqüência da maior quantidade de antígeno empregada, o que também acarretou num leve aumento no tamanho médio das partículas, de 24 para 27 μm . Partículas de alginato contendo uma quantidade elevada de bactérias apresentam formato menos regular, mas ainda satisfatório (Figura 45). Estas partículas mostram-se totalmente recheadas com a bacterina, e apresentam maior diâmetro médio e maior tendência à aglomeração, muito provavelmente em decorrência da maior quantidade de antígeno empregada, que impediu a formação de gotas de alginato menores. Este resultado é condizente com o obtido por RODRIGUES *et al.* (2006), que observou que ao aumentar a quantidade de suspensão celular na solução de alginato para a formação das partículas, também se observava um aumento gradual em seu diâmetro médio.

4.1.5. Ensaio de estabilidade *in vitro* das partículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* em meios que simulam as condições gastrointestinais da tilápia do Nilo

De acordo com RODRIGUES *et al.* (2006), o trato gastrointestinal dos peixes varia de muito ácido, na região do estômago, devido à intensa produção de pepsinogênio e ácido clorídrico durante a alimentação, com valores de pH entre 2,0 e 4,5, até levemente alcalino na região do intestino, que apresenta pH entre 7,0 a 9,0. Desta forma, avaliou-se a estabilidade das partículas nas condições da região gastrointestinal dos peixes, de modo a se observar o perfil de liberação do agente antigênico nestas condições.

Assim, amostras contendo 14,3 mg de bactérias/mL de gel de alginato foram incubadas por 12 horas em soluções que simulavam as condições gastrointestinais dos peixes a uma temperatura de 26 °C (temperatura média ideal de acondicionamento das

tilápias do Nilo). O perfil de liberação das bactérias nos diferentes valores de pH e a variação de tamanho das micropartículas são mostrados na Tabela 12. Realizou-se este ensaio apenas para as amostras contendo 14,3 mg de bactérias/mL de gel de alginato por limitação na detecção das bactérias liberadas para as amostras contendo menores concentrações de bacterina.

Tabela 12: Perfil de liberação da bacterina nas micropartículas contendo 14,3 mg de bactéria/mL de gel de alginato em soluções aquosas de diferentes valores de pH e a variação do diâmetro médio após exposição a estas condições gastrointestinais simuladas.

pH da solução de incubação	Fração de bactérias liberadas após 12 horas (%)	Diâmetro médio após 12 horas (μm)
2,0	2,9	28 ± 2
4,5	2,9	27 ± 1
7,4	2,8	31 ± 3
9,0	2,9	30 ± 2

Em todos os casos, a variação de diâmetros foi inferior a 15%, e a quantidade de bactérias liberadas foi menor que 3%, o que indica que as micropartículas possuem a capacidade de manter-se como um gel íntegro, protegendo efetivamente o agente encapsulado, sendo, portanto, ideais neste sentido para a vacinação oral (GEORGE e ABRAHAM, 2006). Estes resultados são condizentes com o trabalho de SUGAWARA *et al.* (1994), LEMOINE *et al.* (1998) e RODRIGUES *et al.* (2006). Como a liberação do agente encapsulado pode ocorrer por mecanismos difusivo e pela degradação da rede polimérica da matriz de alginato e uma vez que a quantidade de agente antigênico liberado após a incubação foi muito pequena, pode-se supor que a liberação do agente ocorreu preferencialmente pelo mecanismo difusivo, já que a partículas mantiveram-se praticamente íntegras quando submetidas às condições gastrointestinais simuladas. Observou-se que as amostras não apresentaram mudança morfológica significativa ao longo da exposição às diferentes condições de pH.

Sendo assim, o comportamento das micropartículas frente às variações de pH se mostrou bastante satisfatório, uma vez que o agente antigênico praticamente não foi liberado nas condições gastrointestinais simuladas da tilápia do Nilo. Assim, hipoteticamente, os possíveis processos de desnaturação e degradação das proteínas bacterianas seriam prevenidos, dando maior oportunidade às micropartículas de transporem a parede intestinal e, uma vez na corrente sanguínea, liberarem lenta e eficazmente o material incorporado.

4.2. Preparação e Caracterização de Partículas de Quitosana

Partindo-se de adaptações da metodologia de RODRIGUES *et al.* (2006) para obtenção de micropartículas de alginato, realizaram-se ensaios de formação de partículas de quitosana pela gelificação com hidróxido de potássio de gotículas do polissacarídeo em fase aquosa dispersas em uma emulsão com óleo de milho, testando-se diversas condições de concentração, taxas de agitação e uso e concentração de surfatante para preparação das mesmas.

4.2.1. Efeito da concentração de quitosana e da taxa de agitação sobre a formação, morfologia e distribuição de diâmetros das partículas

Nestes ensaios, fixou-se a proporção de fase aquosa/oleosa em 1:5, variando-se a concentração de quitosana dissolvida em solução aquosa de ácido acético a 1% na faixa de 2 a 3% e a taxa de agitação do sistema de 1.000 a 2.000 rpm. As distribuições de tamanhos das partículas estão apresentadas na Figura 47 e na Tabela 13 estão sumarizados os resultados obtidos.

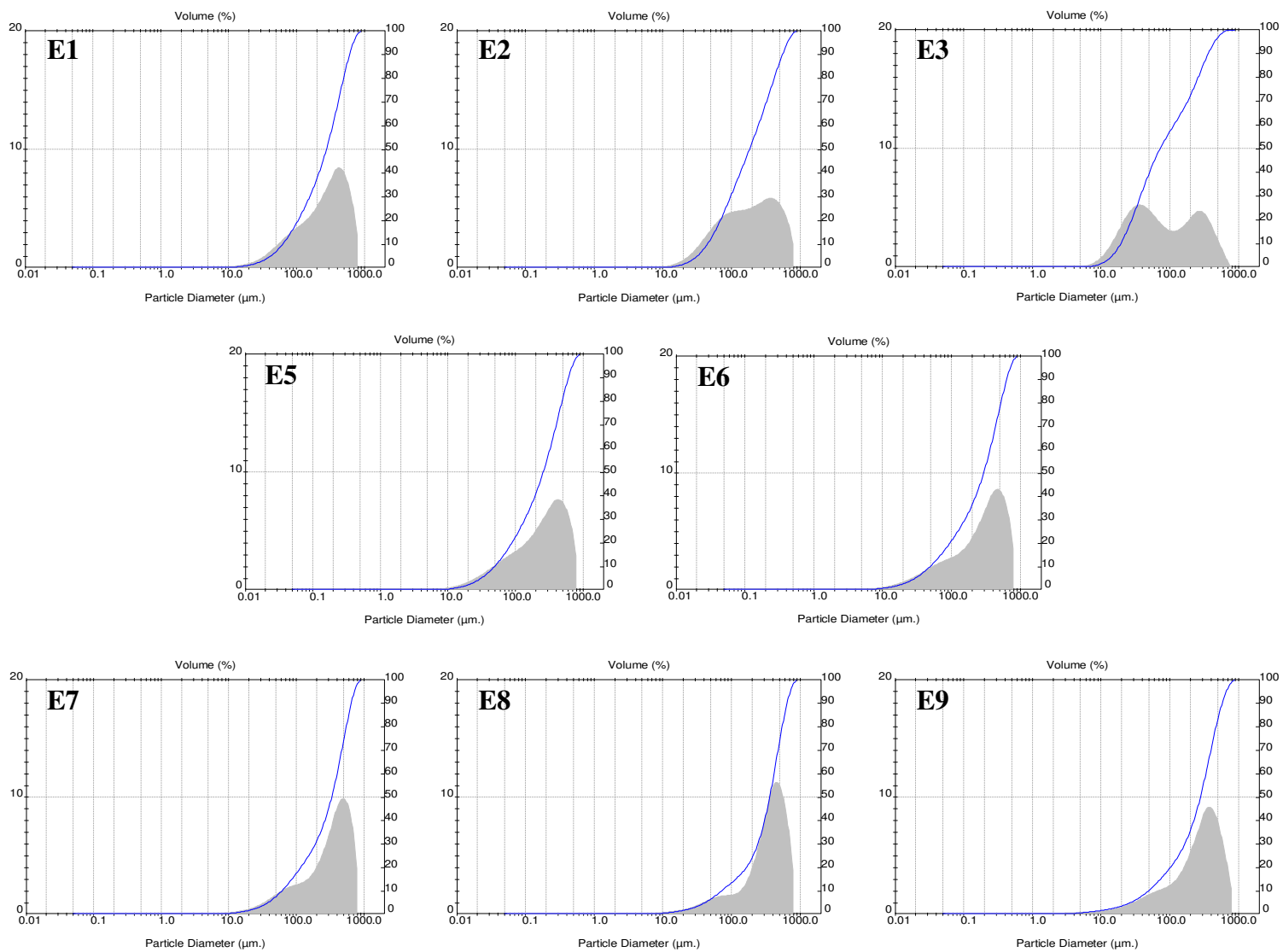


Figura 47: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas nos diferentes ensaios.

Tabela 13: Característica das partículas obtidas para os ensaios em que se variou a concentração da solução de quitosana e a taxa de agitação.

Ensaio	Concentração de quitosana (%)	Taxa de agitação (rpm)	Aspecto morfológico das partículas
E1		1.000	Partículas de variados tamanhos
E2	2,0	1.500	Partículas de variados tamanhos
E3		2.000	Partículas de variados tamanhos
E4		1.000	Aglomerados e zonas não particuladas*
E5	2,5	1.500	Poucas partículas de formato esférico
E6		2.000	Poucas partículas de formato esférico
E7		1.000	Poucas partículas de formato esférico
E8	3,0	1.500	Poucas partículas de formato esférico
E9		2.000	Poucas partículas e fraca reticulação

*partículas muito aglomeradas, não se realizou medição de tamanho.

Observa-se que, o uso de uma solução aquosa de quitosana à concentração de 2%, com agitação a 2.000 rpm se mostrou mais promissora para a formação das partículas, já que resultou nas partículas com menor diâmetro médio. As características morfológicas típicas destas partículas podem ser analisadas através da Figura 48. Neste caso, observa-se pelo gráfico de distribuição de tamanhos de partículas, a presença de duas populações distintas de partículas, uma com diâmetro médio de 41,4 μm e a outra com 258,9 μm . Nota-se também pela Figura 48 que as partículas de quitosana são bastante translúcidas e por isso, são de mais difícil visualização que as partículas de alginato.

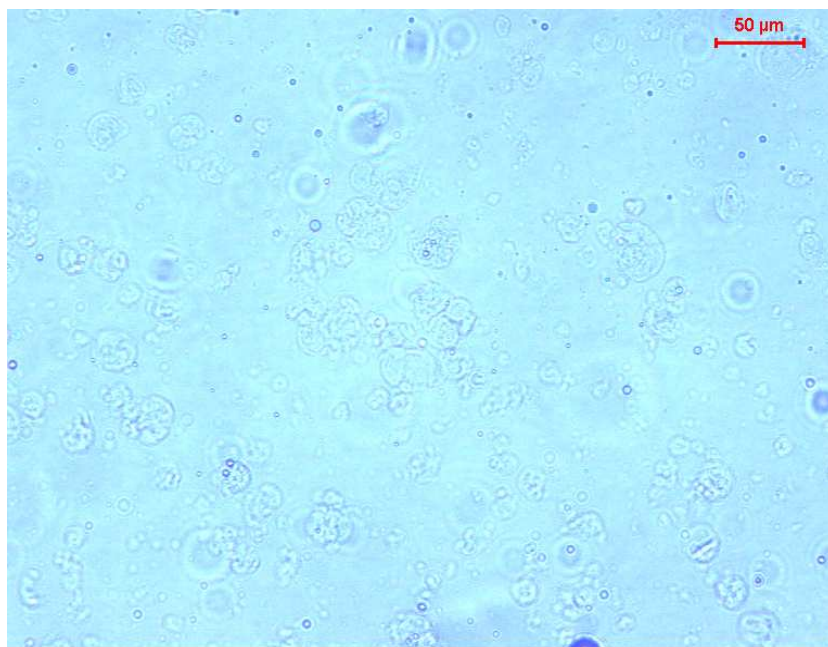


Figura 48: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E3).

Apesar da curva de distribuição de tamanhos para as partículas preparadas no ensaio E3 não apresentar comportamento unimodal, este resultado de medida mostrou-se o mais confiável, uma vez que toda a população de partículas ficou abaixo do limite superior de detecção do equipamento (1.000 μm), com residual inferior a 0,4%, o que não aconteceu para os demais ensaios. Desta forma, para os próximos ensaios, fixou-se a concentração de quitosana em 2,0%, utilizando-se agitação de 2.000 rpm para a formação da emulsão.

4.2.2. Efeito da proporção das fases aquosa e oleosa sobre a formação, morfologia e distribuição de diâmetros das partículas

Foram realizados ensaios de análise da influência da proporção da fase aquosa/oleosa sobre a formação das partículas de quitosana. Os aspectos morfológicos típicos, bem como as curvas de distribuição de tamanhos das partículas formadas nas

diferentes proporções de fase aquosa/oleosa são mostrados da Figura 49 a Figura 54, enquanto na Tabela 14 são resumidos os principais resultados observados.

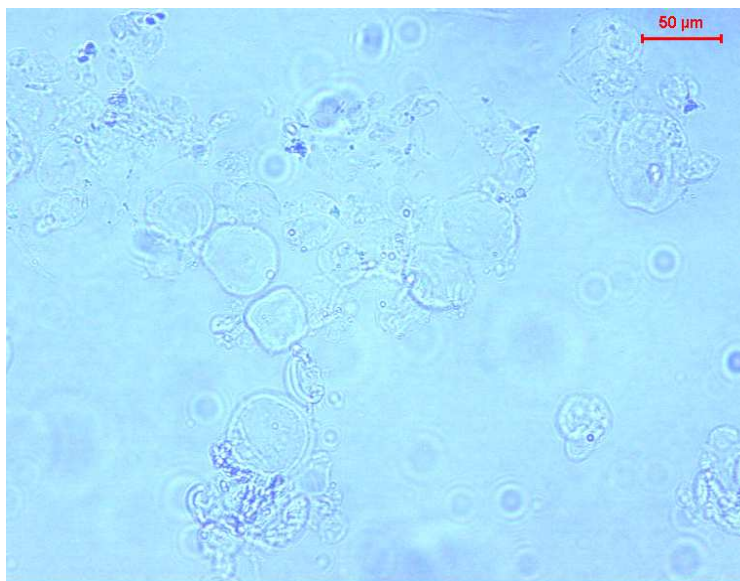


Figura 49: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:9 e taxa de agitação de 2.000 rpm. (Ensaio E11).

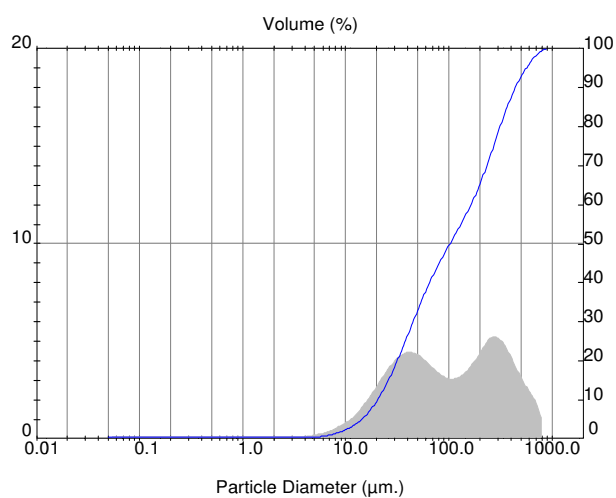


Figura 50: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:9 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E11).

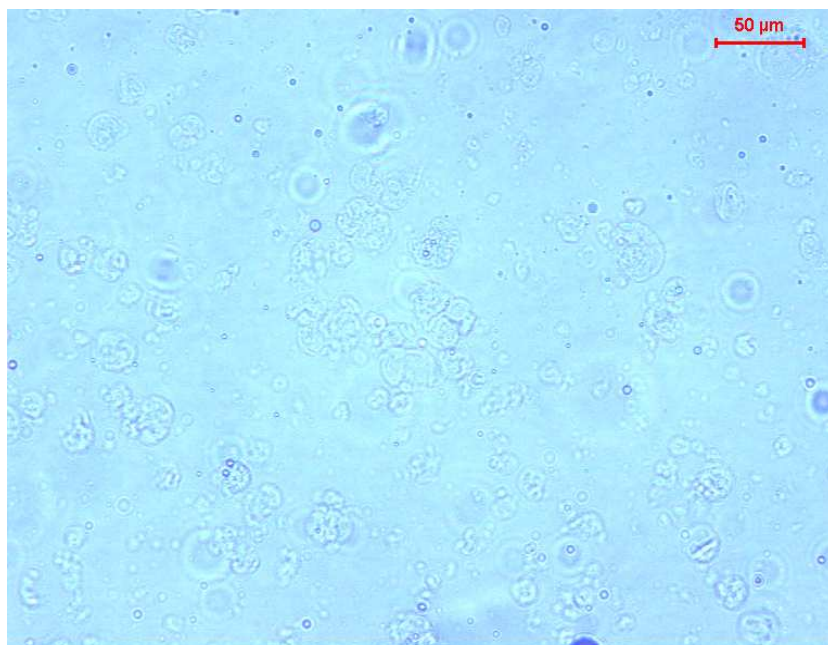


Figura 51: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:15 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E12).

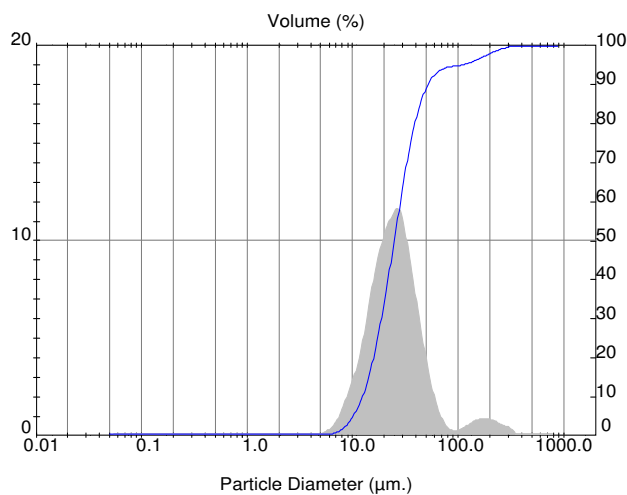


Figura 52: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:15 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E12).

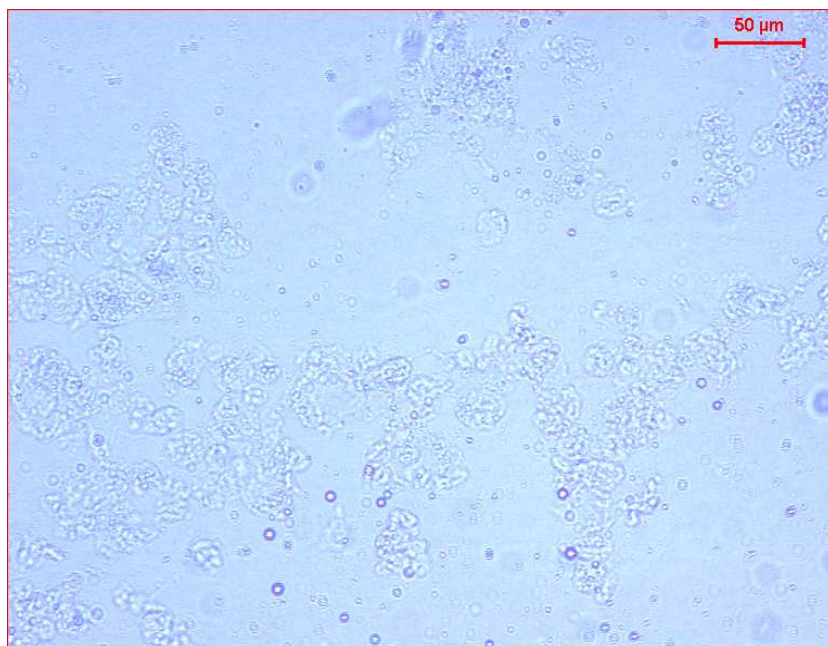


Figura 53: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E13).

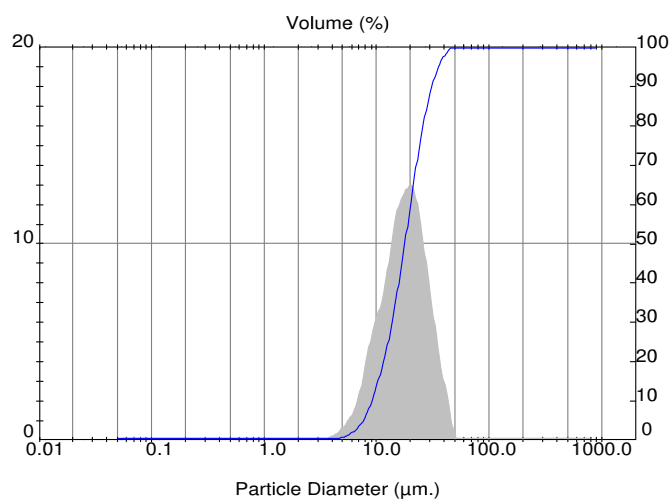


Figura 54: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0%, com proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm (Ensaio E13).

Tabela 14: Efeito da proporção das fases aquosa e oleosa nas partículas de quitosana formadas a partir de solução aquosa de quitosana a 2,0%.

Ensaio	Proporção da fase aquosa/oleosa	Diâmetro médio das partículas (μm)	Aspecto morfológico das partículas
E10	1:5	148 ± 8	Grande quantidade de aglomerados
E11	1:9	159 ± 13	Muitas partículas deformadas
E12	1:15	30 ± 5	Redução de aglomerados e deformação
E13	1:20	20 ± 1	Partículas menores e menos deformadas

Observou-se que para os ensaios que utilizaram uma proporção de fase aquosa/oleosa de 1:5 e 1:9 ocorreu a formação de dois picos de distribuição de tamanhos, o que pode ser indício da fraca estabilidade e de problemas quanto à homogeneização do sistema, levando à formação de partículas irregulares e de diferentes tamanhos. Com o aumento da proporção da fase aquosa/oleosa de 1:5 para 1:15 ocorreu uma redução em cinco vezes no tamanho das partículas. Também se observou a formação de curvas de distribuição de tamanhos mais estreitas para maiores proporções de óleo. No entanto, como se pode observar na Figura 53 e Figura 54, o aumento na proporção de fase aquosa/oleosa em 1:20 forneceu resultados ainda mais satisfatórios, uma vez que neste ensaio observou-se a formação de partículas ainda menores e com curva de distribuição de tamanhos unimodal. Apesar das partículas formadas possuírem tamanhos adequados frente à aplicação final, estas não possuíam forma esférica, o que poderia comprometer a liberação controlada do agente vacinal.

Estes resultados são condizentes com os obtidos por SHANMUGANATHAN *et al.* (2008), que observaram grande variabilidade na morfologia e distribuição de tamanhos de partículas de quitosana quando a proporção de fase aquosa/oleosa foi alterada de 1:12 para 1:25. Estes autores notaram que para proporções de fase aquosa/oleosa menores, ocorria a formação de agregados e maior variabilidade na distribuição de tamanhos, bem como para proporção de fase aquosa/oleosa maiores observaram-se a formação de

coacervados de estrutura mais frágil. Mediante os resultados obtidos, foram realizados ensaios de análise da influência da adição de Span 80 na fase oleosa a diferentes concentrações, uma vez que este poderia ajudar na estabilização das gotas e propiciar assim, a formação de partículas mais regulares.

4.2.3. Efeito da variação da concentração de tensoativo nas características das partículas de quitosana

Os resultados da análise do efeito da adição de concentrações crescentes de Span 80 estão resumidos na Tabela 15 e da Figura 55 à Figura 62 são mostrados os aspectos morfológicos típicos e as curvas de distribuição de tamanhos destes ensaios.

Na Figura 53 e Figura 54, já indicadas anteriormente, são mostrados os aspectos morfológicos típicos e a curva de distribuição de tamanhos das partículas formadas sem adição de Span 80 (Ensaio E13).

Tabela 15: Efeito da adição e concentração de Span 80 à fase oleosa sobre a formação, morfologia e distribuição de tamanhos das partículas de quitosana obtidas.

Ensaio	Concentração de Span 80 na fase oleosa (%)	Diâmetro médio das partículas de quitosana (μm)	Aspecto morfológico característico
E13	0,0	20 ± 1	Partículas agregadas e bastante deformadas
E14	1,0	17 ± 2	Partículas agregadas e poucas partículas esféricas
E15	2,0	11 ± 3	Intensa agregação e poucas partículas esféricas
E16	3,0	10 ± 2	Intensa agregação e poucas partículas esféricas
E17	4,0	9 ± 4	Menor agregação e partículas deformadas

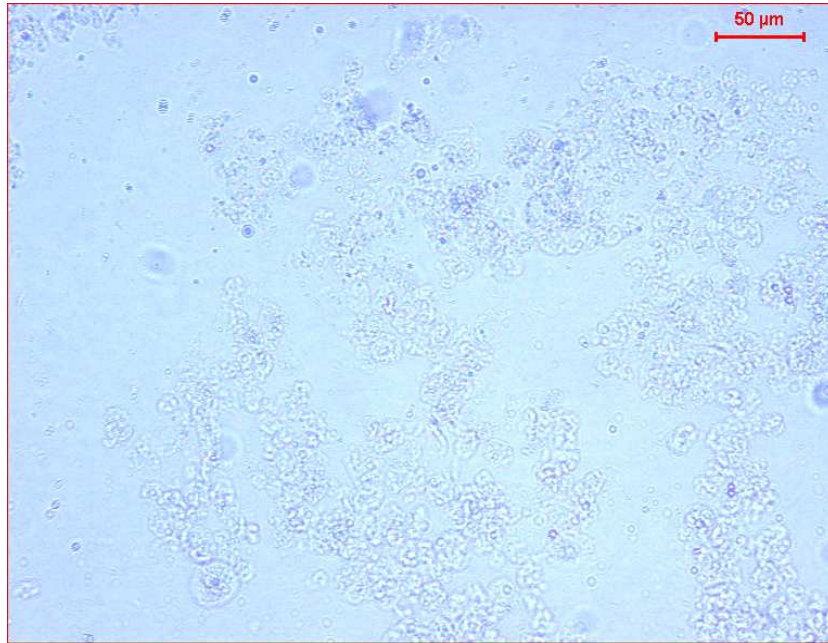


Figura 55: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 1% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E14).

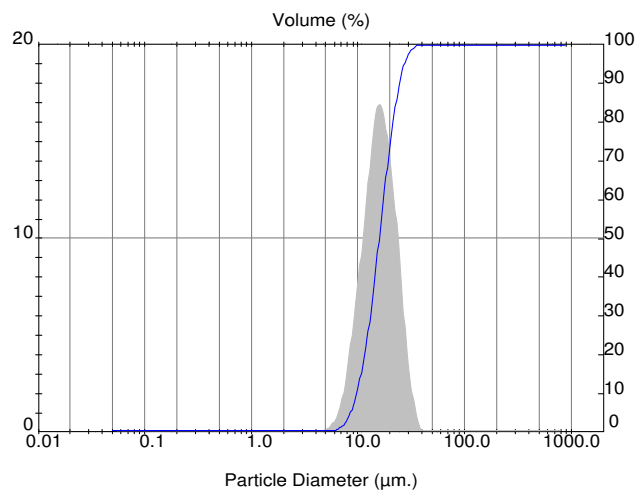


Figura 56: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 1% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E14).

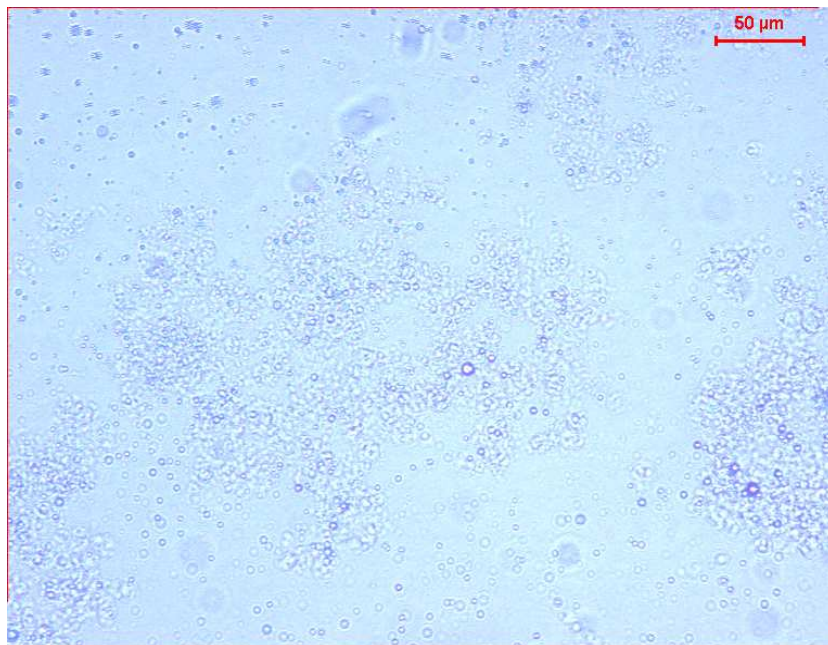


Figura 57: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 2% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E15).

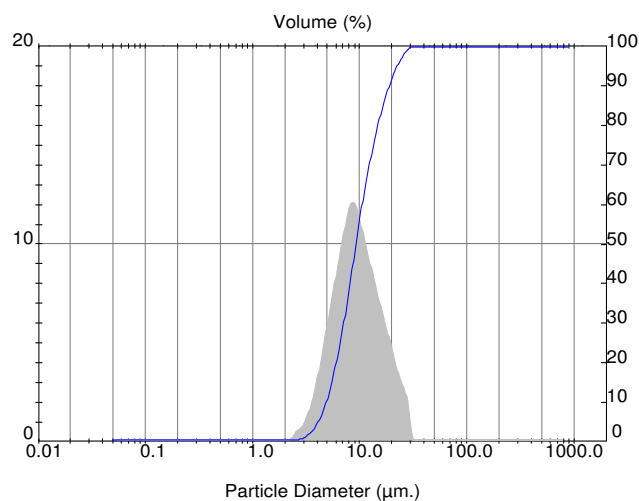


Figura 58: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 2% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E15).

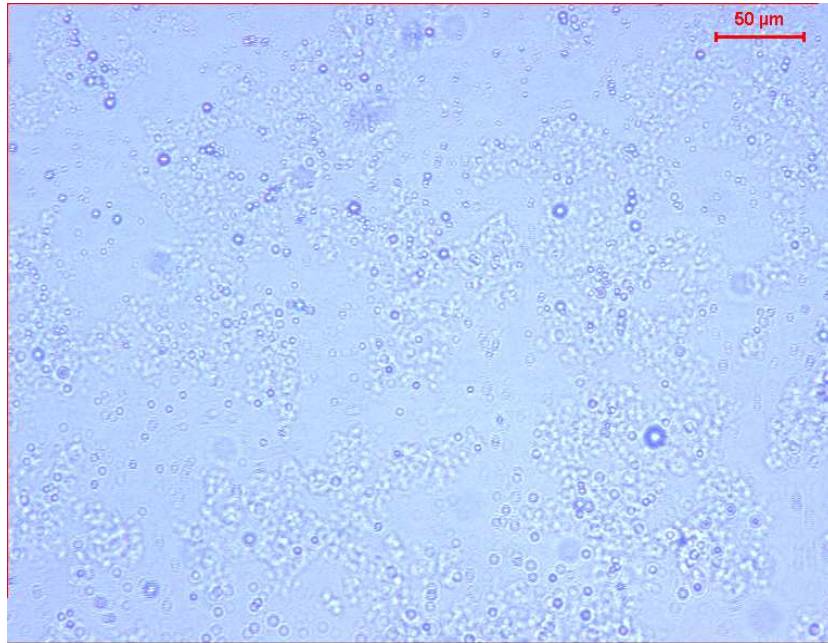


Figura 59: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 3% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E16).

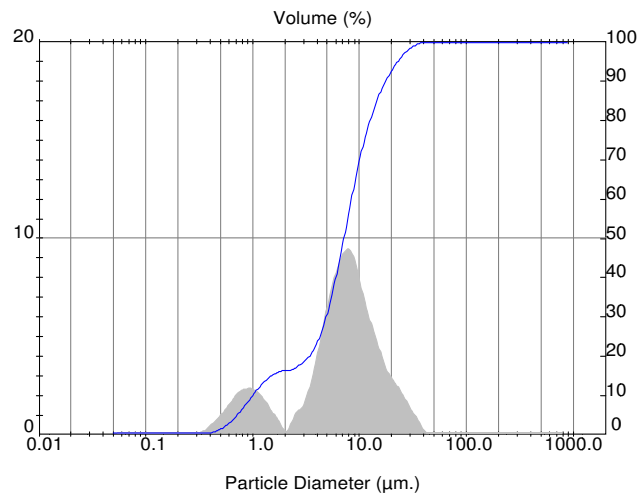


Figura 60: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 3% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E16).

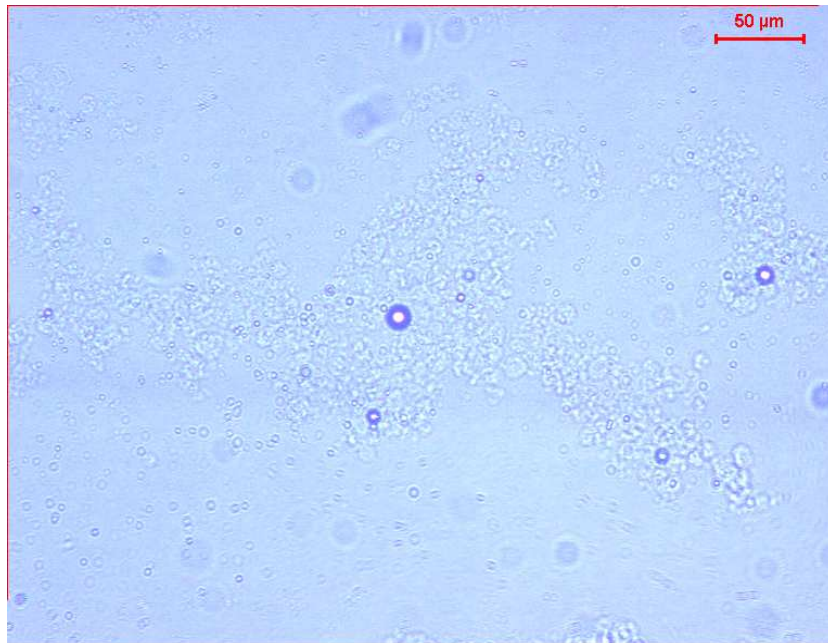


Figura 61: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 200x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 4% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E17).

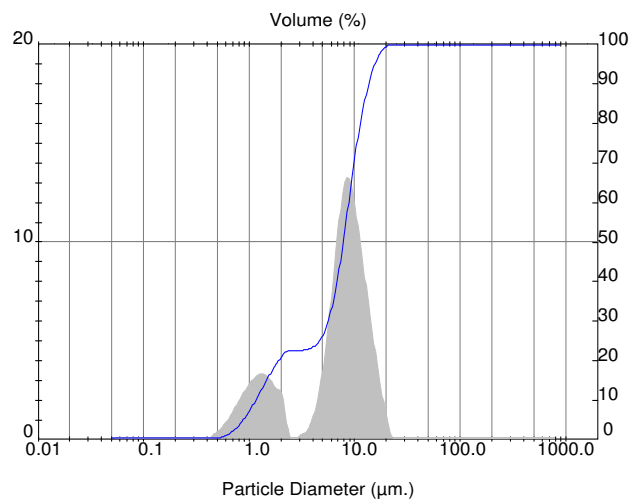


Figura 62: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 2,0% com adição de 4% de Span 80 à fase oleosa (Ensaio E17).

Para partículas formadas na presença de 2% de Span 80, verificou-se a intensa formação de aglomerados, formação de poucas partículas esféricas, curva de distribuição de tamanhos unimodal, mas grande variabilidade de tamanhos das partículas. As partículas formadas na presença de 3% de Span possuíam morfologia parecida com as obtidas com 2% de Span 80, no entanto, notando-se como principal diferença a formação de duas largas populações, indicando grande variabilidade de tamanhos das mesmas. Já as partículas obtidas em presença de 4% de Span 80 apresentaram grande deformação, menor aglomeração que as anteriores, contando com uma curva de distribuição de tamanhos com duas populações. Deve-se destacar também que, durante a formação das partículas de quitosana em que se utilizaram concentrações de Span 80 de 2 a 4%, notou-se a formação de muita espuma durante o processo, o que também dificulta a recuperação das partículas.

Como se pode observar, através da Figura 55 e Figura 56, a concentração de 1% de Span 80 na fase oleosa foi a que propiciou os melhores resultados, verificando-se a formação de partículas com adequado diâmetro médio e estreita distribuição de tamanhos. Apesar do uso do surfatante, notou-se que poucas partículas formadas eram totalmente esféricas. Isso pode ter ocorrido em decorrência da baixa quantidade de quitosana no sistema, de modo a impedir a aproximação das cadeias e permitir a reticulação eficiente com KOH, formando assim, estruturas pouco estáveis e ineficientemente reticuladas.

Com base nestes resultados, optou-se por realizar a formação de partículas usando uma concentração maior de quitosana, sob as mesmas condições operacionais empregadas para partículas formadas com 2% de quitosana. Desta forma, realizou-se a formação de partículas de quitosana utilizando-se as seguintes condições experimentais: solução de quitosana a 3% (m/v), 1% de Span 80 adicionada à fase oleosa (v/v), proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm. Na Figura 63 e Figura 64 podem-se observar as características morfológicas bem como a distribuição de tamanhos das partículas formadas nestas condições.

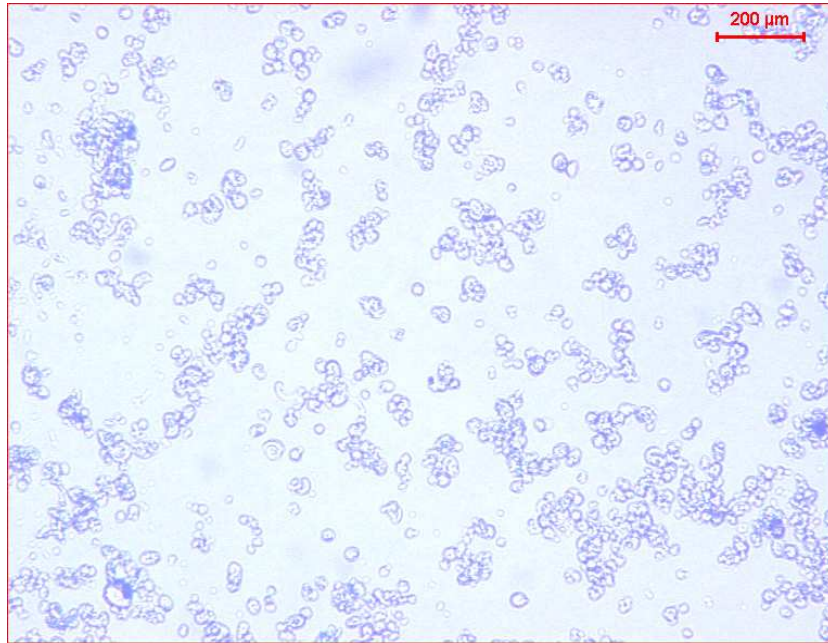


Figura 63: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 3,0% com adição de 1% de Span 80 à fase oleosa, proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm.

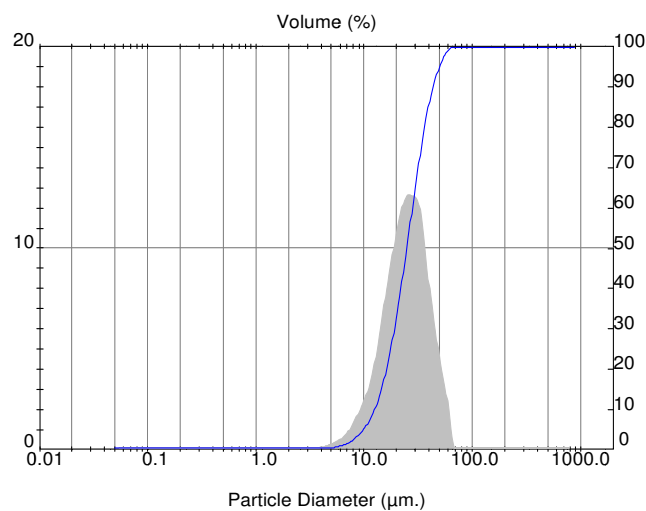


Figura 64: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana produzidas com solução aquosa de quitosana a 3,0% com adição de 1% de Span 80 à fase oleosa, proporção de fase aquosa/oleosa de 1:20 e taxa de agitação de 2.000 rpm.

Como se pode verificar, as partículas de quitosana formadas usando os parâmetros de processos descritos anteriormente possuem boa distribuição de tamanhos, apresentando curva unimodal, bem como formato predominantemente esférico, com pouca agregação, e diâmetro médio de $29 \pm 2 \mu\text{m}$.

Esta alteração nas características das partículas de quitosana produzidas com soluções aquosas de quitosana a 3% mostra que a concentração do polímero na preparação das partículas é um dos fatores predominantes para a formação de estruturas estáveis e a obtenção de características morfológicas regulares das mesmas.

Estes resultados são condizentes com os verificados por JANES *et al.* (2001), que mostraram que para concentrações de quitosana abaixo de 3%, notava-se a formação de coacervados de estruturas fracas, que eram facilmente suscetíveis à quebra durante o processo de agitação, levando à formação de partículas deformadas e com forte tendência a agregação.

Com base nos resultados obtidos, foram produzidas partículas incorporando o agente vacinal em questão.

4.2.4. Ensaio de incorporação da *Flavobacterium columnare* em partículas de quitosana

Buscou-se verificar qual a eficácia de incorporação da bacterina nas partículas de quitosana produzidas utilizando-se o protocolo proposto anteriormente. Para tanto, produziu-se partículas de quitosana na presença de diferentes quantidades iniciais do agente antigênico, variando-se a concentração da suspensão celular inicial de 1,17 a 10,23 g.L⁻¹ (em termos de massa seca celular por litro de solução de quitosana).

As partículas formadas apresentaram pouca variação no diâmetro médio, como se pode observar na Tabela 16, em relação a partículas produzidas sem a incorporação das bactérias, de $29 \pm 2 \mu\text{m}$. Da Figura 65 à Figura 70 pode-se observar o aspecto morfológico das partículas produzidas a estas diferentes concentrações iniciais de bacterina, bem como o perfil de distribuição de tamanhos das mesmas.

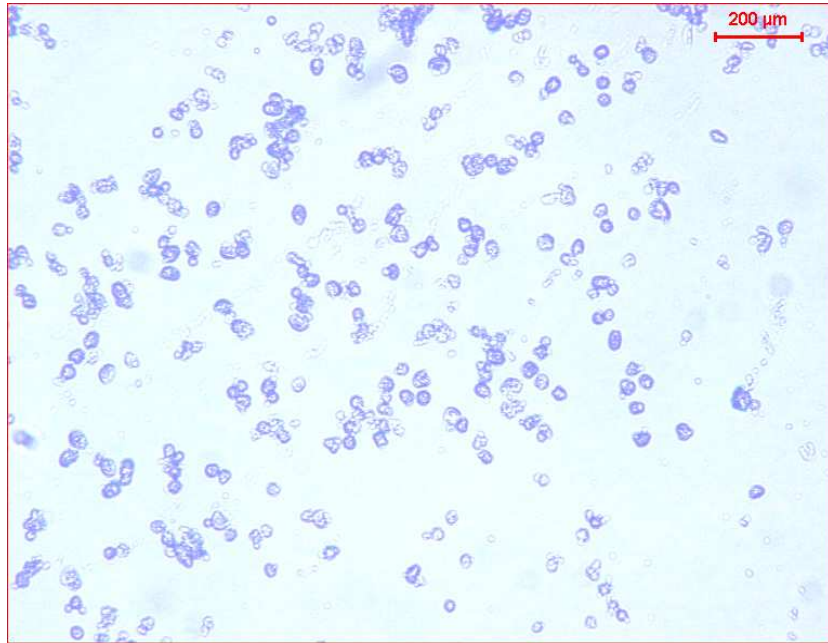


Figura 65: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de alginato preparadas na presença de $1,17 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

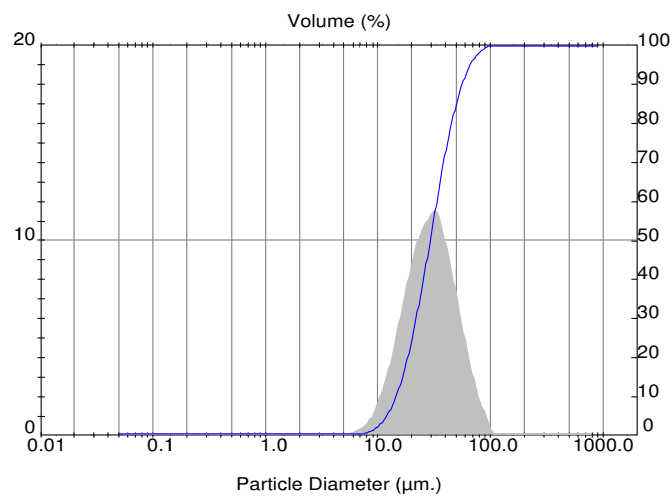


Figura 66: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana preparadas na presença de $1,17 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

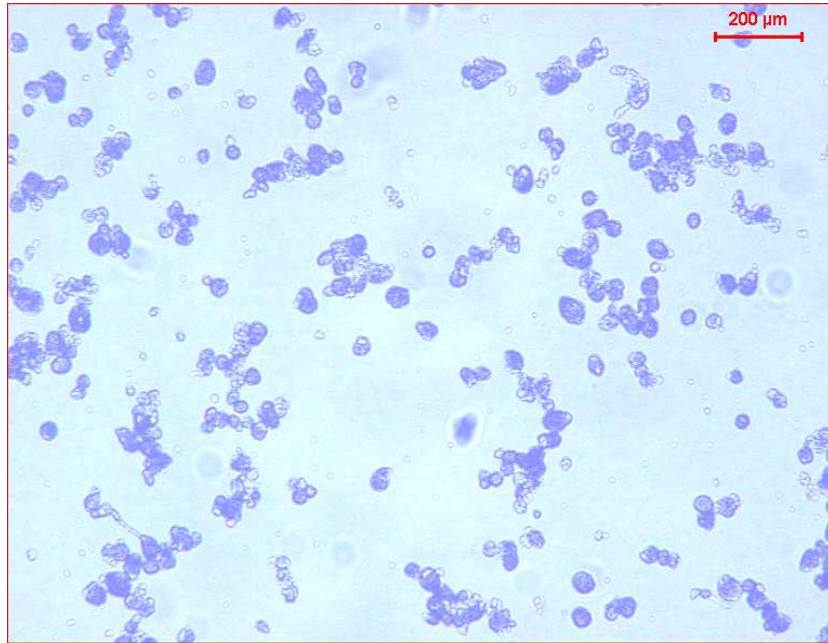


Figura 67: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de alginato preparadas na presença de $4,53 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

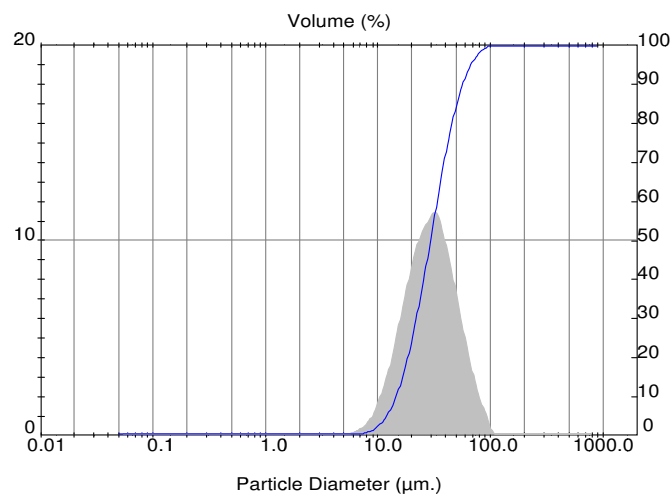


Figura 68: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana preparadas na presença de $4,53 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

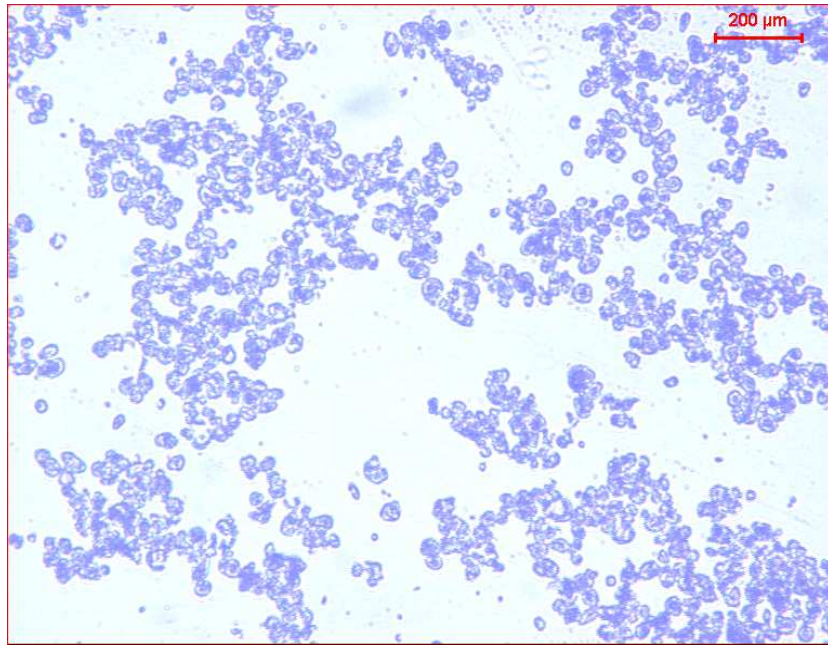


Figura 69: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de alginato preparadas na presença de $10,23 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

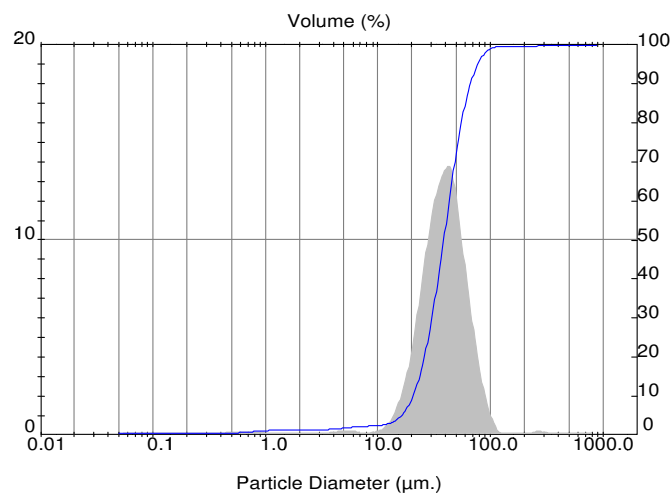


Figura 70: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana preparadas na presença de $10,23 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

Tabela 16: Características das micropartículas de quitosana preparadas na presença de diferentes concentrações de suspensão celular.

Concentração inicial da suspensão celular (g.L⁻¹)	Eficiência de incorporação (%)	Diâmetro médio (µm)
1,17	81,3	28 ± 1
4,53	81,7	31 ± 1
10,23	84,1	34 ± 3

Nota-se que, o aumento na concentração do agente antigênico não causou drásticas alterações da curva de distribuição de tamanhos, sendo que para todos os casos, a curva de distribuição principal foi bastante estreita, observando-se, entretanto, a presença de duas pequenas populações secundárias. Isso deve ter ocorrido em função do tamanho pequeno das bactérias, que permitiu a encapsulação de diferentes concentrações de bacterina sem que ocorressem alterações significativas no diâmetro médio das partículas formadas.

Notou-se que as partículas de quitosana apresentaram formato esférico e regular, observando-se, assim como no caso das partículas de alginato, uma maior rugosidade, notando-se também uma acentuada alteração na cor apresentada pelas partículas nas quais a concentração celular utilizada foi maior, quando comparadas às partículas vazias. Observou-se que eficiência de incorporação de bacterina variou de 81 a 84%, aproximadamente.

Apesar da menor eficiência de encapsulação de bacterina nas partículas, quando comparada às partículas de alginato, as partículas de quitosana mostram-se bastante promissoras para a vacinação oral, tendo em vista tanto sua capacidade de reter uma quantidade superior a 80% de agente ativo em sua matriz polimérica quanto seu diâmetro médio e sua distribuição de tamanhos.

4.2.5. Avaliação da formação, morfologia e distribuição de diâmetro das partículas de quitosana recobertas com alginato

Sabe-se que na presença de soluções de pH muito baixos, como é o caso do pH gástrico, a quitosana tende a sofrer a desestabilização da rede de gel formada. De modo a prevenir a degradação das partículas de quitosana nas condições do trato gástrico e a conseqüente liberação precoce das células incorporadas na matriz polimérica, realizou-se o recobrimento das mesmas com alginato, que tem, conforme já demonstrado, características ácido-resistente. Os resultados estão indicados da Figura 71 à Figura 74.

Como se pode verificar na Figura 71 e na Figura 73, o processo de recobrimento acarretou numa ligeira agregação das partículas de quitosana por conta da forte interação entre os polímeros. Muito provavelmente, regiões de partículas que não haviam sido completamente recobertas com o alginato interagiram com a película de alginato formada nas demais partículas, o que propiciou esta agregação, similarmente ao observado para as partículas de alginato recobertas com quitosana. Nota-se também, através da Figura 74 que a curva de distribuição de tamanhos apresentou ligeiro deslocamento à direita, quando comparada à das partículas de quitosana sem incorporação da bacterina (Figura 72). Também se observa a formação de duas populações na mesma curva de distribuição, em decorrência da agregação do sistema. O diâmetro médio das partículas recobertas e sem incorporação de agente antigênico foi de $40 \pm 1 \mu\text{m}$, mas cada população individual apresenta diâmetro médio de 35,4 e $220 \mu\text{m}$.

As partículas contendo $8,60 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias, também apresentaram aumento na variação do tamanho das partículas, o que pode ser verificado pela Figura 74. Para estas partículas, o diâmetro médio obtido foi de $48 \pm 4 \mu\text{m}$, que deve ser decorrente do aumento natural do tamanho das partículas, por estarem recheadas de bactéria, que dificulta a formação de gotas menores, e também em decorrência da formação de agregados (de $236 \mu\text{m}$). Estes resultados são condizentes com os obtidos por LI *et al.* (2008), que verificaram um aumento de até três vezes no tamanho das partículas recobertas com alginato contendo ou não agentes ativos e a formação de agregados por conta da forte

interação entre a película de alginato das partículas recobertas com regiões de partículas de quitosana fracamente recobertas.

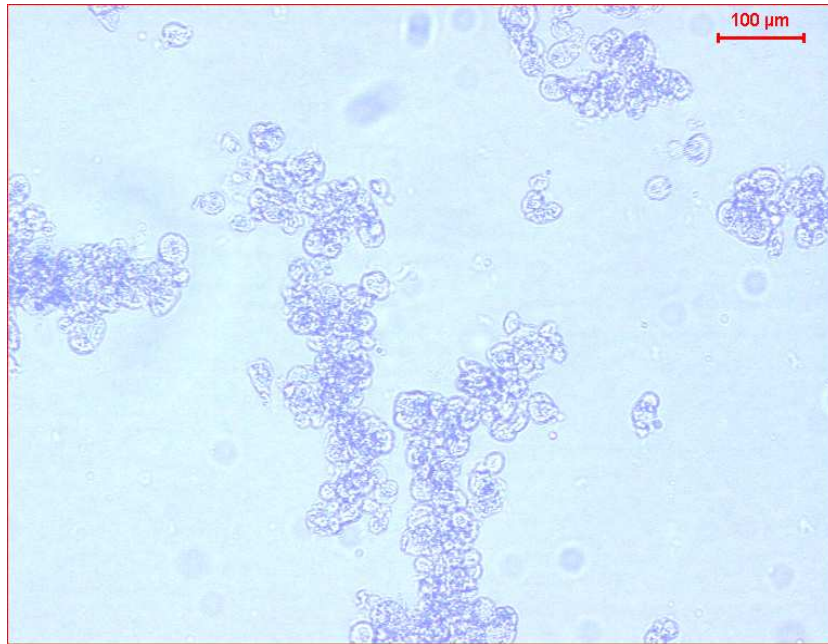


Figura 71: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 100x) das partículas de quitosana recobertas com alginato.

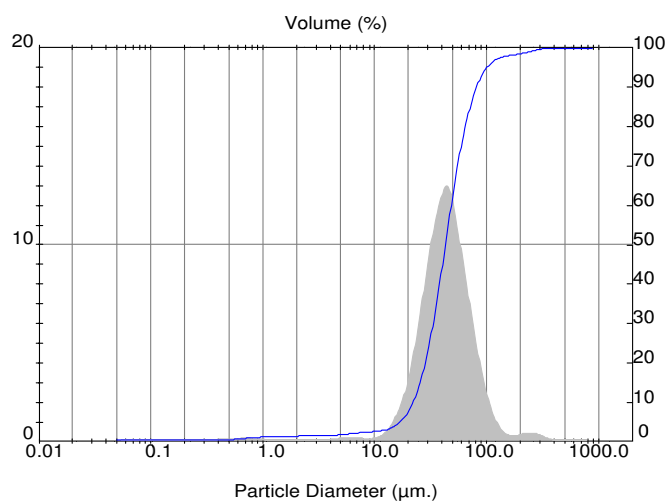


Figura 72: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana recobertas com alginato.

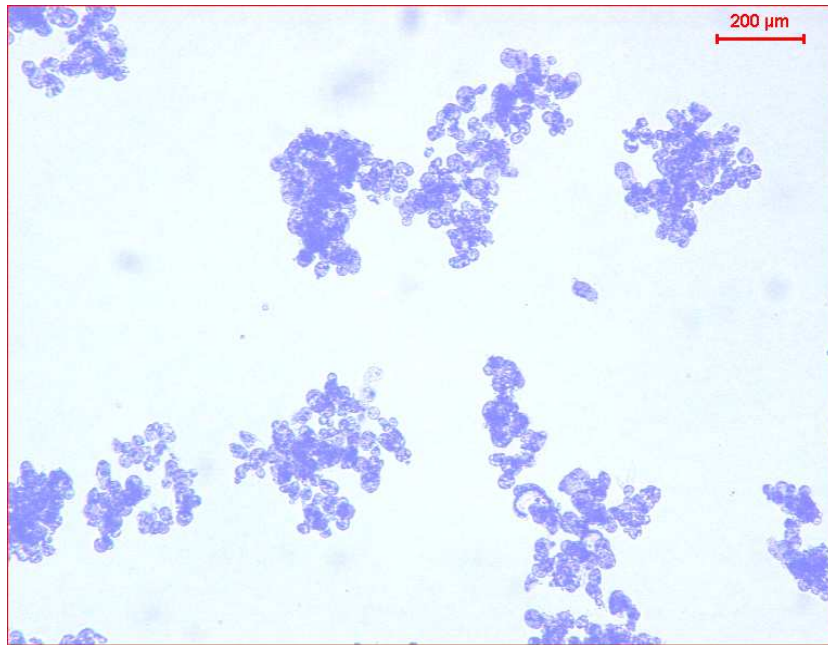


Figura 73: Aspecto morfológico típico em microscópio ótico (aumento de 50x) das partículas de quitosana recobertas com alginato contendo $8,60 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

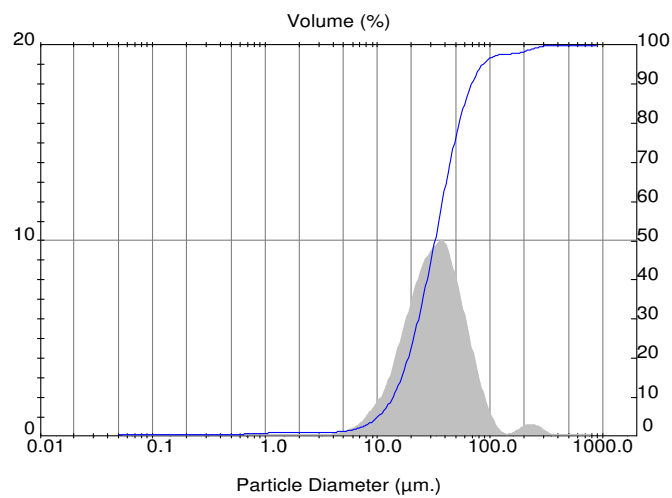


Figura 74: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas de quitosana recobertas com alginato contendo $8,60 \text{ g.L}^{-1}$ de bactérias.

4.2.6. Ensaio de estabilidade *in vitro* das partículas de quitosana em meios que simulam as condições gastrointestinais da tilápia do Nilo

Apesar das partículas de quitosana não se mostrarem mais apropriadas que as de alginato, para a veiculação de bacterina de *Flavobacterium columnare* para tilápias do Nilo, em decorrência de seu maior diâmetro médio e de sua maior distribuição de tamanhos, avaliou-se a estabilidade das partículas de quitosana contendo bacterina recobertas com alginato ou não, nas condições da região gastrointestinal dos peixes, de modo a se observar o perfil de liberação do agente antigênico. Similarmente aos ensaios efetuados para as partículas de alginato somente, amostras contendo 8,60 mg de bactéria/mL de gel de quitosana foram incubadas por 12 horas em soluções que simulavam as condições gastrointestinais da tilápia do Nilo a uma temperatura de 26 °C. A liberação das bactérias nos diferentes valores de pH é mostrada na Tabela 17.

Tabela 17: Perfil de liberação da bacterina nas micropartículas contendo 8,6 mg de bactéria/mL de gel de quitosana em soluções aquosas de diferentes valores de pH simulando as condições gastrointestinais de tilápias do Nilo.

pH da solução de incubação	Fração de bactérias liberadas após 12 horas (%)	
	Partículas não recobertas	Partículas recobertas com alginato
2,0	99,90	3,72
4,5	52,92	2,60
7,4	33,20	5,30
9,0	42,10	8,87

Como se pode observar, para as partículas de quitosana nas quais não se efetuou o recobrimento com alginato, a quantidade de antígeno liberado nas condições gástricas variou de 52 a praticamente 100%. Isso demonstra, de fato, que as partículas de quitosana são degradadas facilmente em pH baixos, o que impossibilitaria o processo eficiente de

imunização dos peixes. No entanto, quando se realizou o recobrimento das partículas, observa-se uma redução significativa na liberação do antígeno nas condições estomacais, sendo que a quantidade liberada não ultrapassa os 4%. Também se observou uma redução da quantidade de antígeno liberada das partículas recobertas com alginato quando em contato com soluções que simulam as condições intestinais dos peixes, notando-se um máximo de liberação de cerca de 9% para pH entre 7,4 e 9,0.

Nas partículas de quitosana recobertas com alginato observou-se uma maior liberação da bacterina, quando em comparação com as partículas de alginato. Apesar deste comportamento, as partículas de quitosana recobertas com alginato poderiam vir a ser empregadas eficientemente como veículos de administração oral de vacinas, uma vez que, no trato gástrico, as partículas se manteriam íntegras, liberando uma quantidade relativamente pequena de bactérias, ao passo que na região intestinal ocorreria uma liberação mais eficiente, devido ao efeito de hidratação da quitosana, que eleva a capacidade de adesão da mucosa, favorecendo a liberação do agente ativo no sítio-alvo (GÅSERØD *et al.*, 1998).

5. CONCLUSÕES

A realização do presente trabalho permitiu chegar às seguintes conclusões:

- Partículas de alginato com diâmetros menores que 35 μm , capazes de incorporar a bactéria *Flavobacterium columnare* com concentrações de até 14,6 mg de bactéria por grama de gel de alginato, podem ser obtidas utilizando-se o método de emulsão;
- A morfologia, o diâmetro médio e a distribuição de tamanhos das partículas de alginato são afetados pela temperatura e pelo tipo de impelidor usado na formação das partículas;
- Partículas de alginato recobertas com quitosana sofrem intensa agregação, o que pode ser problemático do ponto de vista da aplicação final;
- As partículas de alginato mostraram-se capazes de resistir às variações de pH, liberando um máximo de 3 % das células incorporadas;
- Partículas de quitosana menores que 50 μm , capazes de encapsular eficientemente concentrações até 8,6 mg de *Flavobacterium columnare* por grama de gel de quitosana, podem ser obtidas pelo método de emulsão;
- A morfologia, o diâmetro médio e a distribuição de tamanhos das partículas de quitosana são afetados pela taxa de agitação, concentração de tensoativo, proporção fase aquosa/oleosa e concentração da solução de quitosana;
- O recobrimento das partículas de quitosana com alginato intensificou o processo de agregação das partículas;
- As partículas de quitosana mostraram-se capazes de resistir às variações de pH (máximo de liberação de 9 % das células incorporadas).

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Levando-se em consideração os estudos realizados, propõem-se como temas para futuros trabalhos:

- A avaliação da factibilidade de reutilização total ou parcial do óleo usado para formação da emulsão. Para tanto seria necessário remover as substâncias residuais, tais como as do tipo volátil (etanol, ácido acético), inorgânicas (cálcio), polímeros e a umidade (no caso, a água), através de processos como degomagem com água e neutralização;
- Realização de estudos de recobrimento das partículas de alginato utilizando-se menores concentrações de quitosana, redução do tempo de exposição das partículas de alginato à quitosana, alteração na velocidade de mistura das partículas, visando diminuir a agregação entre as partículas;
- Realização de estudos de verificação de espessura de recobrimento das partículas de quitosana com alginato através do uso de corantes de carga oposta, ou mesmo realizar a formação de partículas através do método de gotejamento, com posterior recobrimento, para verificar a espessura da camada de quitosana através da fratura das partículas;
- Realização de estudos de estabilidade das partículas em condições que compreendam as variações de temperatura e a variação das características das águas oriundas de tanques de criação de tilápias do Nilo;
- Realização de estudos de liberação *in vivo* da bacterina incorporada nas micropartículas produzidas;
- Escalonamento do processo, de modo a produzir uma quantidade maior de partículas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMANN, M.; KÖLLNER, B.; BERGMANN, S. M.; FISCHER, U.; LANGE, B.; WEITSCHIES, W.; ENZMANN, P.-J.; FICHTNER, D. “Development of an oral vaccine for immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia”. *Vaccine*, vol. 26, pp. 837-844, 2008.
- AGGARWAL, A.; KAUR, S.; TIWARY, A. K.; GUPTA, S. “Chitosan microspheres prepared by an aqueous process: release of indomethacin”. *Journal of Microencapsulation*, vol. 18, pp. 819-823, 2001.
- ALMUTAIRI, S. H.; *Tese de Doutorado*, Texas A&M University, Estados Unidos da América, 2008.
- ALVIM, I. D. “Produção e Caracterização de Micropartículas Obtidas por Spray Drying e Coacervação Complexa e seu Uso para Alimentação de Larvas de Peixes”. *Tese de Doutorado*, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2005.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. “Bacterial Fish Pathogens”. Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 225-247, 1987.
- BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I.; “Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects”. *Aquaculture*, vol. 197, n. 3, pp. 283-301, 2001.
- BERNADET, J. F. “*Flexibacter columnaris*: first description in France and comparison with bacterial strains from other origins”. *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 6, pp. 37-44, 1989.
- BERNADET, J. F.; GRIMONT, P. A. D. “Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus*”. Watabayashi, Hikida and Masumura, 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 39, pp. 346-354, 1989.

- BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. "Influence of crosslinking on the acid stability and physicochemical properties of Chitosan microspheres". *STP pharmaceuticals*, vol. 6, pp. 358-364, 1996.
- BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; "Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com 17 α -metiltestosterona". *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 34, n. 2, pp. 365-372, 2005.
- BORGES, O.; SILVA, M.; SOUSA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. "Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen". *International Immunopharmacology*, vol. 8, pp. 1773-1780, 2008.
- CHELLAT, F. TABRIZIAN, M.; DUMITRIU, A.; CHORNET, E.; RIVARD, C. H.; YAHIA, L. "Study of biodegradation behavior of Chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media". *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 53, pp. 592-599, 2000.
- CHICKERING, D. E.; MATHIOWITZ, E. "Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa". *Journal of Controlled Release*, vol. 34, pp. 251-261, 1995.
- CIOFANI, G.; RAFFA, V.; MENCIASSI, A. "Alginate and chitosan particles as drug delivery system for cell therapy". *Biomed Microdevices*, vol. 10, n. 2, pp. 131-140, 2008.
- CRESTECHNOLOGIES. Disponível em <http://www.crestechtechnologies.com/equipment.html>
Acesso em 06/07/2008.
- DAVIS, H. S. "A new bacterial disease of fresh water fishes". *Bulletin, U.S. Bureau of Fisheries*, vol. 38, pp. 261-280, 1922.
- DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; DEVRIESE, L. A. "Shieh medium supplemented with Tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter*

- columnaris*) from diseased fish”. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, pp. 322-324, 1997.
- DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; GABRIEL NETO, A.; DE STÉFANI, M. V.; MALHEIROS, E. B.; ZANARDI, M. F.; SANTOS, M. A.; “Reversão sexual de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de banhos de imersão em diferentes dosagens hormonais”. *Revista Acadêmica*, vol. 5, n. 4, p. 391-395, 2007.
- DURBOROW, R. M.; THUNE, R. L.; HAWKE, J. P.; CAMUS, A. C. “Columnaris Disease – A Bacterial Infection Caused by *Flavobacterium columnare*”. *Southern Regional Aquaculture Center Publication*, n° 479, 1998.
- ELLIS, A. E. “Meeting the requirements for delayed release of oral vaccines for fish”. *Journal of Applied Ichthyology*, n.º 3-4, vol. 14, pp. 149-152, 1998.
- FAO. “The state of world fisheries and aquaculture”. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*, 180 p., 2006.
- GALINDO-RODRIGUEZ, S. A.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. “Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies”. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier. System*, vol. 22, pp. 419-464, 2005.
- GARNJOBST, L. “*Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: a mycobacterium pathogenic to fish”. *Journal of Bacteriology*, vol. 49, pp. 113-128, 1945.
- GÅSERØD, O.; JOLLIFFE, A. G.; HAMPSON, F. C.; DETTMAR, P. W.; SKJÅK-BRAEK, G. “The enhancement of the bioadhesive properties of calcium Alginate gel beads by coating with Chitosan”. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 175, n. 2, pp. 237-246, 1998.
- GÅSERØD, O.; SANNES, A.; SKJÅK-BRAEK, G. “Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability”. *Biomaterials*, vol. 20, pp. 773-783, 1999.

- GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review". *Journal Controlled Release*, vol. 114, pp. 1-14, 2006.
- GOHEL, M. C.; SHETH, M. N.; PATEL, M. M.; JANI, G. K.; PATEL, H. "Design of Chitosan microspheres containing diclofenac sodium". *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 56, pp. 210-214, 1994.
- GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, Ø. "Recent developments in fish vaccinology". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 72, pp. 203-212, 1999.
- HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. "In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of Chitosan microspheres". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 166, n. 1, pp. 75-88, 1998.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais, 2005. Estatística da Pesca 2005 – Grandes Regiões e Unidades da Federação, 108 p., 2007.
- IGARASHI, M. A. "Tilápia: Cultivo de Tilápia". Disponível em: <http://www.geocities.com/ctaufc/tilapia.htm?200730>, acesso: 07/08/2008.
- JANES, K. A.; FRESNEAU, M. P.; MARAZUELA, A.; FABRA, A.; ALONSO, M. J. "Chitosan nanoparticles as delivery system for doxorubicin". *Journal of Controlled Release*, vol. 73, PP. 255-267, 2001.
- JOAQUIM JUNIOR, C. F.; CEKINSKI, E.; NUNHEZ, J. R.; URENHA, L. C. "Agitação e mistura na indústria". Rio de Janeiro, LTC, 2007.
- KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. "Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana". *Química Nova*, vol. 31, n. 1, pp. 134-143, 2008.
- KICHATOV, B. V.; KORSHUNOV, A. M; BOIKO, I. V.; ASSOROVA, P. V. "Effect of Impeller blade Geometry on Drop Size in Stirring of Immiscible Liquids". *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, vol. 37, pp. 19-24, 2003.

- LEMOINE, D.; WAUTERS, F.; BOUCHEND'HOMME, S.; PRE'AT, V.; "Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 176, pp. 9-19, 1998.
- LI, X.; KONG, X.; SHI, S.; ZHENG, X.; GUO, G.; WEI, Y.; QIAN, Z. "Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery". *BMC Biotechnology*, vol. 8:89, 2008.
- LIM, L. Y.; WAN, L. S.; THAI, P. Y. "Chitosan microspheres prepared by emulsification and ionotropic gelation". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 23, PP. 981-985, 1997.
- LIM, S. T.; MARTIN, G. P.; BERRY, D. J., BROWN, M. B. "Preparation and evaluation of the *in vitro* drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and Chitosan". *Journal of Controlled Release*, vol. 66, pp. 281-292, 2000.
- LIN, W. J.; KANG, W. W. "Comparison of Chitosan and gelatin coated microparticles: prepared by hot-melt method". *Journal of Microencapsulation*, vol. 20, pp. 169-177, 2003.
- MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; CAMPOS, B. E. S.; SILVA, A. L. "Masculinização da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 α -metiltestosterona". *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 29, n. 3, p. 654-659, 2000.
- MI, F. L.; SHYU, S. S.; CHEN, C. T.; SCHOUNG, J. Y. "Porous Chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and *in vitro* release". *Biomaterials*, vol. 20, pp. 1603-1612, 1999.
- MI, F. L.; WONG, T. B.; SHYU, S. S. "Sustained-release of oxytetracycline from Chitosan microspheres methods". *Journal of Microencapsulation*, vol. 14, pp. 577-591, 1997.
- MURATA, Y.; NAKADA, K.; MIYAMOTO, E.; KAWASHIMA, S.; SEO, S. H. "Influence of erosion of calcium-induced alginate gel matrix on the release of Brilliant Blue". *Journal of Controlled Release*, vol. 23, pp. 21-26, 1993.

- NAKANISHI, T.; KIRYU, I.; OTOTAKE, M. "Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument". *Vaccine*, vol. 20, pp. 3764-3769, 2002.
- NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. "Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: Gudding, R.; Lillehaug, A.; Midtlyng, P. J; *et al.*, editors." *Fish Vaccinology*, pp. 59-68, 1997.
- O'HAGAN, D.; *Advanced Drug Delivery Reviews.*, vol. 34, p. 305-320, 1998.
- OLIVEIRA, A. P. C. "Produção e caracterização de partículas de hidrogéis para aplicações em cosméticos". *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, 2004.
- OPAWALE, F.O.; BURGESS, D. J. "Influence of interfacial properties of lipophilic surfactants on water-in-oil emulsion stability". *Journal of Colloids and Interface Science*, vol. 197, pp. 142-150, 1998.
- ORDAL, E.; RUCKER, R. "Pathogenic myxobacteria". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 56, pp. 15-18, 1944.
- ORIENTI, I.; AIEDEH, K.; GIANASI, E.; BERTASI, V.; ZECCHI, V. "Indomethacin loaded chitosan microspheres. Correlation between the erosion process and release kinetics". *Journal of Microencapsulation*, vol. 13, pp. 463-472, 1996.
- PAL, R.; "Effect of Droplet Size on the Rheology of Emulsions". *AIChE Journal*, vol. 42, pp. 3181-3190, 1996.
- PENICHE, C.; ARGÈLLES-MONAL, W.; PENICHE, H.; ACOSTA, N. "Chitosan: An Atractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation". *Macromolecular Bioscience*, vol. 3, pp. 511-520, 2003.
- PONCELET, D. "Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation". *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 944, pp. 74-82, 2001.
- PONCELET, D.; BABAK, V.; DULIEU, C.; PICOT, A. "A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-intenal ionotropic gelation". *Colloids*

- and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 155, pp. 171-176, 1999.
- PONCELET, D.; SMERT, B. P. D.; BEAULIEU, C.; HUGUET, A.; FOURNIER, A.; NEUFELD, R. J. "Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. *Physicochemistry. Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 43, pp. 644-650, 1995.
- REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; VILELA, S.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. "Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles". *Journal of Microencapsulation*, vol. 23, n. 3, pp. 245-257, 2006.
- REIS, C. P.; RIBEIRO, A. J.; NEUFELD, R. J.; VEIGA, F. "Alginate Microparticles as Novel Carrier for Oral Insulin Delivery". *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 96, n. 5, pp. 977-989, 2007.
- RIBEIRO, A. J.; SILVA, C.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. "Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 25, pp. 31-40, 2005.
- RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y. J.; PRÉAT, V. "Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach". *Journal of controlled released*, vol. 116, pp. 1-27, 2006.
- RODRIGUES, A. P.; "Produção e caracterização de micropartículas de alginato incorporando *Aeromonas hydrophila* inativada para imunização de tilápia do nilo por via oral". *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, 2004.
- RODRIGUES, A.P.; HIRSCH, D.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LOGATO, P. V. R.; MORAES, A. M. "Production and characterization of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination". *Process Biochemistry*, vol. 41, pp. 638-643, 2006.
- ROMALDE, J. L.; LUZARDO-ALVAREZ, A.; RAVELO, C.; TORANZO, A. E.; BLANCO-MENDEZ, J. "Oral immunization using alginate microparticles as a useful

- strategy for booster vaccination against fish lactococcosis”. *Aquaculture*, vol. 236, pp. 119-129, 2004.
- ROTTA, M. A. “Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura”. EMBRAPA Pantanal, 49 p., 2003.
- RUMA. “Responsible use of vaccines and vaccination in fish production”. *Responsible Use of Medicines in Agriculture Alliance Guidelines*, 2006.
- SARMENTO, B.; MARTINS, S.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; NEUFELD, R.; FERREIRA, D. “Development and Comparison of Different Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes as Insulin Carriers”. *International Journal of peptide Research and Therapeutics*, vol. 12, n. 2, pp. 131-138, 2006.
- SAWYER, E. S; STROUT, R. G. “Survival and growth of vaccinated, medicated and untreated coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to *Vibrio anguillarum*”. *Aquaculture*, vol. 10, pp. 311-315, 1975.
- SCHIPPER, N. G. M.; OLSSON, S.; HOOGSTRAATE, J. A.; DEBOER, A. G.; VARUM, K. M.; ARTURSSON, P. “Chitosans as absorption enhancers for poorly adsorbable drugs: 2. Mechanism of absorption enhancement”. *Pharmaceutical Research*, vol. 14, n. 7, pp. 923-929, 1997.
- SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALGAARD, I.; PEDERSEN, K.; LARSEN, J. L. “Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, n. 11, pp. 4908-4915, 2000.
- SCHRECKENBERGER, P. C. “Emended classification and description of the family Flavobacteriaceae and the Genus *Sphingobacterium*”. *Clinical Microbiology News*, vol. 20, n. 14, pp. 115-124, 1998.
- SCHUBERT, H. “Nabobubbles, hydrophobic effect, heterocoagulation and hydrodynamics in flotation”. *International journal of mineral processing*, vol. 75, pp. 11-21, 2005.
- SHANMUGANATHAN, S.; SHANUMUGASUNDARAM, N.; ADHIRAJAN, N.; LAKSHMI, T. S. R.; BABU, M. “Preparation and characterization of chitosan

- microspheres for doxycycline delivery”. *Carbohydrate Polymers*, vol. 73, pp. 201-211, 2008.
- SHOEMAKER, C. A.; VANDENBERG, G. W.; DESORMEAUX, A.; KLESIUS, P. H.; EVANS, J. J. “Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)”. *Aquaculture*, vol. 255, pp. 151-156, 2006.
- SHU, X. Z.; ZHU, K. J. “Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation”. *Journal Microencapsulation*, vol. 18, n. 2, pp. 237-245, 2001.
- SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FIGUEIREDO, M.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. “Microencapsulation of Hemoglobin in Chitosan-coated Alginate Microspheres Prepared by Emulsification/Internal Gelation”. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, vol. 7, n. 4, pp. E903-E913, 2006.
- SINGH, M.; O’HAGAN, D.; “The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 34, p. 285-304, 1998.
- SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R. KUMRIA, R. “Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs”. *International journal of pharmaceutics*, vol. 274, pp. 1-33, 2004.
- SONG, Y. L.; FRYER, J. L.; ROHOVEC, J. S. “Comparison of six media for the cultivation of *Flexibacter columnaris*”. *Fish Pathology*, vol. 23, pp. 91-94, 1988.
- SUGAWARA, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M. “The Controlled Release of Prednisolone Using Alginate Gel”, *Pharmaceutical Research*, vol. 11, n. 2, pp. 272-277, 1994.
- SUOMALAINEN, L-R. “*Flavobacterium columnare* I Finnish fish farming: characterization and putative disease management strategies”. *Jyväskylä Studies in Biological and Environmental Science*, 52 p, 2005.

- THOMAS-JINU, S.; GOODWIN, A. E. "Morphological and genetics characteristics of *Flavobacterium columnare* isolates: correlations with virulence in fish". *Journal of Fish Diseases*, vol. 27, pp. 29-35, 2004.
- THORARINSSON, R.; POWELL, D. B. "Effects of disease risk, vaccine efficacy, and market price on the economics of fish vaccination". *Aquaculture*, vol. 256, pp. 42-49, 2006.
- THUNE, R. L.; COLLINS, L. A.; PEÑA, M. P. " A comparison of Immersion, Immersion/Oral Combination and Injection Methods for the Vaccination of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Against *Edwardsiella ictaluri*". *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 28, n. 2, pp. 193-201, 1997.
- TIAN, J.; YU, J.; SUN, X. "Chitosan microspheres as candidate plasmid vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 126, pp. 220-229, 2008.
- TRIPATHI, N. K.; LATIMER, K. S.; GREGORY, C. R. "Development and evaluation of an experimental model of cutaneous columnaris disease in koi *Cyprinus carpio*". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 17, n. 1, pp. 45-54, 2005
- TRIYANTO, A. K.; WAKABAYASHI, H. "Genotypic diversity of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fishes". *Fish Pathology*, vol. 34, n. 2, pp. 65-71, 1999.
- VAN DER LUBBEN, I. M.; VERHOEF, J. C.; VAN AELST, A. C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. "Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches". *Biomaterials*, vol. 22, pp. 687-694, 2001.
- VARVARIGOS, P. "Immersion or injection: Practical considerations of vaccination strategies". *Vetcare*, 2003.
- VERVACKE, S.; OLLEVIER, F.; KINGET, R.; MICHOEL, A. "Oral vaccination of African catfish *Vibrio anguillarum* O2: effect on antigen uptake and immune response

- by absorption enhancers in lag time coated pellets”. *Fish and Shellfish Immunology*, vol.16, pp. 407-414, 2004.
- VOLPATO, G. L.; LUCHIARI, A. C.; DUARTE, C. R. A.; BARRETO, R. E.; RAMANZINI, G.C.; “Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia”. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, vol. 36, pp. 1659-1663, 2003.
- WIKINGSSON, L. D.; SJÖHOLM, I. “Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunization, inducing mucosal and systemic immune responses in mice”. *Vaccine*, vol. 20, pp. 3355-3363, 2002.
- WORLD FOOD PROGRAMME. (www.wfp.org/english, acesso em 25/06/2008).
- WU, W. Y.; LI, Y. G. “Preparation of genistein-load chitosan microspheres”. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 27, pp. 353-355, 2002.
- XING, L.; DAWEI, C.; LIPING, X.; RONGQUING, Z. “Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide: development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome”. *Journal of Controlled Release*, vol. 93, pp. 293-300, 2003.
- YAO, K. D.; PENG, T.; FENG, H. B.; HE, Y. Y. “Swelling kinetics and release characteristics of crosslinked chitosan – polyether polymer network (semi-IPN) hydrogels”. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 32, pp. 1213-1223, 1994.
- YASUMOTO, S.; KUZUYA, Y.; YASUDA, M.; YOSHIMURA, T.; MIYAZAKI, T. “Oral immunization of Common Carp with a Liposome Vaccine Fusing Koi herpesvirus Antigen”. *Fish Pathology*, vol. 41, n. 4, pp. 141-145, 2006.